

# Zielgerichteter Gentransfer und Zellersatz in Blutgefäßen mit Hilfe magnetischer Nanopartikel

---

**SARAH VOSEN**



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Prof. Dr. Dr. S. Arnhold  
und  
Institut für Physiologie I  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Prof. Dr. B. K. Fleischmann

**Zielgerichteter Gentransfer und Zellersatz in Blutgefäßen  
mit Hilfe magnetischer Nanopartikel**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Sarah Vosen**

Tierärztin aus Frechen

Gießen 2014

## **Imprimatur**

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 16.12.2014

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in meiner Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sarah Vosen

Für Papa.

Danke, dass du mir alles ermöglicht hast  
und dabei immer an mich geglaubt hast.

**panta rhei -**

alles fließt

Heraklith



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1	Das Endothel als funktionelles Organ .....	9
1.1.1	Stickstoffmonoxid (NO) .....	9
1.1.2	Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) .....	11
1.1.2.1	Der eNOS-NO-cGMP Signalweg .....	14
1.1.3	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) .....	16
1.2	Atherosklerose – eine Erkrankung des Endothels .....	18
1.2.1	Therapieoptionen bei Atherosklerose .....	21
1.2.1.1	Gen- und Zelltherapie als zusätzliche Therapieoption bei der Behandlung von ..... Atherosklerose .....	23
1.3	Magnetische Nanopartikel .....	25
1.3.1	MNPs in der Gen- und Zelltherapie.....	28
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1	Verwendete Materialien .....	32
3.1.1	Geräte.....	32
3.1.2	Software .....	33
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.4	Chemikalien.....	34
3.1.5	Puffer und Lösungen .....	37
3.1.6	Zellkulturmedien .....	38
3.1.6.1	Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	38
3.1.7	Primer.....	39
3.1.8	Lentivirale Vektoren (LV).....	39
3.1.8.1	Eingesetzte LV zur Übertragung verschiedener Transgene .....	39
3.1.8.2	pCHIVeGFP Lentivirus (pCHIV LV) .....	40
3.1.9	Magnetische Nanopartikel (MNPs).....	40
3.1.10	Antikörper .....	42
3.1.10.1	Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen .....	42
3.1.10.2	Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	42
3.1.10.3	Primäre Antikörper für Western Blot-Experimente.....	42
3.1.10.4	Sekundäre Antikörper für Western Blot-Experimente .....	42
3.1.11	Versuchstiere .....	43
3.2	<i>Ex vivo</i> Perfusionsexperimente .....	43
3.2.1	<i>Ex vivo</i> Perfusionssystem und Perfusionskammer.....	43
3.2.1.1	Magnetfeld für <i>ex vivo</i> Perfusionen.....	44

3.2.2	<i>Ex vivo</i> Schlauchperfusionen .....	47
3.2.3	Präparation der Mausarten für <i>ex vivo</i> Perfusionsexperimente .....	47
3.2.3.1	<i>Ex vivo</i> Perfusion der Mausarten .....	48
3.2.3.1.1	Perfusion mit magnetischen Komplexen.....	48
3.2.3.1.2	Perfusion mit Zellen.....	48
3.3	<i>In vivo</i> Zellinjektion .....	49
3.4	Isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen.....	54
3.5	Angiogenese-Assay.....	55
3.5.1	Gewinnung von VEGF-konditioniertem Medium.....	56
3.5.2	Bestimmung der VEGF-Konzentration im Medium.....	56
3.5.3	Aortenring-Aussprossungs-Versuch.....	57
3.6	Molekularbiologische Methoden .....	58
3.6.1	Homogenisierung der Aorten.....	58
3.6.2	RNA-Isolation.....	58
3.6.3	Reverse Transkription und qRT-PCR .....	58
3.7	Biochemische Methoden .....	60
3.7.1	Bestimmung des Eisengehalts der perfundierten Schläuche und Mausarten ....	60
3.7.2	Proteinnachweis.....	60
3.7.3	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung .....	61
3.7.4	Western Blot .....	61
3.7.4.1	SDS-PAGE.....	61
3.7.4.2	Semidry-Blot.....	61
3.7.4.3	Tankblot.....	62
3.7.4.4	Immunodetektion .....	62
3.7.5	Bestimmung der cGMP-Konzentration in den perfundierten Aorten .....	63
3.8	Immunfluoreszenz- und Preußisch-Blau-Färbung .....	63
3.8.1	Fixierung mit Paraformaldehyd.....	64
3.8.2	Kryokonservierung der Aorten.....	64
3.8.3	Anfertigung von Aortenschnitten .....	64
3.8.4	Immunfluoreszenzfärbung von Aortenschnitten.....	64
3.8.5	Preußisch-Blau-Färbung von Aortenschnitten.....	65
3.9	Mikroskopie.....	65
3.10	Statistik.....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
4.1	Bestimmung der optimalen Magnetkonfiguration zur zielgerichteten direkten Transduktion und Zellpositionierung in Mausarten <i>ex vivo</i> .....	67
4.1.1	Vergleich von Experiment und mathematischer Simulation der Komplexanlagerung in Blutgefäßen .....	67

4.1.2	Radialsymmetrische Transduktion von residentem Endothel in Mauseaorten unter Flussbedingungen.....	69
4.1.3	Radialsymmetrische Positionierung von magnetofizierten Endothelzellen in Mauseaorten unter Flussbedingungen .....	74
4.2	Zielgerichtete, Magnet-gestützte direkte Transduktion von Endothel in Mauseaorten mit funktionellen Genen .....	77
4.2.1	Direkte Transduktion von Mausendothel mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS LV und SO-Mag5 MNPs unter Flussbedingungen.....	77
4.2.1.1	Quantifizierung der eNOS-Expression in eNOS-/- Aorten, die mit CMV-eNOS LV/ SO-Mag5 Komplexen transduziert wurden.....	79
4.2.1.2	Analyse der cGMP-Produktion in eNOS-/- Aorten, die mit CMV-eNOS LV/ SO-Mag5 Komplexen transduziert wurden .....	80
4.2.1.3	Einfluss der direkten Transduktion mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen auf die Tonusregulation in eNOS-/- Aorten .....	81
4.2.2	Direkte Transduktion von Mausendothel mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-VEGF LV und SO-Mag5 MNPs unter Flussbedingungen .....	83
4.2.2.1	Untersuchung der VEGF-Synthese CD1 Aorten nach direkter Transduktion mit CMV-VEGF LV/ SO-Mag5 Komplexen.....	84
4.3	Zielgerichtete, Magnet-gestützte <i>ex vivo</i> Positionierung von Endothelzellen in Mauseaorten unter Flussbedingungen .....	86
4.3.1	Zellpositionierung in CD1 Aorten unter Flussbedingungen .....	87
4.3.1.1	Untersuchung des Einflusses der Deendothelialisierung von CD1 Aorten auf die Gefäßfunktion .....	87
4.3.1.2	Radialsymmetrische Positionierung von magnetofizierten, eNOS überexprimierenden bPAECs in deendothelialisierten CD1 Aorten .....	88
4.3.1.3	Quantifizierung der eNOS-Expression in deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs auf mRNA-Ebene .....	89
4.3.1.4	Analyse des Gefäßtonus in deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs .....	91
4.3.2	Zellpositionierung in eNOS-/- Aorten unter Flussbedingungen.....	93
4.3.2.1	Untersuchung des Einflusses der Deendothelialisierung von eNOS-/- Aorten auf die Gefäßfunktion .....	93
4.3.2.2	Quantifizierung der eNOS-Expression in deendothelialisierten eNOS-/- Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs.....	95
4.3.2.3	Analyse der cGMP-Produktion in deendothelialisierten eNOS-/- Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs .....	96
4.3.2.4	Analyse des Gefäßtonus in deendothelialisierten eNOS-/- Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs .....	97

4.4	Zielgerichtete, Magnet-gestützte Positionierung von Endothelzellen in Karotiden . der Maus unter <i>in vivo</i> Flussbedingungen .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>104</b>
5.1	Verbesserung von gen- und zelltherapeutischen Ansätzen durch die Verwendung von MNPs in Kombination mit magnetischen Feldern .....	104
5.1.1	Lokalisierbarkeit .....	104
5.1.2	Spezifität.....	106
5.1.3	Effizienz .....	108
5.2	Sicherheit der Anwendung von Magnet-gestützter Gen- und Zelltherapie .....	110
5.3	Verbesserung der Behandlungsoptionen bei Gefäßerkrankungen durch .....	
	Verwendung von eNOS und VEGF Plasmiden bei der lentiviralen Magnet- .....	
	gestützten Gen- und Zelltherapie .....	114
5.3.1	ENOS.....	114
5.3.2	VEGF .....	118
5.4	Fazit und Ausblick.....	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>124</b>

**Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Wirkung von NO im vaskulären System..... 11

**Abbildung 2:** Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin..... 12

**Abbildung 3:** Der eNOS-Wirkmechanismus..... 14

**Abbildung 4:** Wirkung von VEGF..... 18

**Abbildung 5:** Atherosklerose ..... 21

**Abbildung 6:** Superparamagnetismus bei MNPs ..... 26

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verfolgten Strategien ..... 31

**Abbildung 8:** Schematische Darstellung von SO-Mag5 ..... 41

**Abbildung 9:** Perfusionssystem mit Perfusionskammer und Magnethalterung ..... 44

**Abbildung 10:** Magnetanordnungen und entsprechende Gradienten der magnetischen  
Flussdichte für *ex vivo* Perfusionsexperimente ..... 46

**Abbildung 11:** Berechnung der Einfangrate der magnetischen Komplexe..... 46

**Abbildung 12:** *In vivo* Zellinjektion in die Arteria carotis communis der Maus ..... 52

**Abbildung 13:** Magnethalterung und Injektionsvorrichtung für die *in vivo* Zellinjektion..... 53

**Abbildung 14:** Magnetanordnung und Gradient der magnetischen Flussdichte für die *in vivo*  
Zellinjektion ..... 54

**Abbildung 15:** Myographprotokoll für isometrische Kraftmessungen ..... 55

**Abbildung 16:** Ablauf des Angiogenese-Assays ..... 56

**Abbildung 17:** Perfusion von Schläuchen mit pCHIV LV/SO-Mag5 Komplexen mit  
verschiedenen Magnetkonfigurationen ..... 69

**Abbildung 18:** Direkte Transduktion von CD1 Aorten nach Perfusion mit CMV-eGFP LV/SO-  
Mag5 Komplexen mit verschiedenen Magnetkonfigurationen ..... 71

**Abbildung 19:** Endothelständige eGFP-Expression in transduzierter CD1 Aorta nach Perfusion  
mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen mit der Magnetkonfiguration A ..... 71

**Abbildung 20:** Analyse der mit eGFP LV/SO-Mag5 direkt transduzierten CD1 Aorten ..... 73

**Abbildung 21:** Durch Magnetofektion transduzierte und magnetisierte bPAECs..... 75

**Abbildung 22:** Denudierte CD1 Aorta, die mit magnetofizierten bPAECs perfundiert wurde 76

**Abbildung 23:** Vergleich der eNOS-Expression einer eNOS-/- Aorta, die mit CMV-eNOS  
LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurde, mit unbehandelten Gefäßen..... 78

**Abbildung 24:** Quantitative Analyse der eNOS-/- Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5  
Komplexen perfundiert wurden ..... 80

**Abbildung 25:** Analyse der cGMP-Konzentration in eNOS-/- Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-  
Mag5 Komplexen perfundiert wurden ..... 81

**Abbildung 26:** Isometrische Kraftmessungen von eNOS-/- Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-  
Mag5 Komplexen perfundiert wurden ..... 83

**Abbildung 27:** Vergleich der VEGF-Expression einer CD1 Aorta, die mit CMV-VEGF LV/SO-  
Mag5 Komplexen perfundiert wurde, mit einem unbehandelten Gefäß..... 84

**Abbildung 28:** Analyse der erhöhten VEGF-Produktion in CD1 Aorten, die mit CMV-VEGF  
LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden..... 86

**Abbildung 29:** Deendothelialisierung von CD1 Aorten ..... 88

**Abbildung 30:** Deendothelialisierte CD1 Aorta, die mit eNOS- und eGFP-  
überexpressierten bPAECs (eNOS bPAECs) perfundiert wurde ..... 89

<b>Abbildung 31:</b> Analyse der eNOS- und eGFP-Expression auf mRNA-Ebene in denudierten CD1 Aorten, die mit magnetofizierten bPAECs perfundiert wurden .....	<b>90</b>
<b>Abbildung 32:</b> Isometrische Kraftmessungen von deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit bPAECs .....	<b>92</b>
<b>Abbildung 33:</b> Deendothelialisierung von eNOS <sup>-/-</sup> Aorten .....	<b>94</b>
<b>Abbildung 34:</b> Analyse von deendothelialisierten eNOS <sup>-/-</sup> -Aorten nach Perfusion mit eNOS bPAECs auf mRNA- und Proteinebene.....	<b>96</b>
<b>Abbildung 35:</b> Analyse der cGMP-Konzentration in denudierten eNOS <sup>-/-</sup> Aorten nach Perfusion mit eNOS bPAECs.....	<b>97</b>
<b>Abbildung 36:</b> Isometrische Kraftmessungen von deendothelialiserten eNOS <sup>-/-</sup> Aorten nach der Perfusion mit bPAECs .....	<b>99</b>
<b>Abbildung 37:</b> <i>In vivo</i> Zellinjektion von eNOS bPAECs in deendothelialisierte eNOS <sup>-/-</sup> Karotiden .....	<b>101</b>
<b>Abbildung 38:</b> Direkter Nachweis der Expression der transgenen eNOS in deendothelialisierten eNOS <sup>-/-</sup> Karotiden nach der <i>in vivo</i> Zellinjektion.....	<b>102</b>
<b>Abbildung 39:</b> Isometrische Kraftmessungen von deendothelialisierten eNOS <sup>-/-</sup> Karotiden nach der <i>in vivo</i> Zellinjektion .....	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	<i>Arteria carotis communis</i> , Halsschlagader
ACE	<i>Arteria carotis externa</i>
ACh	Azetylcholin
ACI	<i>Arteria carotis interna</i>
$\alpha$ smac	$\alpha$ -smooth muscle actin, glattmuskuläres Aktinfilament
AVV	Adeno-assoziiertes Virus
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
Bl6	Labormaus mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J
BMS	<i>bare metal stents</i> , unbeschichtete Metallstents
bPAECs	<i>bovine pulmonary artery endothelial cells</i> , bovine pulmonal-arterielle Endothelzellen
CD1	Labormaus mit dem genetischen Hintergrund CD1
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV-eGFP LV	lentiviraler Vektor mit eGFP-Expressionskassette
CMV-eNOS LV	lentiviraler Vektor mit eNOS-Expressionskassette
CMV-eNOS-IRES-eGFP LV	lentiviraler Vektor mit eNOS- und eGFP Expressionskassette
CMV-VEGF LV	lentiviraler Vektor mit VEGF-Expressionskassette
C <sub>t</sub>	cycle threshold
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , standardisiertes Medium für die Zellkultur
DES	<i>drug eluting stents</i> , Medikamenten-beschichtete Stents
DTAH	duale Thrombozytenaggregationshemmung
ecSOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
eGFP	enhanced green fluorescent protein, verstärkte Variante des grün fluoreszierenden Proteins
eGFP bPAECs	eGFP überexprimierende bPAECs
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , europäische Arzneimittel-Agentur
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
eNOS bPAECs	eNOS sowie eGFP überexprimierende bPAECs
eNOS <sup>-/-</sup>	Labormaus mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J, bei der das eNOS-Gen deaktiviert wurde
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> , behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA
FMN	Flavin Mononukleotid
HBSS <sup>++</sup>	<i>Hank's balanced salt solution</i> , standardisierte Salzlösung mit Kalzium und Magnesium
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> , Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSV-TK	<i>Herpes simplex Virus</i> Thymidinkinase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IP	infektiöser Viruspartikel
iPSC	<i>induced pluripotent stem cells</i> , induzierte pluripotente Stammzellen

IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kDA	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
Konfig A / B	Magnetkonfiguration A / B
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoproteine geringer Dichte
LV	lentiviraler Vektor
mNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxidsynthase
MNP	magnetischer Nanopartikel
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nikotinamidadenidinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
Opti-MEM	reduced-serum minimal essential medium
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCHIV-LV	pCHIVEGFP Lentivirus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
P/S	Penizillin / Streptomycin Lösung
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> (Echtzeit) PCR
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffverbindungen
rrl-156 LV	lentiviraler Vektor mit Expressionskassette, die kein Transgen trägt
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SERCA	<i>Sarcoplasmic / endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> , Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
VP	Viruspartikel
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> , Zelle der glatten Gefäßmuskulatur

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endothel als funktionelles Organ

Das Endothel ist die Zellschicht, die alle Blutgefäße von innen auskleidet. Es stellt mit einer Dicke von etwa 1  $\mu\text{m}$  die Barriere zwischen intraluminalen Blutkompartiment und dem subendothelialen Gewebe dar. Im menschlichen Körper finden sich zwischen  $1 \cdot 10^{13}$  bis  $6 \cdot 10^{13}$  Endothelzellen, die diese Barriere bilden und zusammen etwa 1 kg des Körpergewichts ausmachen<sup>1</sup>. Lange wurde angenommen, dass das Endothel eine inerte, semipermeable Membran ist<sup>2</sup>. In den letzten Jahren konnte aber gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Endothelzellen tatsächlich ein komplexes, metabolisch hoch aktives Organsystem darstellt, das physiologisch wichtige Aufgaben übernimmt. So zählen Vasorelaxation und –konstriktion, die Regulation der Hämostase sowie vaskuläres Wachstum und *remodeling* zu den Aufgaben des Endothels<sup>3 4 5</sup>. Dies wird durch die Freisetzung verschiedener vasoaktiver Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Prostazyklinen (z.B.  $\text{PGI}_2$ ), dem *endothelium-derived hyperpolarising factor* (EDHF), Endothelin (z.B. ET-1), Thromboxanen (z.B.  $\text{TXA}_2$ ) und Angiotensin II erreicht<sup>1 6</sup>. Vor allem NO nimmt im Hinblick auf die physiologische, pathophysiologische und auch klinische Bedeutung der Endothelfunktion eine zentrale Rolle ein.

Dabei ist diese große biologische Relevanz von NO noch nicht sehr lange bekannt. Erst im Jahr 1980 konnten Furchgott und Zawadzki zeigen, dass Azetylcholin (ACh) in isolierten Gefäßsegmenten mit intaktem Endothel eine vasodilatierende Wirkung aufweist. In Gefäßsegmenten, in denen das Endothel entfernt wurde, war dieser dilatierende Effekt aufgehoben, und hohe Dosen ACh führten zu einem konstringierenden Effekt<sup>7</sup>. Furchgott und Zawadzki nannten diese durch ACh Applikation freigesetzte Substanz *endothelium-dependent relaxing factor* (EDRF). Erst sieben Jahre später konnte der EDRF als NO identifiziert werden<sup>8 9 10</sup>. Im Jahr 1998 wurden diese Arbeiten, die die Basis der Identifikation von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System darstellen, mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie honoriert.

### 1.1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Bis zu Beginn der 1980er Jahre war NO hauptsächlich als Umweltschadstoff und weniger als physiologisch wertvolles Transmittermolekül bekannt. NO tritt in Zigarettenrauch,

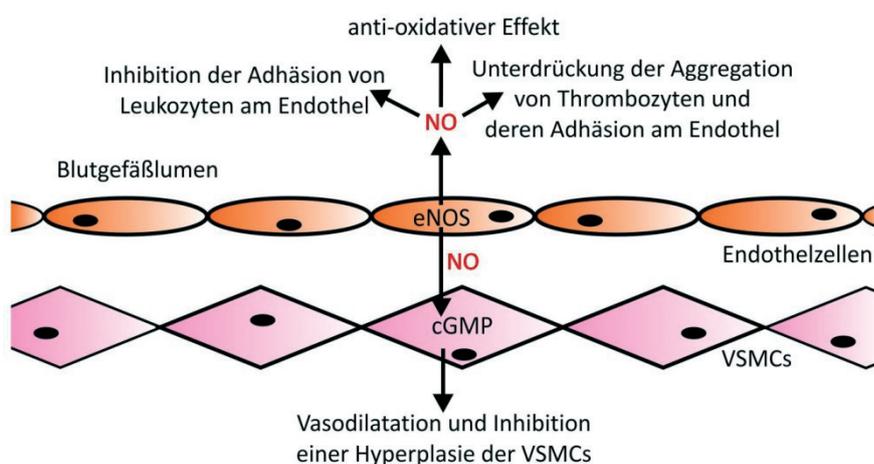
Autoabgasen und während verschiedener industrieller Verbrennungsprozesse auf <sup>11 12</sup>. Umso erstaunlicher ist sein hohes vasoprotektives Potenzial, das es im Organismus entfaltet. NO ist ein gasförmiges, lipophiles Radikal, welches frei durch Membranen diffundieren kann <sup>12</sup>. Die NO Produktion wird durch Enzyme der Familie der Stickstoffmonoxidsynthasen katalysiert. Bisher sind drei Isoformen der NO Synthasen charakterisiert, wobei die NO Produktion im vaskulären System hauptsächlich auf die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) zurückzuführen ist <sup>13</sup> (vgl. 1.1.2). Im Endothel produziertes NO wird zum einen zur luminalen Gefäßseite hin abgegeben und wirkt dort anti-thrombotisch, anti-adhäsiv und anti-atherosklerotisch. Im Gefäßlumen wirkt es zum einen als potenter Inhibitor auf die Aggregation und Endotheladhäsion von Thrombozyten <sup>14 15 16 17 18 19</sup>. Eine weitere Wirkung von durch eNOS produziertem NO im Blutgefäßlumen ist die Unterdrückung des *rolling and sticking* von Leukozyten am Endothel <sup>14 19</sup>. Es ist beschrieben, dass diese Wirkung durch die NO-medierte Inhibition der Ausbildung des leukozytären Adhäsionsmoleküls CD11/CD18 hervorgerufen wird <sup>20 21</sup>. Dadurch ist es den Leukozyten nicht mehr möglich, am Endothel anzuhafte.

Im Endothel produziertes NO kann des Weiteren in die glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) diffundieren. Dort führt es zum Anstieg der intrazellulären Konzentration des *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Der Anstieg der cGMP Konzentration in den VSMCs führt letztendlich zu deren Relaxation und zu einer Weitstellung des Blutgefäßes <sup>19 22 23 24 25</sup> (vgl. 1.1.2.1). Des Weiteren konnten bereits verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass NO die DNA-Synthese, die Mitose und die Proliferation von VSMCs hemmt <sup>26</sup>. Auch dieser Effekt wird auf den NO-bedingten Anstieg von cGMP in den glatten Muskelzellen zurückgeführt <sup>27 28 29 30 31</sup>. Die oben beschriebene Inhibition der Anlagerung von Thrombozyten am Endothel durch NO verhindert auch, dass VSMCs mit verschiedenen von Blutplättchen gebildeten Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factor* und VEGF in Kontakt kommen <sup>32</sup>. Hierdurch wird ebenfalls eine übermäßige Proliferation der VSMCs verhindert <sup>13</sup>.

Nicht zuletzt ist NO ein potentes anti-oxidatives Molekül <sup>19</sup>. Oxidativer Stress, vor allem durch die Formation von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), ist einer der Faktoren, der die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankung stark begünstigt. Der am besten beschriebene anti-oxidative Effekt von NO ist die Inhibition der Oxidation von Lipiden, wie etwa Lipoproteine geringer Dichte (*low density lipoproteins*, LDL) <sup>33</sup>. Genau diese Oxidation von LDL ist ein Initiator der Entstehung atherosklerotischer Läsionen <sup>34</sup> (vgl. 1.2). Auch die NO-vermittelte Aktivierung

der endothelialen Ferritin Synthese trägt zu dessen anti-oxidativem Effekt bei. Ferritin kann freie Ionen wie  $O_2^-$  binden und so oxidativen Stress reduzieren<sup>35</sup>. Des weiteren induziert NO die extrazelluläre Superoxiddismutase (ecSOD), ein anti-oxidatives Enzym, das auf der Zellmembran von VSMCs lokalisiert ist und dort zu einer Verminderung des oxidativen Stresses durch reaktive Sauerstoffspezies führt<sup>19 36 37</sup>.

Alle beschriebenen vasoprotektiven Effekte zeigen, dass NO einen potenten, endogenen Schutz des Endothels vor pathologischen Läsionen, wie sie etwa im Verlauf einer atherosklerotischen Erkrankung auftreten (vgl. 1.2), darstellt. Es wird ebenfalls deutlich, dass eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit die Entstehung ebensolcher Gefäßerkrankungen begünstigt.



**Abbildung 1: Wirkung von NO im vaskulären System**

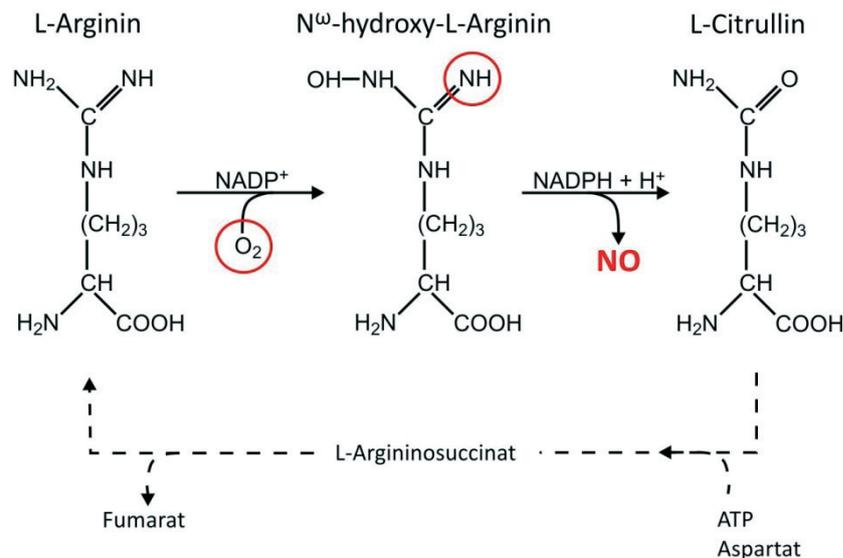
Ins Blutgefäßlumen abgegebenes NO wirkt inhibierend auf Thrombozytenaggregation, auf die Adhäsion von Blutplättchen sowie Leukozyten an das Endothel. In den glatten Muskelzellen der Blutgefäßwand (VSMCs) bewirkt NO über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase einen Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration. Diese wiederum führt zu einer Relaxation der Muskelzellen und zu einer Vasodilatation. CGMP hat weiterhin einen antiproliferativen Effekt auf die VSMCs<sup>1</sup>. Des Weiteren wird NO ein potenter anti-oxidativer Effekt zugeschrieben<sup>19</sup>.

### 1.1.2 Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)

Wie oben erwähnt, wird die NO Produktion durch die Enzymfamilie der NO Synthasen (NOS) katalysiert. Bisher sind drei Isoformen der NOS identifiziert, die von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden<sup>13 38</sup>: die neuronale NOS (nNOS oder NOS I), die hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert wird<sup>11</sup>, die induzierbare NOS (iNOS oder NOS II), die vorwiegend in Zellen der unspezifischen Immunabwehr wie Makrophagen, aber auch in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird<sup>11 39</sup> sowie die endotheliale NOS (eNOS oder NOS III), die in Endothelzellen exprimiert wird und für den überwiegenden Anteil der NO Produktion im Blutgefäßsystem verantwortlich ist<sup>13 40</sup>. Es gibt Anhaltspunkte für eine vierte

Isoform, die in Mitochondrien mancher Gewebe exprimiert werden soll, die mitochondriale NOS (mNOS)<sup>41 42</sup>.

Allen Isoformen ist gemeinsam, dass sie für die NO-Synthese die Aminosäure L-Arginin als Substrat und molekularen Sauerstoff sowie Nikotinamidadenidinukleotidphosphat (NADP<sup>+</sup>) als Kosubstrat benötigen<sup>43</sup>. Die NO-Synthese selbst stellt einen Transfer von Elektronen dar, welcher in der Entstehung von NO und weiterhin L-Citrullin als Nebenprodukt resultiert<sup>14</sup> (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin**

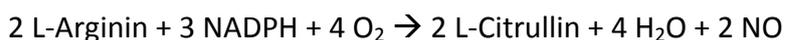
L-Arginin wird durch NOS über N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin umgewandelt. Das bei der Reaktion entstehende NO erhält sein Sauerstoffatom von dem molekularen Sauerstoff, der als Kosubstrat benötigt wird. Das Stickstoffatom stammt von der Guanidinogruppe des L-Arginins. Das entstandene L-Citrullin kann im Rahmen des endothelialen Stickstoffmetabolismus wieder zu L-Arginin umgewandelt werden.<sup>11</sup>

Das Gen, welches für die humane eNOS kodiert, befindet sich auf Chromosom 7 (Region 7q35→7Q36). Es beinhaltet 26 Exons und 25 Introns und ist 21 kb groß. Die bei der Transkription entstehende messenger RNA (mRNA) ist 4052 Nukleotide lang und wird in ein Protein mit einer Molekülmasse von 133 kD translatiert<sup>13</sup>.

Das eNOS Protein besteht aus zwei jeweils katalytisch aktiven Domänen. N-terminal befindet sich eine Domäne mit Oxygenaseaktivität. Diese beinhaltet die Bindungsstellen für die essentiellen Kofaktoren Häm (Häm/Fe<sup>2+</sup>), (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) sowie die Bindungsstelle für die Substrate L-Arginin und O<sub>2</sub><sup>38</sup>. Der Oxygenasebereich ist über eine Calmodulin-Bindungsstelle an eine C-terminale Proteindomäne mit Reduktaseaktivität gekoppelt. Eine Ca<sup>2+</sup>-induzierte Calmodulin Bindung an diese Bindungsstelle erhöht die Flussrate der Elektronen. Dieser Fluss führt letztendlich zur NO-Synthese<sup>14</sup>. Im Reduktasebereich befinden sich die Bindungsstellen für die Kofaktoren Flavin Adenin

Dinukleotid (FAD) und Flavin Mononukleotid (FMN) sowie eine Bindungsstelle für das Kosubstrat NADP<sup>+</sup> <sup>44 45 46</sup>. Für eine korrekte NO-Synthese müssen zwei eNOS-Moleküle dimerisiert vorliegen, wobei der Kofaktor Häm das Homodimer stabilisiert <sup>14</sup>. Zusätzlich wird das Dimer durch einen an der Dimerisierungsstelle gebundenen tetraedischen Zink-Thiolat Komplex stabilisiert <sup>47</sup>. Dieser besteht aus einem zentralen Zinkatom, das an jeweils zwei Cysteinmoleküle eines Monomers gebunden ist (Abbildung 3) <sup>7 9</sup>.

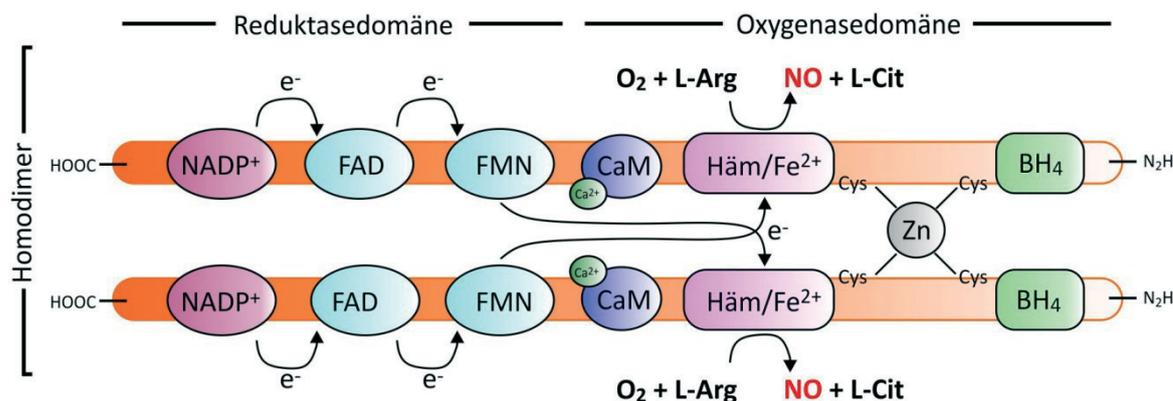
Während der NO-Synthese werden Elektronen von dem an der Reduktasedomäne des einen Monomers gebundenen NADP<sup>+</sup> über die Flavine FAD und FMN zur Häm-Gruppe des anderen Monomers transportiert (Abbildung 3). Hier werden die Elektronen genutzt, um molekularen Sauerstoff zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu reduzieren. Weiterhin wird gebundenes L-Arginin zu N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-Arginin hydroxyliert. Dieses intermediäre Zwischenprodukt wird dann weiter zu L-Citrullin oxidiert, wobei NO als Endprodukt entsteht <sup>14 48</sup>. Die genaue Stöchiometrie der Reaktion lautet:



Sollte eine Dimerisierung aufgrund des Fehlens verschiedener Kofaktoren, vor allem BH<sub>4</sub>, nicht möglich sein, wird der Prozess der Reduktion des Sauerstoffs zum Superoxidation vom Prozess der Reaktion mit L-Arginin entkoppelt <sup>14 49</sup>. In diesem Fall nimmt die NO-Produktion zugunsten der Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), wie O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ab. Dieser Prozess kann zu verminderter NO-Bioverfügbarkeit und zur Entstehung von oxidativem Stress am Endothel führen <sup>1 5</sup>.

Die Aktivität von eNOS und die daraus resultierende NO-Produktion sind sehr genau reguliert. Die eNOS wird zwar konstitutiv exprimiert, unterliegt aber einigen Regulationsmechanismen auf Expressionsebene und einigen posttranslationalen Modifikationen. Es konnte gezeigt werden, dass Scherkräfte, die auf das Endothel wirken, über eine Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src zur Hochregulation der eNOS Expression führen sowie zu einer verlängerten eNOS mRNA Stabilität <sup>50</sup>. Auf posttranslationaler Ebene gibt es mehrere die eNOS Aktivität beeinflussende Faktoren. Protein-Protein-Interaktionen mit Calmodulin und Calcium z.B. führen, wie bereits erwähnt, zu einem beschleunigten Elektronenfluss und damit zu einer gesteigerten eNOS Aktivität <sup>51 52</sup>. Diese Protein-Protein-Interaktion erklärt auch, wie verschiedene Agonisten, die zu einem rezeptorvermittelten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen, wie z.B. ACh oder Bradykinin, die eNOS Aktivität steigern <sup>11 53 54</sup>. Weitere posttranslationalen Regulationsmechanismen stellen

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen verschiedener Serin- und Tyrosinreste des eNOS Proteins dar<sup>55 56 57 58 59 60 61</sup>.



**Abbildung 3: Der eNOS-Wirkmechanismus**

Die nur als Homodimer voll funktionsfähige eNOS katalysiert die Entstehung von NO aus L-Arginin (L-Arg) und O<sub>2</sub>. L-Citrullin (L-Cit) entsteht als Nebenprodukt. Die Reaktion besteht aus einem Elektronentransfer vom Kosubstrat NADPH aus entlang der an der Reduktasedomäne gebundenen Kofaktoren FAD und FMN zu der an der Oxygenasedomäne des jeweils anderen Monomers gebundenen Häm-Gruppe. Hier wird der Sauerstoff reduziert und dadurch aktiviert. Das L-Arg wird zu L-Cit umgewandelt, wobei Stickstoff frei wird, der mit dem aktivierten Sauerstoff zu NO reagiert. Eine Kalzium-induzierte Calmodulin (CAM) Bindung kann den Elektronentransfer beschleunigen. Das Kosubstrat (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ist notwendig, damit die Monomere dimerisieren können. Ein Zink (Zn) Thiolat Komplex stabilisiert die Dimerstruktur<sup>14</sup>.

### 1.1.2.1 Der eNOS-NO-cGMP Signalweg

Physiologisch besonders hervorzuheben sind die cGMP-vermittelten Effekte des von eNOS produzierten NO im Blutgefäßsystem. So ist NO etwa eine der wichtigsten endogenen vasodilatatorischen Substanzen. Es gleicht die vasokonstriktorisches Effekte des sympathischen Transmittermoleküls Noradrenalin und des Renin-Angiotensin Systems aus, um den Blutdruck konstant zu halten<sup>13</sup>. Studien in Kaninchen konnten zeigen, dass im peripheren Gefäßbett 69% der Noradrenalinausschüttung allein für die Gegenregulation der durch NO-medierte Vasodilatation benötigt werden<sup>62</sup>. Dies verdeutlicht, welche zentrale Rolle der eNOS-NO-cGMP Signalweg bei der Homöostase des Blutdrucks spielt.

Im Endothel produziertes NO, das in die glatte Gefäßmuskulatur diffundiert, trifft hier direkt auf sein Zielprotein, die lösliche Guanylatzyklase (*soluble guanylyl cyclase*, sGC). Die sGC ist, ähnlich wie eNOS, ein Häm-haltiges Enzym, das die Metabolisierung von Guanosintriphosphat (GTP) zum *second messenger* cGMP und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) katalysiert<sup>63</sup>. Das Enzym wird aktiviert, sobald NO an dessen Kofaktor Häm bindet. Durch diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Porphyrinrings, sodass GTP gebunden und umgesetzt werden kann<sup>64</sup>. Der NO-Häm-Komplexe und damit auch die gesteigerte Aktivität

der sGC haben eine Halbwertszeit von etwa 0,2 Sekunden<sup>11</sup>. Danach muss ein neues NO Molekül an die prosthetische Hämgruppe binden, damit wieder vermehrt cGMP entsteht.

Das entstandene cGMP ist jedoch nur der Anfang verschiedener Signalkaskaden, die letztendlich den kontraktile Apparat der glatten Gefäßmuskelzelle beeinflussen, und hier zu einer Relaxation führen. Einer der primären Effekte von cGMP ist die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG), vor allem der PKG I, die wiederum durch Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten anderer Proteine deren Aktivität beeinflusst<sup>65 66</sup>.

Es ist beschrieben, dass es durch die cGMP-vermittelte Aktivierung der PKG zu einer Beeinflussung der Kalziumkonzentration der VSMCs kommt. Die PKG I phosphoryliert Phospholamban und enthemmt somit die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (*sarcoplasmatic endoplasmatic reticulum ATPase, SERCA*)<sup>67</sup>. Weiterhin wird durch Phosphorylierung des 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) rezeptorassoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) die IP<sub>3</sub>-vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum inhibiert<sup>68</sup>. Ferner ist auch eine NO-vermittelte Aktivierung von Kaliumkanälen in der VSMC Membran beschrieben<sup>69</sup>. Die aus dem Kaliumefflux resultierende Hyperpolarisation der Zelle vermindert den Kalziumeinstrom in die Gefäßmuskelzelle<sup>19</sup>. Durch diese drei Prozesse wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesenkt. Dies wiederum wirkt sich inhibierend auf die Formation des Kalzium-Calmodulin-Myosin leichte Kette Kinase (*myosin light chain kinase, MLCK*)-Komplexes aus<sup>19</sup>. Diese Inaktivierung der MLCK hat zur Folge, dass die regulatorische leichte Kette des Myosinfilaments nicht phosphoryliert wird und so keine Interaktion mit dem Aktinfilament eingehen kann<sup>70</sup>. Die Gefäßmuskelzellen relaxieren, es kommt zur Vasodilatation, welche letztendlich zu einer Zunahme des Blutflusses und zu einer Verminderung des Blutdrucks führt<sup>11</sup>.

Auch der anti-thrombotische Effekt des NOs ist auf einen Anstieg der cGMP Konzentration in den Thrombozyten und einer daraus resultierenden Aktivierung der PKG I zurückzuführen<sup>19</sup>. Auch hier spielt die Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration eine zentrale Rolle<sup>71</sup>.

Ebenso werden die anti-proliferativen Effekte, die NO auf die glatten Muskelzellen ausübt, durch cGMP und PKG moduliert<sup>67</sup>.

### 1.1.3 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Die Angiogenese, die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, ist ein sowohl physiologisch als auch pathologisch hoch relevanter Prozess, an dem das Endothel maßgeblich beteiligt ist. Eines der potentesten proangiogenetischen Moleküle, welches hochspezifisch an Endothelzellen wirkt, ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). VEGF wird auf bestimmte Reize hin in verschiedenen Geweben des Körpers gebildet und entfaltet dann rezeptorvermittelt seine proangiogenetische Wirkung an den vaskulären und auch lymphatischen Endothelzellen. Hier kommt es VEGF-vermittelt zu einer Verstärkung der endothelialen Proliferation und Migration, zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der Endothelzellen und zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Hyperpermeabilität<sup>6</sup>. Dadurch wird die Entstehung neuer Blutgefäße, die Angiogenese, vorangetrieben. Dies spielt etwa während der Wundheilung, dem weiblichen Menstruationszyklus, der Tumorgenese und verschiedenen inflammatorischen und auch ischämischen Erkrankungen eine wichtige Rolle<sup>6</sup>. Es sind sieben verschiedene VEGF Proteine bekannt: VEGF-A bis -F sowie der Plazenta Wachstumsfaktor (*placental growth factor*, PlGF)<sup>6</sup>. Allen Proteinen in der VEGF Familie ist gemeinsam, dass sie, ähnlich wie eNOS, ihre Wirkung nur entfalten, wenn sie dimerisiert vorliegen<sup>72 73</sup>.

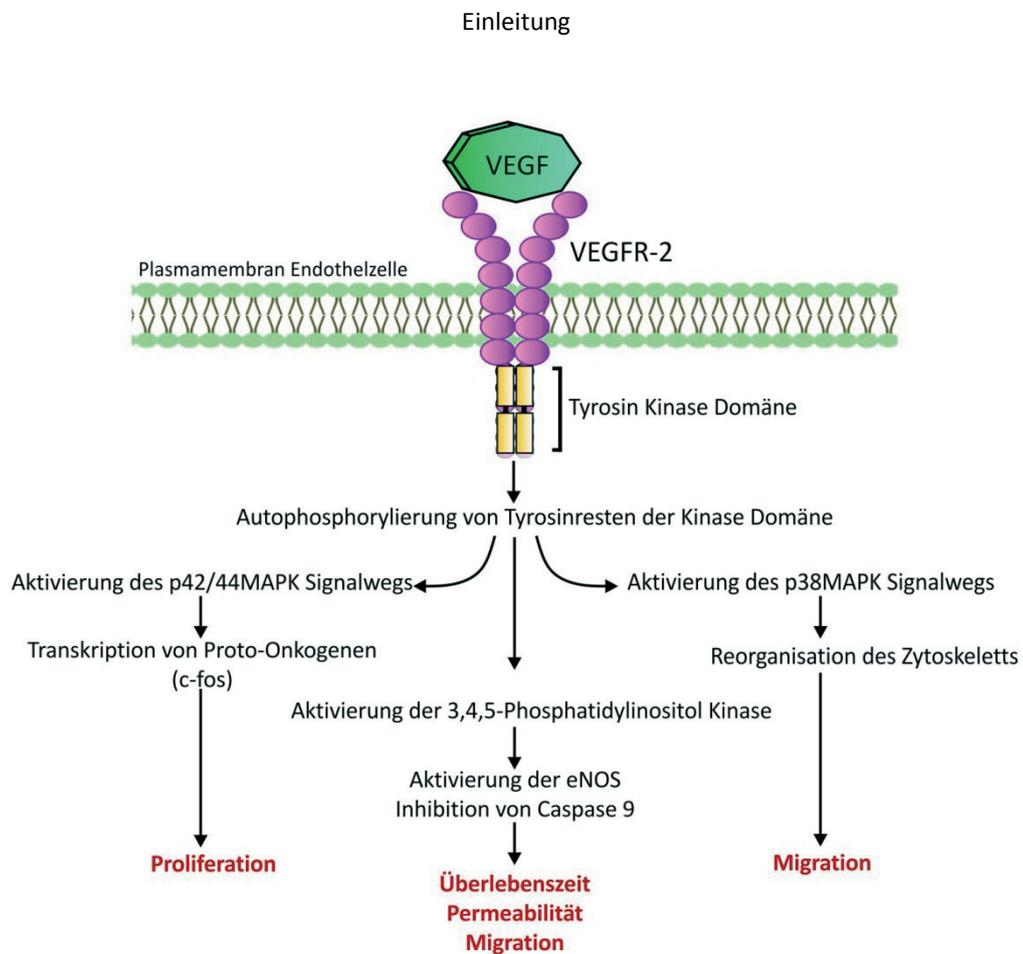
Es sind drei verschiedene VEGF-Rezeptoren beschrieben: der VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1), auch als *fms*-ähnliche Tyrosin Kinase 1 (*fms-like tyrosin kinase*, Flt-1) bezeichnet, der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2), auch als fetale Leber Kinase 1 (*fetal liver kinase*, flk-1) bezeichnet sowie der VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR-3), auch als *fms*-ähnliche Tyrosin Kinase 4 (*fms-like tyrosin kinase*, Flt-4) bezeichnet<sup>73 6</sup>. Der wohl wichtigste Rezeptor für die Induktion von Angiogenese durch VEGF ist der VEGFR-2<sup>74 75</sup>. VEGFR-2 bindet VEGF-A, -C, -D und -E und vermittelt nach Ligandenbindung eine verstärkte Mitose und Migration von Endothelzellen, eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und die vermehrte Produktion von thrombozytenaktivierendem Faktor (*platelet activating factor*, PAF)<sup>73 76 77 78</sup> (Abbildung 4). Auf Ligandenbindung hin kommt es beim VEGFR-2 zu einer Dimerisierung zweier Rezeptormonomere und zur Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste der Kinase Domäne des Rezeptors<sup>6</sup>. Durch diese Phosphorylierungen werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. So kommt es durch die Aktivierung der Mitogen aktivierten Kinase (*mitogen activated kinase*, MAPK) zur Transkription verschiedener Protoonkogene<sup>79 80 81</sup>. Die Aktivierung von VEGFR-2 führt weiterhin zu einer durch den intrazellulären Anstieg der

Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat-Konzentration induzierten Aktivierung der eNOS<sup>6 61</sup>. Weiterhin ist eine Reorganisation des endothelzellulären Zytoskletts beschrieben<sup>82</sup>.

Einer der wichtigsten Faktoren zur Regulation der Expression von VEGF ist Hypoxie. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass sich in der 3' und 5' Region des VEGF-A Gens *enhancer* Sequenzen befinden<sup>83 84</sup>. An diese Sequenz kann der *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) Protein Komplex binden, was zu einer Hochregulation der Genexpression und der mRNA Stabilität von VEGF-A führt<sup>85</sup>. HIF-1 ist ein Dimer, bestehend aus den Monomeren HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  wird konstitutiv exprimiert, während HIF-1 $\alpha$  nur unter hypoxischen Bedingungen stabil ist und unter Normoxie ubiquitiniert und dann degradiert wird<sup>86</sup>. So erklärt sich, dass nur unter hypoxischen Bedingungen eine Dimerisierung stattfinden kann und nur dann eine Verstärkung der VEGF-A Expression möglich ist<sup>6</sup>.

Auch die Expression von VEGFR-1 und -2 wird höchstwahrscheinlich durch Hypoxie induziert<sup>83 87</sup>. Die Regulation der Rezeptorexpression ist allerdings weniger genau untersucht. Es wird weniger ein direkter Effekt von HIF vermutet, als ein parakriner Effekt eines unter hypoxischen Bedingungen ausgeschütteten Mediators, der sich positiv auf die VEGF-Rezeptor mRNA auswirkt<sup>6</sup>.

Die Induktion der VEGF-medierten Angiogenese durch Hypoxie ist sowohl physiologisch als auch pathologisch hochrelevant. Bei ischämischen Prozessen wird so eine Kollateralisierung vorangetrieben, um die minderversorgten Strömungsgebiete wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen<sup>6</sup>.



**Abbildung 4: Wirkung von VEGF**

Bei Bindung eines VEGF Moleküls kommt es zu Rezeptordimerisierung und zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Tyrosin Kinase Domäne des Rezeptors. Diese Phosphorylierungen setzen verschiedene Signalkaskaden in Gang, die die Proliferation, die Überlebenszeit, die Permeabilität und die Migration von Endothelzellen fördern. Dies führt zur VEGF-medierten Angiogenese – dem Entstehen neuer Blutgefäße.<sup>6</sup>

## 1.2 Atherosklerose – eine Erkrankung des Endothels

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der *Tunica intima* und *Tunica media* der Arterienwand, die mit der Bildung von Gefäßplaques, sogenannten Atheromen, einhergeht. Dies kann zu Komplikationen wie Ischämien in verschiedenen Strömungsgebieten führen, was sich in Form von Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) manifestieren kann<sup>5 88</sup>. Kardiovaskuläre Erkrankungen, denen häufig atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand zugrunde liegen, stellen global gesehen die häufigste Todesursache dar<sup>89</sup>. Im Jahr 2008 verstarben weltweit 17,3 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen, was 30% der Todesfälle in diesem Jahr ausmacht<sup>89</sup>. Prognosen besagen, dass diese Zahl bis zum Jahr 2030 auf über 23 Millionen Todesfälle ansteigen wird<sup>89 90</sup>.

Die Pathogenese der Atherosklerose ist hochkomplex. Eine zentrale Rolle spielt das Gefäßendothel, welches die Grenz- und Kommunikationsfläche zwischen Arterienwand und

Blutkompartiment bildet <sup>5</sup> (vgl. 1.19), sowie eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit des vasoprotektiven endothelialen Botenstoffes NO (vgl. 1.1.1). Bei der Entstehung von Atheromen kann man verschiedene Phasen unterscheiden <sup>5 34 93</sup>:

### 1. Endotheliale Dysfunktion

Diese erste Phase der Atherogenese ist ein lokalisierter Prozess, der besonders häufig an Stellen im Blutgefäßsystem beobachtet wird, die keine laminaren Strömungsverhältnisse aufweisen, wie z.B. an Gefäßabzweigungen oder Bifurkationen <sup>91 92 93</sup>. Die Endothelzellen passen sich den Scherkräften des Blutes an und nehmen in diesen turbulenten Strömungsgebieten eine polygonale Morphologie an. Diese morphologischen Änderungen gehen mit einer erhöhten Permeabilität der Zellen für Makromoleküle einher <sup>94</sup>. Zu diesen Makromolekülen zählt auch LDL. Das LDL reichert sich in der Intima der Gefäßwand an und wird hier unter anderem oxidiert <sup>34 95</sup>. Es ist beschrieben, dass die Oxidation des LDL durch ROS vorangetrieben wird <sup>34</sup>. Vor allem bei geringer NO-Bioverfügbarkeit kommt es häufig zu dieser oxidativen Alteration des LDL <sup>19</sup>.

