

Verwendung magnetischer Nanopartikel zur lentiviralen
Transduktion und zielgerichteten Positionierung von
Endothelzellen

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Sarah Rieck

aus
Köln

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. B. K. Fleischmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. O. Fürst

Tag der Promotion: 15.06.2015

Erscheinungsjahr: 2015

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2010 bis Januar 2015 am Institut für Physiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter Anleitung von Prof. Dr. B. K. Fleischmann erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wenzel D., **Rieck S.**, Vosen S., Mykhaylyk O., Trueck C., Eberbeck D., Trahms L., Zimmermann K., Pfeifer A., Fleischmann B. K., 2012, *Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells*, *Pharmaceutical Research*, 29(5): 1242-54

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Alle von mir verwendeten Hilfsmittel und Quellen sind als solche gekennzeichnet. Des Weiteren hat die Arbeit keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Sarah Rieck

Köln, den 05.01.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau von Blutgefäßen	1
1.1.1 Funktion der Blutgefäße	1
1.1.2 Aufbau der Gefäßwand	1
1.1.3 Krankhafte Veränderungen der Gefäßwand – Atherosklerose	3
1.2 Modulatoren des Gefäßsystems – Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	6
1.2.1 Aufbau der eNOS	7
1.2.2 Regulation der Enzymaktivität	8
1.2.3 Wirkung von NO	10
1.3 Modulatoren des Gefäßsystems – Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2	14
1.4 Virale Vektoren in der Gentherapie	16
1.5 Lentiviren und lentivirale Vektoren	18
1.5.1 Genom und Replikationszyklus eines Lentivirus	19
1.5.2 Lentiviren als Vektoren	19
1.6 Magnetische Nanopartikel	21
1.6.1 Magnetismus und magnetische Eigenschaften von MNPs	22
1.6.2 Einsatzgebiete von MNPs	24
1.7 MNP-basierte Therapieansätze	25
1.8 Zielsetzung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 verwendete Materialien	28
2.1.1 Software	28
2.1.2 Geräte	28
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.4 Chemikalien und gekaufte Lösungen	31
2.1.5 Puffer und angesetzte Lösungen	36
2.1.6 Kits	38
2.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze	39
2.1.8 Eukaryotische Zelllinien	40

2.1.9	Primer	41
2.1.10	Lentivirale Vektoren	41
2.1.11	Magnetische Nanopartikel (MNPs)	42
2.1.12	Antikörper	44
2.2	Zellbiologische Methoden	46
2.2.1	Auftauen von Endothelzellen	46
2.2.2	Kultivierung von Endothelzellen	46
2.2.3	Einfrieren von Endothelzellen	46
2.2.4	Beladung von Endothelzellen mit MNPs	47
2.2.5	Bestimmung der Magnetisierungseffizienz von MNPs	47
2.2.6	MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von Endothelzellen	47
2.2.7	Bestimmung der magnetischen Ansprechbarkeit MNP-beladener Endothelzellen	48
2.2.8	Bestimmung des Eisengehaltes MNP-beladener Endothelzellen mittels Magnetpartikelspektroskopie	48
2.2.9	Kolorimetrisches Eisennachweisverfahren	49
2.2.10	Angiogeneseassay	49
2.2.11	Diaminofluoresceinassay	50
2.2.12	Apoptoseassay	50
2.2.13	Kultivierung von Nährzellen	51
2.2.14	Auftauen von mES-Zellen	51
2.2.15	Kultivierung von mES-Zellen	51
2.2.16	Einfrieren von mES-Zellen	52
2.2.17	Ansetzen einer Massenkultur	52
2.2.18	Dissoziation von EBs	53
2.2.19	Quantifizierung der Gefäßbildung	53
2.2.20	Homogene MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von mES-Zellen	53
2.2.21	Magnetspitzenvergleich	54
2.2.22	Lokale MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von mES-Zellen	54
2.3	<i>Ex-vivo</i>-Aortenperfusion	55
2.4	Molekularbiologische Methoden	55
2.4.1	RNA-Isolation	55

2.4.2	Gelelektrophoretische Qualitätskontrolle der RNA	56
2.4.3	Reverse Transkription	56
2.4.4	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	57
2.5	Biochemische Methoden	58
2.5.1	Proteinisolation	58
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	58
2.5.3	Western Blot	58
2.5.4	LDH-Assay	60
2.6	Immunhistochemische und histologische Methoden	60
2.6.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)	60
2.6.2	Indirekte immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen	60
2.6.3	Histologische Färbungen	61
2.6.3.1	Preußisch Blau	61
2.6.3.2	Eosinfärbung	61
2.7	Mikroskopie	62
2.8	Statistik	62
2.9	Kooperationsübersicht	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Verwendung von NDT-Mag1 und PEI-Mag2 zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen	64
3.1.1	Identifizierung geeigneter Nanopartikel zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen	64
3.1.2	Magnetisierung von Endothelzellen mit NDT-Mag1 und/oder PEI-Mag2	66
3.1.3	Lentivirale Transduktion von Endothelzellen mit NDT-Mag1 und/oder PEI-Mag2	68
3.1.4	Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen nach Behandlung mit NDT-Mag1 und PEI-Mag2	70
3.1.5	Retention NDT-Mag1-beladener Endothelzellen nach PEI-Mag2-vermittelter lentiviraler Transduktion an der Gefäßwand unter Flussbedingungen	73

3.1.6	ENOS-Überexpression und funktioneller Stickstoffmonoxidnachweis in NDT-Mag1-beladenen bPAECs nach PEI-Mag2-vermittelter lentiviraler Transduktion	75
3.2	Verwendung von SO-Mag5 zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen	78
3.2.1	Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen mit SO-Mag5	78
3.2.2	Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen 72 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	81
3.2.3	Radialsymmetrische Retention von SO-Mag5-beladenen und lentiviral transduzierten Endothelzellen an der Gefäßwand unter Flussbedingungen	83
3.2.4	SO-Mag5-vermittelte Transduktion von Endothelzellen mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt	85
3.2.5	Magnetisierung von Endothelzellen 120 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	87
3.2.6	Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen 120 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	89
3.2.7	Proliferation von Endothelzellen nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	91
3.2.8	ENOS-Überexpression im Zeitverlauf nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	94
3.2.9	Funktioneller Stickstoffmonoxidnachweis nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion	96
3.2.10	Ex-vivo-Perfusion der Mausaorta mit eNOS-überexprimierenden Endothelzellen	97
3.3	Modulation der Angiogenese durch MNP-vermittelte, lentivirale SHP2-Regulation	99
3.3.1	Etablierung eines multizellulären <i>In-vitro</i> -Angiogenesemodells	99
3.3.2	MNP-vermittelte Transduktion mit einem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt	100
3.3.3	Vergleich zweier Magnetspitzen zur lokalen Transduktion	103
3.3.4	Lokale Transduktion embryonaler D3-Stammzellen	105

3.3.5 Lokale Transduktion von embryonalen, transgenen D3 Flt1-eGFP-Stammzellen	109
4. Diskussion	113
4.1 Lentivirale Vektoren	113
4.1.1 Lentivirale Transduktion von Endothelzellen	113
4.1.2 Lokale lentivirale Transduktion	115
4.2 MNPs und Toxizität	115
4.2.1 Toxizität von MNPs in Endothelzellen	115
4.2.2 Toxizität von MNPs bei lokalen Transduktionen	117
4.3 Gezielter Einsatz von MNPs für Magnetisierung und Transduktion	118
4.3.1 NDT-Mag1 und PEI-Mag2 – Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen	118
4.3.2 SO-Mag5 – Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen	119
4.3.3 SO-Mag5 – lokale Transduktion	121
4.4 ENOS als therapeutisches Gen	123
4.5 SHP2 als therapeutisches Gen	124
4.6 MNP-basierte Therapieansätze	126
5. Zusammenfassung	128
6. Literaturverzeichnis	130
7. Abürzungsverzeichnis	146
Liste der Publikationen	151
Danksagung	152

1. Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau von Blutgefäßen

1.1.1 Funktion der Blutgefäße

Blutgefäße sind Hohlorgane, die für den Bluttransport im Körper verantwortlich sind und damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleisten. Vom Herzen ausgehend leiten Arterien und die kleineren Arteriolen das Blut in die Peripherie des Körpers, während Venolen und Venen es von dort zurück zum Herzen transportieren. Die Verbindung zwischen den beiden Gefäßtypen stellen die Kapillaren dar. Basierend auf dem in den Gefäßen herrschenden Blutdruck unterscheidet man ein Hochdrucksystem, das im linken Ventrikel beginnt und bis zu den Arteriolen reicht, und ein Niederdrucksystem, welches sich von den Kapillaren bis zum linken Ventrikel erstreckt, also die Kapillaren, Venolen, Venen, das rechte Herz und die Lunge umfasst. Während die Aufgabe der Gefäße des Hochdrucksystems darin besteht, die Organe mit Blut zu versorgen, dienen die Gefäße des Niederdrucksystems als Blutspeicher. Hier befinden sich zwischen 75 % und 85 % des zirkulierenden Blutvolumens.

Der Blutfluss in den Gefäßen kann über Vasokonstriktion und Vasodilatation reguliert werden. Bei einer Vasokonstriktion, die beispielsweise durch Adrenalin oder Noradrenalin hervorgerufen werden kann, kontrahieren die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und das Gefäßlumen wird verkleinert. Bei einer Vasodilatation hingegen relaxiert die glatte Muskulatur, wodurch das Gefäßlumen vergrößert wird. Eine solche Relaxation wird beispielsweise durch Stickstoffmonoxid (NO), welches von Zellen der innersten Gefäßschicht, den Endothelzellen, freigesetzt wird, eingeleitet. Um solche und andere Vorgänge, die in den Blutgefäßen ablaufen, vollständig zu verstehen, ist es von Vorteil, den Aufbau der Gefäßwand im Detail zu kennen. Daher wird darauf im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.1.2 Aufbau der Gefäßwand

Die größeren Blutgefäße zeigen einen dreischichtigen Aufbau, der sich, von innen nach außen betrachtet, aus der Tunica intima, der Tunica media und der Tunica adventitia zusammensetzt (vgl. Abb. 1). Die Intima besteht aus dem Endothel, einer subendothelialen Schicht und der Membrana elastica interna¹. Während sich das Endothel aus einer Schicht polygonaler Zellen zusammensetzt, ist die subendotheliale Schicht aus losem Bindegewebe mit vereinzelt, wahrscheinlich aus der Media eingewanderten,

glatten Muskelzellen aufgebaut. Bei der Membrana elastica interna handelt es sich um ein Flechtwerk aus elastischen Fasern, welches die Intima von der Media trennt.