### 2. Die inflammatorische Phase

Die Anreicherung von oxidiertem LDL in subendothelialen Bereichen der Gefäßwand stellt einen permanenten Entzündungsreiz dar <sup>5</sup>. Dieser führt in den Endothelzellen zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Proteinen. Dadurch werden Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut rekrutiert, die an das Endothel andocken und in die Gefäßwand migrieren <sup>34</sup>. Zusätzlich verstärkt wird dieser Prozess durch eine verminderten NO-Synthese, da der anti-adhäsive Effekt des NOs herabgesetzt ist <sup>19</sup>. Die aus dem Blut eingewanderten Monozyten differenzieren in der Gefäßwand zu Makrophagen. Die Makrophagen phagozytieren das aggregierte und oxidierte LDL und werden dadurch zu Schaumzellen <sup>34</sup>. Diese Akkumulationen der LDL-gefüllten Makrophagen, der Schaumzellen, in der Arterienwand werden auch als *fatty streaks* bezeichnet <sup>5</sup>.

### 3. Die reparative Phase

In dieser Phase kommt es zur Ausbildung eines fibrotischen Plaques <sup>5</sup> (Abbildung 5). Dieser stellt eine Art derbes Narbengewebe dar, welches die atherosklerotische Läsion abdeckt und stabilisiert. Das fibrotische Gewebe enthält glatte Gefäßmuskelzellen und von diesen produzierte extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagene und elastische Fasern <sup>95</sup>. Auch Makrophagen bzw. Schaumzellen und

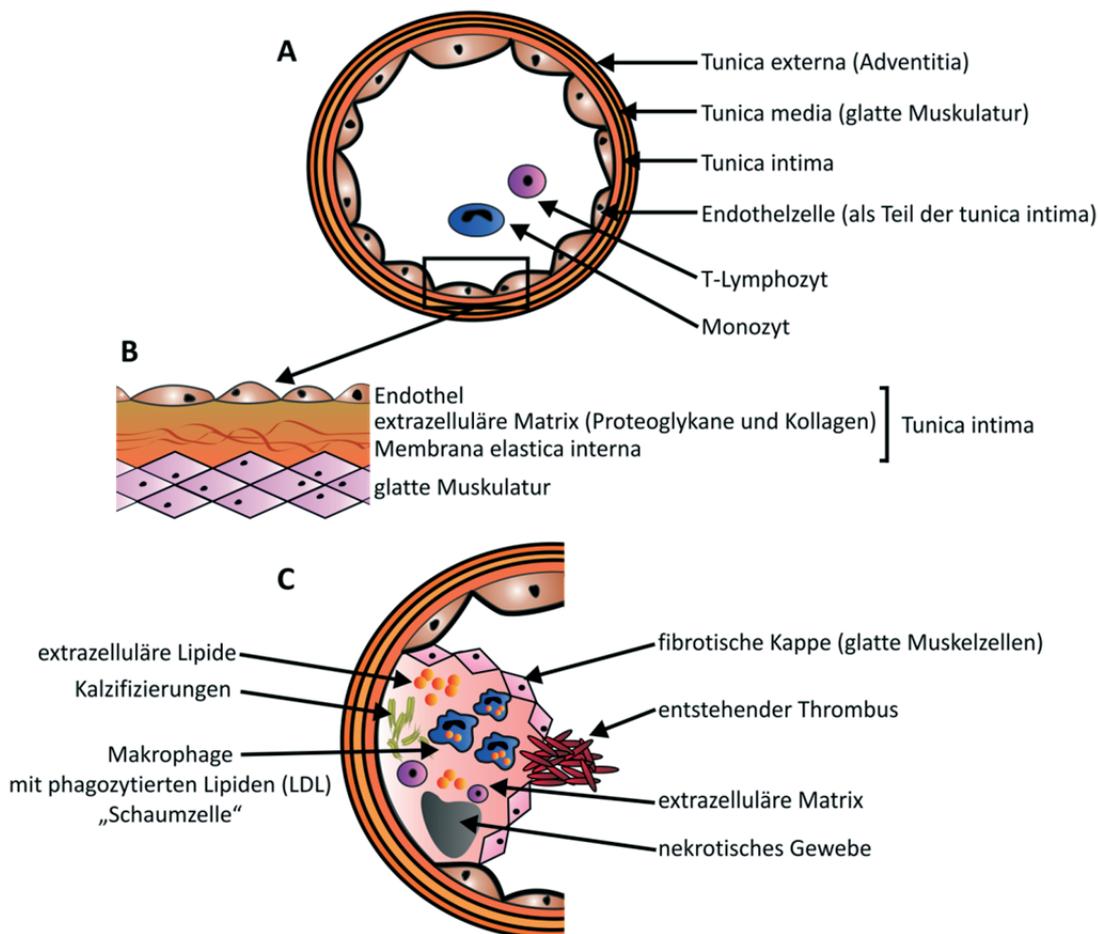
Lymphozyten finden sich im fibrotischen Plaque, was zu einer potentiellen Instabilität beiträgt<sup>96</sup>. Unter dem fibrotischen Gewebe kommt es zu Anreicherung von weiteren Schaumzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Matrixproteinen, extrazellulär vorliegenden Lipiden sowie nekrotischem als auch verkalktem Gewebe<sup>95</sup>. Der fehlende direkte anti-proliferative Effekt des NOs auf die glatten Muskelzellen führt zu einer Hyperplasie eben dieser und zu einem weiteren Fortschreiten der Entwicklung des Atheroms<sup>19</sup>. Mit fortschreitender Größenzunahme des Atheroms kommt es zu Stenosen im Gefäßlumen. Hier ist der Plaque nun den Scherkräften des Blutflusses ausgesetzt<sup>34</sup>.

#### 4. Die thrombotische Phase

Je nach Komposition kann man stabile von weniger stabilen fibrotischen Plaques unterscheiden. Je höher der Anteil an inflammatorischen Zellen und Lipiden ist, desto vulnerabler ist der Plaque<sup>34</sup>. Wenn dieser nun den turbulenten Scherkräften im stenosierten Gefäßlumen ausgesetzt ist, kann es zur Plaque-Ruptur kommen<sup>5</sup>. Dabei kommt es zum Kontakt des Blutes mit dem prothrombotischen Plaquegewebe, was zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und zur Thrombusformation führt<sup>5</sup> (Abbildung 5). Verstärkt wird dieser Prozess durch die verminderte NO-Synthese, da der anti-thrombotische Effekt des NOs herabgesetzt ist<sup>19</sup>. Die Gefahr der Thrombosierung des Gefäßes besteht nun darin, dass der wachsende Thrombus zu einem weitgehenden Verschluss des Blutgefäßes führt. Dadurch kann es zu Ischämien im folgenden Versorgungsgebiet kommen. Eine weitere Komplikation besteht darin, dass der Thrombus als Embolus abgeschwemmt wird. Eine Thrombosierung oder Embolie der Herzkranzgefäße kann zu einer myokardialen Ischämie, einem Herzinfarkt, führen. Sollte der Gefäßverschluss im Bereich der Becken-Bein-Arterien (*A. iliaca*, *A. femoralis*, *A. poplitea*, *A. tibialis*) auftreten, kann dies zu einer pAVK führen. Embolien im Strömungsgebieten des ZNS können zu einer zerebralen Ischämie, einem Schlaganfall, führen<sup>5</sup>.

Die Entstehung von Atheromen ist ein multifaktorielles Geschehen. Manche Faktoren haben eine starke genetische Komponente, wie das Geschlecht, erhöhte LDL Plasmakonzentration, Hypertonie oder auch Diabetes mellitus<sup>97 98</sup>. Andere Risiken sind Umweltfaktoren, wie eine fettreiche Ernährung, Nikotinabusus oder ein geringes Maß an körperlicher Ertüchtigung<sup>98</sup>. Letztendlich kommt es in erster Instanz zu einer Schädigung des Endothels, die zu einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit des vasoprotektiven Faktors NO führt. Dies begünstigt

Inflammation, oxidative Prozesse, Proliferation, Koagulation sowie vaskuläre Adhäsion und damit das Fortschreiten der Erkrankung<sup>3 19 99</sup>.



**Abbildung 5: Atherosklerose**

**A:** An der gesunden Gefäßwand lassen sich die bindegewebige Tunica externa, die Tunica media mit glatten Muskelzellen und die Tunica intima unterscheiden. Die Tunica intima ist maßgeblich an der Entstehung von Atheromen beteiligt. Auch Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten sind Teil der Pathogenese. **B:** Die Tunica intima besteht aus einem *Monolayer* Endothelzellen und einer darunterliegenden Schicht aus extrazellulärer Matrix. Die Membrana elastica interna ist ebenfalls Teil der Intima. Es schließen sich die glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media an. **C:** Ein fortgeschrittenes Atherom ist durch die unter anderem aus glatten Muskelzellen gebildete fibrotische Kappe gekennzeichnet. Das darunterliegende Gewebe besteht aus von den Muskelzellen gebildeter extrazellulärer Matrix, nekrotischem und auch verkalktem Gewebe, extrazellulären Lipidablagerungen und aus dem Blutkompartiment eingewanderten Zellen. Zu Makrophagen differenzierte Monozyten phagozytieren die Lipidablagerungen, vornehmlich oxidiertes LDL, und werden so zu Schaumzellen. Bei Ruptur der fibrotischen Kappe kann es zu Thrombusformation kommen.<sup>34 95</sup>

### 1.2.1 Therapieoptionen bei Atherosklerose

Aufgrund der komplexen und mehrphasigen Genese einer atherosklerotischen Läsion gibt es mehrere Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention.

Im frühen Stadium einer endothelialen Dysfunktion werden häufig Wirkstoffe eingesetzt, die den LDL- und somit auch den Cholesterolspiegel im Blutplasma senken und einer

Hyperlipidämie entgegenwirken. Zu dieser Wirkstoffgruppe zählen die Statine, Inhibitoren der 3-Hydroxy-Methylglutaryl-Koenzym A-Reduktase (HMG-CoA Reduktase) <sup>100</sup>. Der ursprünglich aus Schimmelpilzen isolierte Wirkstoff bindet an das katalytische Zentrum der HMG-CoA Reduktase und inhibiert die Umwandlung von 3-Hydroxy-Methylglutaryl zu Mevalonat, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese <sup>101 102</sup>. Durch diese Inhibition wird die hepatozytäre Cholesterolsynthese gehemmt und zirkulierendes, LDL-gebundenes Cholesterin vermehrt rezeptorvermittelt aus dem Blut in Hepatozyten aufgenommen <sup>103 104</sup>. So kommt es zu einer Reduktion der LDL-Plasma-Konzentration durch Statingabe. Einige Studien beschreiben einen LDL senkenden Effekt von verschiedenen Statinen um bis zu 50% <sup>104</sup>. Den Statinen werden aber auch weitere, Cholesterin-unabhängige Wirkungen zugeschrieben <sup>102</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Statine die Expression der eNOS positiv beeinflussen können und so zu vermehrter NO-Synthese führen <sup>105 106</sup>. Allerdings sind auch verschiedene Nebenwirkungen der systemischen Statintherapie beschrieben. So konnten einige Studien eine Lebertoxizität nachweisen sowie eine erhöhte Neigung zur Entwicklung von Myopathien unter Statingabe <sup>104</sup>.

Weitere Wirkstoffgruppen, die zur Unterstützung der Endothelfunktion verabreicht werden können, sind NO-Donoren, sGC-aktivierende Substanzen, Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms oder auch L-Arginin und BH<sub>4</sub>, Substrat bzw. Kosubstrat für die eNOS <sup>19 14</sup>. All diese Substanzen führen zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit von NO und wirken somit einem Fortschreiten der atherosklerotischen Veränderungen am Endothel entgegen. In späteren Stadien atherosklerotischer Erkrankungen mit fortgeschrittener Plaqueformation sind chirurgische Interventionen Mittel der Wahl <sup>107</sup>. Neben hochinvasiven gefäßchirurgischen Verfahren wie der intramuralen Endarteriektomie stehen auch weniger invasive kathetergestützte Methoden zur Wahl. Mittels der endoluminalen Angioplastie (perkutane transluminale Angioplastie, PTA) ist es möglich, ein stenosiertes Gefäß kathetergestützt mittels Ballondilatation oder anderer Verfahren wieder zu öffnen. Bei einer Ballondilatation wird ein Ballonkatheter zum stenosierten Gefäß vorgeschoben und dort mit einem Druck von 8 bis 12 Bar expandiert. Dadurch wird das atherosklerotische Gewebe, der Plaque, in die Gefäßwand gedrückt und somit beseitigt. Weitere Beispiele für endoluminale angioplastische Methoden sind die katheterunterstützte Lasertherapie oder die Rotablation. Bei der Rotablation können besonders harte Plaques mit einem hohen Anteil an kalzifiziertem Gewebe mit Hilfe eines mit Diamantsplintern besetzten Bohrkopfes entfernt

werden. Der große Nachteil der PTAs ist die unwiederbringliche Schädigung des Endothels und die damit einhergehende massiv herabgesetzte endotheliale NO-Synthese. Dies resultiert sehr häufig in einer reaktiven Hyperplasie der Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Aufgrund der herabgesetzten NO-Bioverfügbarkeit wuchern die VSMCs im Bereich der Intervention und formen hier eine Neointima, die wiederum zu Stenosen führen kann. Um dieses Problem zu umgehen, werden seit Anfang der 1980er Jahre im Rahmen einer PTA häufig zusätzlich Stents eingesetzt, die den behandelten Gefäßabschnitt offen halten sollen<sup>108 109 110</sup>. Jedoch liegt die Rate der Stentthrombosen bei einem Einsatz von konventionellen unbeschichteten Stents (*bare metal stents*, BMS) bei 25%<sup>111</sup>. Deshalb wird bei Stentimplantation stets als zusätzliche systemische Therapie die duale Thrombozytenaggregationshemmung (DTAH), eine Kombinationstherapie aus Acetylsalicylsäure und Thienopyridinderivaten, eingesetzt. Dadurch ist es möglich, die Stentthromboserate auf 1% zu senken<sup>112 113 114</sup>. Aufgrund des Fremdkörperreizes, den der BMS ausübt, kommt es allerdings in bis zu 30% der Fälle in den ersten sechs Monaten nach Implantation zur Stentstenose durch VSMC Hyperplasie, unter anderem auch aufgrund der herabgesetzten NO-Bioverfügbarkeit<sup>115 116 117</sup>. Um dieses Problem zu umgehen, werden seit einiger Zeit neben den BMS auch mit Medikamenten beschichtete Stents (*drug eluting stents*, DES) eingesetzt. So sind DES, die mit dem immunsuppressiven Wirkstoff Sirolimus oder dem Zytostatikum Paclitaxel beschichtet sind, erhältlich. Obwohl in Deutschland bei etwa 80% der PTAs Stents implantiert werden und bei der Hälfte dieser Implantationen DES verwendet werden, bleibt das Problem der Stentstenose aufgrund des fortwährenden Fremdkörperreizes in bis zu 10% der Fälle bestehen<sup>107 118</sup>. Um dieses Problem als auch das der Neointimaformation zu lösen, wäre eine Kombination der bisher eingesetzten PTA-Interventionen mit einer Strategie zur Wiederherstellung des Endothels und zur Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit wünschenswert (vgl. 1.2.1 sowie 1.2.1.1).

#### **1.2.1.1 Gen- und Zelltherapie als zusätzliche Therapieoption bei der Behandlung von Atherosklerose**

Wie unter 1.2 und 1.2.1 beschrieben, nimmt die herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit sowohl während der Pathogenese der Atherosklerose als auch im Hinblick auf Komplikationen bei der Atherosklerosetherapie eine Schlüsselrolle ein. Folglich wäre eine Strategie hilfreich, die die NO-Synthese in den Gefäßabschnitten, die endotheliale Dysfunktion aufweisen oder durch PTA-Interventionen stark geschädigt wurden, steigert und somit eine physiologische

Endothelfunktion wiederherstellt. Denkbar wäre etwa eine Gentherapie, um in frühen Stadien der endothelialen Dysfunktion die NO-Synthese zu forcieren und somit das Fortschreiten der Atheromformation einzudämmen. In Stadien, in denen das Endothel bereits unwiederbringlich geschädigt ist, etwa nach PTA-Intervention, könnte eine Zellersatz-Therapie mit Endothelzellen die Rate an Komplikationen, wie Neointimaformation oder Stentstenosen, verringern.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits an der Etablierung eines gentherapeutischen Ansatzes gearbeitet. So konnten Lake-Bruse *et al.* zeigen, dass Aortensegmente von eNOS  $-/-$  Mäusen *in vitro* mit Hilfe adenoviraler Vektoren, die eine eNOS-ExpressionKassette tragen, transduziert werden können <sup>119</sup>. Die Gefäßsegmente konnten, dies zeigten Kraftmessungen im Drahtmyographen, durch diese Behandlung in ihrer Funktion positiv beeinflusst werden. Auch in *in vivo* Ansätzen wurde bereits gezeigt, dass das Einschleusen von Fremd-DNA in Endothelzellen mit Hilfe viraler Vektoren möglich ist. So konnten Qian *et al.* durch Applikation von Hantavirus-pseudotypisierten Lentiviren eine Überexpression von ecSOD in Endothelzellen und VSMC von durch Ballonkatheter-Dilatation geschädigten Karotiden in Kaninchen nachweisen <sup>120</sup>. Durch diese Strategie konnte die Neointimaformation in den geschädigten Gefäßen reduziert werden. Allerdings war die Transduktionsrate recht gering und in ungeschädigten Karotiden mit intaktem Endothel kaum detektierbar. Eine Lösung, die die effiziente Transduktion von Endothel von Blutgefäßen erlaubt, gilt es demnach noch zu finden.

Auch die Strategie des Zellersatzes zur Reendothelialisierung von Gefäßen wurde bereits untersucht. Die Arbeitsgruppe Bender konnte durch Transplantation von autologen Endothelzellen die Morphologie von durch Ballonkatheter-Applikation geschädigten Iliofemoralarterien in Kaninchen verbessern <sup>121</sup>. Allerdings wurde zum Zwecke der Zelltransplantation der Blutfluss im Strömungsgebiet der A. iliaca externa und der A. femoralis unterbrochen. Für eine Anwendung als mögliche Atherosklerose-Therapie in der Arteria carotis communis ein nur schwer durchzuführender Ansatz, der mit großen Risiken verbunden ist. Andere Arbeitsgruppen haben versucht, Strategien zu entwickeln, BMS mit Endothelzellen zu besiedeln <sup>122 123</sup>. Allerdings waren diese Ansätze durch die geringe Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen limitiert und auch ein unspezifisches Anhaften von proinflammatorischen Zellen an den Stents stellte sich als problematisch dar <sup>124</sup>. Auch für die Zellersatztherapie muss demnach noch eine Lösung gefunden werden, die die effiziente Reendothelialisierung von Blutgefäßen erlaubt.

Weiterhin haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der forcierten Induktion von Kollateralbildung zur Behandlung von pAVK beschäftigt. Die systemische Gabe von Plasmid-DNA oder adenoviralen Vektoren mit VEGF-Expressionkassette stellte sich allerdings als wenig erfolgreich heraus, da die angewandte Verabreichungsform zur systemischen Verteilung der eingebrachten Agenzien führte und die Konzentration von Vektoren am Zielgewebe dementsprechend gering ausfiel<sup>6 125</sup>. Intramuskuläre Applikation von VEGF-tragenden Vektoren brachte zwar eine Verbesserung der Transduktionseffizienz mit sich, aber es wurden weiterhin Effekte in ektopischem Gewebe beobachtet<sup>126 127 128</sup>.

Allen oben vorgestellten Strategien zum Gentransfer oder Zellersatz ist gemeinsam, dass sie hinsichtlich Lokalisierbarkeit, Effizienz und Gewebespezifität optimiert werden müssen. Nur so kann eine maximale, ortsspezifische Wirkung im gewünschten Gefäßsegment erzielt werden, während die systemischen Nebenwirkungen so gering wie möglich gehalten wird<sup>6 129</sup>. Es gilt demnach einen neuen Ansatz zu etablieren, der diese Limitationen von Gentransfer oder Zellersatz in Blutgefäßen überwindet. Eine Möglichkeit zur Optimierung von gen- und zelltherapeutischen Strategien wäre etwa der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln in Kombination mit magnetischen Federn.

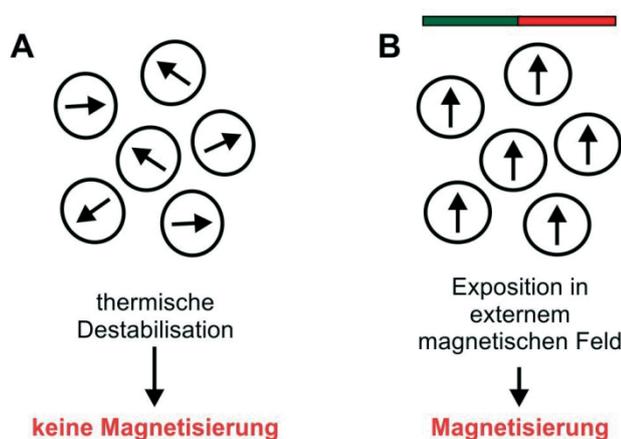
### 1.3 Magnetische Nanopartikel

Das Feld der Nanotechnologie und der Nanobiotechnologie hat in den letzten 20 Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Indikatoren zeigen, dass diese Arbeitsbereiche immer mehr Relevanz erlangen. Im Jahr 1999 wurden Nanotechnologie *start-up*-Unternehmen mit etwa 800 Millionen Euro gefördert<sup>130</sup>. Die Präsenz von Nanotechnologie und Nanobiotechnologie in den US-Medien stieg von etwa 200 Erwähnungen im Jahr 1995 auf über 4000 im Jahr 2002<sup>130 131</sup>. Allein in den USA wurden seit August 2008 884 neue US-Patente veröffentlicht, die das Wort Nanopartikel enthielten<sup>130</sup>. Diese Aspekte verdeutlichen, wie viel Potential im Bereich der Nanotechnologie und der Nanobiotechnologie liegt.

Vor allem Nanopartikel haben einen großen Anwendungsbereich in der biomedizinischen Forschung und kommen teilweise auch bereits bei klinischen Applikationen zum Einsatz. In der heterogenen Gruppe der Nanopartikel gibt es wiederum eine Klasse an Partikeln, die sich aufgrund Ihrer physikalischen Eigenschaften besonders für den Einsatz in Forschung und Klinik eignen: die magnetischen Nanopartikel (MNP).

Das wichtigste Charakteristikum von MNPs ist ihre Größe. Diese liegt im Nanobereich zwischen 1 bis 100 nm<sup>132</sup>. Diese geringe Größe beeinflusst die physikalischen Eigenschaften der Partikel weitreichend und bedingt, dass sie sich grundlegend anders verhalten als größere Einheiten des Materials, aus dem sie hergestellt sind. Da MNPs kleiner sind als eine einzelne magnetische Domäne, ein sogenannter Weiss-Bezirk, sind sie bei Raumtemperatur superparamagnetisch. Bei solchen superparamagnetischen Partikeln ist die normale Raumtemperatur ausreichend, um zu einer thermischen Destabilisation der magnetischen Domänen zu führen. Die einzelnen magnetischen Dipole können sich nicht mehr ausrichten und die resultierende Magnetisierung ist gleich null<sup>133 134</sup> (Abbildung 6, A). Bei Exposition in einem externen magnetischen Feld hingegen richten sich die magnetischen Domänen entsprechend aus und die superparamagnetischen Partikel entwickeln ein magnetisches Moment<sup>133 134</sup> (Abbildung 6, B). Diese Magnetisierung geht verloren, wenn das externe Feld entfernt wird. Superparamagnetische Nanopartikel verlieren ihren Magnetismus auch unterhalb der für die einzelnen Materialien charakteristischen Curie-Temperatur (z.B.  $T_c(\text{Fe}): 768^\circ\text{C}$ )<sup>134</sup>. Bei größeren Strukturen, etwa einem Eisennagel, ist dies nur der Fall, wenn die Umgebungstemperatur oberhalb der jeweiligen Curie-Temperatur liegt<sup>135 136</sup>.

MNPs, die in Forschung oder Klinik zum Einsatz kommen, sollen eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Hier hat sich der Einsatz von Eisen-basierten MNPs gegenüber weitaus toxischeren MNPs, die auf Basis von Übergangsmetallen hergestellt werden, durchgesetzt. Die kritische Größe, bis zu welcher solche MNPs auf Basis von Eisen superparamagnetisches Verhalten aufweisen, liegt bei ca. 70 nm<sup>134</sup> (vgl. 3.1.9).



**Abbildung 6: Superparamagnetismus bei MNPs**

Die einzelnen Kreise stellen MNPs dar, die aufgrund ihrer geringen Größe eine einzelne magnetische Domäne repräsentieren. **A:** Bei Raumtemperatur und ohne Präsenz eines externen magnetischen Feldes ordnen sich die Dipole der Partikel aufgrund von thermischer Destabilisation nicht gleichmäßig an. Es entsteht kein

magnetisches Moment. **B:** Bei Anwesenheit eines externen magnetischen Feldes richten sich die Dipole der Partikel in diesem aus, und es entsteht ein magnetisches Moment. Wird das externe Feld entfernt, gehen die Partikel wieder in den ungeordneten Zustand (A) über und die Magnetisierung geht verloren.<sup>133 134</sup>

Neben dem magnetischen Kern ist die Hülle der Partikel ein weiterer wichtiger Aspekt beim Design von MNPs. So werden zum Beispiel die Stabilität der Partikel aber auch deren magnetischen Eigenschaften stark von der Beschichtung beeinflusst. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass im Besonderen die Beschichtung mit Phosphonaten den Magnetismus der Partikel nicht negativ beeinflusst<sup>137</sup> (vgl. 3.1.9). Natürlich ist die Beschichtung der Nanopartikel auch deshalb von besonderer Bedeutung, weil sie die Kommunikationsfläche des Partikels zur Umgebung darstellt. Vor allem bei funktionalisierten MNPs, welche z.B. mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, ist die Zusammensetzung und das Design der Nanopartikelhülle von entscheidender Bedeutung<sup>134 138</sup>. Bei biologischen Applikationen hat sich der Einsatz von mit Siliziumoxid beschichteter Partikel als besonders positiv herausgestellt. Sie weisen eine hohe Biokompatibilität auf und lassen sich weiterhin relativ einfach mit anderen biologischen Molekülen konjugieren<sup>139 140 141</sup> (vgl. 3.1.9).

Aufgrund der vielen verschiedenen Möglichkeiten, Nanopartikel zu funktionalisieren, etwa mit Antikörpern, ist das Einsatzgebiet von MNPs in Forschung und Klinik weit gefächert. So werden sie zum Beispiel zur molekularen Detektion von Proteinen, DNA und verschiedenen Pathogenen eingesetzt<sup>142 143 144 145</sup>. Auch eine auf MNPs basierende magnetische Separation von Gemischen zur Aufreinigung und Anreicherung von Proteinen, RNA, DNA sowie ganzen pro- und eukaryotischen Zellen wird zum Teil bereits standardmäßig im Labor eingesetzt<sup>146 147 148 149</sup>. Die MNP-basierten Methoden der Detektion und Separation haben einige Vorteile gegenüber den konventionellen Methoden. Sie verlangen nicht nach einer aufwendigen Aufarbeitung der Proben oder nach hochspezialisiertem Equipment, es ist möglich, auch kleinste Probenvolumina zu untersuchen, und sie sind relativ preisgünstig<sup>134</sup>. Eisen-basierte Nanopartikel werden außerdem bereits erfolgreich zur Kontrastverstärkung bei magnetresonanztomographischen Messungen verwendet (Partikel aus Ferumoxid wie Endorem®<sup>150</sup>, Partikelgröße: 120 bis 180 nm; Partikel aus Ferucarbotran wie Resovist®, Partikelgröße 60 nm)<sup>151 152 153</sup>. Auch im Rahmen einer gezielten Pharmakotherapie kommen bereits wirkstoffreisetzende MNPs zum Einsatz. Das Prinzip hierbei ist die Kombination von MNPs, die durch die Funktionalisierung ihrer Oberfläche gezielt an bestimmte Zelltypen, z.B. Tumorzellen, binden, mit einem pharmakologischen Wirkstoff, z.B. einem Chemotherapeutikum<sup>134</sup>. So kann bei systemischer Verabreichung von MNP-gebundenen

Zytostatika, wie etwa Paclitaxel oder Doxorubicin, die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen sowie auch die benötigte Dosis reduziert werden<sup>154</sup>. In der Krebstherapie haben sich Nanopartikel ebenfalls bereits bewährt. Die Methode beruht der Übertragung von Energie auf in das Tumorgewebe eingebrachten superparamagnetischen Nanopartikel durch direkte Exposition gegenüber einem magnetischen Wechselfeld. Die resultierende Hyperthermie schädigt die Tumorzellen irreparabel (Thermoablation) oder sie werden empfindlicher gegenüber einer begleitenden Radio- oder Chemotherapie (Hyperthermie)<sup>134</sup>.

### 1.3.1 MNPs in der Gen- und Zelltherapie

Ein weiteres Einsatzgebiet für MNPs ist die MNP-unterstützte genetische Manipulation von Zellen, die Magnetofektion.

Das Einbringen von Fremd-DNA, von sogenannten Transgenen, in Zellen wird bereits seit längerer Zeit standardmäßig im Labor genutzt sowie auch klinisch im Rahmen der Gentherapie eingesetzt<sup>155 156</sup>. Hierbei werden sowohl die Transfektion als auch die Virus-vermittelte Transduktion genutzt. Der limitierende Faktor dieser Verfahren ist die recht geringe Effizienz der DNA-Aufnahme durch die Zielzelle bzw. durch das Zielgewebe sowie auch die stark eingeschränkte Lokalisierbarkeit der Transfektion oder Transduktion<sup>157</sup>. Um diese beiden Probleme zu umgehen, gibt es seit Mitte der 1990er Jahre den Ansatz, einzubringende Fremd-DNA an MNPs zu koppeln<sup>157</sup>. Durch Applikation eines geeigneten magnetischen Feldes können dadurch Nukleinsäuren, die an MNPs gekoppelt wurden, zu ihrer Zielstruktur geleitet werden. Dadurch wird zum einen eine zielgerichtete Positionierung der Vektoren ermöglicht und gleichzeitig eine Steigerung der Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz *in vitro* und *in vivo* erreicht<sup>158 159 160</sup>. Seitdem ist der Begriff Magnetofektion für die kombinierte Anwendung von Nukleinsäuren, MNPs und einem magnetischen Feld gebräuchlich<sup>161</sup>.

Bei der Wahl der Vektoren, die zum Einbringen der fremden Nukleinsäuren in die Zelle nötig sind, bieten virale Vektoren einige Vorteile gegenüber nicht-viralen Vektoren, denn sie führen zu einer effizienteren und stabileren Transgenexpression<sup>156</sup>. In der Gruppe der verschiedenen viralen Vektoren haben vor allem die auf dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) basierenden Vektoren einige Eigenschaften, die sie als besonders geeignet für den Einsatz als Gentransfer-*shuttle* ausweisen<sup>156 162</sup>. So infizieren die zur Familie der Retroviren und zur Gattung der Lentiviren zählenden HI-Viren sowohl mitotische Zellen, als auch Zellen, die sich nicht im Zellzyklus befinden. Weiterhin integrieren sie das Transgen,

welches sie tragen, stabil als Provirus in das Genom der infizierten Zelle, was zu einer langen Transgenexpression durch die Wirtszelle führt. Und schließlich sie sind nur sehr schwach immunogen<sup>156 162 163 164</sup>. Durch Einbringen des Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) in die Virushülle konnten sogenannte VSV-G pseudotypisierte HI-Viren generiert werden, die einen sehr breiten Wirtszelltropismus aufweisen<sup>165</sup>.

Die Methode des magnetischen *targeting* von Nukleinsäuren wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich zur effizienten Transduktion von kultivierten Endothelzelllinien genutzt<sup>166 160</sup>. Auch in verschiedenen *in vivo* Ansätzen konnten bereits mit Hilfe der Magnetofektion unterschiedliche Gewebe, wie etwa das Gefäßendothel, zielgenau, wenn auch nur punktuell, transduziert werden<sup>167</sup>. Grundlegend für die zielgenaue Positionierung und damit lokale Anreicherung der mit Nukleinsäuren beladenen MNPs ist ein externer magnetischer Feldgradient<sup>134 154</sup>. Mit Hilfe des magnetischen Gradienten können die superparamagnetischen MNPs zu ihrem Zielgewebe geleitet und dort akkumuliert werden. Eine genaue Berechnung und Adaptation des magnetischen Feldes an die jeweilige Zielstruktur ist essentiell für den Erfolg der Magnetofektion<sup>168 169</sup>.

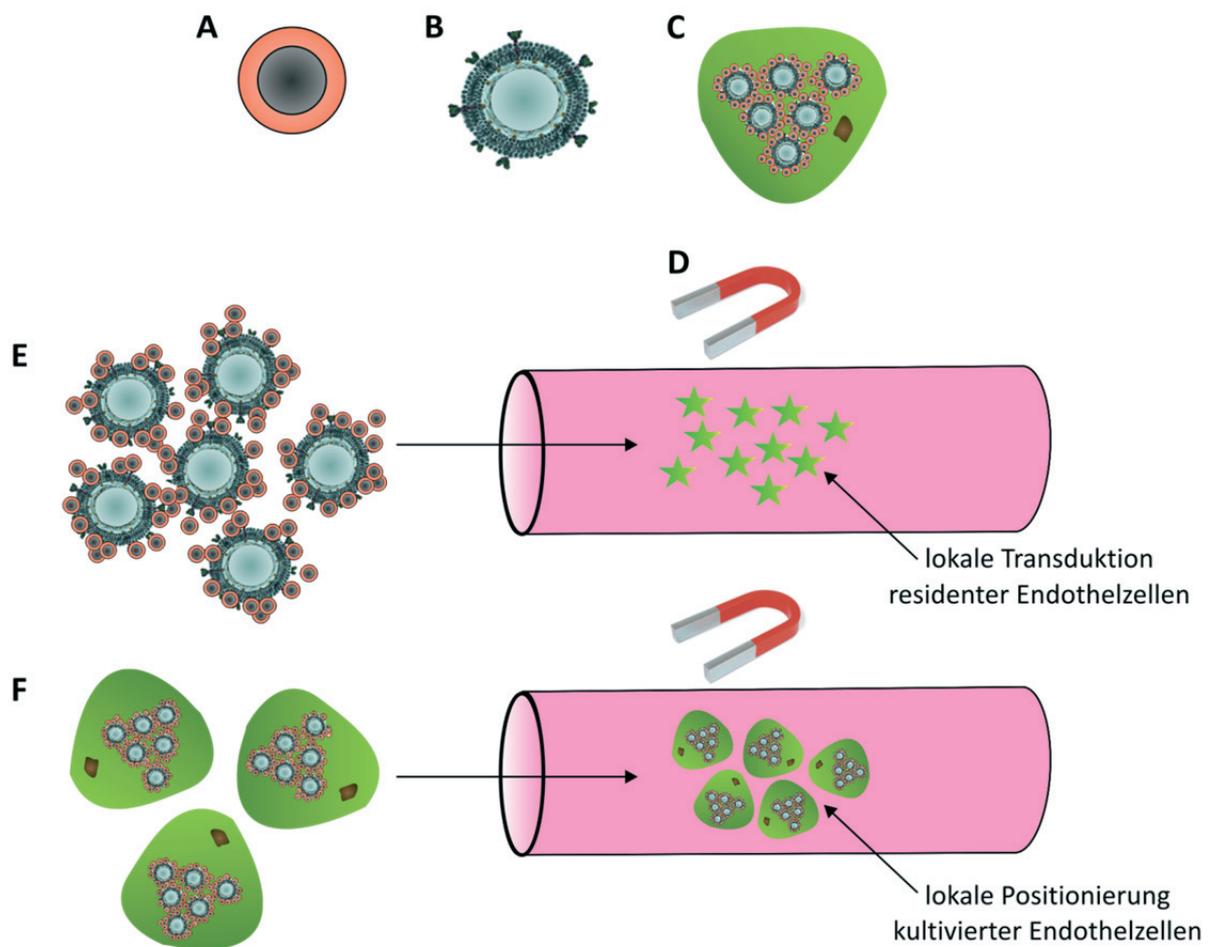
Ein weiterer Vorteil der Magnetofektion kultivierter Zellen ist deren Magnetisierung durch die Aufnahme von MNPs in das Zytoplasma. Dadurch wird es möglich, diese Zellen Magnetgestützt zielgenau zu positionieren<sup>124 168 166 170 171</sup>.

## 2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Methode zur Gentransfer- und Zellersatztherapie im Blutgefäß unter Flussbedingungen zu etablieren. Hierzu wurden lentivirale Vektoren, MNPs und magnetische Felder miteinander kombiniert, um das Endothel als primäre Zielgewebe zu erreichen und die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zum Gentransfer und Zellersatz in Blutgefäßen in ihrer Lokalisierbarkeit, Effizienz und Spezifität zu verbessern. Es wurden zwei Strategien verfolgt: die Magnet-gestützte direkte Transduktion des Endothels mit Hilfe von magnetischen Komplexen sowie die Magnet-gestützte Positionierung von magnetofizierten Endothelzellen unter Flussbedingungen (Abbildung 7). Im Rahmen der direkten Transduktion wurden residente Endothelzellen einer Mauseorta mit Hilfe von magnetischen Komplexen bestehend aus superparamagnetischen Nanopartikeln und lentiviralen Vektoren mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes zielgerichtet transduziert (Abbildung 7, E). Bei der Zellpositionierung wurden dieselben Komplexe zur Magnetofektion von in Kultur gehaltenen Endothelzellen genutzt. Durch die Aufnahme der Komplexe wurden die Zellen transduziert und im selben Schritt magnetisiert. Dadurch wurde eine zielgerichtete Positionierung dieser Zellen in einer zuvor deendothelialisierten Mauseorta mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes ermöglicht (Abbildung 7, F). Um eine möglichst effiziente Transduktion bzw. Wiederbesiedelung des Blutgefäßes zu erzielen, wurde ein speziell berechnetes Magnetfeld genutzt, das eine radialsymmetrische Anlagerung von Komplexen und Zellen erlaubte. Der Ansatz der Magnet-gestützten Zellpositionierung wurde weiterführend auch für ein *in vivo* Model adaptiert, um die Anwendbarkeit dieser Strategie unter physiologischen Blutfluss- und Blutdruckbedingungen zu testen. Hierbei wurden magnetisierte Zellen unter Flussbedingungen entlang der Wand der denudierten Arteria carotis communis (ACC) der Maus positioniert. Bei der Transduktion bzw. Magnetofektion wurde besonderes Augenmerk auf solche Gene gelegt, die sich im Rahmen einer Therapie von Gefäßerkrankungen als hilfreich erweisen könnten, wie etwa das eNOS- oder das VEGF-Gen.

Die beiden hier beschriebenen Strategien können langfristig zu einer neuen oder ergänzenden Therapiestrategie bei der Behandlung von Gefäßerkrankungen, zum Beispiel Atherosklerose, führen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Magnet-gestützte, zielgerichtete Gentherapie, die direkte Transduktion, kann in frühen Phasen der Pathogenese der Atherosklerose zum Einsatz kommen und einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirken

(vgl. 1.2). Die Magnet-gestützte, zielgerichtete Zellersatztherapie, die Positionierung von Endothelzellen, kann in Kombination mit einer PTA-Intervention durchgeführt werden, um die Reendothelialisierung zu fördern und Neointimaformation und Restenosen zu verhindern (vgl. 1.2.1). Beide Strategien können durch die Verwendung von MNPs in Kombination mit magnetischen Feldern in ihrer Lokalisierbarkeit, Effizienz und Spezifität optimiert werden. So kann eine maximale Wirkung im gewünschten Gefäßsegment erzielt werden, während unerwünschte, systemische Wirkungen so gering wie möglich gehalten werden (vgl. 1.2.1.1).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verfolgten Strategien**

**A:** Darstellung eines superparamagnetischen Nanopartikels. **B:** Darstellung eines Lentivirus, wie er als Transgenvektor genutzt wurde. Durch das Einbringen verschiedener Transgen-tragender Plasmide in das Virus konnten je nach Fragestellung verschiedenen Gene übertragen werden. **C:** Darstellung einer Endothelzelle, die Magnet-gestützt magnetische Komplexe aufgenommen hat, welche nun im Zytoplasma der Zelle vorliegen. Durch diese Behandlung wurde die Zelle gleichzeitig transduziert und magnetisiert. **E:** Die Strategie der direkten Endotheltransduktion (Gentherapie): magnetische Komplexe bestehend aus MNPs und Lentiviren werden unter Flussbedingungen in ein Gefäß eingebracht und mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes zielgerichtet positioniert. Dadurch wird das residente Endothel transduziert und exprimiert das gewünschte Transgen (dargestellt durch einen grünen Stern). **F:** Die Strategie der Zellpositionierung (Zellersatztherapie): die wie unter C erläuterten präparierten Zellen werden unter Flussbedingungen in ein denudiertes Gefäß eingebracht und mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes zielgerichtet entlang der Gefäßwand positioniert.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Verwendete Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
A/D-Wandler PowerLab4125	AD Instruments (Spechbach, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Fluoreszenzlampe ebq 100	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Fluoreszenzlampen XBO 75	Zeiss (Jena, Deutschland)
Fluoreszenz Stereomikroskop Leica MZ 16F	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gelkammern für Elektrophorese	BioRad (München, Deutschland)
Glasperlensterilisator Steri250	Simon Keller (Burgdorf, Schweiz)
Haereus Kleinbrutschrank B15	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HERAguard Reinluftwerkbank HPH4	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Kaltlichtquelle KL1500LCD	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kühlschränke (4°C)	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
LED Lichtquelle für Stereolupe LED3000SLI	Leica (Wetzlar, Deutschland)
LötKolben WHS 40D	Weller (Besigheim, Deutschland)
Magnethalterung	Riedmüller Kunststofftechnik (Radolfzell, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Observer Z1	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskopkamera ProgRes C10+	Jenoptik (Jena, Deutschland)
Multi Myograph System 610M / 620M	Danish MyoTechnology (Aarhus, Dänemark)
PCR-Gerät	Biometra (Göttingen, Deutschland)
PCR-Gerät, Realtime Rotor Gene Q	Corbett Research, jetzt Vertrieb über Qiagen (Hilden, Deutschland)
Perfusionskammer	eigene Herstellung
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Gilson (Limburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Integra Bioscience (Fernwald, Deutschland)
Prolene Nahtmaterial	Johnson & Johnson (Livington, Schottland)
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Rollerpumpe ISM 832C	Ismatec (Wertheim, Deutschland)
Spannungsgerät PowerPAC HC	BioRad (München, Deutschland)
Spectrophotometer Nanodrop	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Stereolupe M3 und M8	Wild Heerbrugg (Heerbrugg, Schweiz)
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstofftank	TecLab
Thermoblock (mit Heiz-/Kühlfunktion)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)

Thermomixer HLC	Ditabis (Pforzheim, Deutschland)
Teewagen	Carl Roth (Karlsruhe Deutschland)
Tischzentrifuge 5424R (mit Kühlfunktion)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
TissueLyser LT	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vapor für Isofluran	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Vortexer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Western Blot Trans-Blot Turbo	BioRad (München, Deutschland)
Western Blot Zubehör	BioRad (München, Deutschland)
Wippe Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

### 3.1.2 Software

Bezeichnung	Lieferant
Axio Vision Release 4.8	Zeiss (Jena, Deutschland)
Chart v. 5.2. Software	AD-Instruments (Newton, USA)
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel Corporation (München, Deutschland)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
WCIF ImageJ	Wayne Rasband, National Institute of Mental Health (Bethesda, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
ProgRes Image Capture Software	Jenoptik (Jena, Deutschland)
Rotorgene-Q Series Software 1.7	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Deckgläser	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Dreiwegehahn Discifix C-3	Braun (Melsungen, Deutschland)
Dumont Pinzette, gerade	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Einwegskalpelle Nr. 10	Feather Safety Razor (Osaka, Japan)
Federstahldraht, nichtrostend (0,2 mm, 0,6mm und 0,8 mm Durchmesser)	HMC H.Meyer &Co. Spezialstahl GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Filterpapier	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Gelladepipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heidelberger Verlängerungen	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
ibiTreat $\mu$ -Slide 8well	ibidi (Martinsried, Deutschland)
Insektennadeln	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Irisschere	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Kanüle BD Microlance 3, 21G	BD (Heidelberg, Deutschland)
Magnetquader, 2 x 2 x 10 mm, NdFeB, Epoxid beschichtet, 35 N	HKCM (Eckernförde, Deutschland)
Microloader Gelladepipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nitrocellulosemembran Protran BA 85	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Omnifix Luer Lock solo Spritze, 10 ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Präparierschale, 6cm, Boden bedeckt mit Silikon	eigene Herstellung
Perfusorspritzen-Spritzen, 50 ml	Braun (Melsungen, Deutschland)

Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus (Winsen/Luhe, Deutschland)
Polyethylen Schlauch (1.14 mm Innendurchmesser, 1.57 mm Außendurchmesser)	Portex Smith Medical (Grasbrunn, Deutschland)
Polyethylen Schlauch (0.75 mm Innendurchmesser, 1.22 mm Außendurchmesser)	Portex Smith Medical (Grasbrunn, Deutschland)
Pumpenschlauch, Tygon, Red/Grey	Ismatec (Wertheim, Deutschland)
QIAshredder Säulen	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 4er Streifen für PCR	LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß, 0,2 ml und 0,5 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß, 2 ml mit abgerundetem Boden	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß, 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Schere	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Schnappdeckeldosen	Kartell Spa Labware Division (Noviglio, Italien)
Seidenfaden 6/0	Resorba (Nürnberg, Deutschland)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Stahlkugeln aus rostfreiem Edelstahl, 7 mm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Vanna's Mikroschere, gerade	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Venofix® Venenpunktionsbesteck mit 27G Nadel	Braun (Melsungen, Deutschland)
Wundnadeln, unsteril	Feuerstein Suprama (Belrin, Deutschland)
Zellkulturschale 60/15	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkultur Mikroplatte, 96-well	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

### 3.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Ammonium-Acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ )	A7330	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Acrylamid 4K-Lösung (40%); Mix 37,5:1	A1577	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat ( $\text{CH}_2\text{CO}_3\text{NH}_4$ )	A7330	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	215589	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammonium Fe(II) Sulfate Hexahydrat ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_6$ )	F3754	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
$\beta$ -Mercaptoethanol	M3148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Cefuroxim-ratiopharm® 1500 mg p.i.	Zu.-Nr. 38984.00.00	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Ciclosporin (Sandimmun®), 50 mg/ml		Novartis Pharma (Nürnberg,

		Deutschland)
DEPC Wasser	AM9906	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Diethylether	KMF.08-203	KMF Laborchemiehandel (St. Augustin, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
ECL Western Blotting Analysis System	RPN2109	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis	10981	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Entwickler für Röntgenfilme	P7042	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Eselserum	D9663	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol, 70%	27668	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Ethanol, 100%	5054.3	Carl Roth (Karlsruhe Deutschland)
Essigsäure (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H)	45727	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung, 1%	46067	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fixierer für Röntgenfilme	P7167	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	chargenabhängig	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	G4500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glyzin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	G8898	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Heparin-Natrium	PZN-03029843	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Hoechst 33342, 1 mg/ml	B2261	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hydroxylaminhydrochlorid (H <sub>4</sub> CINO)	159417	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	I5879	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Immersionsöl Immersol 518F	444962-0000-000	Zeiss (Jena, Deutschland)
Isofluran (Forene®)		Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	P9333	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	P5655	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumhexazyanoferat(II) (K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	P9387	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C4901	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-NAME (N-Nitro-L-Arginine Methylesterhydrochlorid)	N5751	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Magermilchpulver	1.15363.0500	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	M8266	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	M8150	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Metamizol (Novaminsulfon) 1 g/2 ml	PZN-6882768	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Methanol	A068	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	S5586	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumdeoxycholat (C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> )	D6750	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	S7907	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS, CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OSO <sub>3</sub> Na)	L4390	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	1.06498.0500	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Natriumpermanganat Monohydrat (MnNaO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O)	225851	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	11140-035	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penizillin/Streptomycin	15140-122	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
1,10-Phenanthrolinmonohydrat (C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O)	77500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Propanol	A0900	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitoren ohne EDTA	11873580001	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	P6126	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
RLT Lysepuffer	79216	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Salzsäure, rauchend	A0659	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	07208	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	T7024	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trichloressigsäure (TCA)	6399	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton-X100	93418	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	T5941	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Western Blot Marker Precision Plus Protein Standards, Daul Color	161-0374	BioRad (München, Deutschland)

## 3.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumazetat Puffer	25 g Ammoniumazetat 70 ml Essigsäure 110 ml H <sub>2</sub> O bidest.
DPBS	2,67 mM KCl 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137,93 mM NaCl 8,06 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Eisen-Standard-Lösung	392,8 ml Ammonium Fe(II) Sulfat Hexahydrat 2 ml konzentrierte Schwefelsäure Natriumpermanganat ad 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.
HBSS <sup>+/+</sup>	1,26 mM CaCl <sub>2</sub> 5,56 mM Glukose 5,33 mM KCl 0,441 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137,93 mM NaCl 4,17 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,338 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,493 mM MgCl <sub>2</sub> 0,407 mM MgSO <sub>4</sub>
Physiologische Salzlösung (PSS) mit geringer Ca <sup>2+</sup> Konzentration	118 mM NaCl 1,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM KCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,16 mM CaCl <sub>2</sub> 24 mM Hepes 10 mM Glukose pH 7,4
PSS mit normaler Ca <sup>2+</sup> Konzentration	118 mM NaCl 1,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM KCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 1,6 mM CaCl <sub>2</sub> 24 mM Hepes 10 mM Glukose pH 7,4 bei 37°C
RIPA-Puffer	2 mM EDTA 150 mM NaCl 25 mM Tris-HCl 10 % Glycerol 0,1% Natriumdeoxycholat 1% Nonidet P40 0,1% SDS pH 7,5
RNA-Lysepuffer	RLT Lysepuffer 1% β-Mercaptoethanol
Säurelösung für die Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung	3 M HCl 0,61 M TCA
SDS-Laufpuffer5 (10x)	1,92 M Glyzin 0,25 M Tris-HCl

	1% SDS pH 8,8
SDS-Probenpuffer (5x)	60 mM Tris-HCl 7,5% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau 30% Glycerol 15% SDS
Semidryblot-Puffer	192 mM Glyzin 25 mM Tris-HCl 20% Methanol 0,1% SDS pH 8,8
TBST (10x)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl 0,5% Tween20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Tankblotpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glyzin 0,01% SDS 20% Methanol pH 8,8
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8

### 3.1.6 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	41965-039	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Endothelial cell growth medium (ECGM)	201 0111	Provitro (Berlin, Deutschland)
Kollagen Typ I	08-115	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Opti-MEM, reduced serum medium, GlutaMAX	51985-026	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

#### 3.1.6.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
10% DMEM + IBMX	Inkubation von Aorten für cGMP-ELISA Messungen	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penizillin 100 $\mu$ m IBMX DMEM
20% DMEM	Kultivierung von Aorten nach Transduktion	20% (v/v) FKS 100 U/ml Penizillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol DMEM
Endothelzellmedium	Lagerung von Zellen zur Aortenperfusion	4,5% (v/v) Zusätze

		100/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin
Opti-MEM + P/S	Inkubation von Aortenringen für Angiogenese Assay	100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin Opti-MEM
5% DMEM	Inkubation von Aortenringen für VEGF-ELISA Messungen	5% (v/v) FKS 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin DMEM
Kollagengel	Matrix für Angiogenese Assay	1 mg/ml Kollagen DMEM

### 3.1.7 Primer

Alle Primer für die quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) wurden über QIAGEN (Hilden, Deutschland) bezogen.

Bezeichnung	Artikelnummer
18S-rRNA-Primer (murin) Mm_RN18s_2_SG Quantitect primer assay	QT01036875
eGFP-Primer Control_EGFP_1_SG Quantitect primer assay	QT01171611
eNOS-Primer (human) Hs_NOS3_1_SG Quantitect primer assay	QT00089033

### 3.1.8 Lentivirale Vektoren (LV)

Verwendet wurden selbst-inaktivierende (SIN), VSV-G pseudotypisierte Lentiviren (LV) der dritten Generation basierend auf dem lentiviralen rrl-Vektor<sup>162 156 172</sup>. Bei lentiviralen Konstrukten dieser Generation liegt der das Transgen tragende Vektor getrennt vom Vektor mit den Verpackungsplasmiden (pMDL/pRPE, RSV-rev, pMD.G) vor<sup>173</sup>. Die Virustitration wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt<sup>172</sup>. Gearbeitet wurde entweder mit dem biologischen Virustiter, der die Anzahl der infektiösen Viruspartikel (IPs) angibt. Im Falle eines Fehlens einer Expressionskassette für eGFP, wurde mit dem physikalischen Virustiter gearbeitet, der die gesamte Menge aller Viruspartikel (VPs) angibt.

Alle lentiviralen Vektoren (LV) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) produziert und zur Verfügung gestellt. Die Verpackungsplasmide wurden ursprünglich von Dr. Inder M. Verma (The Salt Lake Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, La Jolla, USA) etabliert.

#### 3.1.8.1 Eingesetzte LV zur Übertragung verschiedener Transgene

- rrl-CMV-eGFP (CMV-eGFP LV)

Expression der verstärkten Variante des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) unter dem Cytomegalivirus (CMV) Promoter. Der eGFP-Vektor wurde ebenfalls von Dr. Inder M. Verma zur Verfügung gestellt. Für lentivirale Partikel mit diesem Transgen ist in der Literatur ein Partikeldurchmesser von  $158 \pm 18$  nm in HBSS<sup>++</sup> beschrieben<sup>170</sup> (vgl. 1.3).

- rrl-CMV-eNOS (CMV-eNOS LV)

Expression der humanen eNOS unter dem CMV-Promoter.

- rrl-CMV-eNOS-IRES-eGFP (CMV-eNOS-IRES-eGFP LV)

Expression der humanen eNOS unter dem CMV-Promoter. Über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) wird zusätzlich eGFP exprimiert.

- rrl-CMV-VEGF165(hu) (CMV-VEGF LV)

Expression von humanem VEGF unter dem CMV-Promoter.

- rrl-156 (rrl-156 LV)

Leerer lentiviraler Vektor ohne Transgen.

### **3.1.8.2 pCHIVeGFP Lentivirus (pCHIV LV)**

Bei diesem lentiviralen Vektor handelt es sich um eine nicht zur Integration befähigte, leere Virushülle ohne Transgen<sup>174</sup>. Die Virushülle ist mit eGFP-Protein assoziiert. Dadurch wird es möglich, die Verteilung der Viruspartikel sofort anhand der eGFP-Fluoreszenz zu beurteilen, ohne eine Transgenexpressionszeit abwarten zu müssen. Der pCHIV LV wurde ursprünglich von Prof. Kräusslich (Institut für Virologie, Universität Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

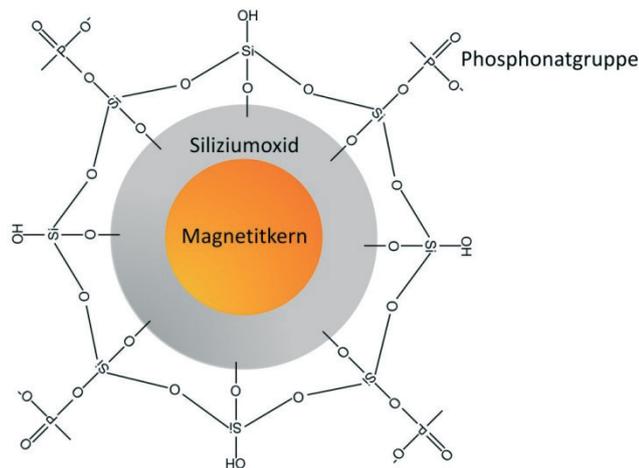
### **3.1.9 Magnetische Nanopartikel (MNPs)**

Die Herstellung und nähere Charakterisierung der superparamagnetischen Nanopartikel erfolgte durch Dr. Olga Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München). In allen nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde SO-Mag5 als Partikel der Wahl eingesetzt<sup>175</sup> (Abbildung 8). Es handelt sich um einen Nanopartikel vom *core-shell-type*. Der Partikelkern besteht aus Magnetit ( $\text{Fe(II)Fe(III)}_2\text{O}_4$ ). Magnetit ist eine Oxidmodifikation von Eisenoxid und hat magnetische Eigenschaften. Aufgrund der geringen Größe des Partikelkerns von 7 nm können die SO-Mag5 Nanopartikel als superparamagnetisch bezeichnet werden (vgl. 1.3). Sie zeigen eine sehr geringe Magnetisierung in Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes und eine hohe Magnetisierung bei einem angelegten magnetischen Feld. Die Hülle

der Nanopartikel setzt sich aus Siliziumoxid und Phosphonatgruppen zusammen. Die Hüllschicht entsteht bei Kondensation von Tetraethylorthosilikat (TEOS) und Propylmethylphosphonat (THPMP). In nachfolgender Tabelle sind die wichtigsten physikalischen Eigenschaften der SO-Mag5 Nanopartikel sowie auch die Größe und das elektrokinetische Potential von Komplexen bestehend aus MNPs und LV am Beispiel von CMV-eGFP LV zusammengefasst <sup>170</sup>.

	SO-Mag5	Komplexe aus SO-Mag5 und CMV-eGFP LV
Kerndurchmesser [nm]	6,8 nm ( $d_{\text{TEM}}: 6,7 \pm 1,5$ )*	-
Hüllschicht	Siliziumoxid mit Phosphonatgruppen an der Oberfläche ( $\text{SiO}_x/\text{Phosphonate}$ )	-
durchschnittliches Eisengewicht pro Partikel $P_{\text{part}}^{\text{Fe}}$ (g Fe / Partikel)	$2,8 * 10^{-18}$	-
Sättigungsmagnetisierung $M_s$ [ $\text{A m}^2/\text{kg}$ (Fe)]	94	-
Magnetsches Moment $m_{\text{eff}}$ [ $\text{A m}^2$ ]	$3,3 * 10^{-19}$	$3.3 * 10^{-15}$
elektrokinetisches Potential in HBSS <sup>++</sup> [mV]	$-9,2 \pm 0,4$	$-12.8 \pm 1.7$
durchschnittlicher hydrodynamischer Durchmesser HBSS <sup>++</sup> [nm]	$40 \pm 14$	450

\* durchschnittlicher Kerndurchmesser ermittelt per Transmissionselektronenmikroskopie <sup>175</sup>



#### Abbildung 8: Schematische Darstellung von SO-Mag5

In allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde als superparamagnetischer Nanopartikel der Wahl SO-Mag5 eingesetzt. Der 7 nm große Magnetitkern des Partikels ist von einer ca. 1 nm dicken Hülle aus Siliziumoxid umgeben, an die pro Partikel etwa 500 Phosphonatgruppen gebunden sind. <sup>175</sup>

### 3.1.10 Antikörper

#### 3.1.10.1 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Anti-Maus- $\alpha$ -glatte Muskulatur-Aktin ( $\alpha$ smac) Antikörper aus der Maus (1:800)	A5228	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-human-eNOS Antikörper aus der Maus (1:1500) (eNOS human)	110297	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Maus-PECAM / CD31 Antikörper aus der Ratte (1:800) (PECAM murin)	550274	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Rind-PECAM / CD31 Antikörper aus dem Kaninchen (1:500) (PECAM bovin)	-	Dr. Peter Newman (University of Wisconsin, USA)
Anti-human-VEGF Antikörper aus dem Kaninchen (1:200) (VEGF human)	sc-152	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)

#### 3.1.10.2 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Cy3-gekoppelter anti-Maus Antikörper aus dem Esel (1:400)	715-165-151	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Cy5-gekoppelter anti-Maus Antikörper aus dem Esel (1:400)	715-175-151	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Cy3-gekoppelter anti-Ratte Antikörper aus dem Esel (1:400)	712-165-153	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Cy5-gekoppelter anti-Ratte Antikörper aus dem Esel (1:400)	712-175-153	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper aus dem Esel (1:400)	711-165-152	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Cy5-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper aus dem Esel (1:400)	711-175-152	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)

#### 3.1.10.3 Primäre Antikörper für Western Blot-Experimente

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Peroxidase-gekoppelter anti- $\beta$ Aktin Antikörper (1:40000)	A3854	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Peroxidase-gekoppelter anti-eNOS Antikörper (1:1000)	Sc-654	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
Anti-eGFP Antikörper aus der Maus (1:1000)	632381	Takara Bio Europe / Clontech Laboratories (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

#### 3.1.10.4 Sekundäre Antikörper für Western Blot-Experimente

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper (1:1000)	115-035-146	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)

### 3.1.11 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 8-12 Wochen alte Mäuse verschiedener Stämme verwendet. CD1 wt Mäuse (CD1) sowie C57/Bl6 J Mäuse (Bl6) wurden über Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Ein eNOS-defizienter Mausstamm (eNOS<sup>-/-</sup>) auf Hintergrund eines C57/Bl6 Mausstammes wurde am Institut selbst gezüchtet. Die eNOS<sup>-/-</sup> Elterntiere wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Gödecke (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt<sup>176</sup>. Die Tierhaltung sowie alle Tierexperimente und Organentnahmen wurden nach den Leitlinien für tierexperimentelles Arbeiten der Universität Bonn und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Sie wurden weiterhin durch die lokale Ethikkommission nach §15-Tierschutzgesetz und das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW bzw. die zuständige Kreisordnungsbehörde genehmigt (Aktenzeichen des Tierversuchs: 87-51.04.2010.A087).

## 3.2 *Ex vivo* Perfusionsexperimente

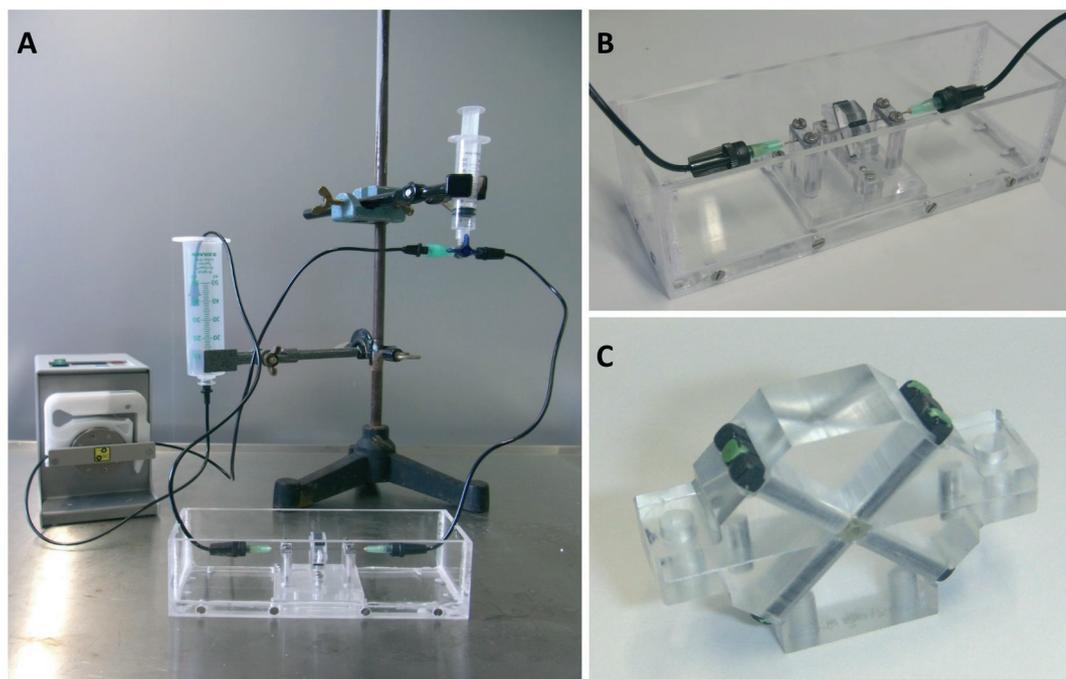
Alle Perfusionsexperimente wurden mit Hilfe des *ex vivo* Perfusionssystems durchgeführt (Abbildung 9). Für erste Experimente wurde Polyethylenschlauch als Gefäßersatz verwendet. Im weiteren Verlauf wurden Mausearten eingesetzt. Im Rahmen der Aortenperfusionsexperimente wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt (vgl. 2). Zum einen wurden Aorten mit magnetischen Komplexen bestehend aus LV und MNPs perfundiert, um eine Transduktion der residenten murinen Endothelzellen zu erreichen. Zum anderen wurden deendothelialisierte Aorten mit zuvor transduzierten und mit MNPs beladenen, magnetischen Endothelzellen perfundiert. Ziel bei diesem Ansatz war es, eine Rebesiedelung der Gefäßwand mit Zellen zu erzielen.

Die Präparation und Bereitstellung der Zellen erfolgte freundlicherweise durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn).

### 3.2.1 *Ex vivo* Perfusionssystem und Perfusionskammer

Das *ex vivo* Perfusionssystem (Abbildung 9 (A)) wurde sowohl für die Perfusion von Polyethylenschläuchen als auch für die Perfusion von Mausearten verwendet<sup>167 166 170 169</sup>. Es setzt sich aus einem System verschiedener Schläuche, einem Droplet, einer Druckausgleichspritze, einem Dreiwegehahn sowie einer Rollerpumpe zusammen. Durch den

Gebrauch von steril verpackten Einmalartikeln konnte für jede Perfusion ein neues, sauberes Schlauchsystem verwendet werden. Einen weiteren Teil des *ex vivo* Perfusionssystems stellt die Perfusionskammer dar (Abbildung 9 (B)). In dieser können zwei abgelenkte, stumpfe Kanülen (21G) fixiert werden, auf die dann die zu perfundierenden Schläuche bzw. Aorten aufgezogen werden können. Im Falle der Aorten erfolgte mittels eines Stücks handelsüblichen Bindfadens eine Fixierung der Gefäße auf den Kanülen. Die Kammer wurde für die Experimente mit 37°C warmem DMEM befüllt. Ebenso wurde das Perfusionssystem mit 10 ml 37°C warmem DMEM befüllt, welches dann mit einer Geschwindigkeit von 4,5 ml/Minute weitergepumpt wurde. Der Druck in den Schläuchen bzw. Gefäßen entsprach 40 mmHg. Nach einer halben Stunde wurde die Perfusion gestoppt. In dieser Zeit konnte das Perfusat ca. 14 Mal durch das Perfusionssystem und dementsprechend auch durch die eingespannten Schläuche und Aorten rezirkulieren.



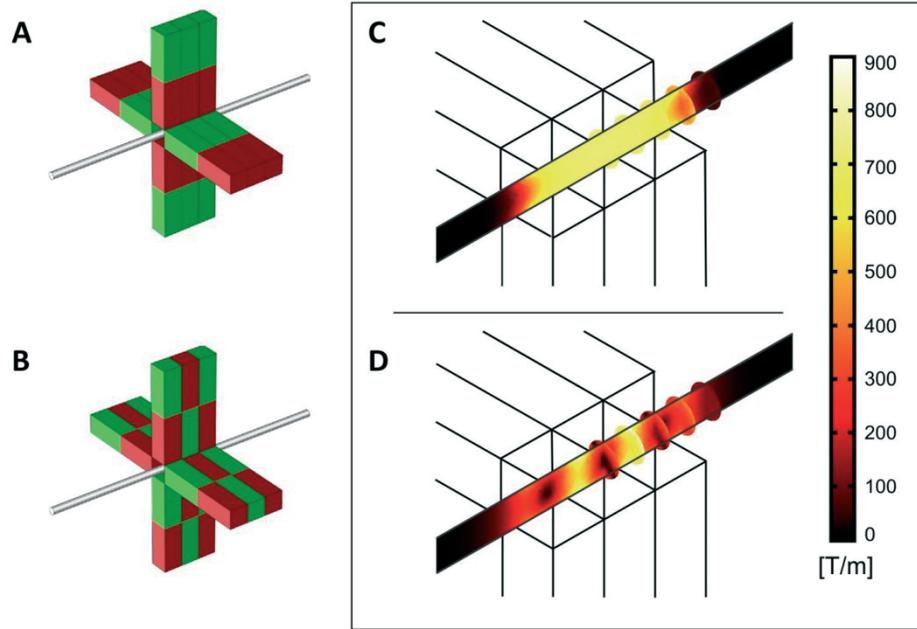
**Abbildung 9: Perfusionssystem mit Perfusionskammer und Magnethalterung**

**A:** Das für die Schlauchperfusion und die *ex vivo* Aortenperfusionen genutzte Perfusionssystem. **B:** Perfusionskammer mit Kanülen, auf die die zu perfundierenden Schläuche oder Aorten aufgezogen wurden. **C:** Magnethalterung mit eingefügten Stabmagneten; die Orientierung der einzelnen Stabmagnete zueinander wurde durch eine farbliche Markierung der Magnetpole erleichtert.

### 3.2.1.1 Magnetfeld für *ex vivo* Perfusionen

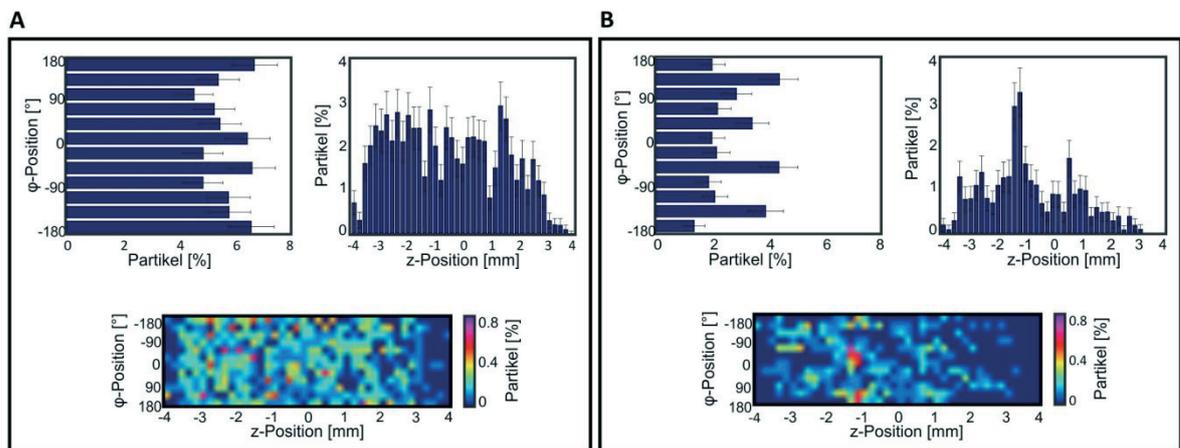
Während der gesamten 30-minütigen Perfusion waren die zu perfundierenden Schläuche sowie auch die Gefäße von einer Magnethalterung umgeben (Abbildung 9 (C)). In diese

Halterung wurden zuvor je nach experimenteller Fragestellung vier Gruppen mit jeweils drei Magnetquadern in verschiedenen Anordnungen eingefügt (Abbildung 10 (A;B)). So entstanden je nach Anordnung der Quader magnetische Felder unterschiedlicher Qualität, die sich in der erzeugten magnetischen Kraft und der Homogenität des Feldes unterschieden (Abbildung 10 (C;D)). Wichtig ist bei der Anwendung magnetischer Felder, die zur Retention von MNP-haltigen Ferrofluiden genutzt werden sollen, dass kein uniformes Magnetfeld erzeugt wird, welches lediglich eine Drehkraft auf im Fluid enthaltenen MNPs ausübt. Vielmehr müssen magnetische Feldgradienten entstehen, mit denen auch auf eine gewisse Entfernung hin eine translationale Kraft auf die MNPs ausgeübt werden kann<sup>129 154 171</sup>. Die von den in dieser Arbeit untersuchten Magnetquaderkonfigurationen hervorgerufenen magnetischen Felder wurden zuvor durch die Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, Technische Universität München) berechnet<sup>169</sup>. Getestet wurden zwei verschiedene Konfigurationen. Eine potentiell gute Magnetkonfiguration A (Konfig A), bei der die Magnetquader in einer Dreier-Gruppe die gleiche Orientierung aufweisen und sich gegenüberstehende Dreiergruppen abstoßen, wodurch ein starkes, homogenes Magnetfeld generieren werden sollte. Im direkten Vergleich dazu wurde eine potentiell schlechte Konfiguration B (Konfig B) getestet, bei der die Magnetquader in einer Dreier-Gruppe abwechselnde Orientierung aufweisen und sich gegenüberstehende Dreiergruppen anziehen, wodurch ein schwaches, inhomogenes Feld hervorgerufen werden sollte. Laut Berechnung der Arbeitsgruppe Gleich sollte die Partikelretention in einem zylindrischen Modell mit einem Durchmesser von 0,75 mm und einer Länge von 6 mm, wie es in etwa einer Mauseorta entspricht, mit Konfiguration A bei 61,20% der eingespeisten MNPs liegen, wohingegen mit Konfiguration B lediglich 16,80% der Partikel zurückgehalten werden sollten (Abbildung 11)<sup>169</sup>. Als Negativkontrolle wurden keine Magnetquader in die Halterung eingefügt und entsprechend kein magnetisches Feld generiert.



**Abbildung 10: Magnetanordnungen und entsprechende Gradienten der magnetischen Flussdichte für *ex vivo* Perfusionsexperimente**

**A:** Anordnung der Stabmagnete (vier Gruppen von jeweils drei Magnetquadrern) in der Magnethalterung für Konfiguration A. Der magnetische Südpol ist grün dargestellt, der magnetische Nordpol rot. **B:** Anordnung der Stabmagnete (vier Gruppen von jeweils drei Magnetquadrern) für Konfiguration B. Der magnetische Südpol ist grün dargestellt, der magnetische Nordpol rot. **C und D:** Gradient der magnetischen Flussdichte in [T/m], der von Magnetkonfiguration A (**C**) bzw. B (**D**) hervorgerufen wird. Dunkle Farben stehen in der Farbkodierung für geringe magnetische Kraft und helle Farben für starke Kraft. Als Negativkontrolle wurden keine Stabmagnete in die Magnethalterung eingefügt und dementsprechend wurde kein magnetisches Feld generiert. Die Simulationen erfolgten durch Alexandra Heidsieck (Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Gleich, TU München)<sup>169</sup>.



**Abbildung 11: Berechnung der Einfangrate der magnetischen Komplexe**

Dargestellt sind die Berechnungen der Einfangrate der magnetischen Komplexe in einem zylindrischen Modell mit Konfiguration A (**A**) sowie Konfiguration B (**B**). Diagramm **a** zeigt den prozentualen Anteil der zurückgehaltenen Komplexe entlang der x-Achse des zylindrischen Modells. Diagramm **b** stellt den prozentualen Anteil der zurückgehaltenen Komplexe entlang der Zirkumferenz des zylindrischen Modells dar. In Abbildung **c** ist die luminale Oberfläche des modellierten Zylinders als plane Fläche dargestellt. Mit Hilfe einer Farbkodierung ist auch hier der prozentuale Anteil der zurückgehaltenen Komplexe dargestellt. Es ergibt sich eine errechnete Komplexretention von 61,2% der initial eingesetzten Komplexe mit Konfiguration A (A) bzw. 16,8% mit Konfiguration B (B).

Die numerischen Simulationen erfolgten durch Alexandra Heidsieck (Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Gleich, TU München)<sup>169</sup>.

### 3.2.2 *Ex vivo* Schlauchperfusionen

Für die Schlauchperfusionsexperimente wurden Polyethylenschläuche mit einem inneren Durchmesser von 0,75 mm auf die Kanülen der Perfusionskammer aufgezogen. Dieser Durchmesser entspricht dem einer murinen Aorta. Die Magnethalterung wurde angelegt und die Perfusion wie unter 3.2.1 beschrieben gestartet. Alle Schlauchperfusionsexperimente wurden mit magnetischen Komplexen durchgeführt. Zur Generierung der Komplexe wurde fluoreszierender pCHIV LV (vgl.3.1.8.2) in einer Konzentration von  $8,7 \cdot 10^8$  VPs zusammen mit SO-Mag5 für 20 Minuten in 800  $\mu$ l HBSS<sup>++</sup> bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden stets 35  $\mu$ g Eisen eingesetzt. Dies entspricht einem Verhältnis von 40 fg Eisen/VP. Nach der Inkubationszeit wurden die Komplexe mit Hilfe einer Pipette als Bolus in das Droplet der *ex vivo* Perfusionssystems eingespeist. Nach der 30-minütigen Perfusion wurden die Schläuche vorsichtig von den Kanülen abgezogen. Sie wurden mit einem Fluoreszenz-Stereomikroskop abfotografiert und für weitere Experimente zur Eisenquantifikation genutzt.

### 3.2.3 Präparation der Mausearten für *ex vivo* Perfusionsexperimente

Zur Präparation von Mausearten wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend mit Kanülen auf einer Styroporunterlage fixiert. Zunächst wurde durch einen medianen Schnitt das Abdomen und der Thorax eröffnet. Nun wurde mittels einer weiteren Kanüle das Herz-Lungen-Paket vorsichtig zur Seite gepinnt, um die ventral entlang der Wirbelsäule verlaufende Aorta besser darstellen zu können. Durch einen weit kranial angesetzten Scherenschlag wurden Aorta und Wirbelsäule durchtrennt. Im Falle einer späteren Verwendung des Gefäßes für Zellpositionierungsexperimente wurde das Gefäß mit Hilfe eines dünnen Drahtes deendothelialisiert. Hierzu wurde der Draht in die kranial eröffnete Aorta eingeführt, etwa bis zum Abgang der Nierenarterien nach distal vorgeschoben und insgesamt dreimal vor und zurück bewegt. Um der unterschiedlichen Körpergröße der für die Experimente eingesetzten Mausstämmen gerecht zu werden, wurde für die größeren CD1 Tiere ein Draht mit einem Durchmesser von 0,8 mm verwendet und für die kleineren Bl6 und eNOS<sup>-/-</sup> Tiere ein Draht mit einem Durchmesser von 0,6 mm. Die Aorten, die für Perfusionen mit magnetischen Komplexen verwendet wurden, wurden nicht deendothelialisiert. Die Aorten wurden dann unter Verwendung eines Skalpell vorsichtig von der Wirbelsäule abgetrennt und möglichst weit distal mit einer Schere abgesetzt. Zur weiteren Präparation wurde die Aorta in eine mit PSS (geringe Ca<sup>2+</sup> Konzentration) gefüllte 6

cm Präparierschale überführt. Mit Hilfe von Insektennadeln konnte die Aorta in dieser Schale zur Feinpräparation fixiert werden. Nun wurde vorsichtig und unter Schonung der Interkostalgefäße das die Aorta umgebende Bindegewebe abgetrennt.

### **3.2.3.1 Ex vivo Perfusion der Mauseorten**

Die Perfusionskammer wurde zur weiteren Vorbereitung der Aorten mit DPBS gefüllt. Die Gefäße wurden auf zwei in die Perfusionseinheit eingespannte Kanülen aufgezogen. Nun wurde das DPBS aus der Kammer entfernt und die Interkostalgefäße mit einem LötKolben vorsichtig kauterisiert, um sie dadurch zu verschließen. Anschließend wurde die Kammer mit 37°C warmem DMEM ohne weitere Zusätze gefüllt und die Magnethalterung angelegt. Nachdem die Perfusionskammer an das *ex vivo* Perfusionssystem angeschlossen wurde, wurde die Perfusion gestartet (vgl. 3.2). Nach Abschluss der Perfusionsexperimente wurden die Gefäße von den Kanülen abgenommen und entsprechend ihrer weiteren Verwendung behandelt.

#### **3.2.3.1.1 Perfusion mit magnetischen Komplexen**

Zur Herstellung der Komplexe wurden LV in einer Menge von  $8,7 \cdot 10^8$  VPs bzw.  $1,2 \cdot 10^8$  IPs zusammen mit SO-Mag5 Nanopartikeln für 20 Minuten in 800  $\mu$ l HBSS<sup>++</sup> bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden stets 35  $\mu$ g Eisen eingesetzt. Dies entspricht einem Verhältnis von ca. 40 fg Eisen/VP bzw. 300 fg Eisen/IP. Nach der Inkubationszeit wurden die Komplexe als Bolus in das *ex vivo* Perfusionssystem eingespeist (vgl. 3.2). Nach 30 Minuten wurden die Aorten aus der Perfusionskammer entnommen und in eine mit 20%igem DMEM gefüllte 6 cm Zellkulturschale überführt. Diese wurde für 6 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Danach folgte die weitere Analyse der Aorten.

#### **3.2.3.1.2 Perfusion mit Zellen**

Die Zellen für die Perfusionsexperimente wurden von Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn), wie nachfolgend beschrieben, präpariert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Alle Versuche wurden mit bovinen pulmonalarteriellen Endothelzellen (bPAECs) durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe von Komplexen bestehend aus LV und SO-Mag5 magnetofiziert, also transduziert und gleichzeitig magnetisiert<sup>166</sup>. 200.000 Zellen wurden in einer 6well-Zellkulturplatte ausgesät. 12 Stunden nach dem Aussäen erfolgte die MNP-

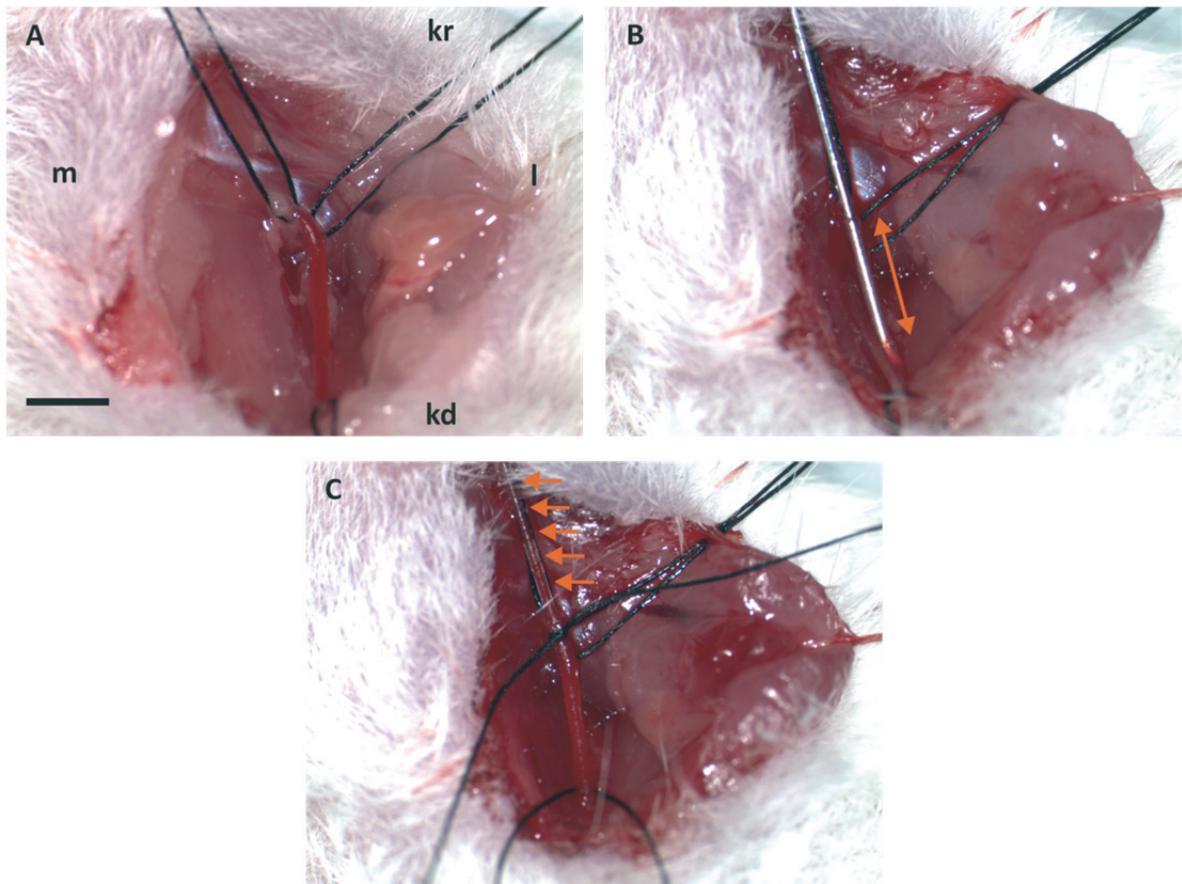
vermittelte lentivirale Transduktion. Hierzu wurden magnetische Komplexe bestehend aus LV und MNPs generiert. Um die benötigte Anzahl IPs zu berechnen, wurde die Anzahl der zu transduzierenden Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 50 multipliziert. Diese MOI wurde gewählt, da sie ein maximales Transduktionsergebnis gewährleistet (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck). Das Eisen zu LV Verhältnis betrug 40 fg Eisen/VP bzw. 4000 fg Eisen/IP. Dies resultierte in einer Eisenmenge von 200 pg Eisen/Zelle, was eine hohe Magnetisierung der bPAECs zur Folge hatte (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck). Die Komplexe in HBSS<sup>++</sup> wurden auf die Zellen gegeben und diese wurden für 30 Minuten auf einer Magnetplatte im Inkubator platziert. Nach 30 Minuten wurden die Komplexe entfernt und die bPAECs mit Endothelzellmedium bedeckt. Die Zellen wurden 3 bzw. 5 Tage nach Transduktion von der Zellkulturschale abgelöst und für den Versuch verwendet. Für die Perfusion wurden 200.000 transduzierte und beladene bPAECs in Endothelzellmedium aufgenommen und als Bolus in die *ex vivo* Perfusionsanlage eingespeist (vgl. 3.2). Nach der 30-minütigen Perfusion wurde das jeweilige Gefäß aus der Perfusionskammer entnommen. Die weitere Analyse erfolgte direkt im Anschluss ohne Abwarten einer Inkubationszeit.

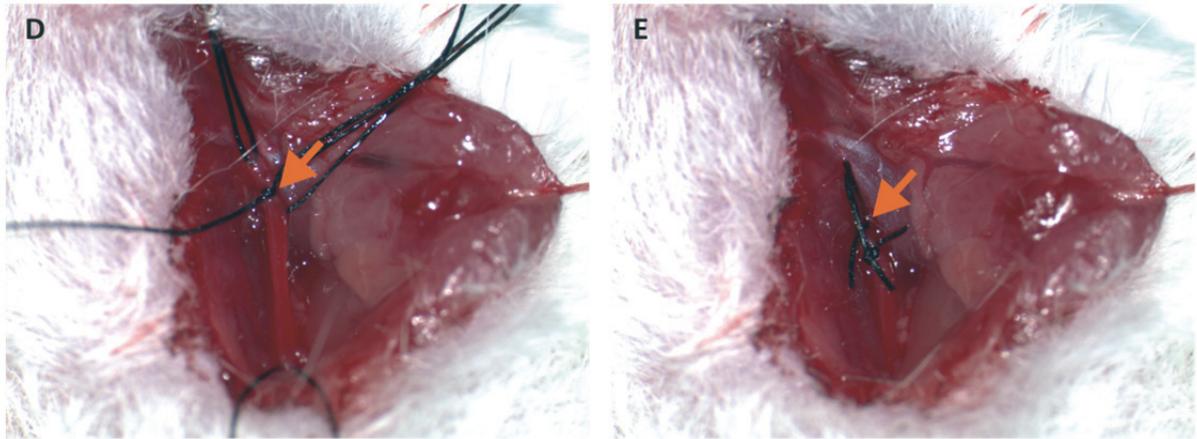
### 3.3 *In vivo* Zellinjektion

In Korrelation zu den *ex vivo* Aortenperfusionen mit magnetofizierten Zellen wurden eine *in vivo* Anwendung zur Zellpositionierung etabliert. Hierzu wurde das von Lindner *et al.* beschriebene und gut charakterisierte Model der Schädigung der Arteria carotis communis (ACC) der Maus gewählt, bei der das Endothel der ACC mit Hilfe eines dünnen Stahldrahtes entfernt wird<sup>167 178</sup>. Zur Narkoseeinleitung sowie auch zu deren Aufrechterhaltung wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran gewählt (Narkoseeinleitung: 4 Vol % Isofluran; Narkoseaufrechterhaltung: 1,0 – 1,5 Vol % Isofluran). Da eine Spontanatmung der anästhesierten Mäuse gegeben war, wurde die Begasung der Tiere mit Inhalationsanästhetikum über eine Maske in Form einer entsprechend gekürzten 10 ml Spritze gewählt. Die chirurgischen Eingriffe wurden auf einer 37°C warmen Wärmeplatte unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Die Mäuse wurden nach dem Erreichen des Stadiums der chirurgischen Toleranz auf dem Rücken liegend mit Leukofix auf der Wärmeplatte fixiert, mittels eines Einmalrasierers enthaart und mit Kodan-Desinfektionsmittel desinfiziert. Durch einen Scherenschlags wurden dann Haut und subkutanes Fettgewebe medial an der ventralen Halsseite durchtrennt. Die beiden Anteile der Glandula submandibularis wurden mittels Pinzetten stumpf voneinander getrennt und

mit Hilfe eines Fadenzügels nach lateral verlagert. Die linke ACC wurde dargestellt und unter maximaler Schonung der Gefäßwand vom umgebenden Fett- und Bindegewebe sowie vom Nervus vagus, der lateral der Halsschlagader verläuft, mobilisiert. Die ACC wurde daraufhin durch einen kaudal angelegten Fadenzügel aus 6/0 Seide sowie durch zwei kraniale Fadenzügel, die jeweils die lateral verlaufende Arteria carotis interna (ACI) und die medial verlaufende Arteria carotis externa (ACE) unterminierten, temporär von der Blutzirkulation abgetrennt (Abbildung 12, A). Danach wurde an der ACE mittels einer Federschere eine Arteriotomie quer zur Gefäßachse durchgeführt. Durch die so entstandene Gefäßöffnung wurde ein Edelstahl draht mit einem Durchmesser von 0,2 mm und einer leicht gebogenen Spitze durch die ACE weit kaudal in die ACC eingeführt und unter einer drehenden Bewegung wieder herausgezogen (Abbildung 12, B). Auf diese Weise wurde die ACC deendothelialisiert<sup>178</sup>. Als nächster Schritt folgte die Injektion der magnetofizierten Zellen. Zu diesem Zweck wurde eine Injektionsvorrichtung etabliert, die aus einer Gelladepipette, einem Venenpunktionsbesteck mit einer 27 G Nadel und einer 1 ml Spritze besteht (Abbildung 13, A und B). Die Vorrichtung wurde mit Heparin gespült, um einer Koagulation von Blut, welches im Verlauf der Zellinjektion und der Magnetapplikation in das System eindringen kann, entgegenzuwirken. Die Vorrichtung wurde daraufhin Luftblasen-frei mit der Suspension der zu injizierenden Zellen befüllt. Pro Maus wurden jeweils 100 000 bPAECs suspendiert in 200 µl Endothelzellmedium injiziert. Die Präparation der Zellen erfolgte wie unter 3.2.3.1.2 beschrieben durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Die Gelladepipette wurde über die Arteriotomiewunde über die ACE in die Strombahn der ACC eingeführt und mit Hilfe einer Ligatur aus 6/0 Seide fixiert (Abbildung 12, B). Die für die hier beschriebene *in vivo* Anwendung modifizierte Magnetkonfiguration (Abbildung 13, C bis F), die der Hälfte der unter 3.2.1.1 beschriebenen Magnetkonfiguration A entspricht, wurde mittels einer Magnethalterung (Abbildung 13, C) direkt über der ACC platziert. Die Modifikation der Magnetkonfiguration und damit des Magnetfelds wurde aufgrund der Größenverhältnisse im Bereich des Operationsfeldes und der eingeschränkten Mobilisierbarkeit der ACC vorgenommen, die keine vollständige Umschließung der Halsschlagader mit der kompletten in 3.2.1 beschriebenen Magnethalterung erlauben. Durch Lockerung des kaudalen und des die ACI unterminierenden Fadenzügels wurde der Blutfluss wiederhergestellt. Nun wurden die Zellen unter Applikation des Magnetfeldes und bei offenen Blutflussbedingungen langsam injiziert. Der Magnet wurde für 30 Minuten nach Zellinjektion in seiner Position dicht über dem Blutgefäß belassen. Nach dieser Zeit wurde

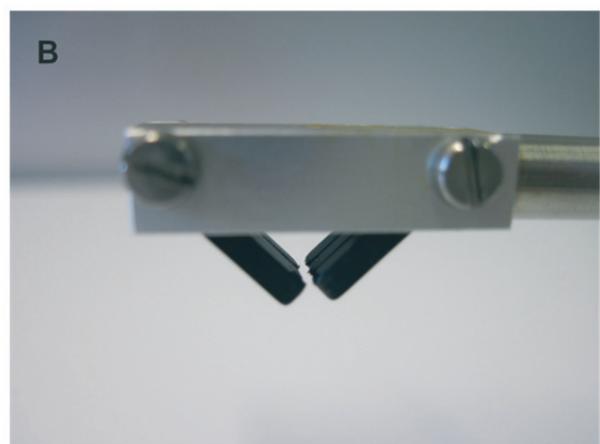
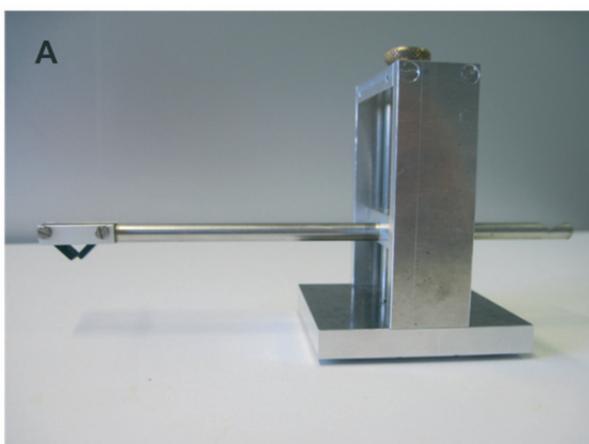
die Magnethalterung entfernt, die Injektionsvorrichtung vorsichtig entnommen und die Ateriotomiewunde sowohl nach kaudal (Abbildung 12, D) als auch nach kranial (Abbildung 12, E) verschlossen. Der Blutfluss war unter diesen Bedingungen post-operativ über die ACC und die ACI gegeben. Die ACE blieb nach dem Eingriff permanent ligiert. Die Speicheldrüsen wurden zurückverlagert und die Hautwunde wurde mit einer fortlaufenden Naht aus 6/0 Prolene geschlossen. Um eine ausreichende Analgesie und Antibiose sicherzustellen, erhielten alle Tiere prä-operativ eine subkutane Injektion von 100 mg/kg KG Cefuroxim und 100 mg/kg KG Metamizol. Zur Unterdrückung einer eventuellen immunbedingten Abstoßung der aus Rindern stammenden bPAECs wurde den Mäusen zusätzlich intraperitoneal 40 mg/kg KG/Tag Ciclosporin verabreicht. Die Ciclospringabe wurde bis zur finalen Analyse der operierten Mäuse in einem Abstand von 24 Stunden wiederholt, um einen ausreichend hohen Wirkstoffspiegel sicherzustellen. Nach Feststellung einer ausreichenden Vitalität wurden die Tiere zurück in den Tierstall gebracht und 2 Tage nach dem operativen Eingriff weiter analysiert.

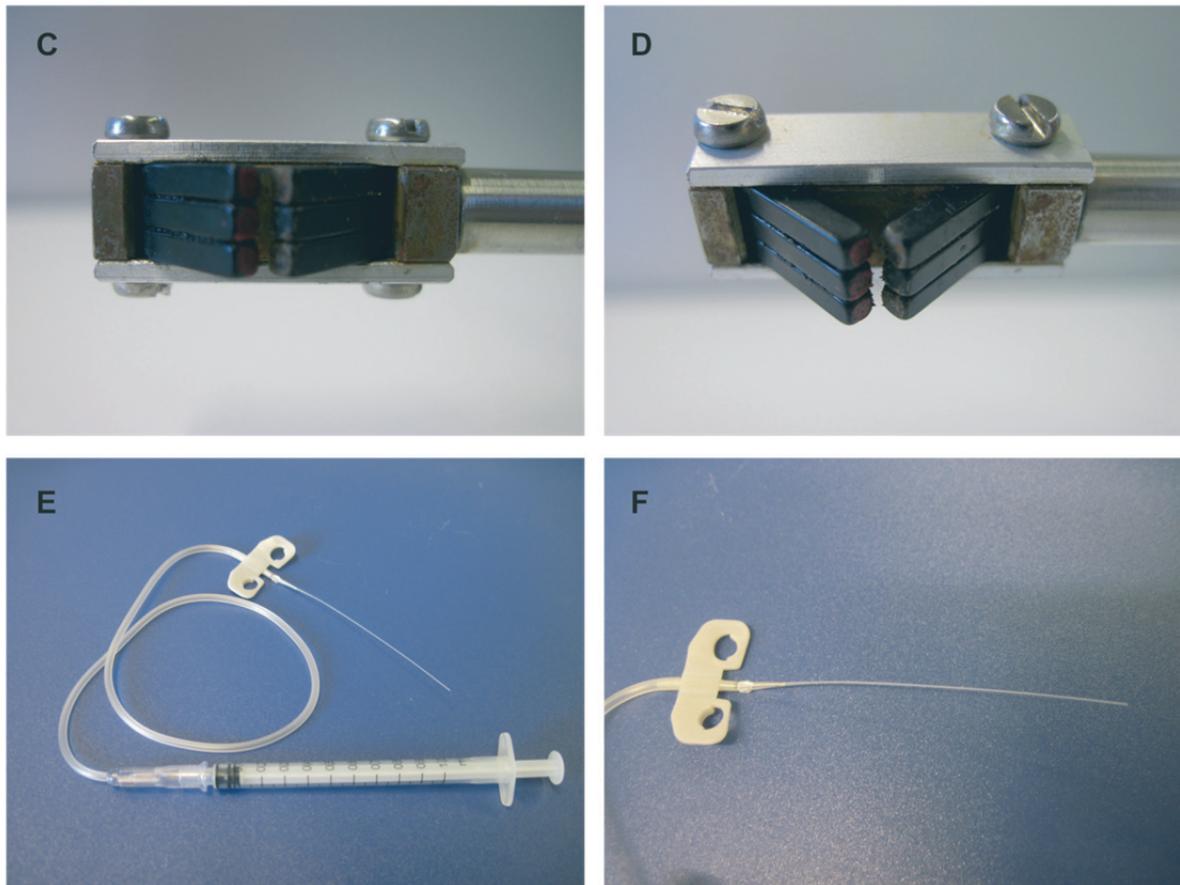




**Abbildung 12: *In vivo* Zellinjektion in die Arteria carotis communis der Maus**

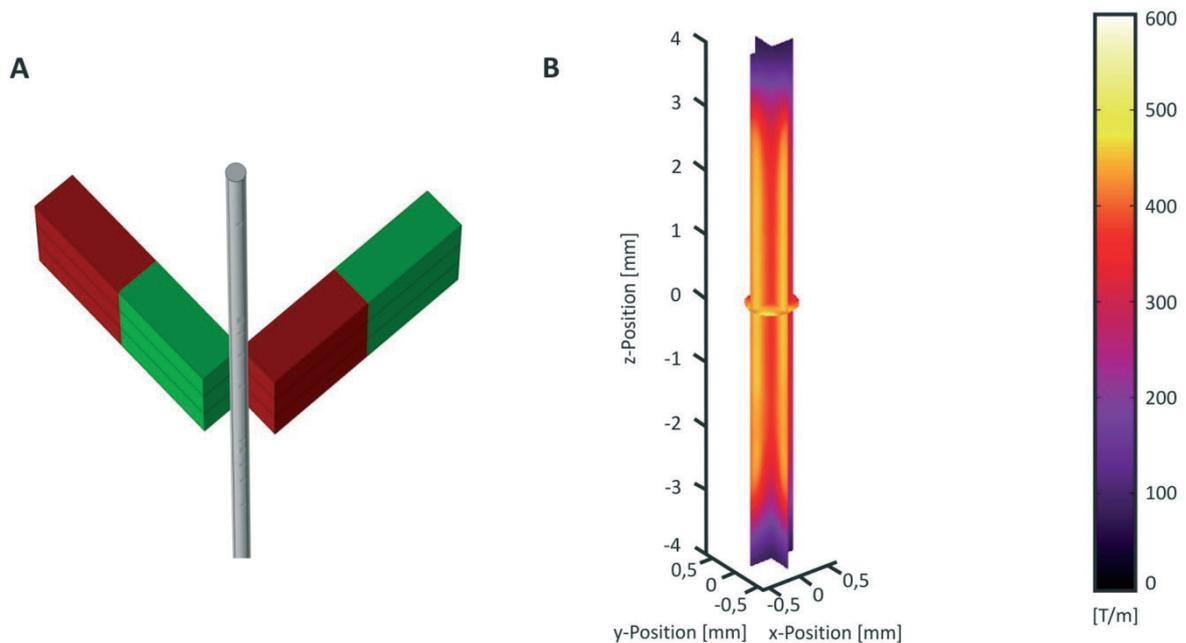
**A:** Darstellung der linken ACC der Maus mit kaudalem Fadenzügel sowie jeweils einem die ACE (medial) und die ACI (lateral) unterminierenden Faden. Durch Applikation von leichtem Zug auf die drei Fadenzügel konnte der Blutfluss in der ACC temporär unterbrochen werden. m=medial, l=lateral, kd=kaudal, kr=kranial, Maßstabsbalken=0,1 cm. **B:** Über eine Arteriotomiewunde in der ACE wurde ein dünner Stahldraht (hervorgehoben durch den orangenen Pfeil) in die ACC eingeführt und durch dessen Vor- und Zurückschieben ein Endothelschaden in der Halsschlagader provoziert. **C:** Anschließend wurde die Gelladepipette als vorderster Teil der mit Zellsuspension gefüllten Injektionsvorrichtung (Abbildung 13, A und B; hervorgehoben durch die orangenen Pfeile) über die Arteriotomiewunde in die Strombahn der ACC eingeführt. Durch Lockerung des kaudalen Fadenzügels und des Fadens um die ACI wurde der Blutfluss in der ACC wiederhergestellt. Nach Platzierung der in Abbildung 13 C bis F gezeigten Magnethalterung mit der für die *in vivo* Anwendung modifizierte Magnetkonfiguration A wurde dann langsam die Suspension der magnetofizierten Zellen über die Injektionsvorrichtung in die ACC injiziert. Die Magnethalterung wurde nach der Zellinjektion für eine Dauer von 30 Minuten in der Position dicht über dem Gefäß belassen. **D:** Nach Entfernung der Magnethalterung und der Gelladepipette wurde die Arteriotomie zunächst durch eine kaudale Ligatur (orangener Pfeil) der ACE permanent verschlossen. **E:** Anschließend wurde auch eine permanente Ligatur kranial der Arteriotomiewunde an der ACE angebracht (orangener Pfeil). Der Blutfluss war nun über die ACC in die ACI gegeben.