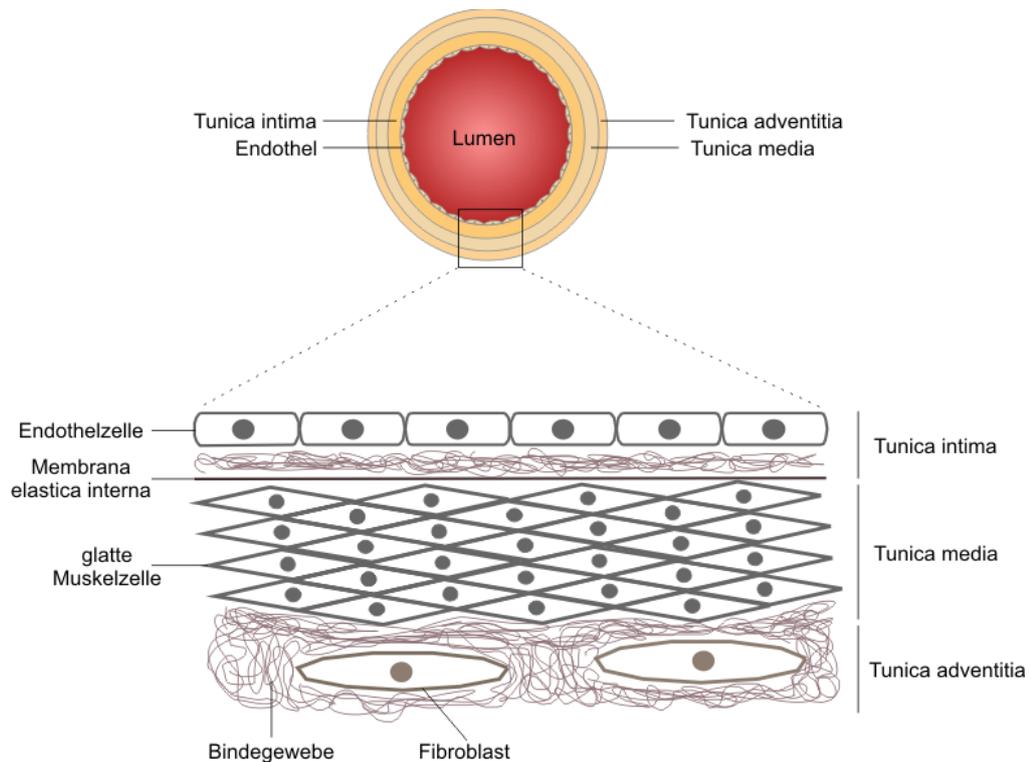


Abb. 1 Gefäßaufbau. Die größeren Blutgefäße werden zum Lumen hin von einer einzelligen Endothelschicht begrenzt. Zusammen mit einer subendothelialen Schicht aus losem Bindegewebe und der Membrana elastica interna bildet diese die Tunica intima. An die Intima schließt sich die hauptsächlich aus glatten Muskelzellen bestehende Tunica media an, welche durch die Membrana elastica externa von der Tunica adventitia getrennt wird. Diese äußerste Schicht setzt sich aus Fibroblasten und Bindegewebe zusammen.

Die Media ist die breiteste der drei Schichten und besteht ausschließlich aus glatten Muskelzellen und der von ihnen gebildeten Extrazellulärmatrix¹. In größeren Gefäßen ist die Membrana elastica externa zu erkennen, welche Media und Adventitia voneinander trennt.

Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, bestehend aus Fibroblasten, elastischen Fasern, Kollagenfasern und Proteoglykanen. In ihr eingebettet sind Blut- und Lymphgefäße, über welche die Gefäßwand versorgt wird¹.

Sowohl Arterien als auch Venen zeigen den oben beschriebenen Aufbau. Allerdings ist die Trennung von Intima, Media und Adventitia in Venen oftmals nicht so deutlich wie in

Arterien. Da die Gefäßwand von Venen generell dünner ist als die der Arterien, besteht hier auch kein direkter Zusammenhang zwischen Gefäßgröße und Durchmesser der Gefäßwand². In den Arterien hingegen nimmt der Durchmesser der Gefäßwand mit der Gefäßgröße ab. So fehlt Arteriolen die subendotheliale Schicht der Intima und sowohl Media als auch Adventitia sind deutlich dünner als in größeren Gefäßen. Die Intima von Kapillaren besteht nur noch aus Endothelzellen, die einer Basalmembran aufliegen, und einer dünnen Adventitia. Die Media fehlt vollständig².

Eine intakte Gefäßwand ist die Grundvoraussetzung für eine normale Gefäßfunktion und damit einen normalen Blutfluss. Krankhafte Veränderungen der Gefäßwand, wie sie im Rahmen der Atherosklerose auftreten, können den Blutfluss massiv einschränken oder sogar vollständig verhindern.

1.1.3 Krankhafte Veränderungen der Gefäßwand – Atherosklerose

Der Begriff Atherosklerose bezeichnet eine systemische Erkrankung der Arterien, in deren Verlauf Ablagerung von Lipiden, Lipoproteinen, Kollagen und Kalk in der subendothelialen Schicht der Intima entstehen. Daraus resultiert die Bildung von Plaques, die zum einen das Gefäßlumen verringern beziehungsweise vollständig verschließen können (vgl. Abb. 2) und die zum anderen die Gefäßelastizität negativ beeinflussen. Bis heute ist noch nicht exakt geklärt, wie es zur Entstehung eines atherosklerotischen Plaques kommt. Es existieren verschiedene Hypothesen, die unterschiedliche Schwerpunkte setzen. Als eine mögliche Ursache wird ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) angenommen, der zu oxidativem Stress und einer endothelialen Dysfunktion führt³. Möglicherweise kommt es infolgedessen zu einer Akkumulation von *Low-Density-Lipoprotein-Komplexen* (LDL) in der subendothelialen Matrix⁴. Durch nachfolgende Oxidation wird das LDL modifiziert und es entstehen eine geringfügig oxidierte und eine hoch oxidierte LDL-Spezies⁴. Die geringfügig oxidierte Variante stimuliert Endothelzellen zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Moleküle und initiiert damit die Einwanderung von Monozyten⁵. Nach Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen können diese die hoch oxidierte LDL-Variante und andere LDL-Modifikationen aufnehmen und wandeln sich dadurch zu sogenannten Schaumzellen um. Die Anreicherung von Makrophagen und Schaumzellen bedingt eine erhöhte Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und zieht entsprechend einen Entzündungsprozess sowie die Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand nach sich. Dadurch steigt