**Abbildung 13: Magnethalterung und Injektionsvorrichtung für die *in vivo* Zellinjektion**

**A bis B:** Injektionsvorrichtung zur Injektion von 200  $\mu$ l Zellsuspension in die ACC der Maus. Die Vorrichtung setzt sich aus einer 1 ml Spritze, einem Venofix® Venenpunktionsbesteck mit einer 27 G Nadel und einer Gelladepipette, die über die Arteriotomiewunde in die Halsschlagader eingeführt wird, zusammen. Letztere Bestandteile sind in Bild **B** noch einmal vergrößert dargestellt. **C:** Magnethalterung wie sie bei der *in vivo* Zellinjektion in die ACC der Maus verwendet wurde. Über ein Schraubgewinde konnte die Höhe der Apparatur stufenlos adaptiert werden, sodass eine Platzierung dicht über dem Blutgefäß erreicht werden konnte. **D bis F:** Der vordere Teil der Magnethalterung mit den eingefügten Stabmagneten ist hier noch einmal vergrößert dargestellt. In der seitlichen (**D**), unteren (**E**) und schrägen (**F**) Ansicht wird deutlich, dass die Orientierung der Magnete zueinander der Anordnung der Magnete in der Magnetkonfiguration A entspricht, wie sie für die *ex vivo* Perfusionsexperimente genutzt wurde (vgl. 3.2.1.1). Die Modifikation wurde aufgrund der Größenverhältnisse im Bereich des Operationsfeldes und der eingeschränkten Mobilisierbarkeit der ACC durchgeführt, die keine vollständige Umschließung der Halsschlagader mit der kompletten in 3.2.1 beschriebenen Magnethalterung erlauben.



**Abbildung 14: Magnetanordnung und Gradient der magnetischen Flussdichte für die *in vivo* Zellinjektion**

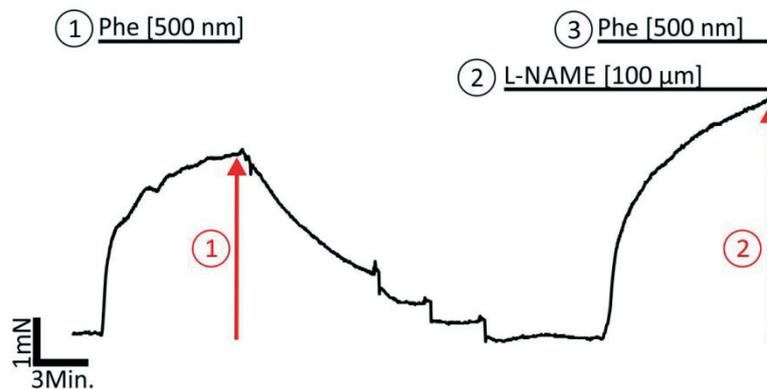
**A:** Anordnung der Stabmagnete (zwei Gruppen von jeweils drei Magnetquaden) in der Magnethalterung, wie sie in Abbildung 13 zu sehen ist und wie sie für die *in vivo* Zellinjektion genutzt wurde. Der magnetische Südpol ist grün dargestellt, der magnetische Nordpol rot. **B:** Gradient der magnetischen Flussdichte in [T/m], der von dieser Magnetkonfiguration hervorgerufen wird. Gezeigt ist der Gradient im Bereich der in der x-, y- und z-Position dargestellten ACC. Dunkle Farben in der Farbkodierung stehen für geringe magnetische Kraft und helle Farben für starke Kraft.

Die Simulationen erfolgten durch Alexandra Heidsieck (Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Gleich, TU München)<sup>169</sup>.

### 3.4 Isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen

Unmittelbar nach Perfusion der Mausearten mit magnetofizierten Zellen bzw. 6 Tage nach Perfusion mit magnetischen Komplexen folgten zur funktionellen Analyse der Gefäße isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen (Abbildung 15). Dazu wurden die Aorten mittels Federschere in drei bis vier jeweils 2 mm lange Ringe zerteilt und in die Versuchskammern des Myographen eingespannt. Im Falle von *in vivo* Zellinjektionen wurde die linke ACC an Tag 2 nach Zellinjektion in einer Länge von etwa 2 mm entnommen und in den Drahtmyographen eingespannt. Für die Kraftmessungen wurden die Gefäßringe zunächst mit Phenylephrin [10  $\mu$ M] maximal vorkontrahiert. Nach Auswaschen dieser Vorkontraktion folgten im Falle von Messungen von Aortenringen drei aufeinanderfolgende submaximale Kontraktion durch Phenylephrin [500 nM]. Im Falle von Messungen von ACC Segmenten wurde einmal submaximal mit Phenylephrin [500 nM] kontrahiert. Nach einem weiteren Auswaschen wurde, nachdem das Grundniveau wieder erreicht war, der NOS-Inhibitor L-NAME [100  $\mu$ M] in das Organbad gegeben und nach einer 3-minütigen Wartezeit

ein weiteres Mal mit Phenylephrin [500 nM] kontrahiert. Für die statistische Auswertung der Kraftmessung wurde der Quotient aus der finalen Kontraktion und dem Mittelwert der drei submaximalen Phenylephrin-induzierten Kontraktionen gebildet (im Weiteren als Ratio bezeichnet). Die Ratio gab Aufschluss über den Gefäßtonus und wurde zur indirekten Ermittlung der basalen NO-Produktion in den Gefäßringen genutzt. Nach der isometrischen Kraftmessung wurden die Gefäßringe wieder aus der Versuchskammer entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

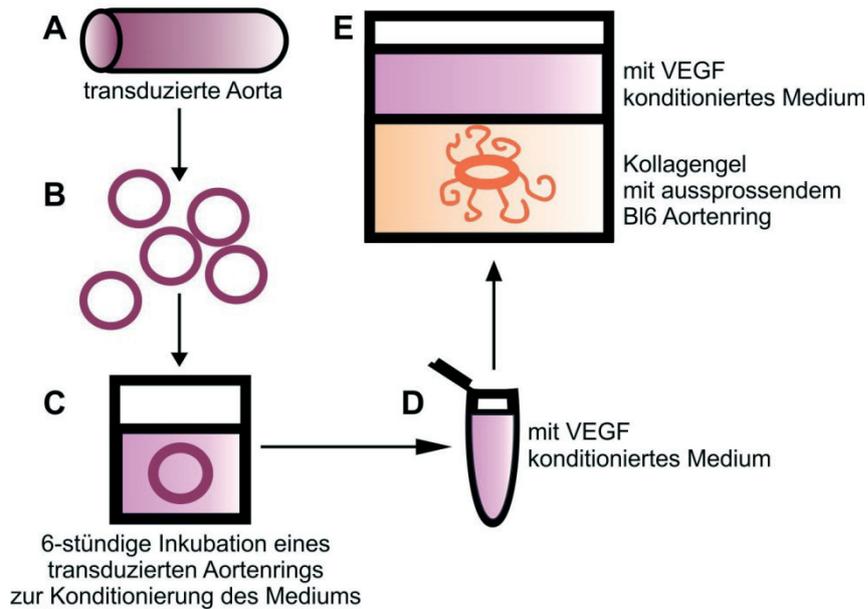


**Abbildung 15: Myographprotokoll für isometrische Kraftmessungen**

Auszüge einer isometrischen Kraftmessung, in der die basale NO-Produktion einer unbehandelten CD1 Aorta bestimmt wurde. Nach Vorkontraktion (nicht gezeigt) wurde die Aorta insgesamt 3 Mal durch Phenylephrinapplikation kontrahiert. Die erste in dieser Abbildung gezeigte Phenylephrinkontraktion (1) ist die letzte dieser drei submaximalen Kontraktionen. Nach Auswaschen des Phenylephrins wurde, sobald das Grundniveau wieder erreicht war, der NOS-Inhibitor L-NAME zugegeben (2). Nach 3 Minuten wurde ohne einen zwischengeschalteten Waschschrift erneut mit Phenylephrin kontrahiert (3). Zur statistischen Auswertung wurde die Ratio der Kontraktionen (hervorgehoben durch die roten Pfeile) ermittelt, welche Aufschluss über den Gefäßtonus gab und mit der basalen NO-Produktion korrelierte. Je höher diese basale NO-Produktion war, desto höher fiel die zweite Kontraktion unter L-NAME Einfluss aus, da der vasorelaxierende, einer Vasokonstriktion entgegenwirkende Effekt von NO fehlte – die Ratio wurde größer.

### 3.5 Angiogenese-Assay

Als weitere funktionelle Analyse der perfundierten Aorten wurde ein Angiogenese-Assay durchgeführt. Hierbei wurde das angiogenetische Potential von Zellkulturüberständen überprüft, in denen Aortenringe inkubiert wurden, die zuvor mit magnetischen Komplexen perfundiert worden waren (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Ablauf des Angiogenese-Assays**

**A:** Die zuvor mit CMV-VEGF LV transduzierte Mausaorta wurde 6 Tage inkubiert, um die Transgenexpression abzuwarten. **B:** Nach 6 Tagen wurde die Aorta in ca. 1 cm lange Ringe geschnitten. **C:** Die Ringe wurden für 6 Stunden bei 37°C in 200 µl Opti-MEM inkubiert. **D:** Das so gewonnene VEGF-haltige Medium wurde für den nachfolgenden Aortenring-Aussprossungs-Versuch genutzt. **E:** Für den Aortenring-Aussprossungsversuch wurde ein frisch präparierter B16 Aortenring in Kollagengel platziert. Das Gel wurde mit dem VEGF-haltigen Medium (D) bedeckt. Eine eventuelle VEGF-stimulierte Aussprossung von Endothelzellen aus dem Aortenring wurde an Tag 8 nach Start des Aussprossungs-Assays per Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert.

### 3.5.1 Gewinnung von VEGF-konditioniertem Medium

CD1 Aorten wurden wie unter 3.2.3.1.1 beschrieben mit magnetischen Komplexen perfundiert. Für die Herstellung der Komplexe wurden CMV-VEGF LV und SO-Mag5 MNPs verwendet. Nach der 30-minütigen Perfusion und nach Abwarten der 6-tägigen Inkubationszeit in 20% DEMEM wurden die perfundierten Aorten in etwa 1 cm lange Ringe geschnitten. Diese wurden in die Vertiefungen einer 96-well Zellkulturplatte überführt, in der entweder für ELISA Messungen 200 µl 5% DMEM oder für Aortenring-Aussprossungs-Versuche 200 µl Opti-MEM+P/S je Vertiefung vorgelegt waren. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C wurde das Medium mittels ELISA weiter analysiert oder für Aortenring-Aussprossungs-Versuche verwendet.

### 3.5.2 Bestimmung der VEGF-Konzentration im Medium

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentration in dem Zellkulturüberstand, der wie unter 3.5.1 beschrieben mit VEGF angereichert wurde, wurde ein kolorimetrischer VEGF-ELISA (Quantikine ELISA für humanes VEGF, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom)

durchgeführt. Für diese Versuche wurden die zuvor perfundierten Ringe in 5% DMEM inkubiert. Durch das im Medium in geringer Konzentration enthaltene FKS wurde eine für die ELISA-Messung notwendige Stabilisierung des VEGFs erreicht. Als Negativkontrolle wurden Überstände verwendet, in denen Aortenringe inkubiert wurden, die zuvor mit Komplexen bestehend aus rr-156 LV und SO-Mag5 MNPs transduziert wurden. Der Immunoassay wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Überstände der mit Leervirus perfundierten Aortenringe wurden vor der Messung 1:2 verdünnt. Die Überstände der mit VEGF-Virus perfundierten Ringe wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Von einer im ELISA-Kit enthaltenen VEGF-Standardlösung wurden verschiedene Verdünnungsstufen mit jeweils bekannter VEGF-Konzentration angefertigt und analog zu den Proben behandelt. Sämtliche Proben sowie auch die Verdünnungsstufen der Standard-Lösung wurden als Duplikate gemessen. Das Auslesen der ELISA-Platte erfolgte unmittelbar nach Abschluss des Immunoassays. Dazu wurde der sich entwickelnde Farbkomplex, der direkt mit der in den Proben enthaltenen Menge an VEGF korreliert, über eine Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Messwerte der Duplikate jeder Probe wurden gemittelt. Anhand der Extinktionswerte der bekannten VEGF-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Proben erfolgte.

### **3.5.3 Aortenring-Aussprossungs-Versuch**

Im weiteren Verlauf wurde das angiogenetische Potential des mit VEGF konditionierten Mediums in einem Aortenring-Aussprossungs-Versuch überprüft (Abbildung 16)<sup>179</sup>. Es wurden wie unter 3.2.3 beschrieben Aorten aus Bl6 Mäusen entnommen und präpariert. Die Aorten wurden in ca. 0,5 cm große Ringe zerteilt und über Nacht in Opti-MEM+P/S im Inkubator bei 37°C gehungert. Am darauffolgenden Tag wurden mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-VEGF LV und SO-Mag5 transduzierte CD1 Aorten genutzt, um wie unter 3.5.1 beschrieben Opti-MEM+P/S mit VEGF anzureichern. Später an diesem Tag wurden 250 µl Kollagengel pro Vertiefung in eine ibiTreat µ-Slide 8well Zellkulturplatte gegeben und ein Bl6 Aortenring darin platziert. Sobald das Gel polymerisiert war, wurde es mit 175 µl des mit VEGF angereicherten Mediums (siehe oben) bedeckt. Als Negativkontrolle wurde nicht weiter behandeltes Opti-MEM+P/S zum Bedecken der Gele verwendet. Ein erster Mediumwechsel wurde an Tag 3 durchgeführt und ein weiterer an Tag 6. Für jeden Mediumwechsel wurde frisch mit VEGF angereichertes Opti-MEM+P/S verwendet. Die finale

Dokumentation am Mikroskop erfolgte an Tag 8. Hierzu wurden phasenkontrastmikroskopische Bilder aufgenommen und die Gefäßaussprossungen ausgezählt.

### **3.6 Molekularbiologische Methoden**

Zur weitergehenden Analyse der perfundierten Mausearten erfolgte eine Auswertung des Transduktionserfolgs auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Dazu wurden die zuvor im Drahtmyographen gemessenen und eingefrorenen Aorten verwendet (vgl. 3.4).

#### **3.6.1 Homogenisierung der Aorten**

Um die RNA aus den Aorten zu gewinnen, wurden diese zunächst homogenisiert. Dazu wurden zunächst zwei 7mm Stahlkugeln in ein 2ml Reaktionsgefäß mit abgerundetem Boden gegeben und 15 Minuten bei -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurde die zu homogenisierende Aorta in ebendieses Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 350 µl RNA-Lysepuffer zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde in den Tissue Lyser LT gestellt und bei einer Frequenz von 50 Hz für 8 Minuten homogenisiert. Das so gewonnene Homogenisat wurde sofort, wie unter 3.6.2 beschrieben, weiterverarbeitet.

#### **3.6.2 RNA-Isolation**

Das Aortenhomogenisat wurde für 7 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAshredder Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Diese wurde wiederum für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die weitere RNA-Isolation aus dem Eluat erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Auf einen DNA-Verdau wurde verzichtet. Die finale Elution der RNA erfolgte mit 14 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentrationsbestimmung wurde am Spektrophotometer durchgeführt.

#### **3.6.3 Reverse Transkription und qRT-PCR**

Die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte direkt anschließend. Hierzu wurde das SuperScript VILO cDNA Synthese Kit (Life Technologies,

Darmstadt, Deutschland) verwendet. Umgeschrieben wurde stets eine Menge von 250 ng RNA.

Ansatz:

- 4µl Reaktionsmix (5x)
- 2µl Enzymmix (10x)
- xµl RNA (250 ng)
- ad 20µl DEPC-Wasser

Schritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	25 °C	10 Minuten
Synthese	42°C	60 Minuten
Abbruch	85°C	5 Minuten
Lagerung	4°C oder -20°C	∞

Die cDNA wurde dann zur weiterfolgenden Bestimmung der relativen Genexpression für die qRT-PCR verwendet. Hierzu wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit und entsprechende QuantiTect Primer (beides Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet (vgl. 3.1.7). Es wurde stets 1ng cDNA pro Reaktion eingesetzt.

Ansatz:

- 7,5µl SYBR Green Mastermix
- 1,5µl QuantiTect Primer
- 1ng cDNA
- ad 15µl DEPC-Wasser

Die PCR selbst erfolgte im RotorGene-Q-PCR-Gerät.

Schritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten
Denaturierung	95°C	5 Sekunden
Primerhybridisierung und Elongation	60°C	10 Sekunden

} 35 Zyklen

Die relative Genexpression wurde entweder nach der  $\Delta Ct$ -Methode oder nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt. Bei diesen Methoden ergibt sich die Genexpression aus  $2^{-\Delta Ct}$  bzw.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Ct steht dabei für den Zyklus-Schwellenwert.  $\Delta Ct$  ist die Differenz des Cts des Gens von Interesse und des Cts des Referenzgens. Als Referenzgen wurde in allen Versuchen das 18S-rRNA-Gen verwendet. Bei der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode, der Livak-Methode, wurde das  $\Delta Ct$  zusätzlich noch auf das  $\Delta Ct$  einer Negativkontrolle bezogen<sup>180</sup>.

## 3.7 Biochemische Methoden

### 3.7.1 Bestimmung des Eisengehalts der perfundierten Schläuche und Mausearten

Zur Bestimmung der während der Perfusionsexperimente zurückgehaltenen Eisenmenge wurde eine kolorimetrische Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung durchgeführt<sup>181</sup>. Die für die Analyse verwendeten Schläuche sowie die Aorten wurden, wie zuvor unter 3.2.2 bzw. 3.2.3.1.1 beschrieben, mit magnetischen Komplexen perfundiert. Der Eisenniederschlag aus den Schläuchen wurde mit 300 µl Säurelösung (vgl. 3.1.5) ausgespült und das Eluat über Nacht bei 65°C inkubiert. Die bis zur Analyse bei -80°C gelagerten Aorten wurden ebenfalls über Nacht bei 65°C in 300 µl Säurelösung lysiert. Durch diese Inkubation wurde das während der Perfusionen zurückgehaltene Eisen in seine ionisierte Form überführt und vorhandenes Protein denaturiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben abzentrifugiert und nur der Überstand für die weitere Analyse verwendet. In einer transparenten 96-well Zellkulturplatte wurden 50 µl Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen vorgelegt. Durch Zugabe von 20 µl 10% Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung, 100 µl Ammoniumazetat und schließlich 50 µl 0.1% Phenantrolin-Lösung in dieser Reihenfolge wurde ein stabiler orange-roter Farbkomplex aus dem zweiwertigen Eisenion und Phenanthrolin gebildet, dessen Intensität direkt mit der in der Probe enthaltenen Eisenmenge korreliert. Zur Generierung einer Standardreihe wurden entsprechende Verdünnungen der Eisen-Standard-Lösung verwendet. Sämtliche Proben sowie auch die Verdünnungsstufen der Standard-Lösung wurden als Triplets gemessen. Die durch die Farbstoffentwicklung gegebene Absorption wurde mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bei 510 nm registriert. Die Messwerte der Dreifachmessung jeder Probe wurden gemittelt. Anhand der Extinktionswerte der Standardreihe mit bekannten Eisen-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Bestimmung der Eisen-Konzentration in den Proben erfolgte.

### 3.7.2 Proteinnachweis

In Korrelation zu der in 3.6 beschriebenen Analyse des Transduktionserfolgs auf mRNA-Ebene erfolgte auch eine Analyse auf Proteinebene mittels Western Blot Experimenten. Mit magnetischen Komplexen perfundierte Gefäße (vgl.3.2.3.1.1) wurden nach Abwarten der 6-tägigen Inkubationszeit bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und

-80°C gelagert. Mit Zellen perfundierte Aorten (vgl.3.2.3.1.2) wurden direkt nach der 30-minütigen Perfusion eingefroren. Es erfolgte keine vorherige Messung im Drahtmyographen.

### **3.7.3 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung**

Zunächst wurden die Aorten zur Isolation des Proteins wie unter 3.6.1 beschrieben homogenisiert. Zur Proteingewinnung erfolgte die Homogenisierung in 120 µl RIPA-Puffer. Nach dem 8-minütigen Homogenisationsprozess wurden die Reaktionsgefäße für zehn Minuten bei 13.000 rpm in einer auf 4°C heruntergekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte direkt im Anschluss mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteinlysate bei -80°C gelagert.

### **3.7.4 Western Blot**

#### **3.7.4.1 SDS-PAGE**

Aus den isolierten Proteingemischen der Aorten wurden die Proteine eNOS, eGFP und  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinextrakte nach der Laemmli-Methode gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zunächst wurde ein 10%-iges Trenngel (1 ml Trenngelpuffer, 160 µl 20% (w/v) SDS, 1,21 ml Acrylamidlösung, 1,84 ml Wasser, 5 µl TEMED, 40 µl 10% (w/v) APS) gegossen. Nach der Polymerisation wurde dieses mit einem 4%-igen Sammelgel (0,5 ml Sammelgelpuffer, 80 µl 20% (w/v) SDS, 200 µl Acrylamidlösung, 1,22 ml Wasser, 2,5 µl TEMED, 40 µl 10% (w/v) APS) überschichtet. Danach wurden 5 µg (Zellperfusionsexperimente) beziehungsweise 15 µg (direkt transduzierte Aorten) Protein pro Probe in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Das polymerisierte Gel wurde in der Laufkammer platziert, die mit SDS-Laufpuffer befüllt war. Die Proben wurden zusammen mit einem definierten Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei konstanter Spannung von 80 V, welche auf 120 V erhöht wurde, sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten.

#### **3.7.4.2 Semidry-Blot**

Um eine spätere Immundetektion der Proteine zu ermöglichen, wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine (vgl. 3.7.4.1) mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens auf eine

Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden zwei Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Trenngel auf die Membran gelegt. Gel und Membran wurden zwischen die zwei Filterpapiere gelegt und in eine Semidry-Blotkammer überführt. Der eigentliche Transfer erfolgte für 30 Minuten bei einer konstanten Spannung von 25V.

#### **3.7.4.3 Tankblot**

Im Falle einer späteren Immundetektion des Proteins eNOS mit einer relativ großen Molekülmasse von 130 kDa<sup>13</sup> wurde ein alternatives Verfahren zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran gewählt, das Tankblot-Verfahren. Hierzu wurden zwei Stücke Vlies in Tankblotpuffer getränkt und das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Trenngel auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt. Gel und Membran wurden zwischen die beiden Vliesstücke gelegt und in die Tankblotapparatur eingespannt. Die Tankblotkammer wurde mit Tankblotpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 4°C für 18 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA.

#### **3.7.4.4 Immunodetektion**

Je nach Fragestellung wurden die Proteine eNOS, eGFP und als Referenz und Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran zum Blockieren aller unspezifischen Antikörperbindungsstellen für 30 Minuten in 5% Magermilchpulver in TBST Puffer inkubiert. Die Bindung der primären Antikörper (vgl. 3.1.10.3) erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver in TBST-Puffer. Anschließend wurde die Membran 3 Mal für 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (vgl. 3.1.10.4) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach folgten 3 weitere Waschschrte. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern entfiel, wenn der primäre Antikörper bereits direkt mit einer Peroxidase konjugiert war. Durch die Kopplung der Sekundärantikörper mit Peroxidase konnten die Proteine von Interesse mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen werden. Dafür wurden die beiden Reagenzien des ECL-Analyse-Systems zu gleichen Teilen miteinander gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Das entstehende Chemolumineszenzsignal wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Die Filme wurden zu Dokumentationszwecken abfotografiert. Im Falle einer semiquantitativen Auswertung der

relativen Proteinexpression wurden die entwickelten Röntgenfilme mit der WCIF Image J Software analysiert. Die relative Expression von eNOS- und eGFP-Protein wurde durch Normierung auf  $\beta$ -Aktin erhalten.

### **3.7.5 Bestimmung der cGMP-Konzentration in den perfundierten Aorten**

Zum indirekten Nachweis der Aktivität der eNOS in den perfundierten Aorten wurde ein cGMP Nachweis durchgeführt. Für diese Experimente wurden die mit magnetischen Komplexen perfundierten Aorten (vgl. 3.2.3.1.1) nach Abwarten der 6-tägigen Inkubationszeit und die mit Zellen perfundierten Aorten (vgl. 3.2.3.1.2) unmittelbar nach der Perfusion für 1 Stunde bei 37°C in 10% DMEM+IBMX (vgl. 3.1.6.1) inkubiert, um den Abbau des cGMPs durch Phosphodiesterasen zu hemmen. Danach wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der cGMP-Nachweis erfolgte mit Hilfe des *Monoclonal Anti-cGMP Antibody Based Direct cGMP ELISA Kit* (NewEast Bioscience, Pennsylvania, USA). Hierzu wurden die Aorten in 200  $\mu$ l 0,1 M Salzsäure mit Hilfe des TissueLyzers homogenisiert (vgl. 3.6.1). Nach dem Homogenisationsprozess wurden die Reaktionsgefäße für zehn Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Das Gewebepellet wurde für eine Bestimmung der Proteinmenge (vgl. 3.7.3) verwendet, um eine spätere Korrelation der gemessenen cGMP-Menge auf die in der Aorta enthaltene Menge an Protein durchführen zu können. Der cGMP-ELISA wurde nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Alle Proben wurden zweifach und 1:2 verdünnt gemessen. Die Farbentwicklung wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Anhand der im Kit enthaltenen Standardreihe mit bekannten cGMP-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Bestimmung der cGMP-Konzentration in den Proben erfolgte.

### **3.8 Immunfluoreszenz- und Preußisch-Blau-Färbung**

Die Aorten aus den zuvor beschriebenen Versuchen (vgl. 3.2.3.1.1 und 3.2.3.1.2) wurden teilweise für Immunfluoreszenz- und Preußisch-Blau-Färbungen genutzt. Die ACC nach *in vivo* Zellinjektion (vgl. 3.3) wurden ebenfalls für Immunfluoreszenzfärbungen genutzt.

### **3.8.1 Fixierung mit Paraformaldehyd**

Um die Blutgefäße zu fixieren, wurden die mit magnetischen Komplexen perfundierten Aorten (vgl. 3.2.3.1.1) nach Abwarten der 6-tägigen Inkubationszeit und die mit Zellen perfundierten Aorten (vgl. 3.2.3.1.2) unmittelbar nach der Perfusion für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung gelagert. Die Karotiden wurden nach der isometrischen Kraftmessung im Drahtmyographen vorsichtig wieder aus der Apparatur entnommen und ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung gelagert. Danach wurden die Gefäße kurz in DPBS gewaschen und weiter behandelt.

### **3.8.2 Kryokonservierung der Aorten**

Die wie unter 3.8.1 beschriebenen fixierten Aorten und Karotiden wurden in ein mit Tissue-Tek O.C.T. Compound gefülltes Schnappdeckelgefäß überführt. Sie wurden in dem Einfriermedium möglichst mittig und senkrecht positioniert und mit Hilfe von auf -80°C herabgekühltem Methylbutan auf Trockeneis eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die auf diesem Weg kryokonservierten Aorten bei -80°C gelagert.

### **3.8.3 Anfertigung von Aortenschnitten**

Von den wie oben beschriebenen kryokonservierten Aorten und Karotiden wurden mit Hilfe eines Kryotoms der Firma Leica 10 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

### **3.8.4 Immunfluoreszenzfärbung von Aortenschnitten**

Die Fluoreszenzfärbung der Aorten- und Karotisschnitte wurde direkt auf den Objektträgern durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und zunächst kurz mit DPBS gewaschen. Danach wurden sie mit 0,2% Tritonlösung für 30 Minuten permeabilisiert und nochmals mit DPBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Hilfe von 5%igem Eserserum blockiert. Danach folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (vgl. 3.1.10.1) für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ für 12 Stunden bei 4°C. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit DPBS. Der mit einem Fluorophor konjugierte sekundäre Antikörper (vgl. 3.1.10.2) wurde in einer Hoechst-Färbelösung verdünnt. Der Sekundärantikörper richtete sich stets gegen die Spezies, aus der der primäre Antikörper

gewonnen wurde, und wurde für 1 Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit DPBS gewaschen und schließlich eingedeckt. Danach wurden die eingedeckten, gefärbten Schnitte im Dunklen über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und zeitnah mikroskopiert.

### **3.8.5 Preußisch-Blau-Färbung von Aortenschnitten**

Um in den mit Zellen perfundierten Aorten (vgl.3.2.3.1.2) das in den bPAECs aufgenommene Eisen zu visualisieren, wurden die Schnitte mit Preußisch-Blau Färbelösung gefärbt. Es wurden analog zu den Immunfluoreszenzfärbungen 10 µm dünne Schnitte von PFA-fixierten, kryokonservierten Aorten verwendet. Eine 5% Kaliumhexazyanoferat(II)-Lösung wurde unter dem Abzug 1:1 mit 5% (v/v) HCl gemischt. Mit dieser Färbelösung wurden die Schnitte für 20 Minuten inkubiert und anschließend 3 Mal mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte eingedeckt und mindestens 1 Tag getrocknet. Die gefärbten Schnitte wurden zeitnah mikroskopiert.

## **3.9 Mikroskopie**

Für die Aufnahmen der perfundierten Aorten sowie der Schläuche (vgl.3.2) wurde ein Fluoreszenz-Stereomikroskop MZ16F mit einer Fluoreszenzlampe ebq100 und einer ProgRes C10+ Mikroskopkamera in Kombination mit der entsprechenden ProgRes Image Capture Software verwendet. Für Fluoreszenzaufnahmen von gefärbten Gefrierschnitten (vgl. 3.8.4) wurde ein Zeiss Observer Z1 mit einer XBO 75 Fluoreszenzlampe und einer AxioCam MRm verwendet und die entsprechende AxioVision Software. Für Aufnahmen von histologischen Färbungen (vgl. 3.8.5) wurde ein Zeiss Axiovert 200 M mit einer AxioCam MRC verwendet und ebenfalls die AxioVision Software.

## **3.10 Statistik**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Software Programmen Excel und GraphPad Prism. Die in dieser Arbeit gezeigten Balkendiagramme zeigen die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Unterschiede in den Ergebnissen wurden beim Vergleich von zwei Gruppen mit dem Student's t-Test berechnet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA und als *post hoc* Analyse der *Tukey's comparison test*

durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der errechnete p-Wert geringer als 0,05 war.

Folgende Arbeiten wurden von anderen Personen durchgeführt, jedoch in Absprachen mit Herrn Prof. Dr. Fleischmann und Frau Dr. Wenzel im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

	<b>durchgeführt von</b>	<b>Institut</b>
Präparation und Magnetofektion der bPAECs	Sarah Rieck	Institut für Physiologie I, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Viruspräparation	Dr. Katrin Zimmermann	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
numerische Simulationen der magnetischen Gradienten	Alexandra Heidsieck	Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Gleich, Zentralinstitut für Medizin Technik, Technische Universität München
Herstellung des Nanopartikels SO-Mag5	Dr. Olga Mykhaylyk	Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Elektronenmikroskopie der magnetofizierten bPAECs	Prof. Dr. Bloch	Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung der optimalen Magnetkonfiguration zur zielgerichteten direkten Transduktion und Zellpositionierung in Mausex vivo

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Strategie zum Gentransfer und Zellersatz in Blutgefäßen unter Flussbedingungen zu etablieren. Hierzu wurden lentivirale Vektoren (LV), MNPs und magnetische Felder miteinander kombiniert. Es wurden zunächst *ex vivo* Versuche durchgeführt, um die Realisierbarkeit dieser Anwendung zu testen und um das am besten geeignete magnetische Feld zu identifizieren. Dieses Feld sollte eine möglichst effiziente und gleichmäßige Retention von sowohl magnetischen Komplexen als auch magnetisierten Zellen erlauben. Besonderes Augenmerk wurde auf eine radialsymmetrische Anlagerung von Komplexen und Zellen gelegt, da dieses Verteilungsmuster der physiologischen Endothelauskleidung von Blutgefäßen entspricht.

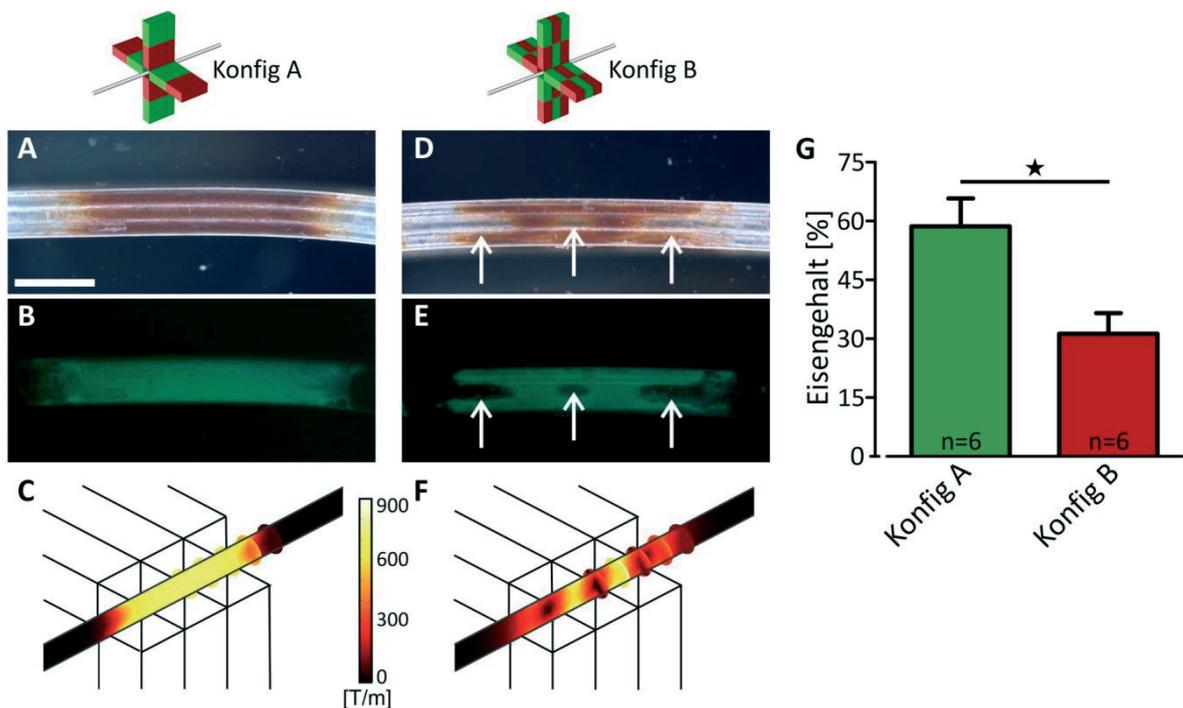
#### 4.1.1 Vergleich von Experiment und mathematischer Simulation der Komplexanlagerung in Blutgefäßen

Zunächst wurden die unter 3.2.1.1 beschriebenen Magnetkonfigurationen, Konfiguration A und Konfiguration B bzw. die entsprechenden magnetischen Felder getestet (Abbildung 10, Abbildung 11). Zum einen sollte diejenige Konfiguration identifiziert werden, die eine möglichst effiziente, homogene und radialsymmetrische Retention von magnetischen Komplexen oder magnetisierten Zellen erlaubt. Zum anderen sollte mit den Versuchen eruiert werden, ob es möglich ist, mit Hilfe numerischer Simulationen von magnetischen Feldern die experimentelle Verteilung von magnetischen Komplexen oder Zellen in einem zylindrischen Model, das einem Blutgefäß entspricht, vorherzusagen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Schlauchperfusionsexperimente durchgeführt. Polyethylen Schläuche wurden in die Perfusionskammer eingespannt und für 30 Minuten mit magnetischen Komplexen perfundiert. Diese bestanden aus dem fluoreszierenden, integrationsinkompetenten pCHIV LV und SO-Mag5 MNPs. Während der 30-minütigen Perfusion waren die Schläuche entweder der Magnetkonfiguration A oder der Magnetkonfiguration B ausgesetzt. Nach der Perfusion war in den mit Konfiguration A perfundierten Schläuchen ein dunkler, homogener Eisenniederschlag sichtbar (Abbildung 17,

A). Auch das Verteilungsmuster der LV, erkennbar durch die native Fluoreszenz der Viruspartikel, stellte sich als entsprechend homogen dar (Abbildung 17, B). Damit entsprach die im Experiment beobachtete Verteilung der magnetischen Komplexe den zuvor angestellten Simulationen für die Magnetkonfiguration A (Abbildung 11, A) (Abbildung 17, C). Im Vergleich dazu stellte sich sowohl die Verteilung der MNPs (Abbildung 17, D), als auch die Verteilung der lentiviralen Vektoren (Abbildung 17, E) bei der Konfiguration B als inhomogen dar. Auch hier korrelierte das experimentelle Ergebnis mit der mathematischen Simulation (Abbildung 11, B) (Abbildung 17, F). Um den Eisenniederschlag in den Schläuchen zu quantifizieren, wurde eine Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung der Schlaucheluate durchgeführt. Es ergab sich eine Eisenretention von  $58,68 \pm 7,07\%$  der ursprünglich eingesetzten Eisenmenge in mit Konfiguration A perfundierten Schläuchen. In den mit Konfiguration B perfundierten Schläuchen wurden  $31,29 \pm 5,24\%$  der eingesetzten Eisenmenge detektiert (Abbildung 17, G). Diese Messwerte stimmten mit den in den Simulationen bestimmten Eisenretentionsmengen von  $61,20\%$  für Konfiguration A und  $16,80\%$  für Konfiguration B recht gut überein.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit Magnetkonfiguration A eine hohe und homogene Komplexretention erzielt werden kann. Des Weiteren ist es möglich, sowohl das Ausmaß dieser Komplexretention als auch ihr Verteilungsmuster in einer zylindrischen Struktur, wie etwa einem Schlauch oder einem Blutgefäß, durch mathematische Simulationen vorherzusagen.



### **Abbildung 17: Perfusion von Schläuchen mit pCHIV LV/SO-Mag5 Komplexen mit verschiedenen Magnetkonfigurationen**

**A:** Eisenniederschlag in einem mit Konfiguration A perfundierten Schlauch. Maßstabsbalken=2 mm **B:** Verteilung der fluoreszierenden pCHIV LV Partikel in ebendiesem Schlauch. **C:** Simulation des Gradienten der magnetischen Flussdichte in [T/m], wie er von Magnetkonfiguration A hervorgerufen wird. **D:** Eisenniederschlag in einem mit Konfiguration B perfundierten Schlauch. Deutlich zu erkennen ist die inhomogene Ablagerung der MNPs (Pfeile). **E:** Verteilung der fluoreszierenden pCHIV LV Partikel in ebendiesem Schlauch. Deutlich zu erkennen ist die inhomogene Verteilung der fluoreszierenden Viruspartikel (Pfeile). **F:** Simulation des Gradienten der magnetischen Flussdichte in [T/m], wie er von Magnetkonfiguration B hervorgerufen wird. **G:** Statistische Auswertung der Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung von Schlaucheluatn nach Perfusion mit Konfiguration A oder B.

Die numerischen Simulationen wurden von Alexandra Heidsieck durchgeführt (Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Gleich, TU München)<sup>169</sup>.

#### **4.1.2 Radialsymmetrische Transduktion von residentem Endothel in Mauseorten unter Flussbedingungen**

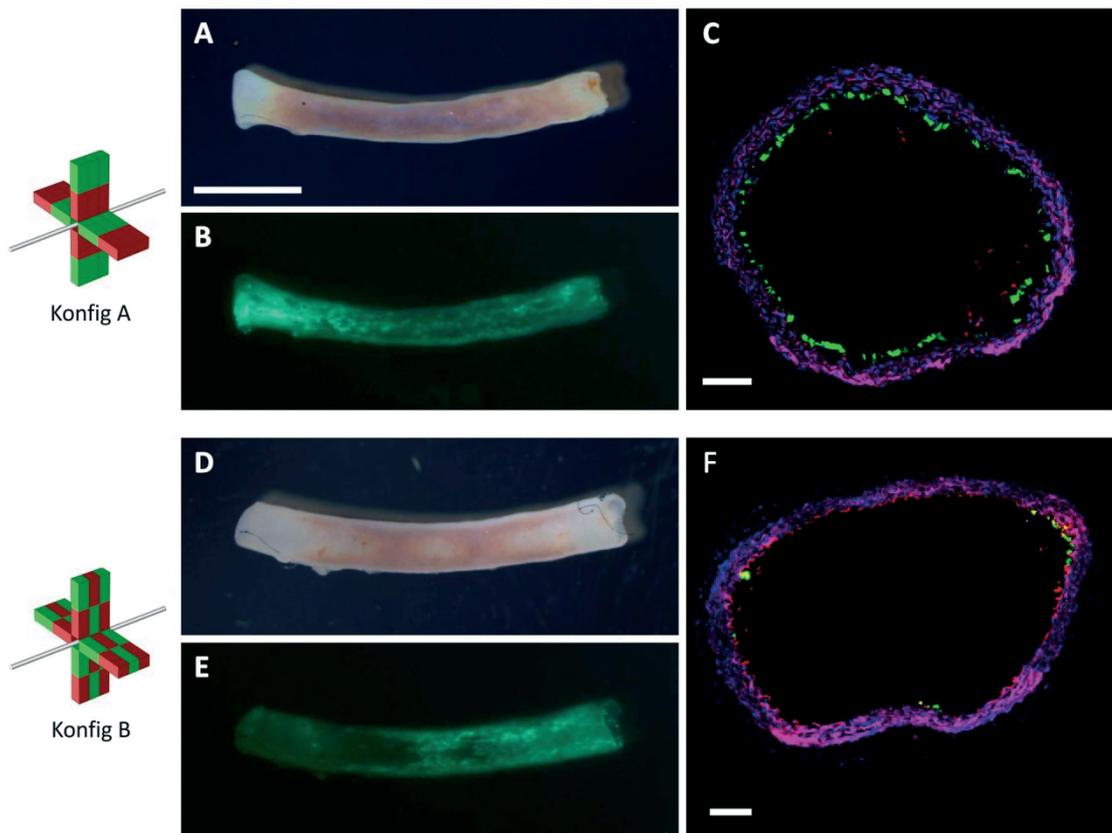
Nachdem durch die Schlauchperfusionsexperimente eine geeignete Magnetkonfiguration zur maximalen und radialsymmetrischen Komplexanlagerung identifiziert wurde, sollte nun eruiert werden, ob die Anwendung von magnetischen Komplexen in Kombination mit magnetischen Feldern auch zur Magnet-gestützten, direkten Transduktion von residentem Gefäßendothel genutzt werden kann. Dazu wurden Aortenperfusionsexperimente durchgeführt. CD1 Aorten wurden in die Perfusionskammer eingespannt und für 30 Minuten mit magnetischen Komplexen perfundiert. Diese bestanden aus CMV-eGFP LV und SO-Mag5 MNPs. Während der 30-minütigen Perfusion waren die Schläuche entweder der Magnetkonfiguration A oder B ausgesetzt. Als Negativkontrolle dienten Aortenperfusionsen ohne angelegtes magnetisches Feld. Das Transduktionsergebnis wurde an Tag 6 nach Perfusion beurteilt.

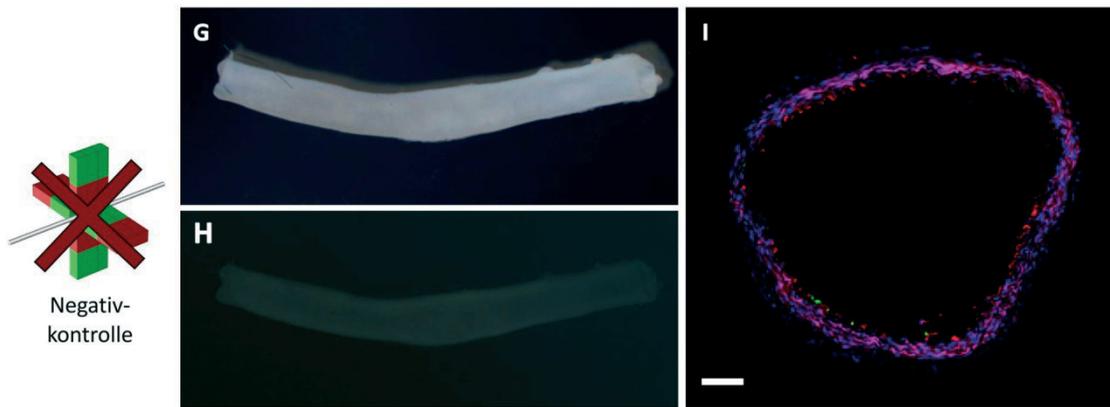
Die mit Konfiguration A perfundierten Aorten zeigten, ähnlich den Ergebnissen der Schlauchperfusionsexperimente, eine homogene und dunkle Eisenanlagerung (Abbildung 18, A). Ebenso konnte eine homogene, das gesamte Gefäß umfassende Transgenexpression beobachtet werden (Abbildung 18, B). Um das Verteilungsmuster der eGFP-Expression genauer beurteilen zu können, wurden Gefrierschnitte der perfundierten Gefäße angefertigt. Zur besseren Visualisierung des Gewebeschnitts wurden die Zellkerne mit Hoechst Farbstoff angefärbt. Das murine Endothel wurde mit Hilfe eines PECAM-Antikörpers und die glatte Gefäßmuskulatur mit Hilfe eines  $\alpha$ smac-Antikörpers und den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern dargestellt. In den Querschnitten durch das Gefäß wurde deutlich, dass die eGFP-Expression radialsymmetrisch entlang der Aortenwand zu detektieren war (Abbildung 18, C). Weiterhin konnte durch die in den

Immunfluoreszenzfärbungen erkennbare Kollokalisierung des PECAM- und des eGFP-Signals gezeigt werden, dass die Transgenexpression auf das Endothel beschränkt war (Abbildung 19).

Im Gegensatz zu den mit Konfiguration A perfundierten Aorten zeigten die mit B perfundierten Gefäße auch hier wieder analog zu den Schlauchperfusionsexperimenten eine inhomogene Eisenanlagerung (Abbildung 18, D). Ebenso konnte nach 6 Tagen eine inhomogene, lückenhafte Transgenexpression beobachtet werden (Abbildung 18, E). Auch im Querschnitt des Gefäßes zeigte sich eine nur auf kleine Abschnitte begrenzte eGFP-Expression, die nicht als radialsymmetrisch betrachtet werden kann (Abbildung 18, F).

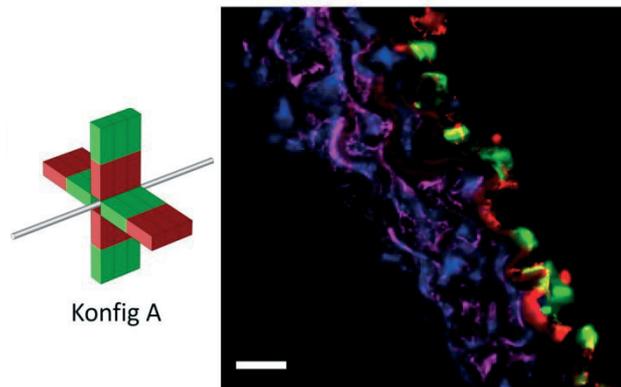
In Aorten, die mit magnetischen Komplexen, aber ohne Exposition in einem magnetischen Feld perfundiert wurden, konnte weder MNP-Retention noch Transgenexpression beobachtet werden (Abbildung 18, G bis I). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die direkte Transduktion der Anwesenheit eines magnetischen Feldes bedarf.





**Abbildung 18: Direkte Transduktion von CD1 Aorten nach Perfusion mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen mit verschiedenen Magnetkonfigurationen**

**A:** Durchlichtbild einer mit Konfiguration A perfundierten Aorta. Maßstabsbalken=2 mm **B:** Fluoreszenzbild derselben Aorta. **C:** Immunfluoreszenzfärbung des Querschnitts der mit Konfiguration A perfundierten Aorta. blau: Hoechst, rot: PECAM murin, magenta:  $\alpha$ smac, Maßstabsbalken=100  $\mu$ m **D:** Durchlichtbild einer mit Konfiguration B perfundierten Aorta. **E:** Fluoreszenzbild derselben Aorta. **F:** Immunfluoreszenzfärbung des Querschnitts der mit Konfiguration B perfundierten Aorta. Maßstabsbalken=100  $\mu$ m **G:** Durchlichtbild einer ohne angelegtes Magnetfeld perfundierten Aorta (Negativkontrolle). **H:** Fluoreszenzbild derselben Aorta. **I:** Immunfluoreszenzfärbung des Querschnitts der ohne magnetisches Feld perfundierten Aorta. Maßstabsbalken=100  $\mu$ m

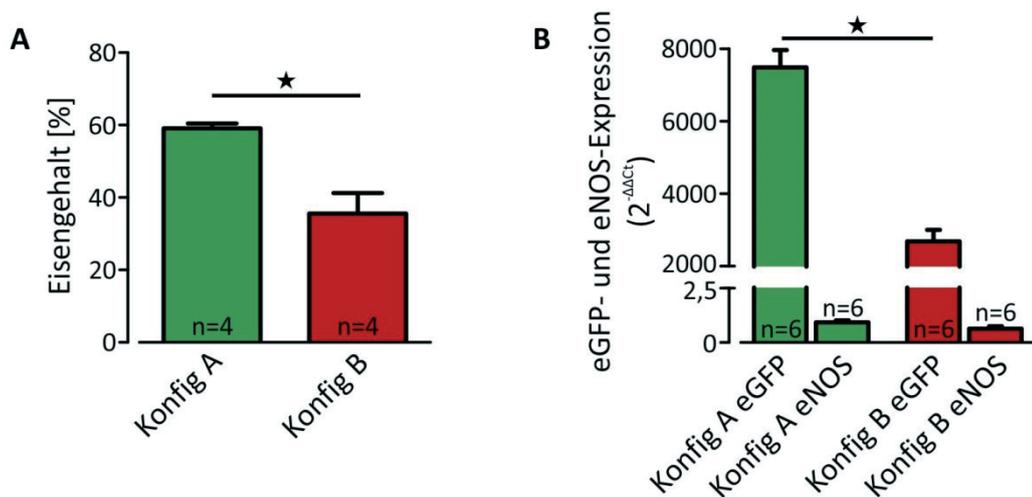


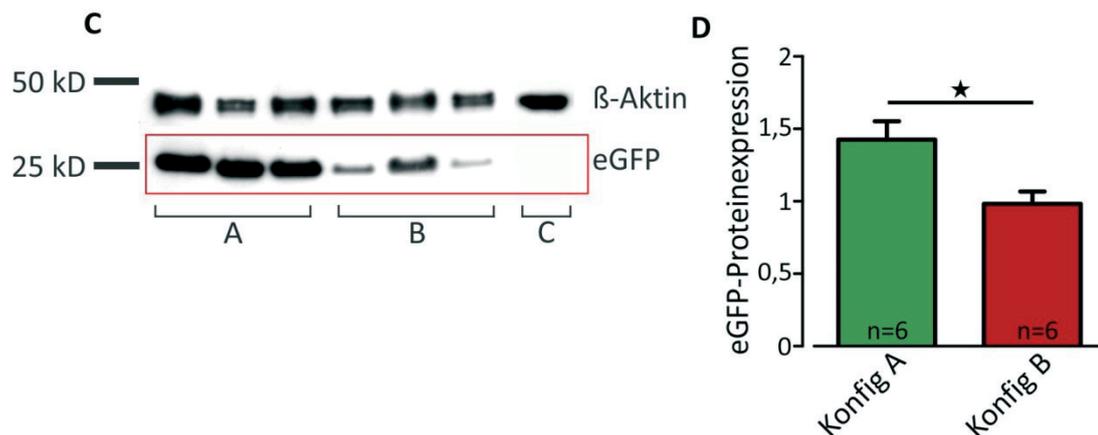
**Abbildung 19: Endothelständige eGFP-Expression in transduzierter CD1 Aorta nach Perfusion mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen mit der Magnetkonfiguration A**

Vergrößerte Ansicht der Wand mit dem eGFP exprimierenden Endothel einer mit Magnetkonfiguration A perfundierten Aorta (ganzes Gefäß dargestellt in Abbildung 18, A, B und C). Blau: Hoechst, rot: PECAM murin, magenta:  $\alpha$ smac, Maßstabsbalken=20  $\mu$ m

Zur weiteren Analyse und Quantifizierung des Transduktionserfolgs wurden Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung, qRT-PCR und Western Blot Experimente mit Homogenisaten der zuvor perfundierten Aorten durchgeführt. Mit Hilfe der Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung konnte in den mit Konfiguration A perfundierten Aorten  $51,41 \pm 1,23\%$  der ursprünglich eingesetzten Eisenmenge von 35  $\mu$ g detektiert werden (Abbildung 20, A). Dies war eine in etwa doppelt so hohe Eisenretention wie in den mit B perfundierten Aorten, in denen  $35,58 \pm 5,66\%$  des

eingesetzten Eisens gefunden werden konnte (Abbildung 20, A). Diese Werte korrelieren mit den in den perfundierten Schläuchen bestimmten Eisenwerten und den zuvor angestellten Berechnungen zur Eisenretention. Durch Quantifizierung der eGFP-mRNA Menge mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die direkte Transduktion mit Konfiguration A zu einer höheren Expression des Transgens eGFP führte ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Konfiguration A:  $7493 \pm 477,80$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Konfiguration B:  $2689 \pm 312,30$ ; die  $\Delta Ct$ -Werte wurden auf die entsprechenden Messwerte der als Negativkontrolle genutzten Aorten, die ohne magnetisches Feld perfundiert wurden, normiert) (Abbildung 20, B). Des Weiteren konnte durch qRT-PCR in den mit Magnetkonfiguration A oder B perfundierten Aorten kein signifikanter Unterschied in deren eNOS-mRNA Level festgestellt werden ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Konfiguration A:  $0,92 \pm 0,10$ ,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Konfiguration B:  $0,64 \pm 0,10$ ; die  $\Delta Ct$ -Werte wurden auf die entsprechenden Messwerte der als Negativkontrolle genutzten Aorten, die ohne magnetisches Feld perfundiert wurden, normiert) (Abbildung 20, B). Dies weist auf die Unversehrtheit des Aortenendothels nach Perfusion hin. Schließlich wurde auch die eGFP-Expression auf Proteinebene durch Western Blot analysiert. Schon auf den ersten Blick wird deutlich, dass in mit Konfiguration A perfundierten Aorten wesentlich mehr eGFP exprimiert ist, als in solchen, die mit B perfundiert wurden (Abbildung 20, C, Bahnen 1 bis 6). In der Negativkontrolle war kein eGFP nachzuweisen (Abbildung 20, C, Bahn 7). Die semiquantitative Auswertung bestätigte diesen Eindruck. Mit Magnetfeld A konnte das  $1,42 \pm 0,13$ -fache an eGFP normiert auf  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden, während es mit Magnetfeld B lediglich das  $0,98 \pm 0,09$ -fache war (Abbildung 20, D).





**Abbildung 20: Analyse der mit eGFP LV/SO-Mag5 direkt transduzierten CD1 Aorten**

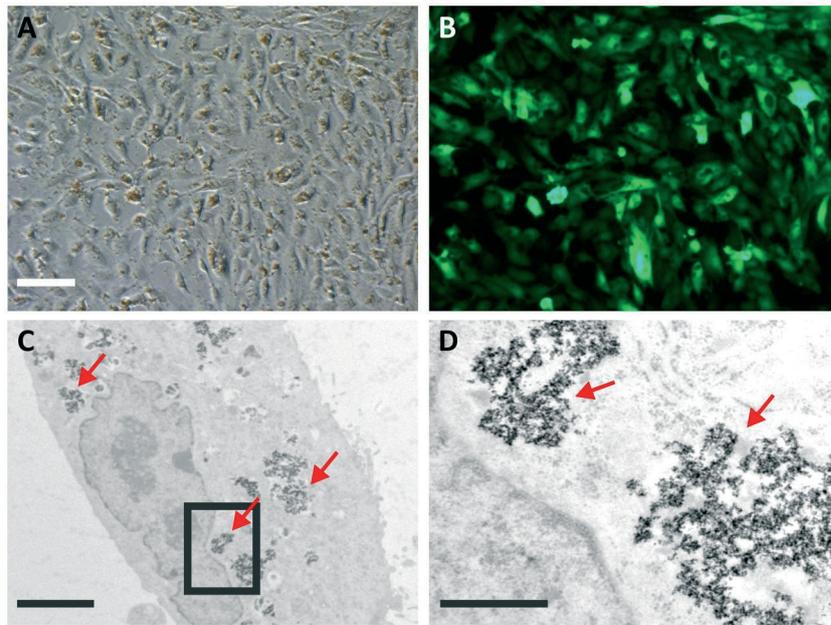
**A:** Statistische Auswertung der Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung in Aortenhomogenisaten nach Perfusion mit Konfiguration A oder B. **B:** Auswertung der relativen Genexpression mittels qRT-PCR. Bestimmt wurden mRNA Mengen von eGFP und eNOS in mit A oder B perfundierten Aorten. Auswertung nach der  $2^{-\Delta\Delta}$ -Methode mit Bezug auf die Negativkontrolle, bei der während der Perfusion keine Exposition gegenüber einem magnetischen Feld bestand. **C:** Western Blot zur Detektion der eGFP-Menge auf Proteinebene. Bahn 1-3: mit Konfiguration A perfundierte Aorten, Bahn 4-6: mit Konfiguration B perfundierte Aorten, Bahn 7: Negativkontrolle. **D:** Semiquantitative Auswertung des Western Blots, für die die eGFP-Menge auf die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normiert wurde.

Durch die makroskopische Betrachtung Aorten, die mit magnetischen Komplexen perfundiert wurden, konnten die Ergebnisse der Schlauchperfusionsexperimente bestätigt werden. Weitergehende Analyseverfahren bestätigten dies. Die Magnet-gestützte, direkte Transduktion stellt ein geeignetes Verfahren dar, um Transgene, in diesem Fall das Reportergen eGFP, unter Flussbedingungen zielgerichtet in das Gefäßendothel einzuschleusen. Die vorab durch die Arbeitsgruppe Gleich berechneten Rate an Komplex-Retention durch die Magnetfelder A und B sowie das jeweilige Verteilungsmuster der magnetischen Komplexe stimmen mit den experimentellen Ergebnissen überein. Es konnte gezeigt werden, dass Magnetkonfiguration A im Gegensatz zu Konfiguration B eine gleichmäßige, effiziente und radialsymmetrische Komplex-Retention und auch Transgenexpression liefert. Da damit noch einmal die besonders gute Eignung von Magnetkonfiguration A bestätigt werden konnte, wurde in den nachfolgend gezeigten Experimenten mit dieser Magnetkonfiguration gearbeitet.

#### **4.1.3 Radialsymmetrische Positionierung von magnetofizierten Endothelzellen in Mauseaorten unter Flussbedingungen**

Um zu testen, ob auch die zweite in dieser Arbeit adressierte Strategie, die Magnet-gestützte Positionierung von Endothelzellen unter Flussbedingungen, durch Applikation von Magnetkonfiguration A möglich ist, wurden wiederum Aortenperfusionsen durchgeführt. Ziel war es auch in diesem Fall, eine möglichst effiziente und vor allem radialsymmetrische Positionierung von Zellen zu erhalten.

Die CD1 Aorten wurden vor der Perfusion mit Hilfe eines dünnen Drahtes denudiert. Durch die Entfernung des nativen Endothels der Mauseorta wurde eine Endothelschädigung nachgeahmt, wie sie etwa nach PTA-Intervention auftreten kann. Für die halbstündige Perfusion wurden bPAECs präpariert. Diese wurden durch die Aufnahme von magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eGFP LV und SO-Mag5 MNPs zum einen transduziert und im selben Schritt durch die Aufnahme der MNPs in das Zytoplasma der Zellen magnetisiert (Abbildung 21). Die Zellen wurden am dritten Tag nach der Magnetofektion für die Perfusion genutzt, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der eGFP-Expression erreicht war (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Durch die grüne Fluoreszenz der Zellen ließ sich deren Verteilungsmuster entlang der Aortenwand besonders gut visualisieren. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, durchgeführt von Herrn Prof. Dr. Bloch (Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln), konnte die genaue intrazelluläre Lokalisierung der MNPs untersucht werden (Abbildung 21, C und D). Es zeigte sich, dass die MNPs frei im Zytoplasma vorlagen und nicht in Autophagosomen eingekapselt waren. Auch ein weitestgehend unveränderter endothelialer Zellphänotyp konnte anhand dieser ultrastrukturellen Aufnahmen festgestellt werden.

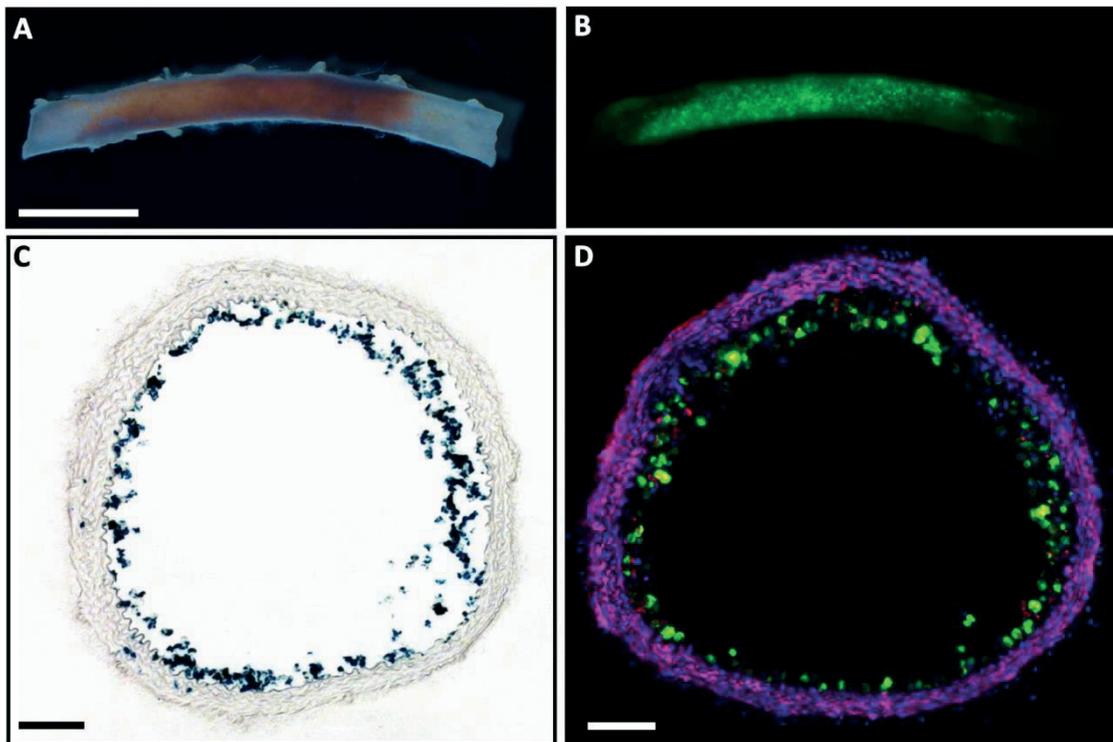
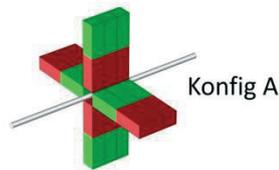


**Abbildung 21: Durch Magnetofektion transduzierte und magnetisierte bPAECs**

**A:** Durchlichtbild von bPAECs nach der Magnetofektion mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen. Im Zytoplasma sind deutlich die braun imponierenden Nanopartikel zu erkennen. Maßstabsbalken=100  $\mu$ m **B:** Fluoreszenzaufnahme von ebendiesen Zellen. Durch die Transduktion mit CMV-eGFP LV als Bestandteil der magnetischen Komplexe zeigen die Zellen eine starke Expression des grün fluoreszierenden Transgens. **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit magnetischen Komplexen behandelten Endothelzelle. Zu erkennen ist der Zellkern und die dunklen MNPs im Zytoplasma (Pfeile). Maßstabsbalken=5  $\mu$ m **D:** Der in Bild C durch einen schwarzen Kasten markierte Bereich ist hier vergrößert dargestellt. Maßstabsbalken=1  $\mu$ m Die Präparation der Zellen erfolgte durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch Herrn Prof. Dr. Bloch (Deutsche Sporthochschule Köln).

Die eGFP-positiven bPAECs wurden für Aortenperfusionsexperimente genutzt. Während der gesamten Perfusion waren die denudierten CD1 Aorten von dem Magnetfeld der Konfiguration A umgeben. Die mit den Zellen perfundierten Aorten zeigten, ähnlich den Ergebnissen der Perfusionen mit magnetischen Komplexen, eine homogene Anlagerung bPAECs, die durch ihre Beladung mit MNPs braun imponieren (Abbildung 22, A). Dieses Verteilungsmuster bestätigte sich durch Fluoreszenzaufnahmen, die die Beurteilung der Verteilung der transgenen bPAECs anhand ihrer eGFP-Expression erlaubten (Abbildung 22, B). Um das Verteilungsmuster der eGFP-exprimierenden, mit MNPs beladenen Zellen genauer beurteilen zu können, wurden wiederum Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden entweder für Immunfluoreszenzfärbungen genutzt oder Preußisch-Blau gefärbt (Abbildung 22, C und D). In den Querschnitten wurde deutlich, dass die Zellen radialsymmetrisch und enganliegend an der Aortenwand positioniert waren. Durch Auszählung der eGFP-positiven bPAECs wurde eine Zellretentionsrate von  $19,40 \pm 7,70\%$  der in das *ex vivo* Perfusionssystem injizierten Zellen ermittelt. Die entspricht einer gemittelten Zellretention von ca. 40 000

Zellen pro Mauseorta oder 3200 Zellen pro  $\text{mm}^2$  Aortenwand (bei einer mittleren Gefäßlänge von etwa 4 mm auf der sich grüne fluoreszierende Zellen finden, und einem Radius von etwa 0,50 mm, aus denen sich eine Mantelfläche von  $12,8 \text{ mm}^2$  ergibt).



**Abbildung 22: Denudierte CD1 Aorta, die mit magnetofizierten bPAECs perfundiert wurde**

**A:** Durchlichtbild denudierten CD1 Aorta, die unter Anwesenheit der Magnetkonfiguration A mit magnetofizierten bPAECs perfundiert wurde. Maßstabsbalken=2 mm **B:** Fluoreszenzbild derselben Aorta. **C:** Preußisch-Blau-Färbung eines Querschnitts der Aorta. blau: Eisen-haltige MNPs in den bPAECs. Maßstabsbalken=100  $\mu\text{m}$  **D:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts einer mit Zellen perfundierten Aorta. blau: Hoechst, grün: eGFP-Fluoreszenz der Zellen, rot: PECAM bovin, magenta:  $\alpha\text{smac}$ ; Maßstabsbalken=100  $\mu\text{m}$

Die Präparation der Zellen erfolgte durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn).

Sowohl durch die makroskopische Betrachtung der Aorten, die mit magnetisierten und transduzierten bPAECs perfundiert wurden, als auch Immunfluoreszenz-sowie Preußisch-Bau-Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Magnet-gestützte Zellpositionierung ein geeignetes Verfahren darstellt, um Endothelzellen unter Flussbedingungen zielgerichtet entlang der denudierten Wand von Mauseorten zu positionieren. Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit den Schlauchperfusionsexperimenten sowie mit den Ergebnissen der

direkten Endotheltransduktion von Aorten gezeigt werden, dass Magnetkonfiguration A eine gleichmäßige, effiziente und radialsymmetrische Zellpositionierung ermöglicht.

In den nun folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die Strategie der zielgerichteten direkten Transduktion sowie der Magnet-gestützten Zellpositionierung praktikabel sind, um funktionelle, für eine physiologische Endothelfunktion essentielle Gene, unter Flussbedingungen in Blutgefäße einzubringen. Es wurde dabei stets mit der Magnetkonfiguration A gearbeitet, da diese, wie oben gezeigt, eine effiziente, gleichmäßige und radialsymmetrische Retention von magnetischen Komplexen und magnetisierten Zellen erlaubt.

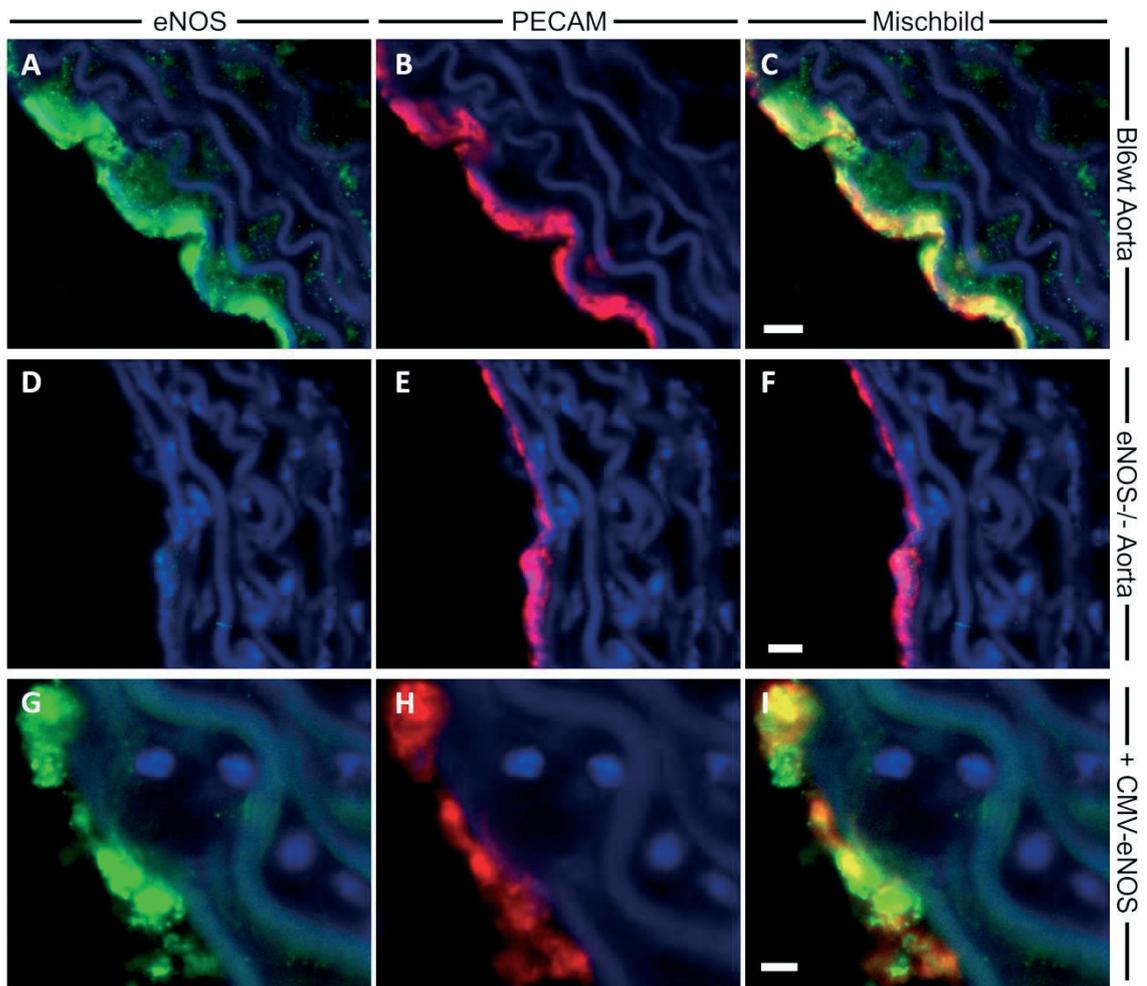
## **4.2 Zielgerichtete, Magnet-gestützte direkte Transduktion von Endothel in Mausarten mit funktionellen Genen**

In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Strategie der direkten Transduktion erfolgreich genutzt werden kann, um Transgene, wie das Reporter-gen eGFP, unter Flussbedingungen effizient und radialsymmetrisch in residente Endothelzellen von Mausarten einzuschleusen. Auch die für diese Applikation am besten geeignete Magnetkonfiguration, Konfiguration A, konnte bereits identifiziert werden. Nun wurde in weiteren Experimenten erprobt, ob es möglich ist, auch funktionelle Gene, wie etwa eNOS oder VEGF, mittels direkter Transduktion in nativem Endothel von Mausarten überzuexprimieren. Weiterhin sollte eruiert werden, ob die direkte Transduktion mit funktionellen Genen eine Auswirkung auf die Gefäßfunktion hat.

### **4.2.1 Direkte Transduktion von Mausendothel mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS LV und SO-Mag5 MNPs unter Flussbedingungen**

In dieser Reihe von Experimenten wurde getestet, ob mittels direkter Transduktion eNOS in nativem Endothel von Mausarten überexprimiert werden kann. Zu diesem Zwecke wurden eNOS<sup>-/-</sup> Aorten dem magnetischen Feld der Konfiguration A ausgesetzt und mit Komplexen bestehend aus CMV-eNOS LV und SO-Mag5 MNPs perfundiert. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der direkten Transduktion und ihr Einfluss auf die Gefäßfunktion dargelegt.

Zunächst wurden die Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden, Tag 6 nach Transduktion anhand von Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten analysiert. Um den Transduktionserfolg besser einschätzen zu können, wurden Bl6 Aorten sowie unbehandelte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten zum Vergleich herangezogen. In den Bl6 Aorten war ein starkes, endothelständiges eNOS-Signal zu erkennen (Abbildung 23, A bis C). In den unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten hingegen waren keinerlei eNOS-exprimierende Zellen sichtbar (Abbildung 23, D bis F). Nach der Perfusion mit Komplexen jedoch war in der PECAM-positiven Endothelzellschicht der eNOS<sup>-/-</sup> Aorten ein klares eNOS-Signal zu detektieren (Abbildung 23, G bis I).



**Abbildung 23: Vergleich der eNOS-Expression einer eNOS<sup>-/-</sup> Aorta, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurde, mit unbehandelten Gefäßen**

**A-C:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer unbehandelten Bl6 Aorta. Maßstabsbalken=10 µm  
**D-F:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. Maßstabsbalken=10 µm  
**G-I:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer eNOS<sup>-/-</sup> Aorta nach Perfusion mit CMV-eNOS LV/So-Mag5 Komplexen. Maßstabsbalken=5 µm

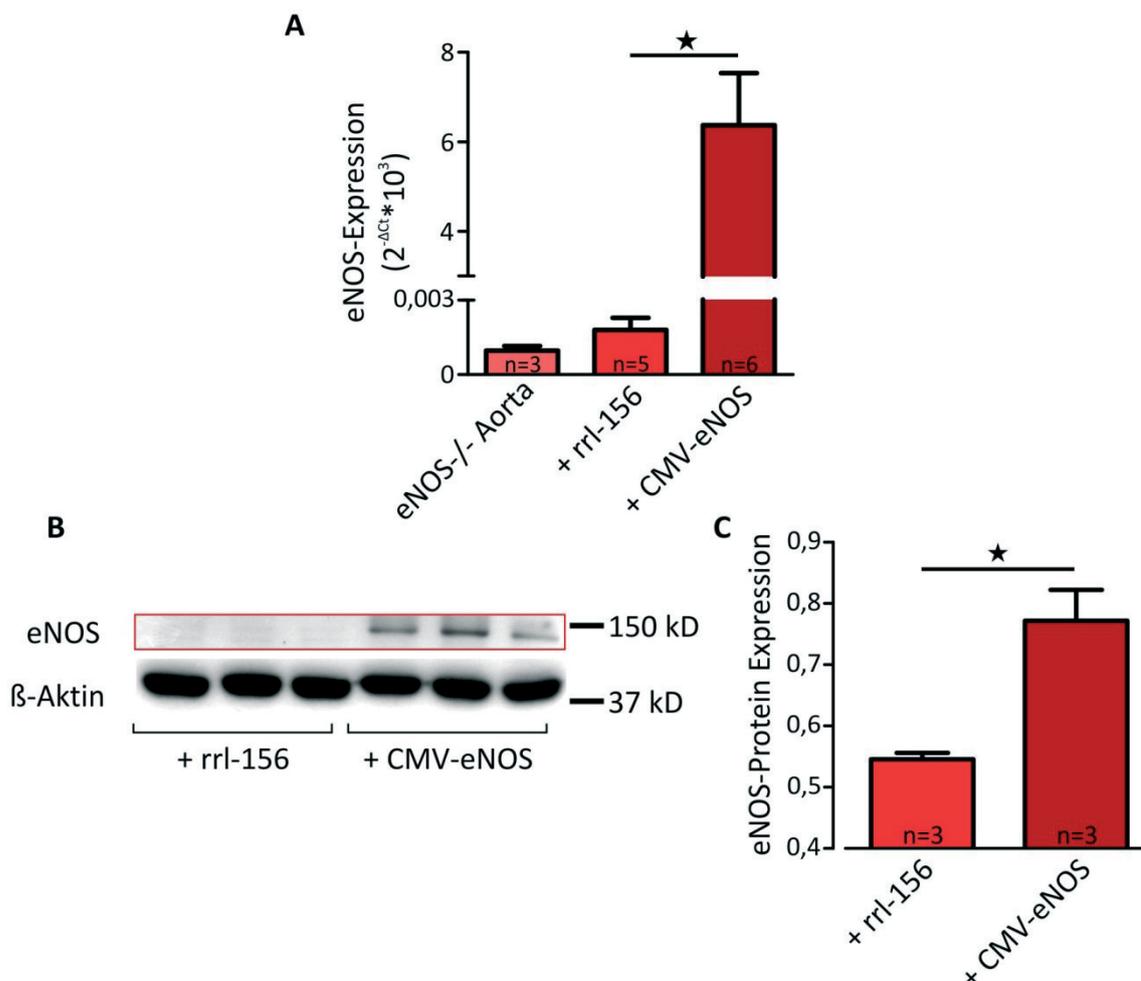
Mit Hilfe dieser Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass die Magnet-gestützte, direkte Transduktion auch für die Überexpression von funktionellen Genen, wie

eNOS, in residenten Mausendothel geeignet ist. Durch die Perfusion von eNOS<sup>-/-</sup> Aorten mit magnetischen Komplexen wurden ähnliche eNOS-Expressionsmuster wie in Bl6 Aorten erzielt.

#### **4.2.1.1 Quantifizierung der eNOS-Expression in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen transduziert wurden**

Zur weiteren Analyse und Quantifizierung des Transduktionserfolgs wurden qRT-PCR und Western Blot Experimente mit Homogenisaten der zuvor perfundierten Aorten durchgeführt. Zum Vergleich wurden unbehandelte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten herangezogen sowie eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit magnetischen Komplexen bestehend aus rrl-156 LV und SO-Mag5 MNPs perfundiert wurden. Durch letztere Kontrolle konnte sichergestellt werden, dass etwaige Effekte auf die transgene eNOS zurückzuführen sind, und nicht auf den viralen Vektor selbst.

Die Quantifizierung der eNOS-mRNA Menge in den Homogenisaten erfolgte mittels qRT-PCR. In unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten waren nur geringe Level an relative eNOS-Genexpression zu ermitteln ( $2^{-\Delta Ct}$  eNOS<sup>-/-</sup> Aorta:  $9,67 \cdot 10^{-5} \pm 1,86 \cdot 10^{-5}$ ). Diese konnte durch Perfusion mit rrl-156 LV/SO-Mag5 Komplexen nicht wesentlich erhöht werden ( $2^{-\Delta Ct}$  +rrl-156:  $1,8 \cdot 10^{-4} \pm 4,4 \cdot 10^{-5}$ ). Nach Perfusion mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen war eine deutliche Erhöhung der eNOS-Expression zu detektiert ( $2^{-\Delta Ct}$  +CMV-eNOS:  $6,37 \pm 1,17$ ) (Abbildung 24, A). Weiterhin wurde durch Western Blot Analysen die eNOS-Expression auf Proteinebene untersucht. In den mit rrl-156 LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierten Aorten sind keine eNOS-Banden zu sehen (Abbildung 24, B, Bahnen 1-3), während in den mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierten Aorten hingegen deutliche eNOS-Banden zu erkennen sind (Abbildung 24, B, Bahnen 4-6). Die semiquantitative Auswertung des gezeigten Blots bestätigte diesen optischen Eindruck. Im Falle der Verwendung des rrl-156 LV für die Perfusionen konnte das  $0,55 \pm 0,01$ -fache an eNOS-Protein normiert  $\beta$ -Aktin detektiert werden (Abbildung 24, C). In eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden, konnte das  $0,77 \pm 0,05$ -fache an transgener eNOS festgestellt werden (Abbildung 24, C).



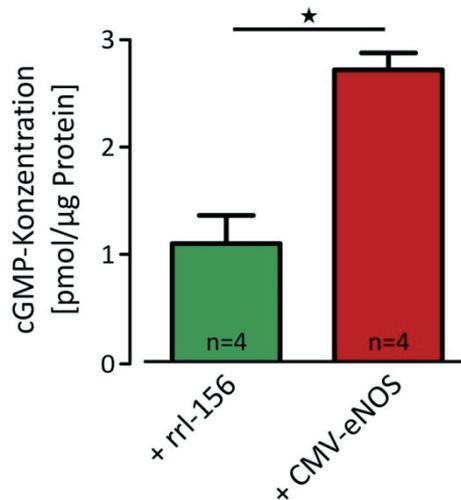
**Abbildung 24: Quantitative Analyse der eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden**

**A:** Auswertung der relativen Genexpression mittels qRT-PCR. Bestimmt wurden mRNA Mengen von eNOS in unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten sowie in solchen die mit Komplexen bestehen aus entweder rrl-156 LV (+rrl-156) oder CMV-eNOS LV (+ CMV-eNOS) und SO-Mag5 perfundiert wurden. **B:** Western Blot zur Detektion der eNOS-Protein Menge. Bahn 1-3: mit rrl-156 LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten (+rrl-156), Bahn 4-6: mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten (+CMV-eNOS). **C:** Semiquantitative Auswertung des Western Blots, für die die eNOS-Mengen auf die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normiert wurden.

#### 4.2.1.2 Analyse der cGMP-Produktion in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/ SO-Mag5 Komplexen transduziert wurden

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen, qRT-PCR und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die direkte Transduktion erfolgreich genutzt werden kann, um das Transgen eNOS in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hochzuregulieren. Nun wurde weiterführend überprüft, ob es sich bei der überexprimierten eNOS um eine funktionell aktive Variante des Enzyms handelt, die katalytisch aktiv ist und die NO-Produktion katalysiert sowie die eNOS-NO-cGMP Signalkaskade anstößt.

Zur Analyse der eNOS-Aktivität wurden mittels ELISA-Messungen die cGMP-Konzentrationen in den perfundierten Aorten bestimmt. Nach Perfusion mit rrl-156/SO-Mag5 Komplexen wurde ein cGMP-Spiegel von  $1,10 \pm 0,26$  pmol cGMP/ $\mu$ g Protein nachgewiesen (Abbildung 25). Dieser in den Behandlungskontrollen gemessene Wert war damit signifikant geringer als der cGMP-Gehalt, der in eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten nach Perfusion mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen festgestellt wurde (+ CMV-eNOS:  $2,72 \pm 0,16$  pmol cGMP/ $\mu$ g Protein) (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Analyse der cGMP-Konzentration in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden**

Statistische Auswertung der Messung des cGMP-Spiegels in eNOS<sup>-/-</sup> nach Perfusion mit rrl-156 LV/SO-Mag5 (+ rrl-156) bzw. CMV-eNOS LV/SO-Mag5 (+ CMV-eNOS) mittels cGMP-ELISA. Die cGMP-Menge wurde auf den Proteininhalt des jeweiligen Homogenisats bezogen.

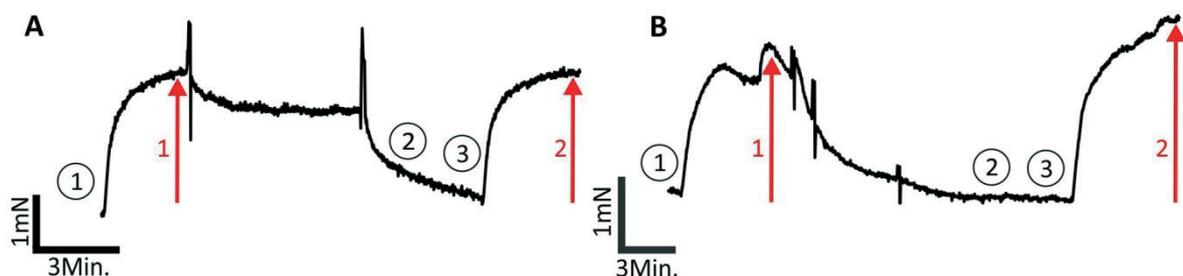
Somit konnte gezeigt werden, dass die Magnet-gestützte direkte Transduktion mit CMV-eNOS/SO-Mag5 Komplexen genutzt werden kann, um funktionell aktive eNOS in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten überzuexprimieren. Diese Strategie führt weiterhin zu einer Aktivierung des eNOS-NO-cGMP-Signalwegs und zum Anstieg der Konzentration an *second messenger* Moleküls cGMP.

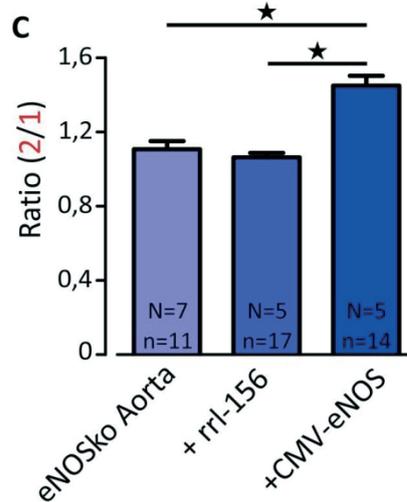
#### 4.2.1.3 Einfluss der direkten Transduktion mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen auf die Tonusregulation in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die überexprimierte eNOS funktionell aktiv ist und zu erhöhten cGMP-Spiegeln in den direkt transduzierten Aorten führt, sollte nun weiterführend untersucht werden, ob durch die hier angewandte Strategie auch direkt die Gefäßfunktion beeinflusst werden kann. Zu diesem Zwecke wurden isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen durchgeführt.

Aus den Messdaten wurde ein Parameter ermittelt, der Aufschluss über die Tonusregulation des Gefäßringes gibt und mit der basalen NO-Produktion korreliert. Dafür wurde für jeweils ein Aortensegment Phe-induzierte Gefäßkontraktionen mit und ohne Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME im Organbad miteinander verglichen. Aus den Kontraktionsamplituden mit und ohne L-NAME Zusatz wurde der Quotient, die Ratio, ermittelt. Je höher die vaskuläre basale NO-Produktion in den Aortenringen war, desto höher fiel im Vergleich zu den Kontraktionen ohne Zusatz des Inhibitors die Kontraktion unter L-NAME-Zusatz aus. Dies war immer dann der Fall, wenn eNOS in den Aortenringen exprimiert wurde. Durch die Inhibition der eNOS durch L-NAME fehlte in diesen Ringen der vasorelaxierende, einer Vasokonstriktion entgegenwirkende Effekt NO. Somit wurde das Verhältnis von Phe-induzierten Kontraktionen mit und ohne L-NAME, die Ratio, größer (Abbildung 26, C) (vgl. 3.4 und Abbildung 15).

Wie zu erwarten war, lag die Ratio in unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten und solchen, die zuvor mit rrl-156 LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden, bei ca. 1 (Ratio unbehandelt:  $1,05 \pm 0,03$ ; Ratio +rrl-156 LV:  $1,07 \pm 0,03$ ) (Abbildung 26,C). Das heißt, es lag keine basale NO-Produktion vor. In mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten jedoch konnte ein signifikant erhöhte Ratio von  $1,37 \pm 0,04$  festgestellt werden. Dieser Anstieg der Ratio deutet auf eine erhöhte basale, tonusaktive NO-Produktion durch die überexprimierte eNOS hin.





**Abbildung 26: Isometrische Kraftmessungen von eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden**

**A:** Original Messdaten einer mit rrl-156 LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. Zur Ermittlung der Ratio wurde der Quotient der beiden Kontraktionsamplituden (hervorgehoben durch die roten Pfeile) ermittelt. **B:** Original Messdaten einer mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen perfundierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. Die zweite Kontraktion, die in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME durch Phe-Applikation ausgelöst wurde, fiel höher aus, als die erste Kontraktion ohne L-NAME Zusatz im Organbad. Diese Beeinflussung des Gefäßtonus ließ auf eine erhöhte basale NO-Produktion schließen. Im Vergleich dazu sind beide in (A) gezeigten Kontraktionen in etwa gleich hoch: ein Einfluss auf den Gefäßtonus war nicht detektierbar. A und B: (1): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM], (2): Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME [100 µM], (3): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM]. **C:** Statistische Auswertung der ermittelten Ratio eNOS<sup>-/-</sup> Aorten nach Perfusion mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 Komplexen im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen.

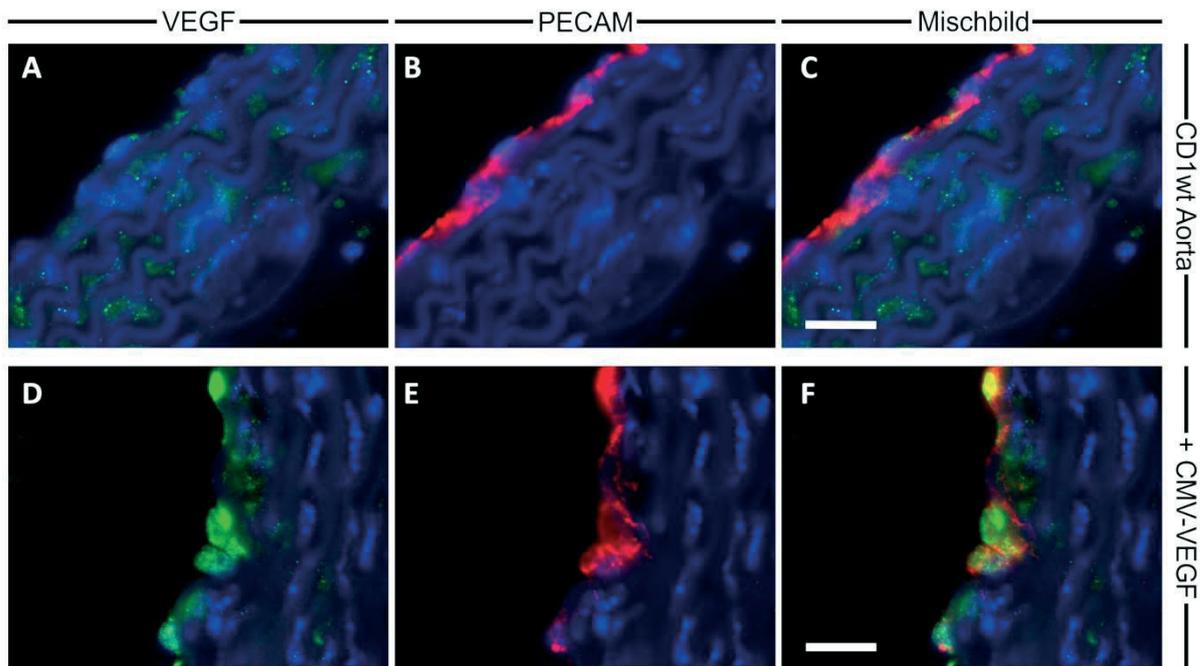
Durch die Magnet-gestützte Perfusion mit CMV-eNOS/SO-Mag5 Komplexen konnte eine starke eNOS-Überexpression in den residenten Endothelzellen von eNOS<sup>-/-</sup> Aorten erzielt werden. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wurden erhöhte eNOS-Level nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die so ins Endothel eingebrachte eNOS funktionell aktiv ist und zu erhöhten cGMP-Spiegeln in den behandelten Gefäßen führt. Schließlich wurde durch isometrische Kraftmessungen demonstriert, dass auch der Gefäßtonus durch die hier angewandte Strategie positiv beeinflusst werden kann.

#### **4.2.2 Direkte Transduktion von Mausendothel mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-VEGF LV und SO-Mag5 MNPs unter Flussbedingungen**

In dieser Reihe von Experimenten wurde getestet, ob mittels direkter Transduktion VEGF in nativem Endothel von Mauseorten überexprimiert werden kann. Zu diesem Zwecke wurden CD1 Aorten dem magnetischen Feld der Konfiguration A ausgesetzt und mit Komplexen bestehend aus CMV-VEGF LV und SO-Mag5 perfundiert. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse dieser direkten Transduktion dargelegt.

Zunächst wurden auch hier die mit CMV-VEGF LV/SO-Mag5 perfundierten CD1 Aorten an Tag 6 nach Transduktion durch Immunfluoreszenzfärbungen von Gefäßquerschnitten analysiert. Um den Transduktionserfolg besser einschätzen zu können, wurden unbehandelte CD1 Aorten zum Vergleich herangezogen. In den unbehandelten Aorten war kein endothelständiges VEGF-Signal zu detektieren (Abbildung 27, A bis C). Nach der Perfusion mit Komplexen jedoch war in der PECAM-positiven Endothelzellschicht der Gefäße ein starkes VEGF-Signal zu erkennen (Abbildung 27, D bis F).

Mit Hilfe dieser Analysemethode konnte gezeigt werden, dass die Magnet-gestützte, direkte Transduktion auch genutzt werden kann, um neben eNOS auch andere, für die Endothelfunktion wichtige Gene, in residentem Mausendothel überzuexprimieren. Durch die Perfusion von CD1 Aorten mit magnetischen Komplexen wurde auch hier eine endothelständige VEGF-Expression erzielt.



**Abbildung 27: Vergleich der VEGF-Expression einer CD1 Aorta, die mit CMV-VEGF LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurde, mit einem unbehandelten Gefäß**

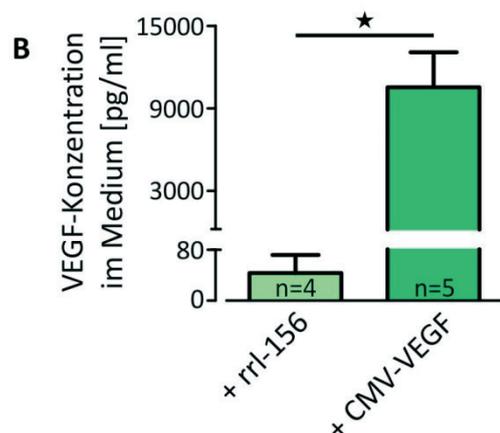
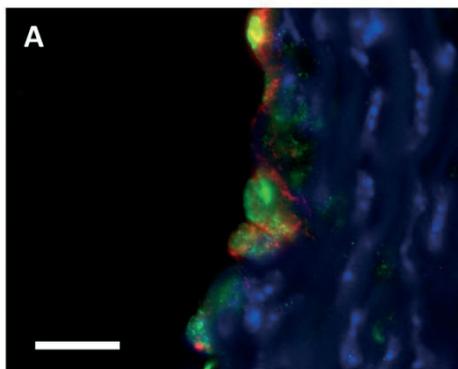
**A-C:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer unbehandelten CD1 Aorta. Maßstabsbalken=20 µm  
**D-F:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer mit Hilfe von magnetischen Komplexen direkt transduzierten CD1 Aorta. Maßstabsbalken=20 µm

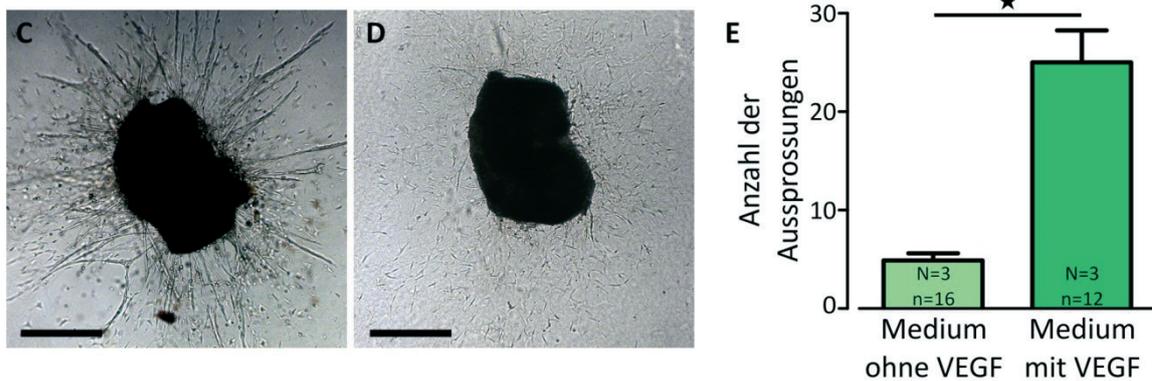
#### 4.2.2.1 Untersuchung der VEGF-Synthese CD1 Aorten nach direkter Transduktion mit CMV-VEGF LV/ SO-Mag5 Komplexen

Nachdem mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden konnte, dass die Strategie der direkten, Magnet-gestützten Transduktion erfolgreich genutzt werden kann,

um das Transgen VEGF in der Endothelzellschicht von CD1 Aorten überzuexprimieren, sollte nun die Funktionalität dieses VEGFs überprüft werden.

Zu diesem Zwecke wurde ein Angiogenese-Assay durchgeführt (vgl. Abbildung 16). Die transduzierten CD1 Aorten wurden für 6 Stunden in Medium inkubiert, um dieses mit dem Wachstumsfaktor VEGF anzureichern. Um zu überprüfen, ob die transduzierten Aorten den Wachstumsfaktor in das Medium sezernierten, wurde mittels ELISA-Messungen die Konzentration an VEGF in diesen Überständen bestimmt. In Überständen von Aorten, die zuvor mit rrl-156 LV/ SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden, konnte  $43,27 \pm 28,61$  pg VEGF/ml nachgewiesen werden (Abbildung 28., B). In Überständen von CD1 Aorten, die mit Hilfe von Komplexen bestehend aus CMV-VEGF und SO-Mag5 MNPs transduziert wurden, konnte hingegen  $10519 \pm 2561$  pg VEGF/ml detektiert werden (Abbildung 28., B). Nachdem so sichergestellt war, dass das konditionierte Medium den Wachstumsfaktor in hoher Konzentration enthielt, wurde dieses in einem Angiogenese-Assay weiter analysiert. Dazu wurde das mit VEGF angereicherte Medium genutzt, um in Kollagengel eingebettete, frisch präparierte Aortenringe zu bedecken. Als Kontrollen wurden Aortenringe mit unbehandeltem Medium ohne VEGF bedeckt. An Tag 8 nach Beginn des Angiogenese-Assays wurde deutlich, dass bei den Ringen, die mit VEGF-haltigem Medium behandelt wurden deutlich mehr endotheliale Aussprossungen zu sehen waren, als bei den Ringen, die mit unbehandeltem Medium inkubiert waren (Abbildung 28, C: Medium mit VEGF, D: Medium ohne VEGF). Durch eine genauere Quantifizierung der Aussprossungen wurde dieser Eindruck bestätigt. In den mit unbehandeltem Medium behandelten Ringen konnten im Mittel  $4,88 \pm 0,74$  Aussprossungen pro Gefäßring gezählt werden, während es bei den mit VEGF-haltigem Medium inkubierten Ringen  $25 \pm 3,27$  waren (Abbildung 28, E).





**Abbildung 28: Analyse der erhöhten VEGF-Produktion in CD1 Aorten, die mit CMV-VEGF LV/SO-Mag5 Komplexen perfundiert wurden**

**A:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnittes einer direkt transduzierten CD1 Aorta. VEGF wird endothelständig exprimiert. Blau: Hoechst, grün: VEGF human, rot: PECAM murin, Maßstabsbalken=20  $\mu$ m **B:** ELISA-Messungen zur Bestimmung der VEGF-Konzentration in Medium, in dem für 6 Stunden transduzierte Aortenringe inkubiert wurden. **C:** Bild eines Aortenringes, der mit VEGF-haltigem Überstand bedeckt wurde. Eine große Anzahl an endothelialen Aussprossungen entlang des gesamten Rings ist deutlich zu erkennen. Maßstabsbalken=500  $\mu$ m **D:** Bild eines Aortenringes, der mit unbehandeltem Überstand bedeckt wurde. Maßstabsbalken=500  $\mu$ m **E:** Quantifizierung der Aussprossungen durch Auszählung.

Die oben beschriebenen Versuche verdeutlichen, dass das mittels direkter Transduktion in die CD1 Aorten eingebrachte VEGF endothelständig exprimiert wird. Weitergehend konnte mit Hilfe des Angiogenese-Assays gezeigt werden, dass dieses VEGF funktionell aktiv ist und ein starkes pro-angiogenetisches Potential aufweist.