die Produktion von extrazellulärer Matrix und es entsteht ein Plaque, der sich aus einer fibrösen Kappe mit einem Lipidkern aus nekrotischen Schaumzellen zusammensetzt. Für den weiteren Krankheitsverlauf sind Größe und Stabilität der Plaques entscheidend. Stabile Plaques haben einen relativ kleinen Lipidkern und sind von einer dicken fibrösen Schicht umgeben (vgl. Abb. 2 B). Sie engen zwar das Gefäßlumen ein und verringern damit den Sauerstofftransport ins Gewebe, das Risiko einer Thrombusbildung ist aber gering. Instabile Plaques hingegen zeichnen sich durch einen großen Lipidkern umgeben von einer dünnen fibrösen Schicht aus (vgl. Abb. 2 C). Ein solcher Plaque neigt dazu, leicht einzureißen. An der Rissstelle kann sich dann ein Thrombus bilden (vgl. Abb. 2 D).

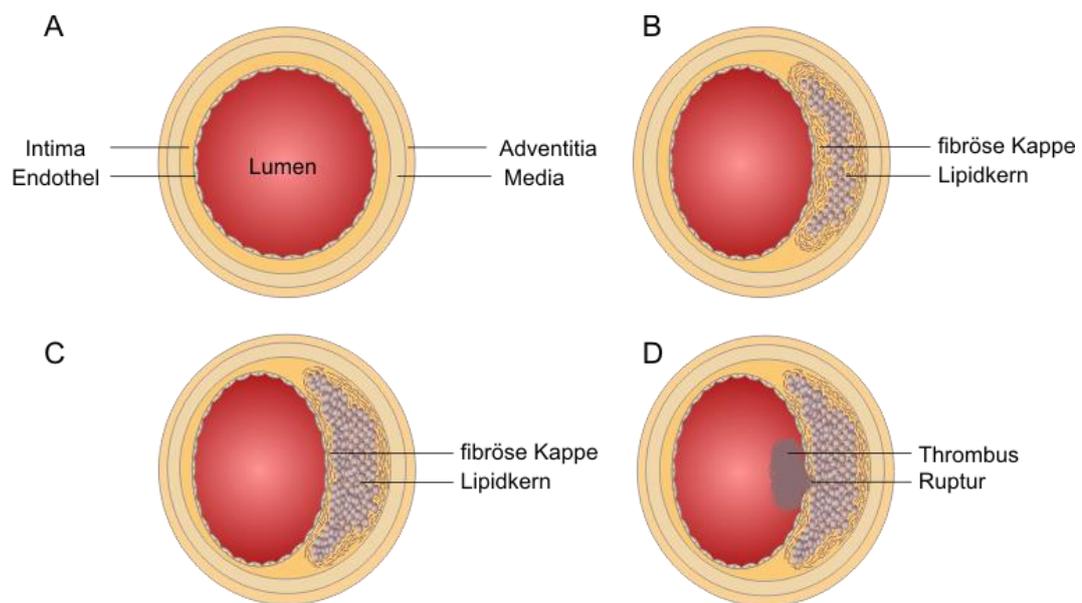


Abb. 2 Entstehung eines atherosklerotischen Plaques. (A) Blutgefäß ohne pathologische Veränderungen. (B) Stabiler atherosklerotischer Plaque mit kleinem Lipidkern umgeben von einer dicken fibrösen Schicht in der Intima der Gefäßwand. (C) Instabiler Plaque mit großem Lipidkern, der nur von einer dünnen fibrösen Schicht begrenzt wird. (D) Ruptur eines instabilen Plaques mit beginnender Thrombusbildung.