### 4.3 Zielgerichtete, Magnet-gestützte *ex vivo* Positionierung von Endothelzellen in Mauseorten unter Flussbedingungen

In den unter 4.1.3 beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Strategie der Magnet-gestützten Endothelzellpositionierung erfolgreich genutzt werden kann, um magnetisierte und mit dem Reportergen eGFP transduzierte bPAECs unter Flussbedingungen effizient und radialsymmetrisch entlang der Wand einer denudierten Mauseorta zu positionieren. Auch die für diese Applikation am besten geeignete Magnetkonfiguration, ebenfalls Konfiguration A, konnte bereits identifiziert werden. Nun wurde in weiteren Experimenten eruiert, ob es möglich ist, auch mit funktionellen Genen, wie etwa eNOS, transduzierte bPAECs mit Hilfe derselben Strategie in der Mauseorta zu positionieren. Weiterhin sollte überprüft werden, ob diese Wiederbesiedelung von deendothelialisierten Gefäßen Auswirkungen auf deren Funktion hat.

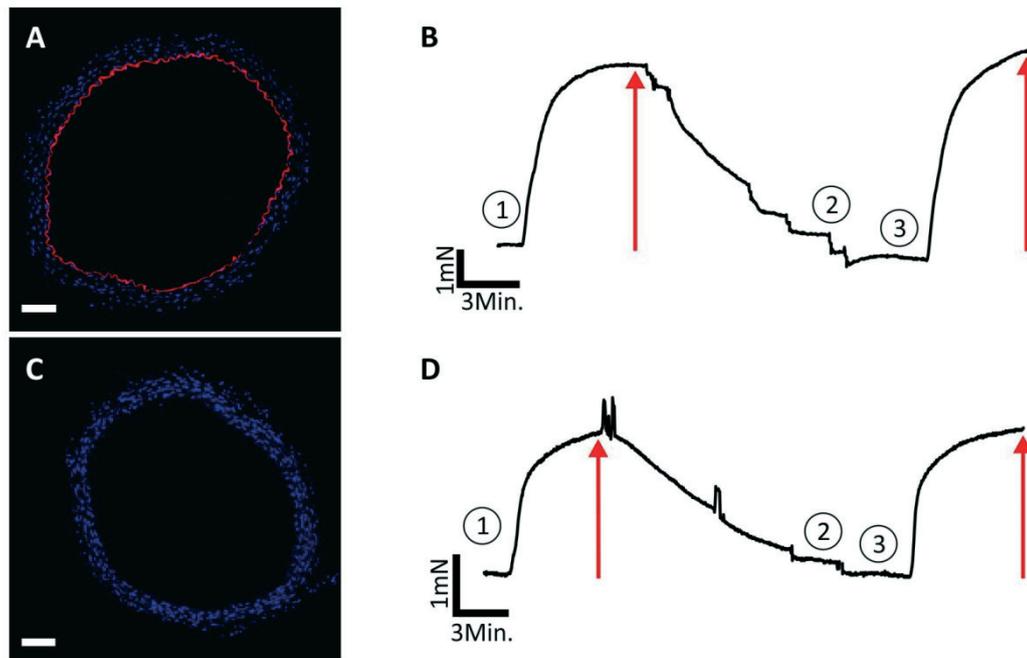
### **4.3.1 Zellpositionierung in CD1 Aorten unter Flussbedingungen**

Diese Reihe von Experimenten hatte zum Ziel, in CD1 Aorten geschädigtes Endothel mit magnetofizierten Endothelzellen zu ersetzen. Die zu positionierenden bPAECs wurden im Vorfeld mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS-IRES-eGFP LV und SO-Mag5 MNPs transduziert und gleichzeitig magnetisiert (im Weiteren als eNOS bPAECs bezeichnet). Die Zellen wurden an Tag 5 nach der Magnetofektion für die Perfusion genutzt, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der eNOS sowie der NO-Produktion erreicht war (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Diese wurden dann in das *ex vivo* Perfusionssystem eingespeist und durch das magnetischen Feld der Magnetkonfiguration A an der Gefäßwand positioniert. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse dieser Zellpositionierung und ihr Einfluss auf die Gefäßfunktion dargelegt.

#### **4.3.1.1 Untersuchung des Einflusses der Deendothelialisierung von CD1 Aorten auf die Gefäßfunktion**

Bevor sie für Perfusionsexperimente genutzt wurden, wurden die CD1 Aorten deendothelialisiert. Dies geschah zum einen, um eine Endothelschädigung nachzuahmen, wie sie etwa nach PTA-Intervention auftreten kann. Zum anderen sollte sichergestellt werden, dass die basale NO-Produktion in den Aorten möglichst gering ist und damit ein großes Verbesserungspotential durch das Einbringen von bPAECs besteht.

Um die Deendothelialisierungsstrategie zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen und isometrische Kraftmessungen durchgeführt. Die CD1 Aorten wurden dafür mit Hilfe eines dünnen Stahldrahts denudiert und anschließend ohne Applikation von Zellen für eine halbe Stunde perfundiert. Um den Erfolg der Entfernung des Endothels besser einschätzen zu können, wurden unbehandelte CD1 Aorten zum Vergleich herangezogen. In den Fluoreszenzfärbungen der Gefäßquerschnitte der nativen Aorta war ein klares, durchgängiges, der inneren Gefäßwand anliegendes PECAM-Signal zu erkennen (Abbildung 29, A). Dieses war nach Deendothelialisierung und Perfusion nicht mehr zu detektieren (Abbildung 29, C). Bestätigt wurde dieser visuelle Eindruck einer erfolgreichen Denudierung der Gefäße durch isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen. Während in den nativen CD1 Aorten eine erhöhte Ratio der Amplituden von Phe-induziertem Kontraktionen mit und ohne Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME festgestellt werden konnte, war eine derartige erhöhte Ratio in Aorten nach Entfernung des Endothels und Perfusion nicht feststellbar (Abbildung 29, B und D) (vgl. 3.4 und Abbildung 15).



**Abbildung 29: Deendothelialisierung von CD1 Aorten**

**A:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts einer nativen CD1 Aorta. Blau: Hoechst, rot: PECAM murin, Maßstabsbalken=100  $\mu\text{m}$  **B:** Original Messdaten einer nativen CD1 Aorta. Die zweite hier gezeigte Kontraktion, die in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME durch Phe-Applikation ausgelöst wurde, fiel höher aus als die erste Kontraktion ohne L-NAME Zusatz im Organbad. Diese Erhöhung der Ratio als Quotient der beiden Kontraktionsamplituden (hervorgehoben durch die roten Pfeile) ließ auf eine erhöhte basale NO- Produktion schließen. **C:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts einer denudierten und perfundierten CD1 Aorta. Blau: Hoechst, rot: PECAM murin, Maßstabsbalken=100  $\mu\text{m}$  **D:** Original Messdaten einer denudierten und perfundierten CD1 Aorta. Im Vergleich zu der in (B) gezeigten Messung sind beide Kontraktionen in etwa gleich hoch: eine erhöhte Ratio als Quotient der beiden Kontraktionsamplituden (hervorgehoben durch die roten Pfeile) war nicht detektierbar. B und D: (1): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM], (2): Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME [100  $\mu\text{M}$ ], (3): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM]

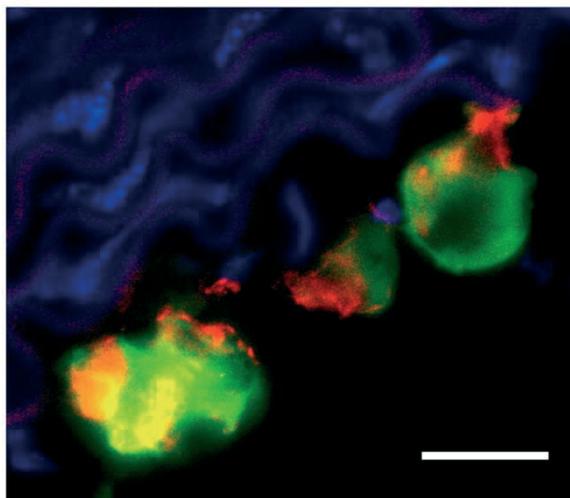
Durch die Immunfluoreszenzfärbungen und die Messungen im Drahtmyographen konnte gezeigt werden, dass die angewandte Methode zur Entfernung des Endothels von CD1 Aorten erfolgreich war.

#### 4.3.1.2 Radialsymmetrische Positionierung von magnetofizierten, eNOS überexprimierenden bPAECs in deendothelialisierten CD1 Aorten

Als nächstes sollte nun geklärt werden, ob sich die mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS-IRES-eGFP LV und SO-Mag5 MNPs behandelten bPAECs (eNOS bPAECs) mit Hilfe des Magnetfeldes der Konfiguration A entlang der denudierten CD1 Aortenwand positionieren lassen.

Durch Preußisch-Blau- sowie Immunfluoreszenzfärbungen von Querschnitten der perfundierten Aorten konnte gezeigt werden, dass sich eine große Zahl der an Tag 5 nach

der Magnetofektion für die Perfusion genutzten eNOS bPAECs entlang der Aortenwand positionieren ließ. Weiterhin wurde deutlich, dass die Retention auch hier radialsymmetrisch ausfiel. Durch die eGFP-Expressionskassette im Vektor des LV konnte auch in diesen Experimenten die Verteilung der sowohl eGFP als auch eNOS überexprimierenden Endothelzellen besonders gut visualisiert werden (Abbildung 30). Durch Immunfluoreszenzfärbung von eNOS und der durch die Transduktion mit dem CMV-eNOS-IRES-eGFP LV gegebene eGFP-Fluoreszenz der bPAECs wurden die Zellen identifiziert. Der Großteil der positionierten Zellen exprimiert die durch die Transduktion in den bPAECs überexprimierte eNOS (Abbildung 30, C, rotes Signal) und das Reporter-gen eGFP (Abbildung 30, C, grünes Signal).



**Abbildung 30: Deendothelialisierte CD1 Aorta, die mit eNOS- und eGFP-überexprimierenden bPAECs (eNOS bPAECs) perfundiert wurde**

Immunfluoreszenzfärbung einer mit eNOS bPAECs perfundierten Aorta. blau: Hoechst, grün: eGFP, rot: eNOS human, Maßstabsbalken=20 µm

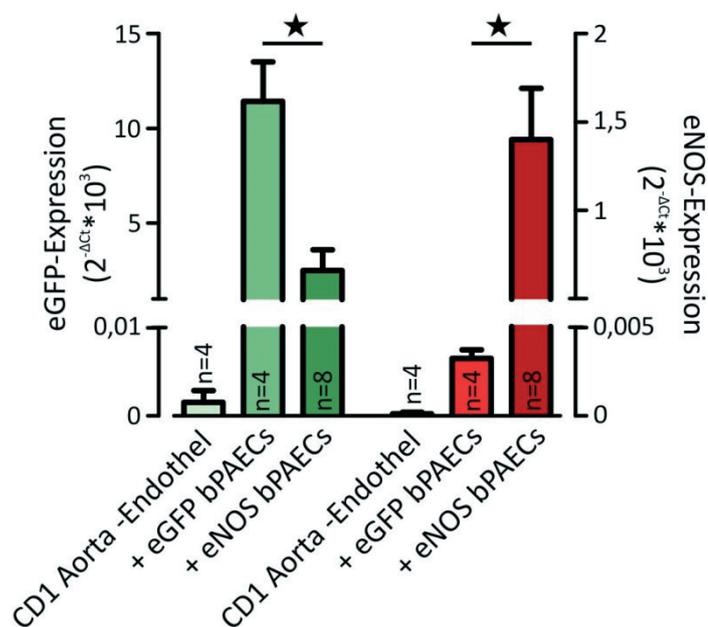
Die Präparation der Zellen erfolgte durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn).

#### **4.3.1.3 Quantifizierung der eNOS-Expression in deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs auf mRNA-Ebene**

Zur weiteren Analyse und Quantifizierung des Erfolgs der Zellpositionierung wurden qRT-PCR Experimente mit Homogenisaten der zuvor mit eNOS-PAECs perfundierten, denudierten CD1 Aorten durchgeführt. Zum Vergleich wurden denudierte aber ohne Zellen perfundierte CD1 Aorten herangezogen. Daneben wurden als weitere direkte Behandlungskontrolle deendothelialisierte CD1 Aorten genutzt, die mit eGFP-überexprimierenden bPAECs

perfundiert wurden. Diese der Zellen wurden zum Zwecke der Kontrolle mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen magnetofiziert (im Weiteren als eGFP bPAECs bezeichnet). Dadurch sollte sichergestellt werden, dass etwaige Effekte auf die transgene eNOS in den Zellen zurückzuführen sind, und nicht auf die nativen Zellen, den viralen Vektor selbst oder die eGFP-Expressions-kassette.

Die Quantifizierung der eGFP- und eNOS-mRNA Menge in den Homogenisaten erfolgte mittels qRT-PCR. Die höchsten eGFP-mRNA Spiegel konnten in den mit eGFP bPAECs perfundierten Aorten nachgewiesen werden ( $2^{-\Delta Ct_{eGFP} + eGFP \text{ bPAECs}}$ :  $11,43 \pm 2,09$ ). Die eGFP-mRNA Level der mit eNOS bPAECs perfundierten Aorten waren wie erwartet geringer ( $2^{-\Delta Ct_{eGFP} + eNOS \text{ bPAECs}}$ :  $2,50 \pm 1,1$ ) (Abbildung 31), da in diesen Zellen die eGFP-Expression, wie bereits beschrieben, durch eine IRES erfolgt. Die eNOS-mRNA Level der mit eGFP bPAECs perfundierten Aorten waren wie erwartet gering ( $2^{-\Delta Ct_{eNOS} + eGFP \text{ bPAECs}}$ :  $0,0033 \pm 0,00048$ ). Die höchsten eNOS-mRNA Spiegel konnten in den mit eNOS bPAECs perfundierten Aorten nachgewiesen werden ( $2^{-\Delta Ct_{eNOS} + eNOS \text{ bPAECs}}$ :  $1,40 \pm 0,29$ ) (Abbildung 31). Die denudierten Aorten, die nicht mit Zellen perfundiert wurden, wiesen verschwindend geringe Mengen von sowohl eGFP- als auch eNOS-mRNA auf ( $2^{-\Delta Ct_{eGFP} - \text{Endothel}}$ :  $0,0015 \pm 0,0013$ ,  $2^{-\Delta Ct_{eNOS} - \text{Endothel}}$ :  $0,00023 \pm 0,00019$ ) (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Analyse der eNOS- und eGFP-Expression auf mRNA-Ebene in denudierten CD1 Aorten, die mit magnetofizierten bPAECs perfundiert wurden**

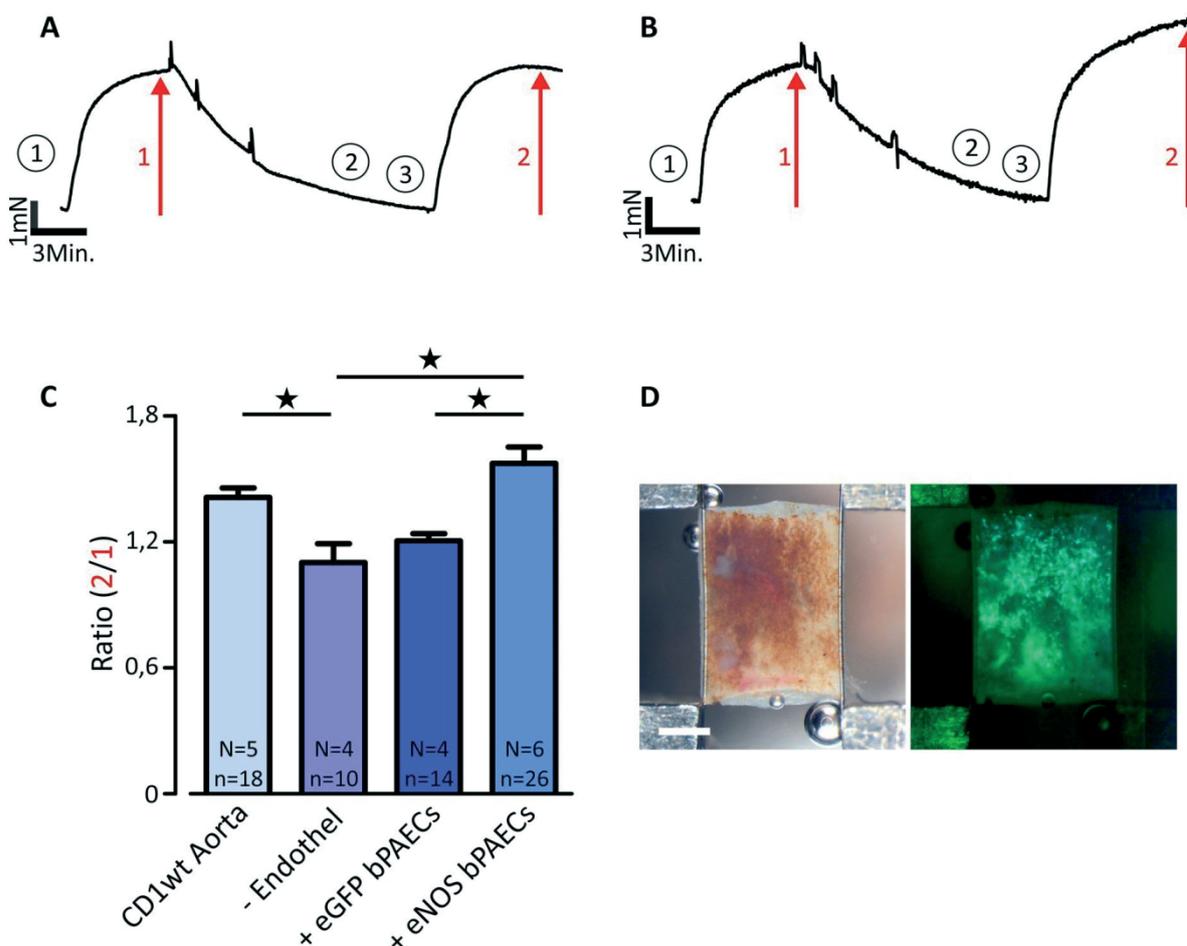
Auswertung der relativen Genexpression mittels qRT-PCR. Bestimmt wurde die mRNA-Expression von eGFP und eNOS in deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit eGFP oder eNOS bPAECs. Als Negativkontrolle wurden denudierte und ohne Zellen perfundierte CD1 Aorten herangezogen.

Durch die qRT-PCR Experimente konnte gezeigt werden, dass die Strategie der Magnet-gestützten Zellpositionierung von eNOS bPAECs in denudierten CD1 Aorten zur Erhöhung der eNOS-Genexpression führt.

#### **4.3.1.4 Analyse des Gefäßtonus in deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Wiederbesiedelung von denudierten CD1 Aorten mit eNOS bPAECs möglich ist und zu einer erhöhten eNOS-Expression führt, sollte weiterführend untersucht werden, ob die eNOS funktionell aktiv ist und ob durch die hier angewandte Strategie auch die Gefäßfunktion beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen durchgeführt.

Für die Kraftmessungen wurden Gefäßringe in den Myographen eingespannt, entlang deren Gefäßwand magnetofizierte bPAECs positionierte waren (Abbildung 32, D). Aus den Messdaten wurde die Ratio der Amplituden der Phe-induzierten Kontraktionen mit und ohne Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME ermittelt, die einen Hinweis auf den Gefäßtonus und damit indirekt auf das Level der basalen NO-Produktion gibt (Abbildung 32, C) (vgl. 3.4 mit Abbildung 15). Durch die unter 3.2.3 und 4.3.1.1 beschriebene Methode der Deendothelialisierung wurde der Gefäßtonus, wie er in unbehandelten CD1 Aorten durch eine erhöhte Ratio zu detektieren war, erhöht (Ratio CD1 Aorta:  $1,41 \pm 0,04$ , Ratio -Endothel:  $1,10 \pm 0,09$ ) (Abbildung 32, C). Durch die Positionierung von eGFP bPAECs in den denudierten Aorten wurde die Ratio nicht wesentlich erhöht (Ratio +eGFP bPAECs:  $1,21 \pm 0,03$ ) (Abbildung 32, A und C). Erst die Wiederbesiedelung des deendothelialisierten Gefäßes mit eNOS bPAECs führte zu einer Erhöhung der Ratio (Ratio +eNOS bPAECs:  $1,57 \pm 0,08$ ) (Abbildung 32, B und C). Dieser Wert lag sogar über dem Niveau, wie es in nativen CD1 Aorten beobachtet werden konnte. Diese Tatsache verdeutlicht die positive Beeinflussung des Gefäßtonus durch die Positionierung von eNOS-überexprimierenden Zellen.



**Abbildung 32: Isometrische Kraftmessungen von deendothelialisierten CD1 Aorten nach der Perfusion mit bPAECs**

**A:** Original Messdaten einer mit eGFP bPAECs perfundierten, denudierten CD1 Aorta. **B:** Original Messdaten einer mit eNOS bPAECs perfundierten, denudierten CD1 Aorta. Die zweite hier gezeigte Kontraktion, die in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME induziert wurde, fiel höher aus als die erste hier gezeigte Kontraktion, ohne L-NAME Zusatz im Organbad. Diese Erhöhung der Ratio als Quotient der beiden Kontraktionsamplituden (hervorgehoben durch die roten Pfeile) ließ auf eine erhöhte basale NO-Produktion schließen. Im Vergleich dazu sind beide in (A) gezeigten Kontraktionen in etwa gleich hoch: eine erhöhte Ratio war nicht detektierbar. A und B: (1): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM], (2): Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME [100 µM], (3): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM]. **C:** Statistische Auswertung der ermittelten Ratio in deendothelialisierten und mit eNOS bPAECs perfundierten CD1 Aorten im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen. **D:** Aufnahme von einem im Drahtmyographen eingespannten Aortenring. Deutlich zu erkennen sind die MNP-beladenen, braun imponierenden eNOS bPAECs im Durchlichtbild (links), die im Fluoreszenzbild (rechts) eine helle eGFP-Fluoreszenz aufweisen. Maßstabsbalken=0,5 mm.

Durch die oben vorgestellte Strategie der Positionierung von transduzierten und magnetisierten eNOS bPAECs in denudierten CD1 Aorten durch ein magnetisches Feld, das effiziente und radialsymmetrische Zellretention entlang der Gefäßwand zulässt, konnte die eNOS-Expression in den denudierten Aorten wiederhergestellt werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die eNOS in den positionierten Zellen funktionell aktiv ist und dass der Gefäßtonus durch die angewandte Strategie positiv beeinflusst wird.

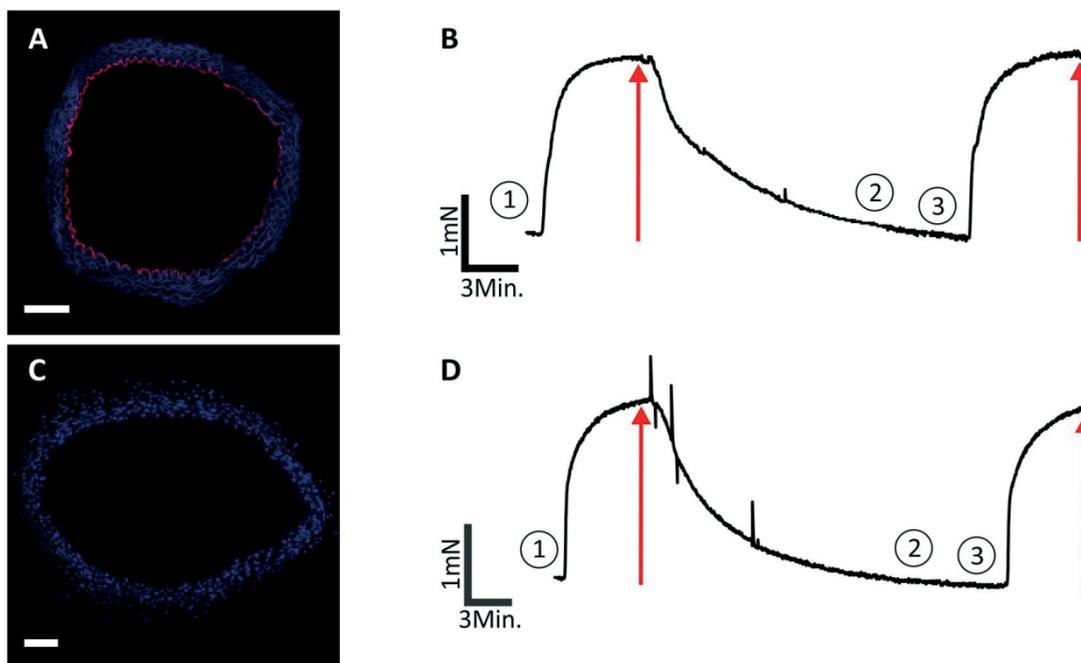
### 4.3.2 Zellpositionierung in eNOS-/- Aorten unter Flussbedingungen

Durch die oben beschriebenen Vorversuche in deendothelialisierten CD1 Aorten konnte erfolgreich demonstriert werden, dass das Prinzip des Endothelzellersatzes unter Flussbedingungen mit MNPs und magnetischen Feldern funktioniert und darüber hinaus auch den Gefäßtonus durch eine erhöhte basale NO-Produktion positiv beeinflusst. Nun sollte diese Strategie der Magnet-gestützten Positionierung von magnetofizierten bPAECs in denudierten eNOS-/- Aorten durchgeführt werden. Die Verwendung von eNOS-/- Aorten sollte sicherstellen, dass jegliche Effekte auf die NO-Produktion der bPAECs zurückzuführen sind, und nicht auf etwaige residuale native eNOS-Expression des Gefäßendothels selbst. Die zu positionierenden bPAECs wurden, wie in den bereits beschriebenen Versuchen mit denudierten CD1 Aorten, mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS-IRES-eGFP LV und SO-Mag5 MNPs transduziert und somit gleichzeitig magnetisiert (im Weiteren als eNOS bPAECs bezeichnet). Diese wurden dann an Tag 5 nach Magnetofektion in das *ex vivo* Perfusionssystem eingespeist und durch das magnetische Feld der Konfiguration A radialsymmetrisch entlang der denudierten Gefäßwand positioniert. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse dieser Zellpositionierung inklusive ihres Einflusses auf die Gefäßfunktion dargelegt.

#### 4.3.2.1 Untersuchung des Einflusses der Deendothelialisierung von eNOS-/- Aorten auf die Gefäßfunktion

Die eNOS-/- Aorten wurden vor den Perfusionsexperimente deendothelialisiert. Dies geschah, wie bereits erläutert, um eine Endothelschädigung nachzuahmen, wie sie etwa nach PTA-Intervention auftreten kann. Zum anderen sollte sichergestellt werden, dass jede Verbesserung der Gefäßfunktion den eingebrachten bPAECs zugeschrieben werden kann. Die Verwendung von eNOS-/- Aorten kann hier als eine Art Goldstandard betrachtet werden. Um die Deendothelialisierungsstrategie zu überprüfen, wurden wiederum Immunfluoreszenzfärbungen und isometrische Kraftmessungen durchgeführt. Die eNOS-/- Aorten wurden dafür denudiert und anschließend ohne Applikation von Zellen für eine halbe Stunde perfundiert. Zum Vergleich wurden native eNOS-/- Aorten herangezogen. In den Fluoreszenzfärbungen der Gefäßquerschnitte der nativen Aorten war ein klares, durchgängiges, der inneren Gefäßwand anliegendes PECAM-Signal zu erkennen, was auf ein intaktes Endothel hinweist (Abbildung 33, A). Nach Deendothelialisierung und Perfusion war dieses Signal nicht mehr sichtbar (Abbildung 33, C). Das Endothel wurde augenscheinlich

erfolgreich entfernt. Durch isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen wurden die Aorten weiter analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass tatsächlich sowohl in den nativen als auch in den denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten keine Erhöhung der Ratio der Amplitude der Phe-induzierten Kontraktionen mit und ohne L-NAME Zusatz zu beobachten war. Dies weist auf eine fehlende basale NO-Produktion (Abbildung 33, B und D) (vgl. 3.4 mit Abbildung 15).



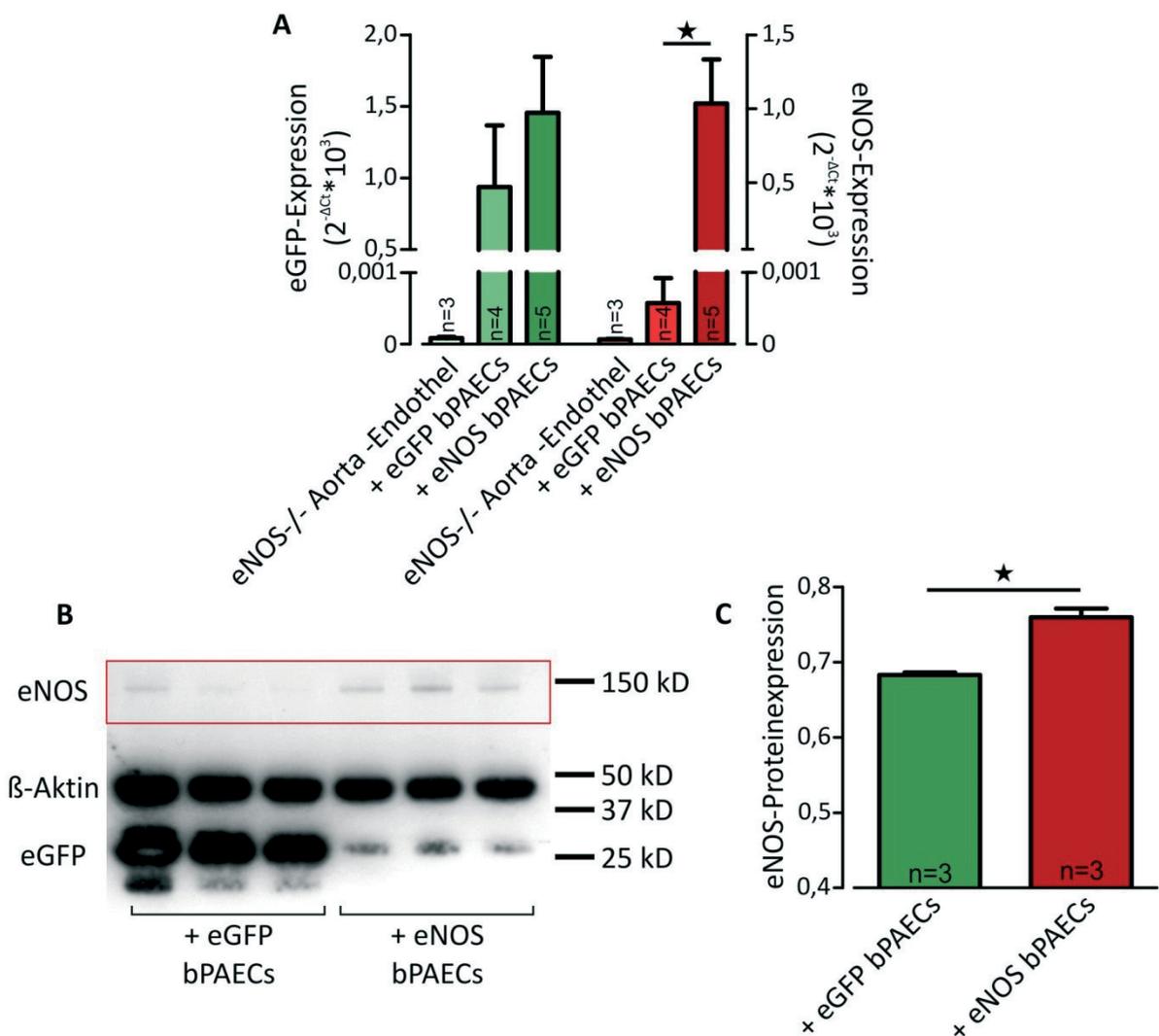
**Abbildung 33: Deendothelialisierung von eNOS<sup>-/-</sup> Aorten**

**A:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts einer nativen eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. blau: Hoechst, rot: PECAM murin, Maßstabsbalken=100  $\mu$ m **B:** Original Messdaten einer nativen eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. Die zwei hier gezeigten Kontraktionen, die erste ohne Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME, die zweite unter L-NAME Einfluss, fielen etwa gleich hoch aus: es war demnach keine Hinweis auf eine basale NO Produktion in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten zu beobachten. **C:** Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts einer denudierten und perfundierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. blau: Hoechst, rot: PECAM murin, Maßstabsbalken=100  $\mu$ m **D:** Original Messdaten einer denudierten und perfundierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorta. Wie auch in der in (B) gezeigten Messung, fallen die beiden gezeigten Kontraktionen in etwa gleich hoch aus: eine erhöhte Ratio und damit ein Hinweis auf eine basale NO-Produktion war auch hier nicht detektierbar. B und D: (1): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM], (2): Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME [100  $\mu$ M], (3): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM]

Durch die Immunfluoreszenzfärbungen und die Messungen im Drahtmyographen konnte gezeigt werden, dass die angewandte Methode zur Entfernung des Endothels von eNOS<sup>-/-</sup> Aorten erfolgreich war. Zwar war nach Deendothelialisierung keine PECAM-positive Endothelzellschicht mehr zu erkennen, aber die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße war noch intakt. Weiterhin konnte weder in den nativen noch in den denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten eine den Gefäßtonus beeinflussende basale NO-Produktion nachgewiesen werden.

#### 4.3.2.2 Quantifizierung der eNOS-Expression in deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs

Zur weiteren Analyse und Quantifizierung des Erfolgs der Zellpositionierung wurden qRT-PCR und Western Blot Experimente mit deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten durchgeführt, die zuvor mit eNOS bPAECs wurden. Als Kontrolle wurden denudierte aber ohne Zellen perfundierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten herangezogen sowie mit eGFP bPAECs (mit CMV-eGFP LV/SO-Mag5 Komplexen magnetofizierte bPAECs) perfundierte denudierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten. Hierdurch sollte, wie bereits erwähnt, sichergestellt werden, dass jegliche beobachtete Effekte auf die durch die eNOS bPAECs eingebrachte eNOS zurückzuführen sind, und nicht auf den viralen Vektor selbst, die eGFP-Expressionskassette oder die nativen bPAECs selbst. Die Quantifizierung der eGFP- und eNOS-mRNA in den Homogenisaten erfolgte mittels qRT-PCR. Die eGFP-mRNA Spiegel in den mit eGFP bPAECs perfundierten Aorten unterschieden sich nicht wesentlich von den mit eNOS bPAECs wiederbesiedelten Gefäßen ( $2^{-\Delta Ct_{eGFP + eGFP \text{ bPAECs}}}$ :  $0,94 \pm 0,43$ ;  $2^{-\Delta Ct_{eGFP + eNOS \text{ bPAECs}}}$ :  $1,46 \pm 0,39$ ) (Abbildung 34, A). Die höchsten eNOS-mRNA Spiegel konnten, wie zu erwarten war, in den mit eNOS bPAECs perfundierten Aorten nachgewiesen werden. Diese waren mit einem  $2^{-\Delta Ct_{eNOS}}$  von  $1,04 \pm 0,30$  signifikant höher als die eNOS-mRNA Level in mit eGFP bPAECs perfundierten Aorten ( $2^{-\Delta Ct_{eNOS + eGFP \text{ bPAECs}}}$ :  $0,00058 \pm 0,00035$ ) (Abbildung 34, A). Die denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die nicht mit Zellen perfundiert wurden, wiesen sehr geringe Mengen von sowohl eGFP- als auch eNOS-mRNA auf ( $2^{-\Delta Ct_{eGFP - \text{Endothel}}}$ :  $8,3 \cdot 10^{-5} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}$ ;  $2^{-\Delta Ct_{eNOS - \text{Endothel}}}$ :  $6,67 \cdot 10^{-5} \pm 6,67 \cdot 10^{-6}$ ) (Abbildung 34, A). Weiterhin wurde durch Western Blot Analysen die eNOS-Expression auf Proteinebene untersucht. In Abbildung 34, B wird deutlich, dass in den mit eNOS bPAECs perfundierten denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten deutliche eNOS-Banden zu sehen sind. Die eGFP-Signale sind in diesen Gefäßen nur schwach ausgeprägt (Abbildung 34, B Bahnen 4-6). In den Aorten, die mit eGFP bPAECs wiederbesiedelt wurden, verhält es sich genau umgekehrt. Die eNOS Banden sind nur sehr schwach zu sehen, während die eGFP-Banden sehr stark ausgeprägt sind (Abbildung 34, B, Bahnen 1-3). Die semiquantitative Auswertung des gezeigten Blots bestätigte diesen visuellen Eindruck. Bei Perfusion mit eGFP bPAECs wurde das  $0,68 \pm 0,003$ -fache an eNOS-Protein normiert auf den  $\beta$ -Aktin Gehalt festgestellt (Abbildung 34, C). Bei Perfusion mit eNOS bPAECs hingegen konnte das  $0,76 \pm 0,12$ -fache werden an transgener eNOS normiert auf den  $\beta$ -Aktin Gehalt ermittelt werden (Abbildung 34, C).



**Abbildung 34: Analyse von deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten nach Perfusion mit eNOS bPAECs auf mRNA- und Proteinebene**

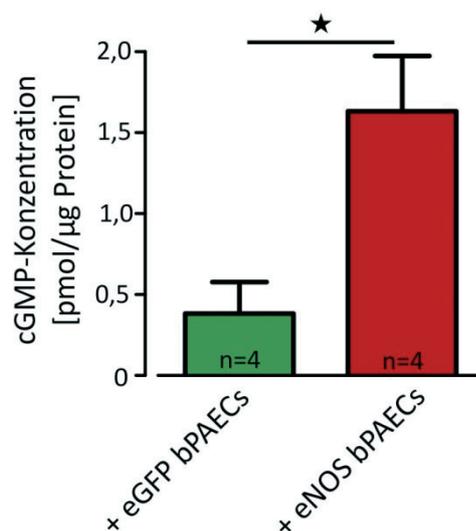
**A:** Auswertung der relativen Genexpression mittels qRT-PCR. Bestimmt wurden eGFP- und eNOS-mRNA in denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit eGFP- oder eNOS bPAECs perfundiert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden deendothelialisierte und ohne Zellen perfundierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten herangezogen. **B:** Western Blot zur Detektion der eGFP- sowie eNOS-Protein Mengen. Bahn 1-3: mit eGFP bPAECs perfundierte, denudierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, Bahn 4-6: mit eNOS bPAECs perfundierte, denudierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten. **C:** Semiquantitative Auswertung des Western Blots, bei dem die eNOS-Mengen auf die jeweilige Ladekontrolle β-Aktin normiert wurden.

#### 4.3.2.3 Analyse der cGMP-Produktion in deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs

Mittels qRT-PCR und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zellpositionierungsstrategie erfolgreich genutzt werden kann, um mit den magnetofizierten Zellen transgene eNOS in denudierte eNOS<sup>-/-</sup> Aorten einzubringen. Nun sollte weiterführend überprüft werden, ob dies auch zur Aktivierung weiterer Signalwege führt. Es sollte eruiert werden, ob es sich bei der mit den eNOS bPAECs in die Aorten eingebrachten eNOS um eine

funktionell aktive Variante handelt und ob es durch die Zellpositionierung zur Modulierung des eNOS-NO-cGMP Signalweges kommt.

Mittels ELISA-Messungen konnte festgestellt werden, dass in denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit eGFP bPAECs besiedelt wurden, der cGMP-Spiegel bei  $0,38 \pm 0,20$  pmol cGMP/ $\mu$ g Protein lag. Die Magnet-gestützte Positionierung von eNOS bPAECs in denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorte führte dazu, dass die Konzentration des second-messenger signifikant auf  $1,63 \pm 0,34$  pmol cGMP/ $\mu$ g Protein anstieg (Abbildung 35). Die Besiedelung mit eNOS-überexprimierenden bPAECs führt demnach zu einer gesteigerten Aktivität *downstream* der eNOS im eNOS-NO-cGMP Signalweg.



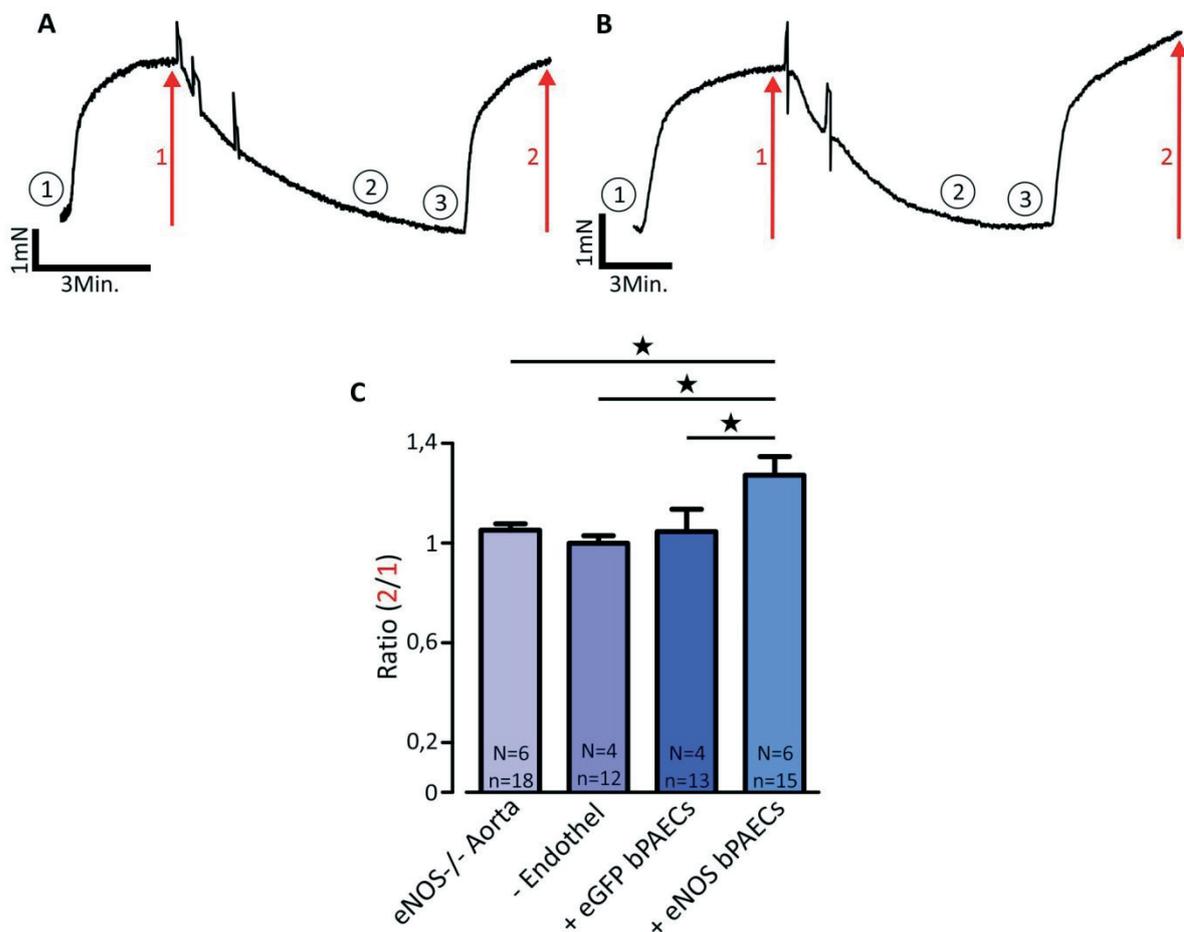
**Abbildung 35: Analyse der cGMP-Konzentration in denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten nach Perfusion mit eNOS bPAECs**

Statistische Auswertung der Messung des cGMP-Spiegels in deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten, die mit eGFP- bzw. eNOS bPAECs besiedelt wurden mittels cGMP-ELISA. Die cGMP-Menge wurde auf den Proteininhalt des jeweiligen Homogenisats normiert.

#### 4.3.2.4 Analyse des Gefäßtonus in deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten nach der Perfusion mit eNOS bPAECs

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die Wiederbesiedelung von denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten mit eNOS bPAECs zu einer Erhöhung von funktionell aktiver eNOS in den behandelten Gefäßen führt, sollte weiterführend untersucht werden, ob durch die hier angewandte Strategie auch direkt die Gefäßfunktion beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden abermals isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen zur Untersuchung des Gefäßtonus durchgeführt.

Aus den Messdaten von deendothelialisierten und mit eNOS bPAECs perfundierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten sowie aus den Messdaten der verschiedenen Kontrollgruppen wurde die Ratio der Amplituden von Phe-induzierten Kontraktionen mit und ohne Zusatz von L-NAME ermittelt. Diese gab abermals Aufschluss über den Gefäßtonus und damit indirekt über die basale NO-Produktion in den Gefäßringen (vgl. 3.4 mit Abbildung 15 sowie 4.2.1.3) (Abbildung 36, C). Weder in nativen noch in denudierten und ohne bPAECs perfundierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten konnte ein Effekt auf den Gefäßtonus in Form einer Erhöhung der Ratio nachgewiesen werden (Ratio eNOS<sup>-/-</sup>-Aorta:  $1,05 \pm 0,03$ ; Ratio - Endothel:  $1,00 \pm 0,03$ ) (vgl. 4.3.2.1). Auch durch die Besiedelung von denudierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten mit eGFP bPAECs konnte die Ratio nicht signifikant erhöhte werden (Ratio +eGFP bPAECs:  $1,05 \pm 0,09$ ) (Abbildung 36, A). Nur die Positionierung von eNOS bPAECs in dem deendothelialisierten Gefäßes führte wie zu erwarten zu einer signifikant erhöhten Ratio (Ratio +eNOS bPAECs:  $1,27 \pm 0,07$ ) (Abbildung 36, B). Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Positionierung von eNOS-überexprimierenden bPAECs durch die in dieser Arbeit vorgestellte Strategie zu einer Verbesserung des Gefäßtonus, über eine Erhöhung der basalen NO-Produktion, führt.



**Abbildung 36: Isometrische Kraftmessungen von deendothelialisierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten nach der Perfusion mit bPAECs**

**A:** Original Messdaten einer denudierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorta, welche mit eGFP bPAECs wiederbesiedelt wurde. **B:** Original Messdaten einer denudierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorta, die mit eNOS bPAECs wiederbesiedelt wurde. Die zweite gezeigte Kontraktion, die in Anwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME induziert wurde, fiel höher aus als die erste hier gezeigte Kontraktion, ohne L-NAME Zusatz im Organbad. Diese Erhöhung der Ratio als Quotient der beiden Kontraktionsamplituden (hervorgehoben durch die roten Pfeile) ließ auf eine erhöhte basale NO-Produktion schließen. Im Vergleich dazu sind beide in (A) gezeigten Kontraktionen in etwa gleich hoch: eine Beeinflussung des Gefäßtonus und eine damit einhergehende Erhöhung der Ratio war nicht detektierbar. A und B: (1): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM], (2): Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME [100 µM], (3): submaximale Kontraktion durch Applikation von Phenylephrin [500 nM]. **C:** Statistische Auswertung der ermittelten Ratio in deendothelialisierten und mit eNOS bPAECs perfundierten eNOS<sup>-/-</sup>-Aorten im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen.

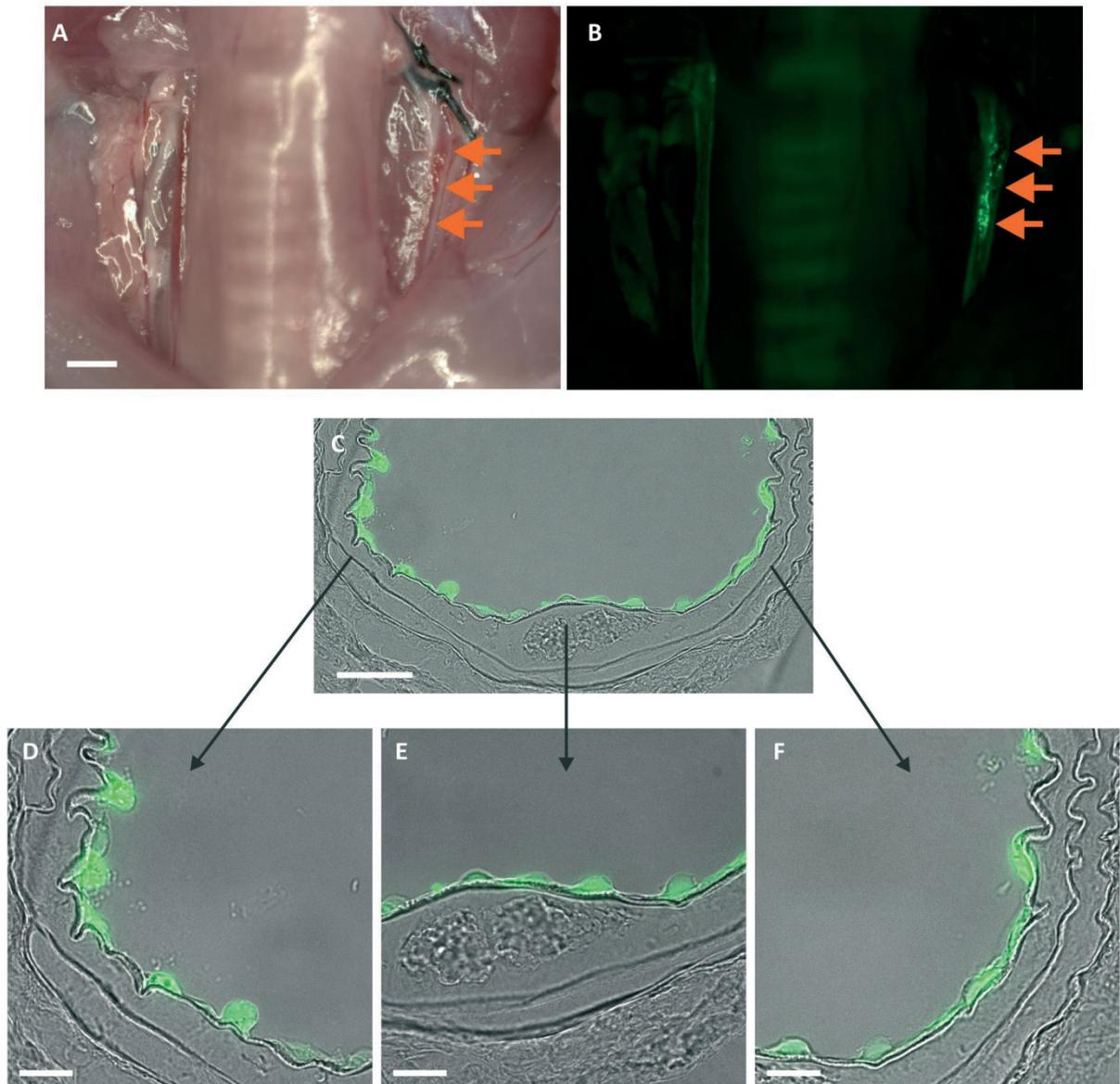
#### **4.4 Zielgerichtete, Magnet-gestützte Positionierung von Endothelzellen in Karotiden der Maus unter *in vivo* Flussbedingungen**

In Korrelation zu den in 4.1.3 und 4.3 gezeigten *ex vivo* Perfusionen von denudierten Mauseorten mit magnetofizierten Endothelzellen wurde die Zellpositionierungsstrategie im Rahmen dieser Arbeit auch in einem *in vivo* Model verifiziert. Mit der Anwendung in der lebenden Maus sollte eruiert werden, ob die hier vorgestellte Methode auch unter physiologischen Blutfluss- und Blutdruckbedingungen eine Magnet-gestützte Zellpositionierung entlang der Gefäßwand, in diesem Fall der denudierten Arteria carotis communis (ACC), erlaubt. Die bereits von Lindner *et al.* etablierte Endothelentfernung in der murinen ACC mittels eines gebogenen Stahldrahtes wurde durchgeführt, um eine Endothelschädigung nachzuahmen, wie sie etwa nach PTA-Intervention auftreten kann<sup>178</sup>. Weiterhin sollte dadurch sichergestellt werden, dass jede Beeinflussung des Gefäßtonus den eingebrachten bPAECs zugeschrieben werden kann und nicht auf das native Endothel der ACC zurückzuführen ist. Die Verwendung von eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen in dieser Reihe von Experimenten kann auch hier als eine Art Goldstandard betrachtet werden. Die Zellinjektion wurde wie unter 3.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden 100 000 magnetofizierte bPAECs in einer Suspension mit 200 µl Endothelzellmedium pro Maus injiziert. Die zu positionierenden bPAECs wurden 3 Tage vor der Injektion mit magnetischen Komplexen bestehend aus CMV-eNOS-IRES-eGFP und SO-Mag5 MNPs transduziert und somit gleichzeitig magnetisiert (auch hier im Weiteren als eNOS bPAECs bezeichnet). Als Kontrolle wurden denudierte und nur mit Injektion von Natriumchlorid-Lösung behandelte eNOS<sup>-/-</sup>-Karotiden herangezogen sowie mit eGFP bPAECs (mit CMV-eGFP/SO-Mag5 Komplexen magnetofizierte bPAECs) behandelte denudierte eNOS<sup>-/-</sup>-ACCs. Hierdurch sollte wiederum sichergestellt werden, dass jegliche beobachteten Effekte auf die durch die eNOS bPAECs eingebrachte

eNOS zurückzuführen sind und nicht auf den viralen Vektor, die eGFP-Expressionskassette oder die nativen bPAECs selbst. Die bPAECs wurden an Tag 3 nach Magnetofektion für *in vivo* Zellinjektionen verwendet. Die finale Analyse der operierten Mäuse erfolgte stets an Tag 2 nach Zellinjektion und somit an Tag 5 nach Magnetofektion der Zellen. Dieser zeitliche Ablauf wurde zum einen gewählt, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der eNOS sowie der NO-Produktion erreicht war (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Zum anderen war so ein direkter Vergleich mit den *ex vivo* Perfusionsexperimenten möglich, da die bPAECs für diese Reihe von Experimenten ebenfalls an Tag 5 nach Magnetofektion verwendet wurden.

Durch Applikation der für die *in vivo* Zellinjektion modifizierten Magnetkonfiguration (Abbildung 13, A-D; Abbildung 14) konnte eine große Anzahl von eGFP-positiven eNOS bPAECs entlang der Gefäßwand der ACC positioniert werden (Abbildung 37, A-B). Diese, so wurde es in Querschnitten durch das behandelte Blutgefäß deutlich, ging über die halbe Zirkumferenz des Gefäßes hinaus (Abbildung 37, C). Weiterhin konnte durch die Analyse von Querschnitten der behandelten Blutgefäßen festgestellt werden, dass die eGFP-positiven eNOS bPAECs nach Injektion die ACC als eine einschichtige Lage von Endothelzellen auskleiden (Abbildung 37, D-F). Durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-human-eNOS Antikörper konnte in den behandelten Karotiden darüber hinaus auch das transgene Protein direkt nachgewiesen werden (Abbildung 38). Nachdem so gezeigt werden konnte, dass die Wiederbesiedelung von denudierten eNOS<sup>-/-</sup> ACCs mit eNOS bPAECs auch unter physiologischen Blutfluss- und Blutdruckbedingungen möglich ist und weiterhin über einen längeren Zeitraum unter konstanten Flussbedingungen bestehen bleibt, sollte weiterführend untersucht werden, ob durch die hier angewandte Strategie die Gefäßfunktion beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen zur Untersuchung des Gefäßtonus durchgeführt. Aus den Messdaten der verschiedenen Kontrollgruppen wurde die Ratio der Kontraktionsamplitude nach Phe-Applikation mit und ohne L-NAME Zusatz im Organbad ermittelt. Diese gab, wie bereits beschrieben, Aufschluss über den Gefäßtonus und damit indirekt über die basal NO-Produktion in den gemessenen Karotiden (vgl. 3.4 mit Abbildung 15). Weder in nativen noch in denudierten und nur mit Injektion von physiologischer Kochsalz-Lösung behandelten eNOS<sup>-/-</sup> ACCs konnte ein Effekt auf den Gefäßtonus in Form einer Erhöhung der Ratio nachgewiesen werden (Ratio eNOS<sup>-/-</sup> ACC:  $1,08 \pm 0,03$ ; Ratio -Endothel:  $1,06 \pm 0,03$ ) (Abbildung 39). Auch durch die Besiedelung von denudierten eNOS<sup>-/-</sup> ACCs mit eGFP bPAECs konnte die Ratio nicht signifikant erhöht

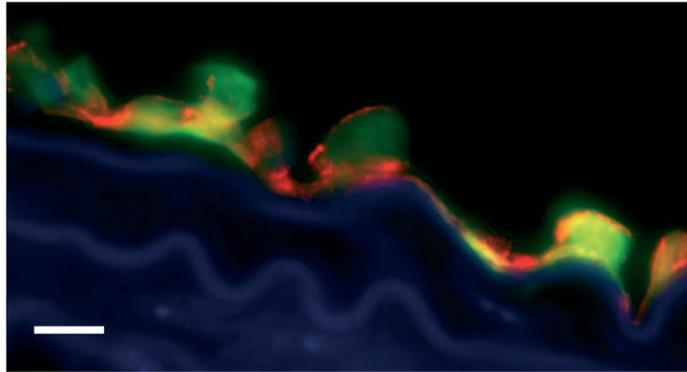
werden (Ratio +eGFP bPAECs:  $1,09 \pm 0,03$ ) (Abbildung 39). Nur die Positionierung von eNOS bPAECs in den deendothelialisierten Gefäßes führte wie zu erwarten zu einer signifikant erhöhten Ratio (Ratio +eNOS bPAECs:  $1,30 \pm 0,03$ ) (Abbildung 39). Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Positionierung von eNOS-überexprimierenden bPAECs durch die in dieser Arbeit vorgestellte Magnet-gestützte Strategie über eine Erhöhung der basalen NO-Produktion zu einer Verbesserung des Gefäßtonus führt.



**Abbildung 37: *In vivo* Zellinjektion von eNOS bPAECs in deendothelialisierte eNOS<sup>-/-</sup> Karotiden**

**A-B:** Durchlicht- (**A**) und Fluoreszenzaufnahme (**B**) der linken und rechten ACC einer eNOS<sup>-/-</sup> Maus nach Injektion von eNOS bPAECs (hervorgehoben durch die orangenen Pfeile). Die Aufnahme erfolgte an Tag 2 nach der Zellinjektion. Deutlich zu erkennen sind die entlang der ACC positionierten eGFP-exprimierenden Zellen. Im direkten Vergleich dazu war kein eGFP-Signal in der rechten, unbehandelten ACC zu detektieren. Maßstabsbalken=0,1 cm. **C-D:** Querschnitt durch die in **A** und **B** gezeigte linke ACC. Die eGFP-positiven eNOS

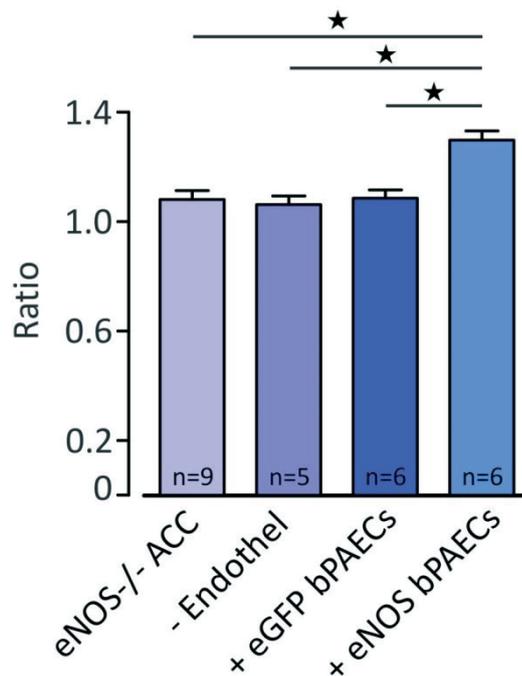
bPAECs stellten sich 2 Tage nach Zellinjektion als einschichtiger, der Gefäßwand unmittelbar anliegender Zellayer dar. Maßstabsbalken Bild C=50 µm, Maßstabsbalken Bilder D-F: 20 µm.  
Die Präparation der Zellen erfolgte durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn).



**Abbildung 38: Direkter Nachweis der Expression der transgenen eNOS in deendothelialisierten eNOS/- Karotiden nach der *in vivo* Zellinjektion**

Immunfluoreszenzfärbung der eNOS- und eGFP-überexprimierenden bPAECs (eNOS bPAECs), die entlang der Wand der auch in Abbildung 37 gezeigten, deendothelialisierten ACC positioniert wurden. blau: Hoechst, grün: eGFP, rot: eNOS human, Maßstabsbalken=10 µm.

Die Präparation der Zellen erfolgte durch Sarah Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn).



**Abbildung 39: Isometrische Kraftmessungen von deendothelialisierten eNOS/- Karotiden nach der *in vivo* Zellinjektion**

Statistische Auswertung der ermittelten Ratio in deendothelialisierten eNOS/- ACC 2 Tage nach Injektion von eNOS bPAECs im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen. Die signifikant erhöhte Ratio als Quotient der Phe-induzierten Kontraktionen mit und ohne NOS-Inhibition durch L-NAME in der Gruppe der mit eNOS bPAECs behandelten Karotiden ließ auf eine erhöhte basale NO-Produktion in diesen Blutgefäßen schließen. Im Vergleich dazu war eine Erhöhung der Ratio und eine damit einhergehende Beeinflussung des Gefäßtonus in den anderen Gruppen nicht detektierbar.

Die Modulation des Gefäßtonus, die durch *in vivo* Zellinjektionen erzielt werden konnte, verdeutlicht, dass der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz zur Magnet-gestützten Zelltherapie auch unter physiologischen Blutdruck- und Blutflussbedingungen anwendbar ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellpositionierung entlang der Gefäßwand, die initial durch die Interaktion zwischen Magnetfeld und MNP-Beladung der magnetofizierten Zellen hergestellt wurde, auch über einen längeren Zeitraum und unter permanentem Blutfluss erhalten bleibt.

Zusammenfassend verdeutlichen die hier beschriebenen Ergebnisse klar die Umsetzbarkeit einer zielgerichteten, Magnet-gestützten Gen- und Zelltherapie sowohl *ex vivo* als auch *in vivo*. Durch die Kombination von viralen Vektoren mit MNPs und geeigneten magnetischen Feldern konnten sowohl die magnetischen Komplexe selbst als auch durch diese Komplexe magnetofizierte Zellen radialsymmetrisch entlang einer Gefäßwand positioniert werden. Somit wurde es möglich, residentes Gefäßendothel unter Flussbedingungen zu transduzieren oder geschädigtes Gefäßendothel durch magnetofizierte Zellen zu ersetzen. In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die zielgerichtete, Magnet-gestützte Gen- oder Zelltherapie nicht nur mit Reportergenen, sondern darüber hinaus auch mit therapeutisch wertvollen Genen, wie eNOS oder VEGF, kombiniert werden können. Sowohl in den mit CMV-eNOS LV/SO-Mag5 direkt transduzierten Aorten als auch in den denudierten und mit eNOS bPAECs besiedelten Aorten konnte eine gesteigerte eNOS-Expression auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden. Diese führte zu einer Aktivierung des nachgeschalteten eNOS-NO-cGMP-Signalwegs und daraus resultierend zu einer Erhöhung der Konzentration des *second messenger* Moleküls cGMP. Letztendlich resultierte die erhöhte basale NO-Produktion durch die überexprimierte eNOS in den behandelten Gefäßen in einer positiven Beeinflussung des Gefäßtonus. Letzterer, den Gefäßtonus betreffende Effekt konnte auch nach *in vivo* Zellinjektion von magnetofizierten, eNOS-überexprimierenden bPAECs in denudierten Karotiden von eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. Weiterhin konnten vielversprechende Ergebnisse in Aorten nach direkter Transduktion mit CMV-VEGF LV/SO-Mag5 Komplexen erzielt werden. Nach der Perfusion mit magnetischen Komplexen sezernierten die behandelten Aorten aktiven Wachstumsfaktor, der zu einer Angiogenese-Induktion führte. Die beiden in dieser Arbeit vorgestellten Strategien zur Gen- und Zelltherapie unter Flussbedingungen könnten demnach als therapeutische Option zur Behandlung verschiedener Gefäßerkrankungen geeignet sein.

## 5 Diskussion

### 5.1 Verbesserung von gen- und zelltherapeutischen Ansätzen durch die Verwendung von MNPs in Kombination mit magnetischen Feldern

Gen- und zelltherapeutische Ansätze stellen für eine Vielzahl von Erkrankungen, besonders für solche des kardiovaskulären Systems, aussichtsreiche Behandlungsoptionen dar<sup>182 183</sup>. Allerdings sind die bisher verfolgten Strategien zum Gen- und Zelltransfer nicht optimal. Die verwendeten viralen Vektoren oder Zellen können nur unzureichend an einem Zielort akkumuliert werden. Dadurch kommt es zu einer herabgesetzten lokalen Effizienz und Spezifität der Therapie<sup>6 129</sup>. Diese Tatsachen bedingen die Notwendigkeit der Gabe hoher Dosen an Vektoren oder Zellen, wodurch wiederum das Risiko für unerwünschte und ektopische Effekte steigt<sup>129</sup>. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Kombination von lentiviralen Vektoren, MNPs und magnetischen Feldern könnte demnach zu einer Verbesserung der Lokalisierbarkeit, Effizienz und Spezifität von Gen- und Zelltherapie führen. Beide hier vorgestellten Strategien, sowohl die direkte Gentherapie unter Verwendung von lentiviralen Vektoren, als auch die Verwendung von transduzierten Zellen, könnten durch den zusätzlichen Einsatz von MNPs und magnetischen Feldern die bisherigen gen- und zelltherapeutische Ansätze verbessern.

#### 5.1.1 Lokalisierbarkeit

Die zielgenaue Applikation von lentiviralen Vektoren, entweder direkt, oder in Form von transduzierten Zellen, ist ein entscheidender Faktor für das Gelingen von Gen- und Zelltherapien<sup>129</sup>. Eine möglichst lokale Anwendung ist wichtig, um eine maximale Wirkung im gewünschten Zielgewebe, etwa einem Blutgefäß, zu erzielen, während die systemischen Wirkungen so gering wie möglich gehalten werden<sup>6</sup>. Besonders Erkrankungen, welche an charakteristischen Prädilektionsstellen auftreten, wie zum Beispiel Atherosklerose, würden von einer besseren Lokalisierbarkeit von Gen- und Zellapplikationen profitieren. In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene Katheter-basierte Strategien vorgestellt, die zu einer Verbesserung der lokalen Anreicherung von verschiedenen Gentransfershutteln oder Zellen führen sollten. So stellte die Arbeitsgruppe von Isner einen Ballonkatheter vor, der mit einem Hydrogel ummantelt ist, welches DNA enthält. Bei Inflation des Ballons kommt die Gefäßwand mit der im Gel enthaltenen DNA in Kontakt und wird so transfiziert<sup>184</sup>.

Thompson *et al.* stellten einen Doppel-Ballon-Katheter vor, bei dem es durch Inflation von zwei hintereinander geschalteten Ballons zu einer Unterbrechung des Blutflusses in dem katheterisierten Blutgefäß kommt. In dem so von der Zirkulation abgetrennten Gefäßabschnitt konnten dann humane Endothelzellen angesiedelt werden <sup>185</sup>. Beide Strategien erlauben eine lokale Applikation von DNA bzw. Endothelzellen, aber die Notwendigkeit, den Blutfluss zu unterbrechen, erschwert eine sichere klinische Anwendung. Auch die Verwendung von Stents in Kombination mit verschiedenen Gentransfershutteln oder auch Zellen, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erprobt <sup>186 187 171</sup>. Trotz der verbesserten Lokalisierbarkeit bleibt bei diesen Stent-basierten Ansätzen das Problem bestehen, dass die Therapie mit einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) einhergeht, welche einen invasiven und mit potentiellen Komplikationen behafteten Eingriff darstellt. Ebenso bleibt bei diesen Stent-basierten Ansätzen stets der Fremdkörperreiz durch den Stent bestehen. Dies Reiz kann auch durch eine beschleunigte Reendothelialisierung durch Behandlung des Stents mit Wachstumsfaktoren und Gentransfershutteln oder auch einer Beschichtung des Stens mit Zellen höchsten minimiert, aber wahrscheinlich niemals ganz ausgeschlossen werden. Der Fremdkörperreiz kann zu schwerwiegenden Komplikationen wie Stentthrombose und Stentstenose führen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden, mit Hilfe derer Lentiviren oder magnetofizierte Endothelzellen durch den Einsatz von MNPs und magnetischen Feldern unter Flussbedingungen zielgenau im Blutgefäß positioniert werden können, stellen demnach eine Verbesserung der bisher eingesetzten Optionen für Gen- und Zelltherapien dar. Durch Applikation von verschiedenen magnetischen Konfigurationen konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl Lentiviren direkt, in Form von magnetischen Komplexen, als auch indirekt durch lentiviral transduzierte bPAECs in unterschiedlicher Qualität und Quantität entlang der Blutgefäßwand positioniert werden. Mit Hilfe von verschiedenen Analyse-Methoden wurden die zuvor berechneten, theoretischen Retentionsraten und Retentionsmuster der Komplexe bestätigt. Es ist demnach vorstellbar, dass weitere Verteilungsmuster mit entsprechenden Magnetkonfigurationen erzielt werden können. Folglich ist eine zielgenaue Positionierung von Gentransfershutteln und Zellen in fast jedem Segment des Blutgefäßsystems denkbar. Bisher konnten magnetische Komplexe oder Zellen mit Hilfe eines magnetischen Feldes lediglich in einem zweidimensionalen Areal positioniert werden <sup>168</sup>. Die Möglichkeit einer radialsymmetrischen Anlagerung von Komplexen und Zellen entlang der Blutgefäßwand unter Flussbedingungen konnte erst durch die in dieser Arbeit verwendete Magnetkonfiguration A erreicht werden

<sup>169</sup>. Durch dieses für Strukturen wie Blutgefäße physiologische Verteilungsmuster kann die Anwendung von Gen- und Zelltherapien im vaskulären System stark verbessert werden. Neben dem Design des magnetischen Felds ist natürlich auch das magnetische Moment der eingesetzten Komplexe und Zellen von spezieller Bedeutung für deren möglichst zielgenaue Positionierung. Die Arbeitsgruppen Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) und Sasse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) konnten bereits zeigen, dass der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nanopartikeltyp SO-Mag5 für beide Anwendungen sehr gut geeignet ist <sup>168 188</sup>. Er verspricht eine gute magnetische Ansprechbarkeit von Komplexen und hat sich bereits bei der Magnetofektion von Endothelzellen, endothelialen Vorläuferzellen und weiteren Zelltypen, etwa Kardiomyozyten, bewährt <sup>168 188</sup>. Bei der Anwendung von SO-Mag5 zum Zwecke der Magnetofektion konnte eine hohe magnetische Ansprechbarkeit der Zellen bereits mit solch geringen Eisenmengen erzielt werden, die keinen zytotoxischen Effekt aufwiesen <sup>188</sup>. Durch Verwendung dieses speziellen MNPs kann demnach eine optimale, effiziente und zielgenaue Positionierung von Komplexen und Zellen durch ein magnetisches Feld gewährleistet werden. Dies ermöglicht eine Reduktion der Dosis von benötigten Vektoren und Zellen, während deren systemische Konzentration gering gehalten wird. Durch die mit Hilfe von SO-Mag5 in Kombination mit geeigneten magnetischen Feldern erreichte stark verbesserte Lokalisierbarkeit von lentiviralen Vektoren und Zellen können unerwünschte Effekte vermindert werden, vergleichbar etwa mit den Vorteilen, die eine stereotaktische Radiotherapie bietet <sup>189</sup>.

### 5.1.2 Spezifität

Ein weiterer Faktor, der für das Gelingen von Gen- und Zelltherapien von entscheidender Bedeutung ist, ist deren Spezifität. Im optimalen Fall sollte ausschließlich das Zielgewebe oder die Zielstruktur erreicht werden und die systemische Konzentration an applizierten Agenzien so gering wie möglich gehalten werden. So kann auch die Rate an unerwünschten und ektopischen Wirkungen auf ein möglich geringes Maß reduziert werden <sup>129</sup>. Die Spezifität von gen- oder zelltherapeutischen Ansätzen ist eng mit der zielgenauen Positionierung der eingebrachten lentiviraler Vektoren oder Zellen verknüpft. Der Einsatz von MNPs und magnetischen Feldern und die dadurch verbesserte Lokalisierbarkeit von magnetischen Komplexen und Zellen führt zu einer erhöhten Akkumulation am Zielgewebe, also in dieser Studie zu einer erhöhten Endothelspezifität. Kontrollversuche, bei denen

Mausarten ohne Exposition in einem magnetischen Feld mit Komplexen perfundiert wurden und bei denen weder MNP-Retention noch Transgenexpression beobachtet werden konnte, demonstrieren, dass die Transduktion in der Tat eines magnetischen Feldes bedarf. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach *in vivo* Zellinjektionen, bei denen kein magnetisches Feld angelegt wurde. In diesen Experimenten konnte keine Zellretention festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt). Eine Positionierung von Komplexen oder magnetofizierten Zellen konnte nur durch die Kombination mit einem magnetischen Feld erreicht werden und kann damit als spezifisch bezeichnet werden. Weiterhin zeigten Immunfluoreszenzfärbungen von Aorten, die mit magnetischen Komplexen perfundiert wurden, dass die Transgenexpression tatsächlich auf das Endothel begrenzt ist. Eine Transduktion von tieferen Schichten der Gefäßwand, wie der glatten Muskulatur, wurde nicht beobachtet. Die Applikation von Lentiviren sowie Zellen kann demnach durch die Verwendung von MNPs in Kombination mit magnetischen Feldern in ihrer Spezifität erhöht werden. Eine zusätzliche Steigerung der Spezifität der Magnet-gestützten Applikation von magnetischen Komplexen könnte durch den Einsatz von Endothelzell-spezifischen Promotoren erzielt werden. Der in dieser Arbeit verwendete CMV-Promoter ist zwar sehr stark, jedoch Gewebe-unspezifisch<sup>190</sup>. Der vaskuläre-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin) Promoter hingegen treibt spezifisch die Genexpression in Endothelzellen an und könnte demnach zu einer weiteren Steigerung der Endothelspezifität des hier vorgestellten Ansatzes beitragen<sup>191</sup>. Dieses transkriptionellen Targeting in Kombination mit dem hier vorgestellten Magnet-gestützten Ansatz gilt es aber noch zu untersuchen. Eine weitere Option zur Spezifitätssteigerung der hier vorgestellten Strategie stellt deren Kombination mit Adeno-assoziierten Viren (AVV) dar. Die verschiedenen Serotypen, die in dieser Gruppe von viralen Vektoren beschrieben sind, und die jeweils einen spezifischen Gewebetropismus, könnte genutzt werden, um die Gewebespezifität des MNP-basierten Ansatzes noch weiter zu verbessern und ihn auch für andere Gewebearten zu nutzen<sup>192 193 194</sup>. Ebenso könnte auch der Einsatz von mit Endothelzell-spezifischen Epitopen versehenen Nanopartikeln förderlich für eine zusätzliche Erhöhung der Gewebespezifität und damit der Sicherheit für die MNP-gestützte Gen- und Zelltherapie sein. Der Einsatz solcher multimodalen Nanopartikel wird derzeit auch bereits erforscht. So arbeitet die Arbeitsgruppe Weissleder intensiv an einem Ansatz des zellspezifischen *targetings* mit Hilfe speziell designerter, Epitop-tragender Nanopartikel<sup>195</sup>.

### 5.1.3 Effizienz

Letztlich ist natürlich auch die Effizienz von gen- und zelltherapeutischen Ansätzen ein entscheidender Faktor für deren Erfolg<sup>129</sup>. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass der Einsatz von Nanopartikeln in Kombination mit Gentransfershutteln, die sogenannte Magnetofektion, die Transduktionseffizienz in Zellkulturexperimenten gegenüber konventionellen Strategien immens steigern kann<sup>160 166 196</sup>. Die hier zugrundeliegende Mechanistik ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Wahrscheinlich spielt hier sowohl das durch die Kombination mit MNPs erhöhte Gewicht der viralen Partikel ebenso eine Rolle, wie ein von den MNPs ausgehender Reiz, der zur vermehrten Aufnahme in die Zellen führt. Was für den Einsatz in der Zellkultur bereits erfolgreich genutzt wird, wurde in dieser Arbeit nun weiterentwickelt und für einen komplexen *ex vivo* und sogar *in vivo* Ansatz etabliert. Die Effizienz von Gen- und Zelltherapien ist eng mit der Möglichkeit der zielgenauen Positionierung der eingebrachten Vektoren und Zellen verknüpft. Die Tatsache, dass bei Mausexperimenten nur eine Transgenexpression zu beobachten war, wenn sie während der *ex vivo* Perfusion von einem magnetischen Feld umschlossen waren, weist auf eine immense Steigerung der Transduktionseffizienz durch Verwendung von MNPs in Kombination mit magnetischen Feldern hin. Die hier erstmals beschriebene Möglichkeit der radialsymmetrisch Positionierung von Komplexen und Zellen führt abermals zu einer Steigerung der Effizienz. Durch die optimale Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Fläche entlang der Gefäßwand kann eine maximale Anzahl an Komplexen oder Zellen am Zielort positioniert werden. Im Hinblick auf das Blutgefäßendothel als Zielstruktur ist diese Art der Positionierung als einziger zielführender Ansatz zu bezeichnen. Andere Arbeitsgruppen, die auch mit der Kombination von viralen Vektoren oder Zellen, MNPs und magnetischen Feldern arbeiten, konnten zwar auch bereits eine zielgenaue Positionierung der eingebrachten Agenzien erzielen, allerdings war diese nicht radialsymmetrisch und damit weniger effizient als die in dieser Arbeit vorgestellte Strategie<sup>166 167 168 170</sup>. Auch der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz zur *in vivo* Zellinjektion ist demnach noch optimierbar, weil die zur Verfügung stehende Gefäßwand nicht in ihrer vollen Zirkumferenz zur Positionierung von Zellen ausgenutzt werden konnte. Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit des Operationsfeldes war es nicht möglich, eine Magnetkonfiguration, die eine radialsymmetrische Positionierung von magnetofizierten bPAECs erlauben würde, anzuwenden. Hier müsste eine andere, kleinere Magnetapparatur etabliert werden, mit der es möglich ist, die Halsschlagader der Maus komplett zu umschließen. Alternativ, jedoch

auch nicht trivial, wäre der *in vivo* Einsatz der direkten Transduktion von Blutgefäßendothel in einem anderen Tiermodell, das mehr Spielraum für die Erprobung von Magnetapparaturen zur radialsymmetrischen Anlagerung von magnetischen Komplexen bietet, etwa dem Schwein.

Die Effizienz einer jeden Gentherapie, auch die *in vitro* Transduktion von Zellen, welche dann für Zelltransplantationen genutzt werden, kann weiterhin durch die Wahl des Vektors beeinflusst und optimiert werden. Unumstritten ist, dass virale Vektoren im Hinblick auf die Transduktionseffizienz den nicht-viralen Vektoren überlegen sind<sup>156 197</sup>. Auch mit der Wahl des viralen Vektors selbst kann die Transduktion in vielerlei Hinsicht beeinflusst werden. So bieten lentivirale Vektoren, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, den entscheidenden Vorteil, dass sie das Transgen, welches sie tragen, stabil als Provirus in das Genom der Wirtszelle einbauen. Dabei kommt es zu einer mitunter lebenslangen Transgenexpression und weiterhin zu einer Übertragung des Provirus auf die Tochterzellen<sup>162</sup>. Auch die Tatsache, dass Lentiviren sowohl mitotische als auch postmitotische Zellen infizieren, einen höheren Tropismus für Gefäße aufweisen als etwa andere Viren der Familie der *Retroviridae*, sowie das Fehlen einer ausgeprägten Immunantwort des Makroorganismus nach Infektion, weisen auf die besondere Eignung dieser Art von Vektoren für die hier gezeigte Anwendung hin<sup>129 162</sup>. Auch Viren aus anderen Virusfamilien, wie die der *Adenoviridae* oder der *Dependoviridae*, können als Transgen-Vektor genutzt werden, bringen aber einige Nachteile mit sich. So führt eine Infektion mit Adenoviren lediglich zu einer transienten Transgenexpression, da dieses nicht stabil ins Wirtszellgenom integriert wird, und ist zudem hoch immunogen<sup>162</sup>. Adeno-assoziierten Viren (AAV) aus der Familie der *Dependoviridae* sind zwar im Gegensatz dazu relativ schwach immunogen, jedoch ist ihre Anwendung in der Gentherapie durch die geringe Größe ihres Genoms limitiert<sup>162</sup>. Eine Alternative, mit Hilfe derer sich die Transfektionseffizienz eventuell noch steigern ließe, ist der Einsatz von chemisch modifizierter mRNA in Verbindung mit den hier beschriebenen MNP-basierten Strategien. Kormann *et al.* konnten zeigen, dass sich die in der Literatur beschriebene hohe Immunogenität von mRNA als Gentransfershuttle immens vermindern lässt, wenn man diese chemisch modifiziert. Durch den Austausch von 25% der Nucleotiden gegen Analoga, die durch geringfügige Veränderungen ihrer Strukturformel modifiziert wurden, konnte sowohl in der Zellkultur als auch in Tierversuchen eine signifikante Steigerung der Transgenexpression erreicht werden<sup>198</sup>. Diese Verbesserung der Effizienz führten die Autoren auf eine geringere Interaktion der modifizierten mRNA mit Toll-like Rezeptoren

zurück. Ein weiterer Vorteil der Anwendung von mRNA ist die Tatsache, dass sie aufgrund der nicht benötigten Transkription sofort translatiert werden kann, womit es sehr schnell zur Expression des Transgens kommt<sup>198</sup>. Die Kombination dieser neuen, artifiziellen Art der mRNA mit MNPs und magnetischen Feldern zur Steigerung der Transfektionseffizienz und zur zielgenauen Positionierung dieses Gentransfershuttels, gilt es aber noch genauer zu untersuchen. Eine weitere Eigenschaft von mRNA, auch der chemisch modifizierten Variante, ist die transiente Expression des jeweiligen Transgens, für das die mRNA kodiert<sup>198</sup>. Dies könnte bei manchen Anwendungsgebieten von Vorteil sein könnte, da sich die Transgenexpression so durch wiederholte Gabe der mRNA gut kontrollieren lassen würde.

## 5.2 Sicherheit der Anwendung von Magnet-gestützter Gen- und Zelltherapie

Ein entscheidender Faktor für die sichere Anwendung der Magnet-gestützten Gen- und Zelltherapie, wie sie oben vorgestellt wurde, ist eine gute Verträglichkeit der applizierten Agenzien im Makroorganismus. Vor allem bei *in vivo* Applikation, sei es im Menschen oder im Tier, muss sichergestellt sein, dass weder von den lentiviralen Vektoren oder Zellen, noch von den verwendeten MNPs eine potentielle Gefährdung ausgeht. Alle verwendeten Materialien müssen biokompatibel und nicht toxisch sein.

Durch den Einsatz von MNPs und magnetischen Feldern kommt es, wie oben beschrieben, zu einer Optimierung der Lokalisierbarkeit, Effizienz und Spezifität bei der Applikation von lentiviralen Vektoren oder Zellen. Dies führt bereits zu einer Verbesserung der Sicherheit von gen- und zelltherapeutischen Ansätzen. Dieses Prinzip gleicht dem der Nanopartikel-gestützten Gabe von Medikamenten, zum Beispiel von Zytostatika<sup>134</sup>. Die zytotoxischen Wirkstoffe werden an MNPs gekoppelt, systemisch appliziert und dann mit Hilfe eines magnetischen Feldes am gewünschten Wirkungsort akkumuliert. Dadurch kann der Wirkstoffspiegel in der Zirkulation so gering wie möglich gehalten werden, wodurch die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen minimiert wird. Gleichzeitig wird die insgesamt benötigte Dosis des Wirkstoffes auf ein Minimum reduziert, da eine lokale und effiziente Anreicherung möglich ist<sup>154</sup>. Dieses Prinzips bedient sich auch die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Methode der Magnet-gestützten direkten Transduktion und Zellpositionierung, wodurch sich unerwünschte und ektopische Effekte auf ein Minimum reduzieren lassen.

Die Verwendung von lentiviralen Vektoren sowie von lentiviral transduzierten Endothelzellen bringen einige Risiken mit sich. Die Integration des über das Lentivirus eingebrachten Transgens in das Wirtszellgenom sowie dessen mitunter lebenslange

Expression bergen allerdings einige potentielle Gefahren. Zum einen findet die Integration nicht zielgerichtet, sondern zufällig statt<sup>190</sup>. Dies kann dazu führen, dass die Integration des Provirus die Unterbrechung von Genen oder die Trunkierung von Proteinen zur Folge hat. Dadurch können verschiedenste Alterationen in der Wirtszelle, etwa in deren Zellzyklusaktivität, hervorgerufen werden<sup>162</sup>. Bei Integration des Provirus in der unmittelbaren Nähe eines Proto-Onkogens kann es weiterhin zu neoplastischen Transformationen der Zelle kommen<sup>190 199</sup>. Die potentielle Gefährdung, die von der zufälligen Integration ausgeht, könnte durch *gene editing* abgeschwächt werden. Hier erproben verschiedene Arbeitsgruppen momentan den Einsatz von Zinkfinger-nukleasen und TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*), beides artifizielle Restriktionsenzyme, die eine zielgerichtete Provirusintegration erlauben und damit die Anwendung von Lentiviren als Gentransfershuttel sicherer gestalten<sup>162</sup>. Die Zinkfinger-nukleasen zum Beispiel enthalten eine Zinkfingerdomäne, die an DNA bindet, und eine Nukleasedomäne, welche die DNA schneidet. Die Zinkfingerdomäne kann so gestaltet werden, dass sie eine bestimmte DNA-Sequenz erkennt. Das bedeutet, dass man mit Zinkfinger-nuklease ein komplexes Genom an einer ganz bestimmten Stelle schneiden kann und so einen zielgerichteten Einbau von fremder DNA ermöglicht. Das potentielle Problem der lang andauernden Transgenexpression, wie sie bei Verwendung von lentiviralen Vektoren beobachtet wird, könnte durch den Einsatz von induzierbaren Promotoren gelöst werden. Diese können durch Gabe verschiedener pharmakologisch aktiver Wirkstoffe an- und abgeschaltet werden, was eine Modulation der Transgenexpression ermöglicht<sup>200</sup>. Auch der Einsatz von zusätzlich zum Transgen im viralen Vektor enthaltenen *suicide genes* („Selbstmordgenen“), wie etwa der *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (HSV-TK), könnte zu einer Erhöhung der Sicherheit in der Applikation von Lentiviren im Rahmen der Gentherapie führen. Dies funktioniert wie folgt: kommt der antivirale Wirkstoff Ganciclovir mit Zellen, die die HSV-TK exprimieren, in Kontakt, wird er durch das Transgen metabolisiert und es reichern sich zytotoxische Triphosphatderivate an, die zum Zelltod führen<sup>190</sup>. Diese Strategie erlaubt es, die Transgenexpression bei Bedarf abzuschalten und sämtliche Transgen-exprimierende Zellen zu eliminieren<sup>201</sup>. Durch das sogenannte *gene editing*, die Verwendung von induzierbarer Promotoren oder *suicide genes* könnten die Verwendung von lentiviralen Vektoren und lentiviral transduzierten Zellen somit sicherer gestaltet werden, und eine zukünftige sichere klinische Applikation wäre denkbar.

Letztendlich müssen natürlich auch die eingesetzten MNPs, im Speziellen der in dieser Arbeit verwendete Partikeltyp SO-Mag5, strenge Kriterien erfüllen, um eine gefahrlose *in vivo* Applikation zu gewährleisten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, eignen sich MNPs mit einem Kern auf Eisenoxidbasis, etwa Magnetit, besonders gut für klinische Anwendungen, da sie nicht toxisch sind <sup>134</sup>. Aufgrund dessen haben die behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (*US Food and Drug Administration*, FDA) sowie die Europäische Arzneimittel-Agentur (*European Medicines Agency*, EMA) bereits Magnetit-haltige MNPs für den medizinischen Gebrauch zugelassen <sup>134</sup>. Auch eine Beschichtung mit Siliziumoxid hat sich als positiv im Hinblick auf die Biokompatibilität der Partikel herausgestellt <sup>139 140 141</sup>. Der in dieser Arbeit verwendete Nanopartikeltyp SO-Mag5, der aus einem Magnetitkern mit einer Hüllschicht aus Siliziumoxid besteht, erfüllt diese Kriterien. Deshalb scheint dieser spezielle MNP-Typ besonders gut für *ex vivo* sowie auch *in vivo* Applikationen geeignet zu sein. Bei den im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten *ex vivo* Aortenperfusionen und auch den *in vivo* Experimenten konnten keine Anzeichen für unerwünschte oder toxische Effekte nach Applikation von magnetischen Komplexen, für deren Herstellung SO-Mag5 verwendet wurde, beobachtet werden. Bei der Verwendung dieses MNP-Typs zur Magnetofektion von kultivierten Endothelzellen konnten ebenfalls keine nachteiligen Effekte der Behandlung auf die Zellviabilität beobachtet werden. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit MNPs beladenen bPAECs waren keine zellulären oder subzellulären Veränderungen der Zellen zu detektiert. Die MNPs lagen frei im Zytoplasma vor und nicht in Endosomen. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln zur Generation von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) kommen kann <sup>134 202</sup>. Diese ROS-Produktion kann mitunter genotoxische Effekte haben <sup>202</sup>. Dieser natürliche Abwehrmechanismus der Zelle kann aber zu einem gewissen Grad abgepuffert werden, so dass eine MNP-Aufnahme nicht zwangsläufig zu einer Induktion von Apoptose durch erhöhte ROS-Spiegel führt <sup>203</sup>. Die weitere von den Partikeln ausgehende ROS-Produktion, und damit eine über die Internalisierungsphase hinausreichende Irritation der Zelle, hängt stark mit der Beschaffenheit und Stabilität der Hüllschicht der MNPs und deren intrazellulärer Konzentration zusammen <sup>204 205</sup>. Es ist weiterhin beschrieben, dass die intrazelluläre Lokalisation und Konzentration mit entscheidend sind für die von den internalisierten Partikeln ausgehende Toxizität <sup>206 207 208</sup>. Eine perinukleäre Lokalisation etwa kann zur Behinderung von Transkriptions- und Translationsprozessen führen und darüber zu

veränderten zellulären Gen- und Proteinexpressionsmustern<sup>209 210</sup>. Der erste in dieser Arbeit durch die Elektronenmikroskopie gewonnene positive optische Eindruck der unveränderten Zellstruktur nach Nanopartikelexposition konnte durch weitere Untersuchungen, die die Viabilität der magnetofizierten bPAECs betreffen, bekräftigt werden. So zeigte sich in Analysen der Expressionsmuster von wichtigen endothelialen Proteinen, wie eNOS, dem VEGF-Rezeptor oder PECAM, kein negativer Effekt der Verwendung von SO-Mag5. Ebenso konnte in Matrigelversuchen ein nicht wesentlich veränderter endothelialer Phänotyp der mit MNPs beladenen bPAECs im Vergleich zu nativen Zellen beobachtet werden. Die Fähigkeit, der bPAECs, im Matrigel gefäßartige Netzwerke zu bilden, war trotz Magnetofektion ungestört. Weiterhin konnte durch Verwendung verschiedener Toxizitätsnachweisverfahren keine gesteigerte Zelltotrate nach Applikation von Komplexen beobachtet werden (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Letztere Beobachtungen decken sich mit einer bereits in der Literatur beschriebenen geringen Toxizität von SO-Mag5 Nanopartikeln beim Einsatz in der Zellkultur<sup>188</sup>. Der in dieser Arbeit verwendete Partikeltyp scheint also gut von Endothelzellen, sowohl von kultivierten, als auch residenten Aortenendothelzellen, toleriert zu werden. Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* konnten keinen wesentlichen nachteiligen Effekten beobachtet werden. Es bleibt jedoch bei der *in vivo* Applikation zu untersuchen, was mit den Nanopartikeln nach Applikation im Organismus geschieht. Es ist bekannt, dass der Abbau der Partikel ähnlich wie deren Toxizität stark von ihrer Komposition und Größe beeinflusst wird<sup>211</sup>. Levy *et al.* konnten in einer 3-monatigen Langzeitstudie die Biotransformation von MNPs verfolgen. Es konnte ein Verlust der superparamagnetischen Eigenschaften beobachtet werden sowie eine Umverteilung des Eisens von der Leber, wo initial hohe Level festgestellt wurden, in die Milz<sup>212</sup>. Weissleder *et al.* konnten für Eisen-haltige Nanopartikel mit einem Durchmesser von 62 nm und 150 nm zeigen, dass diese nach intravenöser Injektion innerhalb von 6 Minuten zu 50% durch Makrophagen phagozytiert und damit aus dem peripheren Blut eliminiert wurden<sup>213</sup>. Die höchste Eisenkonzentration konnte nach 2 Stunden in der Leber und nach 4 Stunden in der Milz beobachtet werden, was die Beobachtungen von Levy *et al.* bestätigt<sup>212</sup>. Die MNPs wurden im weiteren Verlauf mit einer Halbwertszeit von 3 bis 4 Tagen aus diesen Organen eliminiert. Sie wurden in Lysosomen aufgenommen und enzymatisch degradiert, wobei das Eisen dem Eisenspeicher des Makroorganismus zugeführt wurde. Diese Beschreibungen decken sich mit Beobachtungen die im Rahmen dieser Arbeit nach *in vivo* Zellinjektion angestellt wurden. Auch hier war der

Eisengehalt *post injectionem* in Milz und Leber erhöht (Daten hier nicht gezeigt). Levy et al. beobachteten weiterhin, dass MNPs, die nicht abgebaut wurden, von den Zellen ausgeschleust und durch benachbarte Makrophagen phagozytiert wurden. Momentane Anstrengungen, das weitere Schicksal der MNPs nach Aufnahme durch die Endothelzelle zu untersuchen, haben bisher noch nicht gezeigt, ob die Partikel tatsächlich aktiv exozytiert werden, oder ob sie in der Zelle verbleiben, bis diese zugrunde geht (mündliche Kommunikation mit Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Es bleibt also abschließend zu untersuchen, wie sich der in dieser Arbeit verwendete Partikel SO-Mag5 sowohl nach *in vitro* Magnetofektion von Endothelzellen als auch nach *in vivo* Applikation verhält. Die in der Literatur beschriebene gute Toleranz von MNPs, die SO-Mag5 hinsichtlich Komposition und Größe ähnlich sind, sowie auch die während dieser Doktorarbeit und der Arbeit von Kooperationspartnern (Sarah Rieck sowie Annika Ottersbach, Institut für Physiologie I, Universität Bonn) gewonnenen Erkenntnisse, stimmen jedoch positiv, dass SO-Mag5 durchaus für einen sicheren *in vivo* Einsatz im Rahmen einer Magnet-gestützten Gen- und Zelltherapie geeignet ist.

### **5.3 Verbesserung der Behandlungsoptionen bei Gefäßerkrankungen durch Verwendung von eNOS und VEGF Plasmiden bei der lentiviralen Magnet-gestützten Gen- und Zelltherapie**

Wie oben beschrieben, bieten Magnet-gestützte Gen- und Zelltherapieansätze einige Vorteile, die letztendlich zu einer Steigerung der Anwendungssicherheit von Gen- und Zelltherapien führen. Aufgrund dieser Vorteile wurden diese Ansätze zum Gentransfer und Zellersatz im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Eignung als Behandlungsoption bei Gefäßerkrankungen, etwa Atherosklerose, untersucht. Hierfür wurde das Reporter-gen eGFP, mit dem die Strategien zur Magnet-gestützten direkten Transduktion und Zellpositionierung etabliert wurden, gegen funktionelle Gene ausgetauscht. In dieser Arbeit wurde mit den für eine physiologische Endothelfunktion wichtigen und therapeutisch vielversprechenden Genen, die für eNOS und VEGF kodieren, gearbeitet.

#### **5.3.1 ENOS**

ENOS ist als endotheliales Enzym, welches die NO-Synthese katalysiert, substanziell für eine physiologische Endothelfunktion. Weiterhin ist eine herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit, die

eng mit einer verminderten eNOS-Expression einhergeht, ursächlich für endotheliale Dysfunktion und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen. Auch die im Rahmen einer PTA-Intervention häufig auftretenden Komplikationen von Stentthrombose und Stentstenose sind zu einem großen Teil auf eine erniedrigte oder fehlende NO-Produktion zurückzuführen. So sind auch in der Literatur bereits einige erfolgversprechende Arbeiten mit eNOS zur Wiederherstellung einer intakten Endothelfunktion beschrieben. Lake-Bruse *et al.* konnten in isometrischen Kraftmessungen eine positive Beeinflussung der Gefäßfunktion nachweisen, nachdem sie Aortensegmente von eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen *ex vivo* mit eNOS-tragendem Adenovirus inkubierten<sup>119</sup>. Aufgrund dieser Befunde wurde im Rahmen dieser Arbeit die vielversprechende Strategie der Magnet-gestützten Gen- sowie Zelltherapie verwendet, um eNOS *ex vivo* in Mausearten und auch *in vivo* in Karotiden der Maus einzubringen, um so deren Gefäßfunktion positiv zu beeinflussen.

Durch die zielgerichtete Magnet-gestützte direkte Transduktion von Mausearten konnte eine endothelständige eNOS-Überexpression in eNOS<sup>-/-</sup> Aorten erzielt werden. Die transgene eNOS war funktionell aktiv und führte zu einer positiven Beeinflussung des Gefäßtonus. In den mit magnetofizierten bPAECs wiederbesiedelten, denudierten eNOS<sup>-/-</sup> Aorten konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Auch hier wurde eine gesteigerte Transkription und Translation von funktionell aktiver eNOS festgestellt. Die Detektion von signifikant erhöhten cGMP-Spiegeln in den mit eNOS bPAECs perfundierten Gefäßen deutet ebenfalls darauf hin, dass die Anlagerung der Zellen an der Gefäßwand eng anliegend gewesen sein muss. Das in den bPAECs produzierte NO hat nur eine extrem kurze Halbwertszeit von etwa 1 bis 3  $\mu$ s und kann in dieser Zeit nur über sehr kurze Distanzen diffundieren<sup>214</sup>. Da es zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) in den glatten Muskelzellen kam, durch die die gesteigerten cGMP-Spiegel zu erklären sind, muss demnach eine Diffusion von NO aus den der Gefäßwand unmittelbar anliegenden bPAECs in die glatte Muskulatur stattgefunden haben. Das Magnetfeld, welches für die *ex vivo* Perfusionen genutzt wurde, war folglich stark genug, um eine dichte Anlagerung der Zellen entlang der Aortenwand unter Flussbedingungen zu erzielen. Etwaige in Abbildung 22 und Abbildung 30 zu erkennende Abschilferungen der eingebrachten Zellen von der Gefäßwand sind deshalb am wahrscheinlichsten als Artefakte zu erklären, wie sie bei der Kryokonservierung und beim Anfertigen der Gewebeschnitte auftreten können. Schließlich wurde auch in den mit magnetofizierten Zellen wiederbesiedelten, denudierten Mausearten ein positiver Effekt des in den bPAECs durch die transgene eNOS gebildeten NOs

auf die Gefäßfunktion festgestellt. Der gleichen positiven Effekt von eNOS-überexprimierenden, magnetofizierten bPAECs auf den Gefäßtonus wurde auch in denudierten Karotiden der Maus nach *in vivo* Zellinjektion festgestellt. Die MNP-basierte Strategie zur Gen- und Zelltherapie wurde also sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* erfolgreich genutzt, um die Gefäßfunktion zu verbessern. Es war im Gegensatz zu bisher in der Literatur beschriebenen Ansätzen nicht nötig, den Blutfluss in dem zu behandelnden Gefäßsegment zu unterbrechen. Eine interessante Fragestellung, die es nun zu untersuchen gilt, ist, ob der hier beobachtete Effekt der positiven Modulation des Gefäßtonus, der auf eine gesteigerte NO-Produktion in den behandelten Gefäßen zurückzuführen ist, auch antiproliferativ auf die glatte Gefäßmuskulatur wirkt. Wie oben beschrieben ist diese Proliferation und Hyperplasie der glatten Gefäßmuskulatur die Hauptursache für Neointimaformation sowie Stentstenosen<sup>115 116 117</sup>. Weiterhin muss geklärt werden, ob die in den behandelten Aorten und Karotiden exprimierte transgene eNOS lediglich konstitutiv aktiv ist, oder ob sie kalziumabhängig ist und folglich über physiologische Agonisten reguliert werden kann, wie es für die eNOS in wildtyp Gefäßen beschrieben ist<sup>11 14 53 54</sup>. Denkbar wäre hier eine direkte Messung der eNOS-Aktivität oder der NO-Produktion, mit und ohne Zugabe von Substanzen, die zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen, wie etwa Azetylcholin oder Bradykinin. Ein Anstieg der Enzymaktivität oder des NO-Spiegels durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wäre ein Hinweis auf eine regulierbare eNOS-Aktivität. Auch die Option der pharmakologischen Substitution von Metaboliten und Kofaktoren der durch die Gen- oder Zelltherapie überexprimierten eNOS gilt es näher zu untersuchen. Es ist bekannt, dass eNOS neben NO auch zur Produktion von ROS führen kann<sup>1 5</sup>. Dies ist der Fall, wenn die eNOS-Monomere aufgrund des Fehlens des essentiellen Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) nicht dimerisieren können und der Prozess der Reduktion des Sauerstoffs zum Superoxidanion vom Prozess der Reaktion mit L-Arginin entkoppelt wird<sup>14 49</sup>. Das sogenannte eNOS *uncoupling* führt dann zu oxidativem Stress am Endothel und mitunter zu nachteiligen Effekten. Damit einem solchen Szenario vorgebeugt wird, sollte untersucht werden, inwieweit eine Supplementierung des eNOS Kofaktors BH<sub>4</sub> sowie des Substrats L-Arginin in Kombination mit einer Gen- oder Zelltherapie, bei der eNOS verwendet wird, sinnvoll ist<sup>129</sup>. Es ist jedoch bekannt, dass eNOS, im Gegensatz etwa zu nNOS, selbst bei geringsten Konzentrationen an BH<sub>4</sub> und L-Arginin nur geringe Mengen an ROS produziert<sup>38</sup>. Dies hebt noch einmal die besondere Eignung dieses NOS-Isomers für die hier vorgestellte Applikation hervor.