Abhängig davon, in welchen Gefäßen sich atherosklerotische Plaques befinden und wie stabil sie sind, treten unterschiedliche Folgeerkrankungen auf. Wird durch den Plaque das Gefäß lediglich verengt, schränkt das den Blutfluss ein und resultiert in einer Sauerstoffuntersorgung des Gewebes. Sind hiervon die Koronararterien betroffen, kann sich die koronare Herzkrankheit (KHK), deren prominentestes Symptom die Angina pectoris ist, entwickeln. Aus einer Verengung der Nierenarterien kann eine Niereninsuffizienz entstehen, während atherosklerotische Plaques in den

gehirnversorgenden Gefäßen unter anderem Schwindel oder Gedächtnisstörungen zur Folge haben können. Werden hingegen Blutgefäße durch atherosklerotische Plaques oder Thromben vollständig verschlossen, führt dies zu Organinfarkten. Da Herzinfarkte und Schlaganfälle in westlichen Nationen 50 % der Todesfälle ausmachen ⁴, ist eine effiziente Therapie der Atherosklerose von großer Bedeutung.

Der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque kann vorgebeugt werden, indem erhöhte Blutzucker- und Cholesterolvereinerungen sowie Bluthochdruck medikamentös behandelt werden. Bereits bestehende Plaques werden hiervon jedoch nicht beeinflusst. Um diese zu behandeln, kommen oftmals nur chirurgische Methoden in Frage. Eine Verengung der Koronararterien im Rahmen der KHK wird meistens durch das Legen eines sogenannten Bypasses behandelt. Dazu wird ein synthetisches oder körpereigenes Blutgefäß transplantiert, sodass der Blutfluss umgeleitet werden kann. Eine zweite Behandlungsmethode bietet die Angioplastie. Hierbei wird ein Ballonkatheter in das verengte Gefäß eingeführt (vgl. Abb. 3 A) und aufgeblasen, um dieses zu weiten (vgl. Abb. 3 B). Anschließend oder währenddessen kann ein Stent eingesetzt werden, um das Gefäß offen zu halten (vgl. Abb. 3 C).

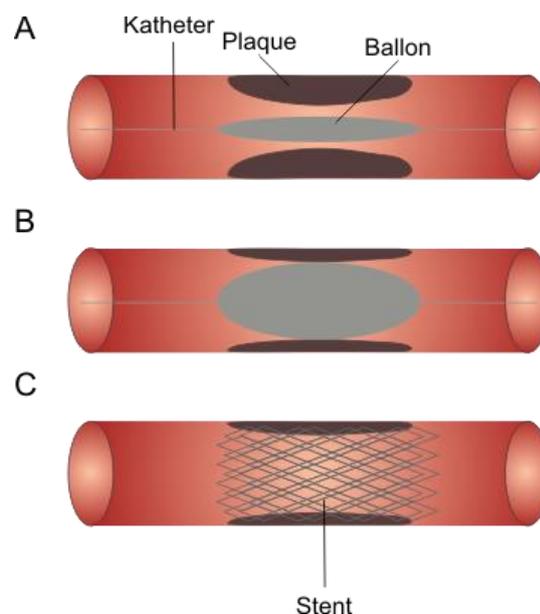


Abb. 3 Ballonangioplastie und Stentimplantation. (A) Mit Hilfe eines Katheters wird ein Ballon in den durch atherosklerotische Plaques verengten Gefäßabschnitt geführt. (B) Die Entfaltung des Ballons erfolgt durch eine Druckerhöhung und weitet das verengte Gefäß. (C) Durch Einsetzen eines Stents kann das Gefäß offen gehalten werden.