Weiterhin gilt es zu klären, welche Zellpopulation für eine eventuelle klinische Anwendung der Zellpositionierungs-Strategie am besten geeignet ist. Dieses allgemeine Problem der Zellersatztherapien könnte durch Anwendung von Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) gelöst werden<sup>215 183</sup>. iPSC sind pluripotente Stammzellen, die durch künstliche Reprogrammierung von nicht-pluripotenten, sondern bereits ausdifferenzierten somatischen Zellen generiert werden. Die Reprogrammierung wird durch Expression spezieller Transkriptionsfaktoren (*c-Myc*, *Klf-4*, *Oct-4* und *Sox-2*) in den somatischen Zellen induziert. Allerdings bedarf die Herstellung Patienten-autologer iPSCs etwa 3 Monate. Diese Zeitspanne macht die zeitnahe Verwendung zum Beispiel nach PTA-Intervention nahezu unmöglich. Als Lösung dieses Problems wird die Anwendung von allogenen iPSCs diskutiert. So könnten iPSCs *stocks* aufgebaut werden, aus denen dann Spenderzellen entnommen werden könnten, bei denen die Gefahr der Abstoßung der allogenen Zellen durch das Immunsystem des jeweiligen Patienten so gering wie möglich ist<sup>215</sup>. So diskutieren Takahashi und Yamanaka etwa die Verwendung von allogenen iPSCs, bei denen das Muster an humane Leukozyten Antigenen (HLA) eng mit dem des zu behandelnden Patienten übereinstimmt<sup>215</sup>. Die Verwendung von iPSCs in Kombination mit der in dieser Arbeit vorgestellten Magnet-gestützten Zelltherapie gilt es aber noch zu untersuchen.

Eine ähnliche Überlegung hinsichtlich der Durchführbarkeit der hier vorgestellten Magnet-gestützten direkten Gentherapie ist, welcher Zeitpunkt für deren Anwendung zu wählen ist. Bei den meisten Vektor-vermittelten Übertragungsarten benötigt die Transgenexpression einige Tage, bis sie ihr Maximum erreicht hat. Deshalb sind gentherapeutische Ansätze, auch der hier vorgestellte Ansatz, eher zu Beginn von pathologischen Veränderungen denkbar<sup>129</sup>. So wäre die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte direkte Transduktion vorteilhaft, um frühe Stadien der endothelialen Dysfunktion zu behandeln und dadurch das Fortschreiten von atherosklerotischen Läsionen des Endothels zu unterbinden. Lentivirale Vektoren, bei deren Einsatz die Transgenexpression, also hier die eNOS-Expression, erst nach einigen Tagen ihr Maximum erreicht, wären für diese nicht als hoch akut zu bezeichnende Stadium der endothelialen Dysfunktion durchaus geeignet. Die Magnet-gestützte Zellpositionierung ist dagegen eher als zusätzliche Therapieoption im Rahmen einer PTA-Intervention vorstellbar. Die Positionierung von Endothelzellen könnte zu einer schnelleren Reendothelialisierung des durch die PTA geschädigten Blutgefäßes und damit zu einer Verminderung der Rate an

Stenthrombosen und Stentstenosen führen. Weiterhin wäre hier auch die durch die Zellen gegebene akute Transgen-, also eNOS-Expression, von Vorteil.

### 5.3.2 VEGF

VEGF ist ein sehr potenter Wachstumsfaktor, dessen pro-angiogenetisches Potential bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen im Rahmen von Gentherapiestudien, unter anderem auch klinischen Studien der Phase III, untersucht wurde <sup>216</sup>. In den in der Literatur beschriebenen Studien war das Ziel die Induktion einer forcierten therapeutischen Angiogenese <sup>217</sup>. Durch die Aussprossung neuer Blutgefäße sollte eine bessere Kollateralisierung im Bereich der Becken-Bein-Arterien erreicht werden, um durch periphere arterielle Verschlusskrankheit obliterierte Arterien zu umgehen und dadurch die Symptome dieser atherosklerotischen Gefäßerkrankung zu mildern. In den Studien wurde der Wachstumsfaktor entweder intramuskulär oder Katheter-gestützt injiziert. In einigen Arbeiten, etwa in der VEGF PVD Studie, bei der das VEGF über einen Katheter appliziert wurde, wurden bereits gute Erfolge registriert <sup>218</sup>. In anderen Studien, zum Beispiel der RAVE oder der Groningen Studie, wurde jeweils die intramuskuläre Applikation gewählt <sup>219 220</sup>. Bei diesen Studien konnte keine Verbesserung des primäres Endpunkts, hierbei die Verbesserung der Symptome der *claudicatio intermittens* sowie die Verminderung der Amputationsrate, festgestellt werden <sup>219 220</sup>. Die lokalere, Katheter-mediierte Applikationsmethode scheint bessere Erfolge zu versprechen. Eine weitere Verbesserung der lokalen Applikation und der räumlichen Begrenzung der Effekte des transgenen Wachstumsfaktors wäre wünschenswert. Dadurch wäre es möglich, etwaige nachteilige Wirkungen einer Gentherapie mit VEGF auf ein Minimum zu reduzieren. Durch eine lokale Applikation und Akkumulation von VEGF könnten zum Beispiel Neovaskularisation in Zielorganen, die nicht durch die Therapie angesprochen werden sollten, wie etwa in der Retina, vermieden werden <sup>221</sup>. Auch ein eventuell gesteigertes Risiko für Neoplasien bzw. ein gesteigertes Tumorwachstum durch erhöhte VEGF-Plasmaspiegel könnten umgangen werden <sup>221</sup>. Ebenso ließe sich das Risiko einer erhöhten Gefäßpermeabilität, welche bei systemischer Gabe von VEGF auftreten kann, vermeiden <sup>222</sup>. Demnach stellt die Kombination der Gabe von VEGF als pro-angiogenetischem Wachstumsfaktor mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode zur zielgenauen Magnet-gestützten Gentherapie einen hoffnungsvollen Ansatz, der zu einer Verbesserung des therapeutischen Verabreichung von VEGF führen könnte.

Durch die zielgerichtete Magnet-gestützte direkte Transduktion konnte eine endothelständige VEGF-Überexpression in Mauseorten erzielt werden. Das angiogenetische Potential des von den behandelten Aorten sezernierten VEGFs konnte in einem Aortenring-Aussprossungsversuch demonstriert werden. Im Rahmen einer eventuellen klinischen Applikation der Magnet-gestützten VEGF-Gentherapie könnten so zielgenau erkrankte Blutgefäße im Bereich der Becken-Bein-Arterien transduziert werden. Durch Expression des Wachstumsfaktors wäre so eine vermehrte Angiogenese in dem behandelten Bereich möglich. Durch atherosklerotische Plaques stenosierte Blutgefäße in den Extremitäten würden durch die neu gebildeten Kollateralen umgangen, wodurch, die Durchblutung distal der Stenose verbessert würde<sup>223</sup>. Natürlich wäre es auch denkbar, die Transgenexpression über die unter 5.1.3 vorgestellten Methoden des *gene editings* zu modulieren und bei Bedarf oder erfolgreichem Abschluss der Therapie durch *suicide genes* vollständig zu eliminieren. Dadurch wäre es möglich, unerwünschte Effekte der erhöhten VEGF-Expression auf ein Minimum zu reduzieren und die VEGF-Gentherapie sicherer zu gestalten. Einige Fragestellungen verdienen es jedoch, noch genauer untersucht zu werden. So muss geklärt werden, ob das Kaliber der durch diese VEGF-Therapie induzierten kapillaren Aussprossungen ausreichend ist, um eine effiziente Kollateralisierung des durch pAVK stenosierten Strömungsbereiches sicherzustellen<sup>223</sup>. Einige Autoren diskutieren, dass allein die Arteriogenese, also das Auswachsen bereits bestehender Arteriolen, welches mit einer Zunahme des Arteriolendurchmesser und deren Wanddicke einhergeht, einen physiologisch relevanten Weg darstellt, um die Durchblutung des Gewebes distal eines stenosierten Blutgefäßes sicherzustellen<sup>224</sup>. Die Arteriogenese kann allerdings nicht, im Gegensatz zur Angiogenese, durch Wachstumsfaktoren wie VEGF getriggert werden. Treibende Kraft sind hier veränderte Strömungsbedingungen, die dann über eine Kaskade von Signalwegen zur Entstehung neuer Arterien führen<sup>225</sup>. Dieses Modell zur Induktion der Kollateralisierung durch die Kombination von VEGF mit der MNP-basierten Gentherapie muss in einem geeigneten *in vivo* Tiermodell, etwa dem Modell der Hinterbeinischämie bei der Maus, auf seine Realisierbarkeit hin überprüft werden. Hier gilt es neben der Qualität und Quantität der Perfusion distal der Stenose auch die Funktionalität und Stabilität der neugebildeten Gefäße zu untersuchen.

## 5.4 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Magnet-gestützte Gen- und Zelltherapie konventionellen Ansätzen im Hinblick auf Lokalisierbarkeit, Spezifität und Effizienz überlegen ist. Durch Kombination der zu applizierenden Agenzien mit MNPs und speziellen magnetischen Feldern konnte die Konzentration der eingebrachten magnetischen Komplexe und Zellen unter Flussbedingungen am gewünschten Zielort erhöht werden, während die Retentionsrate ohne Applikation eines magnetischen Feldes gering war. Durch die hier vorgestellten Strategien können gen- und zelltherapeutische Ansätze im Hinblick auf eine sichere klinische Anwendung hin optimiert werden. Weiterhin wurde in dieser Doktorarbeit gezeigt, dass es die beiden Magnet-gestützten Strategien ermöglichen, therapeutische Gene oder mit ebendiesen transduzierte Zellen radialsymmetrisch in Blutgefäße einzubringen. Durch die Magnet-gestützte Applikation von eNOS, sowohl in Form von lentiviralen Vektoren, als auch in Form von eNOS-überexprimierenden bPAECs, konnte die Gefäßfunktion durch eine erhöhte basale NO-Produktion sowohl in *ex vivo* als auch in *in vivo* Ansätzen positiv beeinflusst werden. Ebenso konnte die Methode der Magnet-gestützte direkten Transduktion erfolgreich genutzt werden, um die Produktion und Sezernierung von funktionell aktivem VEGF in residenten Blutgefäßendothelzellen zu steigern. Bei den vorgestellten Anwendungen stellt das Blutgefäßendothel bzw. die deendothelialisierte Gefäßwand die primäre Zielstruktur dar. Sowohl eNOS als auch VEGF sind für eine physiologische Endothelfunktion von großer Bedeutung. Die beiden hier vorgestellten Strategien könnten also langfristig zu einer Unterstützung oder Wiederherstellung der Endothelfunktion bei endothelialer Dysfunktion oder auch der Reendothelialisierung im Rahmen einer Atherosklerosetherapie genutzt werden.

Natürlich ist es denkbar, die Magnet-gestützte direkte Transduktion und Zellpositionierung auch in Kombination mit anderen physiologisch und pathophysiologisch wichtigen Faktoren anzuwenden. So konnte die hier vorgestellte Strategie der direkten Transduktion bereits erfolgreich zum *knock down* der Tyrosin Phosphatase SHP-2 genutzt werden, wodurch eine Modulation der Angiogenese möglich wurde <sup>226</sup> (Arbeiten von Sarah Rieck, Institut für Physiologie I, Universität Bonn). Im Hinblick auf andere Zielorgane oder Anwendungsbereiche ist auch die Magnet-gestützte Anwendung von anti-proliferativen (z.B. *tissue inhibitor of metalloprotease-3*) <sup>227</sup>, anti-fibrotischen (z.B. Hepatozytenwachstumsfaktor) <sup>228</sup>, anti-oxidativen (z.B. ecSOD) <sup>229</sup>, anti-thrombotischen (z.B. *tissue factor pathway inhibitor*) <sup>230</sup>, anti-apoptotischen (z.B. das NFκB abhängige Gen A20) <sup>231</sup>, anti-

arrythmogenen (z.B. Connexin 43)<sup>232</sup>, oder auch pro-kontraktilen (z.B. SERCA-2)<sup>233</sup> Genen denkbar. Dies sind nur einige Beispiele für Gene, deren lokale Überexpression bei verschiedenen pathologischen Prozessen, wie etwa Neoplasien, Thrombosen oder Myokardinfarkten, hilfreich sein könnte, um konventionelle Therapien zu unterstützen. Die Liste der potentiell hilfreichen Gene, sowie auch die Liste der Anwendungsgebiete, ließen sich beliebig fortführen. Weiterhin sind auch bereits andere Magnet-gestützte Applikationsarten von Nanopartikelformulierungen in der Literatur beschrieben. So konnten Dames *et al.* demonstrieren, dass die Darreichung von magnetischen Aerosolen in Kombination mit speziell designten magnetischen Feldern genutzt werden kann, um ebendiese Aerosole in der Lunge zu akkumulieren<sup>234</sup>. Diese Tatsachen verdeutlichen das breite Anwendungsspektrum der in dieser Doktorarbeit vorgestellten Strategien zur Verbesserung von Gen- und Zelltherapien. Diese könnten zu Verbesserungen der Behandlungsoptionen in der Human- und Tiermedizin führen. Auch wenn in der Literatur der Einsatz von Nanopartikeln für die Tiermedizin noch als finanziell zu aufwendig diskutiert wird, werden die rasanten Entwicklungen auf dem Sektor der Nanomedizin diese bald auch für eine breite Anwendung in der Veterinärmedizin attraktiv machen<sup>235</sup>.

## 6 Zusammenfassung

Das Blutgefäßendothel erfüllt eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Eine der wichtigsten ist die Produktion des Transmittermoleküls NO. NO ist eine der bedeutendsten endogenen vasodilatatorischen sowie vasoprotektiven Substanzen. Eine herabgesetzte NO-Bioverfügbarkeit aufgrund einer Dysfunktion des Endothels kann zu massiven pathologischen Alterationen des Blutgefäßes führen, die sich in atherosklerotischen Läsionen manifestieren. Ein Ansatz zur Therapie von Atherosklerose ist dementsprechend eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit, um einem Fortschreiten dieser Endothelerkrankung vorzubeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Strategien vorgestellt, die den Erfolg von Gen- und Zelltherapien zur Wiederherstellung einer physiologischen Endothelfunktion potenzieren können: die Magnet-gestützte direkte radialsymmetrische Transduktion sowie die Magnet-gestützte radialsymmetrische Positionierung von Endothelzellen im Blutgefäß unter Flussbedingungen. Dabei wurden lentivirale Vektoren oder kultivierte Endothelzellen mit MNPs und magnetischen Feldern kombiniert. Dadurch konnten die Lokalisierbarkeit, die Effizienz und die Spezifität der Gen- oder Zelltherapie sowohl in *ex vivo* als auch in *in vivo* Ansätzen stark verbessert werden. Es wurde eine Magnet-gestützten Gentherapie mit lentiviralen Vektoren, die eNOS- oder VEGF-Expression erlaubten, erprobt. Bei Verwendung von eNOS, einem endothelialen Enzym, das die NO-Produktion katalysiert, konnte sowohl durch die direkte Transduktion von residentem Blutgefäßendothel als auch durch die Positionierung von eNOS-überexprimierenden bPAECs eine signifikante Erhöhung der mRNA- und Protein-Expression des Transgens in den behandelten Gefäßen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde durch den Nachweis von erhöhten Spiegeln des *second messenger* Moleküls cGMP und durch isometrische Kraftmessungen im Drahtmyographen die Funktionalität der transgenen eNOS bestätigt. Nach direkter Transduktion sowie auch nach Zellpositionierung konnte eine positive Modulation der Gefäßfunktion, bedingt durch eine erhöhte vaskuläre NO-Produktion, beobachtet werden. Bei der direkten Transduktion von Blutgefäßendothel mit VEGF, einem wichtigen endothelialen pro-angiogenetischen Wachstumsfaktor, konnte in Aortenring-Aussprossungsversuchen eine verstärkte, von dem Wachstumsfaktor ausgehende, angiogenetische Wirkung beobachtet werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur Magnet-gestützten direkte Transduktion und Zellpositionierung könnten demnach für eine Verbesserung und Ausweitung der Therapieoptionen bei Gefäßerkrankungen hilfreich sein.

## Abstract

The vascular endothelium exhibits a variety of physiological functions. One of the most important ones is the production of the transmitter molecule NO. NO is one of the major endogenous vasorelaxant and vasoprotective agents. A decrease in NO-bioavailability due to endothelial dysfunction can lead to massive pathological alteration of the blood vessel which can become manifest as atherosclerotic lesions. Thus, one option in the therapy of atherosclerosis is the augmentation of NO-bioavailability in order to prevent the progression of this vascular disease. In the context of this doctoral thesis two strategies were introduced which aim to potentiate the success of gene and cell therapies to regain a physiological endothelial function: a magnet-based direct radially-symmetric transduction as well as a magnet-based radially-symmetric endothelial cell positioning approach in blood vessels under flow conditions. For both strategies lentiviral vectors or cultured endothelial cells were combined with MNPs and magnetic fields. By this locality, efficiency and specificity of gene and cell therapy could be greatly improved in *in vivo* and *ex vivo* applications. The magnet-based strategies were based on lentiviral eNOS or VEGF overexpression. When eNOS, an endothelial enzyme which catalyzes the NO-production, was used, either for direct transduction of resident endothelium or for positioning of eNOS-overexpressing bPAECs, a significant rise in mRNA- and protein-expression of the transgene in the treated blood vessels could be detected. Furthermore, by assessing elevated levels of the second messenger molecule cGMP and by isometric force measurements in the wire myograph the functionality of the transgenic eNOS could be validated. After direct transduction as well as after cell positioning a positive modulation of vascular tone, due to an elevation of vascular NO-production, could be observed. When vascular endothelium was directly transduced using VEGF, an important pro-angiogenic endothelial growth-factor, an increase in growth-factor dependent angiogenesis could be assessed in an aortic ring sprouting assay. Consequently, both strategies that are proposed in this thesis, the magnet-based direct transduction and the magnet-based endothelial cell positioning, could allow for new treatment options in vascular therapy.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. & Strijdom, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 23, 222–231 (2012).
2. Esper, R. J. *et al.* Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5, 4 (2006).
3. Chhabra, N. Endothelial dysfunction—a predictor of atherosclerosis. *Internet J Med Update* 4, 33–41 (2009).
4. Strijdom, H. & Lochner, A. Cardiac endothelium: More than just a barrier. *SA Heart Journal* 6, 174–185 (2010).
5. Naseem, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 33–65 (2005).
6. Hoeben, A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56, 549–580 (2004).
7. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376 (1980).
8. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9265–9269 (1987).
9. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. & Wood, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61, 866–879 (1987).
10. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526 (1987).
11. Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 3–31 (2005).
12. Strijdom, H., Chamane, N. & Lochner, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr* 20, 303–310 (2009).
13. Förstermann, U. *et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121–1131 (1994).
14. Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. *Circulation* 113, 1708–1714 (2006).
15. Alheid, U., Frölich, J. C. & Förstermann, U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thrombosis Research* 47, 561–571 (1987).
16. Radomski, M. w., Palmer, R. m. j. & Moncada, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* 92, 639–646 (1987).
17. Busse, R., Lackhoff, A. & Bassenge, E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336, 566–571 (1987).
18. De Graaf, J. C. *et al.* Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85, 2284–2290 (1992).
19. Gewaltig, M. T. & Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* 55, 250–260 (2002).
20. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4651–4655 (1991).
21. Arndt, H., Smith, C. W. & Granger, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 21, 667–673 (1993).
22. Rapoport, R. M. & Murad, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circulation Research* 52, 352–357 (1983).
23. Förstermann, U., Mülsch, A., Böhme, E. & Busse, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation Research* 58, 531–538 (1986).

24. Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. & Kadowitz, P. J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 237, 893–900 (1986).
25. Rapoport, R. M., Draznin, M. B. & Murad, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306, 174–176 (1983).
26. Hogan, M., Cerami, A. & Bucala, R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90, 1110–1115 (1992).
27. Garg, U. C. & Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83, 1774–1777 (1989).
28. Nakaki, T., Nakayama, M. & Kato, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 189, 347–353 (1990).
29. Nunokawa, Y. & Tanaka, S. Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 409–415 (1992).
30. Assender, J. W., Southgate, K. M., Hallett, M. B. & Newby, A. C. Inhibition of proliferation, but not of Ca<sup>2+</sup> mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 288 ( Pt 2), 527–532 (1992).
31. Cornwell, T. L., Arnold, E., Boerth, N. J. & Lincoln, T. M. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol* 267, C1405–C1413 (1994).
32. Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227–1234 (2002).
33. O'Donnell, V. B. & Freeman, B. A. Interactions Between Nitric Oxide and Lipid Oxidation Pathways Implications for Vascular Disease. *Circulation Research* 88, 12–21 (2001).
34. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241 (2000).
35. Balla, G. *et al.* Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* 267, 18148–18153 (1992).
36. Fukai, T. *et al.* Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* 105, 1631–1639 (2000).
37. Strålin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O. & Marklund, S. L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2032–2036 (1995).
38. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593–615 (2001).
39. Kibbe, M., Billiar, T. & Tzeng, E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 43, 650–657 (1999).
40. Papapetropoulos, A., Rudic, R. D. & Sessa, W. C. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 43, 509–520 (1999).
41. Giulivi, C., Poderoso, J. J. & Boveris, A. Production of Nitric Oxide by Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 11038–11043 (1998).
42. Schild, L. *et al.* Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J* 17, 2194–2201 (2003).
43. Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S. & Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153, 1251–1256 (1988).
44. McMillan, K. & Masters, B. S. S. Prokaryotic Expression of the Heme- and Flavin-Binding Domains of Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase as Distinct Polypeptides: Identification of the Heme-Binding Proximal Thiolate Ligand as Cysteine-415. *Biochemistry* 34, 3686–3693 (1995).
45. Ghosh, D. K. & Stuehr, D. J. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 34, 801–807 (1995).

46. Richards, M. K. & Marletta, M. A. Characterization of Neuronal Nitric Oxide Synthase and a C415H Mutant, Purified from a Baculovirus Overexpression System. *Biochemistry* 33, 14723–14732 (1994).
47. Raman, C. . *et al.* Crystal Structure of Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase: A Paradigm for Pterin Function Involving a Novel Metal Center. *Cell* 95, 939–950 (1998).
48. Stuehr, D., Pou, S. & Rosen, G. M. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. *J. Biol. Chem.* 276, 14533–14536 (2001).
49. Stroes, E. *et al.* Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 438, 161–164 (1998).
50. Davis, M. E., Cai, H., Drummond, G. R. & Harrison, D. G. Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circulation Research* 89, 1073–1080 (2001).
51. Chen, P.-F. & Wu, K. K. Characterization of the Roles of the 594–645 Region in Human Endothelial Nitric-oxide Synthase in Regulating Calmodulin Binding and Electron Transfer. *J. Biol. Chem.* 275, 13155–13163 (2000).
52. Bredt, D. S. & Snyder, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682–685 (1990).
53. Goetz, R. M. *et al.* Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2788–2793 (1999).
54. Loscalzo, J. & Welch, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in Cardiovascular Diseases* 38, 87–104 (1995).
55. Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605 (1999).
56. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J. & Sessa, W. C. Enhanced Electron Flux and Reduced Calmodulin Dissociation May Explain ‘Calcium-independent’ eNOS Activation by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 6123–6128 (2000).
57. Gallis, B. *et al.* Identification of Flow-dependent Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation Sites by Mass Spectrometry and Regulation of Phosphorylation and Nitric Oxide Production by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor LY294002. *J. Biol. Chem.* 274, 30101–30108 (1999).
58. Bauer, P. M. *et al.* Compensatory Phosphorylation and Protein-Protein Interactions Revealed by Loss of Function and Gain of Function Mutants of Multiple Serine Phosphorylation Sites in Endothelial Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 14841–14849 (2003).
59. Michell, B. J. *et al.* Identification of Regulatory Sites of Phosphorylation of the Bovine Endothelial Nitric-oxide Synthase at Serine 617 and Serine 635. *J. Biol. Chem.* 277, 42344–42351 (2002).
60. Boo, Y. C. *et al.* Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase at Ser1179 by Akt-independent Mechanisms ROLE OF PROTEIN KINASE A. *J. Biol. Chem.* 277, 3388–3396 (2002).
61. Fulton, D. *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597–601 (1999).
62. Halbrügge, T., Lütsch, K., Thyen, A. & Graefe, K. H. Role of nitric oxide formation in the regulation of haemodynamics and the release of noradrenaline and adrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344, 720–727 (1991).
63. Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 533–559 (2012).
64. Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 879–886 (1999).
65. Pfeifer, A. *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17, 3045–3051 (1998).
66. Münzel, T. *et al.* Physiology and Pathophysiology of Vascular Signaling Controlled by Cyclic Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Circulation* 108, 2172–2183 (2003).

67. Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A. & Lincoln, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 923–931 (1991).
68. Schlossmann, J. *et al.* Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 404, 197–201 (2000).
69. Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850–853 (1994).
70. Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R. & Morgan, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 76, 967–1003 (1996).
71. Rao, G. H. R., Krishnamurthi, S., Raji, L. & White, J. G. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 43, 271–275 (1990).
72. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9–22 (1999).
73. Ortega, N., Hutchings, H. & Plouët, J. Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosci.* 4, D141–152 (1999).
74. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269, 26988–26995 (1994).
75. Zachary, I. Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal. *Exp. Nephrol.* 6, 480–487 (1998).
76. Achen, M. G. & Stacker, S. A. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 79, 255–265 (1998).
77. Ogawa, S. *et al.* A Novel Type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), Preferentially Utilizes KDR/Flk-1 Receptor and Carries a Potent Mitotic Activity without Heparin-binding Domain. *J. Biol. Chem.* 273, 31273–31282 (1998).
78. Bernatchez, P. N., Rollin, S., Soker, S. & Sirois, M. G. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *Journal of Cellular Biochemistry* 85, 629–639 (2002).
79. Rak, J. *et al.* Oncogenes and Tumor Angiogenesis: Differential Modes of Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulation in ras-transformed Epithelial Cells and Fibroblasts. *Cancer Res* 60, 490–498 (2000).
80. Mazure, N. M., Chen, E. Y., Laderoute, K. R. & Giaccia, A. J. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia Is Modulated by a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway in Ha-ras-Transformed Cells Through a Hypoxia Inducible Factor-1 Transcriptional Element. *Blood* 90, 3322–3331 (1997).
81. Arsham, A. M., Plas, D. R., Thompson, C. B. & Simon, M. C. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1  $\alpha$  nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 15162–15170 (2002).
82. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. & Huot, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169–2177 (1997).
83. Dachs, G. & Tozer, G. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *European Journal of Cancer* 36, 1649–1660 (2000).
84. Tsuzuki, Y. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Modulation by Targeting Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$   $\rightarrow$  Hypoxia Response Element  $\rightarrow$  VEGF Cascade Differentially Regulates Vascular Response and Growth Rate in Tumors. *Cancer Res* 60, 6248–6252 (2000).
85. Jones, A. *et al.* Relation of Vascular Endothelial Growth Factor Production to Expression and Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  and Hypoxia-inducible Factor-2 $\alpha$  in Human Bladder Tumors and Cell Lines. *Clin Cancer Res* 7, 1263–1272 (2001).
86. Iyer, N. V. *et al.* Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1? *Genes Dev* 12, 149–162 (1998).

87. Fang, J., Yan, L., Shing, Y. & Moses, M. A. HIF-1 $\alpha$ -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res.* 61, 5731–5735 (2001).
88. Duvall, W. L. & Vorchheimer, D. A. Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem. *J. Thromb. Thrombolysis* 17, 51–61 (2004).
89. Alwan, A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 176 pp. (2011).
90. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3, e442 (2006).
91. Stryer, H. C. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9, 119–32 (1989).
92. Cornhill, J. F., Barrett, W. A., Herderick, E. E., Mahley, R. W. & Fry, D. L. Topographic study of sudanophilic lesions in cholesterol-fed minipigs by image analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 5, 415–426 (1985).
93. Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341–355 (2011).
94. Gimbrone, M. A. Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Am J Pathol* 155, 1–5 (1999).
95. Ross, R. Cell Biology of Atherosclerosis. *Annual Review of Physiology* 57, 791–804 (1995).
96. Faggiotto, A., Ross, R. & Harker, L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4, 323–340 (1984).
97. Nathan, L. & Chaudhuri, G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 477–515 (1997).
98. Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B. & Mancini, M. Coronary Heart Disease: Reducing the Risk The Scientific Background to Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease A Worldwide View. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1819–1824 (1999).
99. Bonetti, P. O., Lerman, L. O. & Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 168–175 (2003).
100. Egan, D. A. *et al.* Rationale and design of the Arterial Disease Multiple Intervention Trial (ADMIT) pilot study. *Am. J. Cardiol.* 83, 569–575 (1999).
101. Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M. & Tanzawa, K. Inhibition of Cholesterol Synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, Competitive Inhibitors of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *European Journal of Biochemistry* 77, 31–36 (1977).
102. Zhou, Q. & Liao, J. K. Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. *Curr Pharm Des* 15, 467–478 (2009).
103. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47 (1986).
104. Maron, D. J., Fazio, S. & Linton, M. F. Current Perspectives on Statins. *Circulation* 101, 207–213 (2000).
105. Laufs, U., Fata, V. L., Plutzky, J. & Liao, J. K. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG CoA Reductase Inhibitors. *Circulation* 97, 1129–1135 (1998).
106. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 1349–1357 (1998).
107. Buuren, F. 25. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. *Der Kardiologe* 4, 502–508 (2010).
108. Serruys, P. W. *et al.* A Comparison of Balloon-Expandable-Stent Implantation with Balloon Angioplasty in Patients with Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* 331, 489–495 (1994).
109. Weaver, W. D. *et al.* Optimum percutaneous transluminal coronary angioplasty compared with routine stent strategy trial (OPUS-1): a randomised trial. *The Lancet* 355, 2199–2203 (2000).
110. Silber, S. *et al.* Guidelines for Percutaneous Coronary Interventions The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26, 804–847 (2005).

111. Serruys, P. W. *et al.* Angiographic Follow-up after Placement of a Self-Expanding Coronary-Artery Stent. *New England Journal of Medicine* 324, 13–17 (1991).
112. Morice, M. C. *et al.* Intracoronary stenting without coumadin: One month results of a French multicenter study. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis* 35, 1–7 (1995).
113. Bertrand, M. E. *et al.* Randomized Multicenter Comparison of Conventional Anticoagulation Versus Antiplatelet Therapy in Unplanned and Elective Coronary Stenting The Full Anticoagulation Versus Aspirin and Ticlopidine (FANTASTIC) Study. *Circulation* 98, 1597–1603 (1998).
114. Hall, P. *et al.* A Randomized Comparison of Combined Ticlopidine and Aspirin Therapy Versus Aspirin Therapy Alone After Successful Intravascular Ultrasound-Guided Stent Implantation. *Circulation* 93, 215–222 (1996).
115. Vom Dahl, J. *et al.* Rotational atherectomy does not reduce recurrent in-stent restenosis: results of the angioplasty versus rotational atherectomy for treatment of diffuse in-stent restenosis trial (ARTIST). *Circulation* 105, 583–588 (2002).
116. Albiero, R. *et al.* Cutting balloon versus conventional balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: results of the restenosis cutting balloon evaluation trial (RESCUT). *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 943–949 (2004).
117. Serruys, P. W., Kutryk, M. J. & Ong, A. T. Coronary-artery stents. *New England Journal of Medicine* 354, 483–495 (2006).
118. Baz, J. A., Pinar, E., Albarrán, A., Mauri, J. & Spanish Society of Cardiology Working Group on Cardiac Catheterization and Interventional Cardiology. Spanish Cardiac Catheterization and Coronary Intervention Registry. 17th official report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Cardiac Catheterization and Interventional Cardiology (1990-2007). *Rev Esp Cardiol* 61, 1298–1314 (2008).
119. Lake-Bruse, K. D. *et al.* Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in eNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 277, H770–776 (1999).
120. Qian, Z. *et al.* Targeting vascular injury using Hantavirus-pseudotyped lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 13, 694–704 (2006).
121. Conte, M. S. *et al.* Endothelial cell seeding influences lesion development following arterial injury in the cholesterol-fed rabbit. *Cardiovasc. Res.* 53, 502–511 (2002).
122. Kipshidze, N. *et al.* Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 733–739 (2004).
123. Shirota, T., Yasui, H., Shimokawa, H. & Matsuda, T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials* 24, 2295–2302 (2003).
124. Pislaru, S. V. *et al.* Magnetically targeted endothelial cell localization in stented vessels. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1839–1845 (2006).
125. Springer, M. L., Chen, A. S., Kraft, P. E., Bednarski, M. & Blau, H. M. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol. Cell* 2, 549–558 (1998).
126. Baumgartner, I. *et al.* Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114–1123 (1998).
127. Isner, J. M. *et al.* Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J. Vasc. Surg.* 28, 964–973; discussion 73–75 (1998).
128. Mack, C. A. *et al.* Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *Journal of Vascular Surgery* 27, 699–709 (1998).
129. Fishbein, I., Chorny, M. & Levy, R. J. Site-specific gene therapy for cardiovascular disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13, 203–213 (2010).
130. Paull, R., Wolfe, J., Hébert, P. & Sinkula, M. Investing in nanotechnology. *Nat Biotech* 21, 1144–1147 (2003).

131. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotech* 24, 1211–1217 (2006).
132. Whitesides, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 21, 1161–1165 (2003).
133. Hülser, T. Strukturelle und magnetische eigenschaften von eisenkarbid-und eisenoxid-nanopartikeln. *Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Duisburg-Essen, Duisburg-Essen* (2003).
134. Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev* 41, 4306–4334 (2012).
135. Jiles, D. *Introduction to magnetism and magnetic materials, 2nd ed.* (Chapman and Hall, 1998).
136. Martin, D. H. *Magnetism in Solids.* (M.I.T. Press, 1967).
137. Daou, T. J. *et al.* Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem. Mater.* 20, 5869–5875 (2008).
138. Salata, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology* 2, 3 (2004).
139. Mahtab, F. *et al.* Fabrication of Silica Nanoparticles with Both Efficient Fluorescence and Strong Magnetization and Exploration of Their Biological Applications. *Advanced Functional Materials* 21, 1733–1740 (2011).
140. Baeza, A., Guisasaola, E., Ruiz-Hernández, E. & Vallet-Regí, M. Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* 24, 517–524 (2012).
141. Kim, J. *et al.* Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 8438–8441 (2008).
142. Nam, J.-M., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins. *Science* 301, 1884–1886 (2003).
143. Cao, Y. C., Jin, R., Nam, J.-M., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14676–14677 (2003).
144. Liberti, P. A., Rao, C. G. & Terstappen, L. W. M. . Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225, 301–307 (2001).
145. Paul, F., Melville, D., Roath, S. & Warhurst, D. A bench top magnetic separator for malarial parasite concentration. *IEEE Transactions on Magnetics* 17, 2822–2824 (1981).
146. Molday, R. S. & MacKenzie, D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J. Immunol. Methods* 52, 353–367 (1982).
147. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231–238 (1990).
148. Hofmann, W.-K. *et al.* Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 100, 3553–3560 (2002).
149. Hong, J. W., Studer, V., Hang, G., Anderson, W. F. & Quake, S. R. A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nat Biotech* 22, 435–439 (2004).
150. Grootendorst, D. J. *et al.* Evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Endorem®) as a photoacoustic contrast agent for intra-operative nodal staging. *Contrast Media Mol Imaging* 8, 83–91 (2013).
151. Weissleder, R. *et al.* Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 175, 489–493 (1990).
152. Bellin, M.-F. MR contrast agents, the old and the new. *Eur J Radiol* 60, 314–323 (2006).
153. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* 1, 35–40 (2011).
154. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, R167 (2003).
155. Rosenecker, J. The long and winding road to clinical success in gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 507–508 (2010).
156. Verma, I. M. & Somia, N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239–242 (1997).

157. Plank, C., Zelphati, O. & Mykhaylyk, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 1300–1331 (2011).
158. Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D. & Plank, C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc* 2, 2391–2411 (2007).
159. Plank, C., Anton, M., Rudolph, C., Rosenecker, J. & Krötz, F. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert Opin Biol Ther* 3, 745–758 (2003).
160. Krötz, F., Sohn, H.-Y., Gloe, T., Plank, C. & Pohl, U. Magnetofection Potentiates Gene Delivery to Cultured Endothelial Cells. *Journal of Vascular Research* 40, 425–434 (2003).
161. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. , *Published online: 13 February 2002; | doi:10.1038/sj/gt/3301624* 9, (2002).
162. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L. & Pistello, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 36, 1–22 (2013).
163. Blomer, U. *et al.* Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641–6649 (1997).
164. Lewis, P., Hensel, M. & Emerman, M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 11, 3053–3058 (1992).
165. Albertini, A. A. V., Baquero, E., Ferlin, A. & Gaudin, Y. Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry. *Viruses* 4, 117–139 (2012).
166. Wenzel, D. *et al.* Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells. *Pharm. Res.* 29, 1242–1254 (2012).
167. Hofmann, A. *et al.* Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 44–49 (2009).
168. Kilgus, C. *et al.* Local gene targeting and cell positioning using magnetic nanoparticles and magnetic tips: comparison of mathematical simulations with experiments. *Pharm. Res.* 29, 1380–1391 (2012).
169. Heidsieck, A., Vosen, S., Zimmermann, K., Wenzel, D. & Gleich, B. Analysis of Trajectories for Targeting of Magnetic Nanoparticles in Blood Vessels. *Mol. Pharm.* (2012). doi:10.1021/mp3001155
170. Trueck, C. *et al.* Optimization of magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer. *Pharm. Res.* 29, 1255–1269 (2012).
171. Polyak, B. *et al.* High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 698–703 (2008).
172. Pfeifer, A. & Hofmann, A. Lentiviral transgenesis. *Methods Mol. Biol.* 530, 391–405 (2009).
173. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463–8471 (1998).
174. Lampe, M. *et al.* Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. *Virology* 360, 92–104 (2007).
175. Mykhaylyk, O. *et al.* Silica-iron oxide magnetic nanoparticles modified for gene delivery: a search for optimum and quantitative criteria. *Pharm. Res.* 29, 1344–1365 (2012).
176. Gödecke, A. *et al.* Coronary Hemodynamics in Endothelial NO Synthase Knockout Mice. *Circulation Research* 82, 186–194 (1998).
178. Lindner, V., Fingerle, J. & Reidy, M. A. Mouse model of arterial injury. *Circ. Res.* 73, 792–796 (1993).
179. Baker, M. *et al.* Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7, 89–104 (2012).
180. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
181. Mykhaylyk, O. *et al.* Nucleic acid delivery to magnetically-labeled cells in a 2D array and at the luminal surface of cell culture tube and their detection by MRI. *J Biomed Nanotechnol* 5, 692–706 (2009).
182. Selkirk, S. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 80, 560–570 (2004).
183. Leeper, N. J., Hunter, A. L. & Cooke, J. P. Stem cell therapy for vascular regeneration: Adult, Embryonic, and Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation* 122, 517–526 (2010).

184. Riessen, R. *et al.* Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon. *Hum. Gene Ther.* 4, 749–758 (1993).
185. Thompson, M. M., Budd, J. S., Eady, S. L., James, R. F. & Bell, P. R. A method to transluminally seed angioplasty sites with endothelial cells using a double balloon catheter. *Eur J Vasc Surg* 7, 113–121 (1993).
186. Fishbein, I. *et al.* Bisphosphonate-mediated gene vector delivery from the metal surfaces of stents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 159–164 (2006).
187. Chorny, M., Fishbein, I., Alferiev, I. & Levy, R. J. Magnetically responsive biodegradable nanoparticles enhance adenoviral gene transfer in cultured smooth muscle and endothelial cells. *Mol. Pharm.* 6, 1380–1387 (2009).
188. Trueck, C. *et al.* Optimization of magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer. *Pharm. Res.* 29, 1255–1269 (2012).
189. Suh, J. H. Stereotactic radiosurgery for the management of brain metastases. *N. Engl. J. Med.* 362, 1119–1127 (2010).
190. Yi, Y., Hahm, S. H. & Lee, K. H. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr Gene Ther* 5, 25–35 (2005).
191. Gory, S. *et al.* The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood* 93, 184–192 (1999).
192. Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R. J. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther* 14, 316–327 (2006).
193. Katwal, A. B. *et al.* Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* 20, 930–938 (2013).
194. Richter, M. *et al.* Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. *Physiol. Genomics* 2, 117–127 (2000).
195. Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y., Shtatland, T. & Josephson, L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat. Biotechnol.* 23, 1418–1423 (2005).
196. Plank, C. *et al.* The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery. *Biological Chemistry* 384, 737–747 (2003).
197. Felgner, P. L. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am.* 276, 102–106 (1997).
198. Kormann, M. S. D. *et al.* Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat. Biotechnol.* 29, 154–157 (2011).
199. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine* 348, 255–256 (2003).
200. P. Osten, V. G. Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handbook of experimental pharmacology* 177–202 (2007). doi:10.1007/978-3-540-35109-2\_8
201. Lim, T.-T. *et al.* Lentiviral vector mediated thymidine kinase expression in pluripotent stem cells enables removal of tumorigenic cells. *PLoS ONE* 8, e70543 (2013).
202. Singh, N. *et al.* NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914 (2009).
203. Díaz, B. *et al.* Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small* 4, 2025–2034 (2008).
204. Arbab, A. S. *et al.* Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 229, 838–846 (2003).
205. Soenen, S. J. H., Brisson, A. R. & De Cuyper, M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials* 30, 3691–3701 (2009).
206. Lehmann, A. D. *et al.* Fluorescent-magnetic hybrid nanoparticles induce a dose-dependent increase in proinflammatory response in lung cells in vitro correlated with intracellular localization. *Small* 6, 753–762 (2010).
207. Brandenberger, C. *et al.* Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. *Small* 6, 1669–1678 (2010).
208. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995–4021 (2005).

209. Pisanic, T. R., 2nd, Blackwell, J. D., Shubayev, V. I., Fiñones, R. R. & Jin, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 28, 2572–2581 (2007).
210. Miller, I. S., Lynch, I., Dowling, D., Dawson, K. A. & Gallagher, W. M. Surface-induced cell signaling events control actin rearrangements and motility. *J Biomed Mater Res A* 93, 493–504 (2010).
211. Lévy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* 21, 395103 (2010).
212. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3988–3999 (2011).
213. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 152, 167–173 (1989).
214. Vaughn, M. W., Kuo, L. & Liao, J. C. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 274, H1705–H1714 (1998).
215. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* 140, 2457–2461 (2013).
216. Sedighiani, F. & Nikol, S. Gene therapy in vascular disease. *The Surgeon* 9, 326–335 (2011).
217. Folkman, J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *New England Journal of Medicine* 333, 1757–1763 (1995).
218. Mäkinen, K. *et al.* Increased Vascularity Detected by Digital Subtraction Angiography after VEGF Gene Transfer to Human Lower Limb Artery: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Phase II Study. *Mol Ther* 6, 127–133 (2002).
219. Kusumanto, Y. H. *et al.* Treatment with Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Compared with Placebo for Patients with Diabetes Mellitus and Critical Limb Ischemia: A Double-Blind Randomized Trial. *Human Gene Therapy* 17, 683–691 (2006).
220. Rajagopalan, S. *et al.* Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease A Phase II Randomized, Double-Blind, Controlled Study of Adenoviral Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor 121 in Patients With Disabling Intermittent Claudication. *Circulation* 108, 1933–1938 (2003).
221. Ylä-Herttuala, S. & Alitalo, K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat. Med.* 9, 694–701 (2003).
222. Collinson, D. . & Donnelly, R. Therapeutic Angiogenesis in Peripheral Arterial Disease: Can Biotechnology Produce an Effective Collateral Circulation? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 28, 9–23 (2004).
223. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674 (1997).
224. Heil, M. & Schaper, W. in *Mechanisms of Angiogenesis* (eds. Clauss, M. & Breier, G.) 181–191 (Birkhäuser Basel, 2005). at <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-7643-7311-3\\_13](http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-7643-7311-3_13)>
225. Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T. & Schaper, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10, 45–55 (2006).
226. Mannell, H. *et al.* Inhibition of the Tyrosine Phosphatase SHP-2 Suppresses Angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Vascular Research* 45, 153–163 (2008).
227. Johnson, T. W. *et al.* Stent-based delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 adenovirus inhibits neointimal formation in porcine coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 754–759 (2005).
228. Miyagawa, S. *et al.* Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 105, 2556–2561 (2002).
229. Laukkanen, M. O. *et al.* Adenovirus-mediated extracellular superoxide dismutase gene therapy reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation* 106, 1999–2003 (2002).
230. Zoldhelyi, P. *et al.* Thromboresistance of balloon-injured porcine carotid arteries after local gene transfer of human tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 101, 289–295 (2000).
231. Patel, V. I. *et al.* A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia. *FASEB J.* 20, 1418–1430 (2006).

232. Roell, W. *et al.* Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 450, 819–824 (2007).
233. Byrne, M. J. *et al.* Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther.* 15, 1550–1557 (2008).
234. Dames, P. *et al.* Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung. *Nat Nanotechnol* 2, 495–499 (2007).
235. Underwood, C. & van Eps, A. W. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. *The Veterinary Journal* 193, 12–23 (2012).

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

- Wenzel, D., Rieck, S., Vosen, S., Mykhaylyk, O., Trueck, C., Eberbeck, D., Trahms, L., Zimmermann, K., Pfeifer, A., and Fleischmann, B.K. (2012). *Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells*. Pharm. Res.
- Trueck, C., Zimmermann, K., Mykhaylyk, O., Anton, M., Vosen, S., Wenzel, D., Fleischmann, B.K., and Pfeifer, A. (2012). *Optimization of magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer*. Pharm. Res.
- Heidsieck, A., Vosen, S., Zimmermann, K., Wenzel, D., and Gleich, B. (2012). *Analysis of Trajectories for Targeting of Magnetic Nanoparticles in Blood Vessels*. Mol. Pharm.
- Jansen, F., Yang, X., Hoelscher, M., Cattelan, A., Schmitz, T., Proebsting, S., Wenzel, D., Vosen, S., Franklin, B.S., Fleischmann, B.K., et al. (2013). *Endothelial Microparticle-Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial Cell Repair via SPRED1 and is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles*. Circulation.

### Vorträge

- Vortrag im Rahmen der 90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg  
(„Lentiviral targeting of endothelial cells in arteries by the application of magnetic nanoparticles (MNPs) and radially symmetric fields“)
- Vortrag im Rahmen des Jahrestreffens der Bonner Graduiertenschule THEME (Theoretical and Experimental Medicine) in Bad Honnef;  
Auszeichnung als bester Vortrag des Jahrgangs  
(„Radially symmetric lentiviral targeting and endothelial cell replacement in vessels by the use of magnetic nanoparticles (MNPs)“)
- Vortrag im Rahmen der 92. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Heidelberg  
(„Improvement of vascular function by magnetic nanoparticle-assisted gene and endothelial cell transfer in vessels“)
- Vortrag im Rahmen der Tsukuba Global Science Week 2013 der Universität Tsukuba, Japan;  
Auszeichnung mit dem *Young Scientist Award*  
(„Improvement of vascular function by magnetic nanoparticle-assisted gene and endothelial cell transfer in vessels“)

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fleischmann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Physiologie I der Universität Bonn durchführen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Arnhold für die Möglichkeit, die Dissertation über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gießen einreichen zu dürfen.

Ein großer Dank gilt Frau Juniorprofessorin Dr. Daniela Wenzel für ihre tägliche Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor, für viele hilfreiche Diskussionen und für ihre hervorragende Wahrnehmung der Aufgabe als Nachwuchsorakel.

Ein großer Dank gilt ebenfalls den zahlreichen Kooperationspartnern, die mir immer mit Rat und Tat (sowie Virus und MNPs) zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wenzel danken: Ela, Katia, Sarah, Sofia, Thomas – ihr seid alle Klasse! Danke, dass ihr mir immer – in allen Lebenslagen – geholfen habt.

Hervorheben möchte ich meine liebe Kollegin Sarah: Du hast einen riesigen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke, dass Du nie die Geduld mit mir verloren hast, wenn ich mal wieder mit einer meiner „Tierarzt-im-Labor“ Fragen zu Dir gekommen bin. Wenn ich könnte, würde ich Dir den Titel „Dr. med. vet. ehrenhalber“ verleihen.

Natürlich gilt ein ganz großer Dank der gesamten Arbeitsgruppe Fleischmann – egal, ob AG Breitbach, AG Hesse, AG Sasse, AG Röhl oder AG Wenzel: bessere Kollegen hätte ich mir nicht wünschen können. Danke für eure stetige Unterstützung und Hilfe. Danke, dass ihr mir immer ein offenes Ohr geschenkt habt. Danke, für die Freundschaften, die während der Zeit am Institut entstanden sind.

Ich danke meiner lieben Freundin Swantje dafür, dass sie mich in unseren vielen Telefonaten immer auf andere Gedanken gebracht hat und mir gezeigt hat, dass das Leben als Tierarzt auch über den Labortellerrand hinausgeht.

Der wahrscheinlich größte Dank gilt der besten Familie der Welt: meiner. Liebe Mama und liebe Inga - danke dafür, dass ihr in den letzten Jahren immer für mich da wart und mich unterstützt habt. Natürlich nicht nur während der Doktorarbeit, sondern auch während meiner Zeit in München – ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

Ich möchte auch meinem Vater danken, dem diese Arbeit gewidmet ist. Papa, Du kannst das vollendete Werk zwar nicht mehr lesen, aber ich weiß, dass Du Dich am meisten von allen darüber gefreut hättest. Du hast mir alles ermöglicht, wovon ich geträumt habe und hast dabei immer an mich geglaubt. Danke.

Zum Schluss danke ich meiner süßen Hummel – dafür, dass sie mir immer wieder gezeigt hat, worauf es im Leben wirklich ankommt: spielen, chillen, glücklich sein ☺.

... so, geschafft!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6311-5



9 783835 196311 5