Bei großen Gefäßen wie der Arteria carotis besteht die Möglichkeit, das Gefäß längsseitig zu öffnen und den Plaque auszuschaben. Dieses Verfahren wird als Thrombendarteriektomie bezeichnet. Sowohl bei der Angioplastie als auch bei der Thrombendarteriektomie besteht der Nachteil, dass insbesondere die Endothelzellschicht irreversibel geschädigt wird und oftmals eine Restenose des Gefäßes nicht ausgeschlossen werden kann. Wie oben schon erwähnt, können Stents eingesetzt werden, um solche Restenosen zu verhindern. Allerdings können auch nach erfolgreicher Stentimplantation erneute Gefäßverschlüsse, sogenannte In-Stent-Restenosen, auftreten. Diese gehen hauptsächlich auf die Proliferation glatter Muskelzellen, ihrer Akkumulation in der Tunica intima und dem daraus resultierenden Wachstum einer Neointima zurück⁶. Die Entstehung einer solchen In-Stent-Restenose kann durch Stents, die über mehrere Wochen Medikamente freisetzen (*drug eluting stents*, DES), verringert werden. Meistens handelt es sich hierbei um herkömmliche Stents, die mit einem Polymer, in welches das freizusetzende Medikament eingebettet ist, beschichtet sind⁷. Als Medikamente können theoretisch alle Substanzen eingesetzt werden, die anti-proliferativ, anti-inflammatorisch oder anti-thrombogenetisch wirken. Gute Erfolge wurden bisher mit den Wirkstoffen Sirolimus (Immunsuppressivum) und Paclitaxel (Zytostatikum) erzielt⁸. Eine Alternative sind sogenannte genfreisetzende Stents (*gene eluting stents*, GES). Hier wird der Stent nicht als Träger für Medikamente genutzt, sondern es werden Vektoren mit therapeutischen Genen entweder direkt an die Stentoberfläche gebunden oder ebenfalls in Polymere integriert, mit denen der Stent dann beschichtet wird⁷. Eingesetzt werden können Gene, die die Proliferation der glatten Muskelzellen verringern oder, wie die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) den Aufbau einer neuen, intakten Endothelzellschicht unterstützen⁷. Auch wenn DES und GES eine Verbesserung zu konventionellen Stents darstellen, wäre es vorteilhaft, gänzlich auf Stents verzichten zu können. Möglich wäre beispielsweise eine auf magnetischen Nanopartikeln basierende, stentfreie Gen- oder Zellersatztherapie. Als therapeutisches Gen käme, wie oben bereits erwähnt, die eNOS in Frage.

1.2 Modulatoren des Gefäßsystems – Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) umfasst drei Isoformen, welche in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden, aber alle die Reaktion von L-Arginin zu

L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) katalysieren. Die induzierbare Isoform iNOS wird in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und unter anderem durch Cytokine reguliert. Das von ihr freigesetzte NO ist in der nicht-spezifischen Immunabwehr^{9, 10}, bei Entzündungsprozessen sowie der Vasodilatation¹¹ und dem Blutdruckabfall im Rahmen eines septischen Schocks von Bedeutung¹². Sowohl die neuronale Isoform nNOS als auch die endotheliale Isoform eNOS werden hauptsächlich über das intrazelluläre Ca²⁺-Level reguliert. Während die nNOS in zentralen und peripheren Nervenzellen vorliegt und dort unter anderem die synaptische Plastizität und den Blutdruck beeinflusst¹³, wird eNOS in Endothelzellen exprimiert. Das von der endothelialen Isoform gebildete NO induziert durch Stimulation der löslichen Guanylylcyclase (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) in den glatten Muskelzellen und dem daraus bedingten Anstieg an zyklischem Guanosinmonophosphat (*cyclic GMP*, cGMP) eine Vasorelaxation³. Zusätzlich induziert NO eine Vielzahl vasoprotektiver Effekte: NO inhibiert die Anlagerung und Aggregation von Thrombozyten sowie die Proliferation glatter Muskelzellen, vermindert die Oxidation von LDL und die Expression pro-inflammatorischer Gene, die die Bildung atherosklerotischer Plaques begünstigen^{3,14,15}. Daher ist dieses Enzym ein guter Ansatzpunkt, um durch Gentherapie die Funktion von geschädigtem Endothel zu verbessern. Des Weiteren könnte eine Kombination aus eNOS-basierter Gen- und Zellersatztherapie eingesetzt werden, um die Gefäßfunktion nach Entfernung eines atherosklerotischen Plaques wiederherzustellen.

1.2.1 Aufbau der eNOS

Die eNOS ist ein Homodimer bestehend aus zwei 134 kDa-Einheiten¹⁶. Jedes Monomer setzt sich zusammen aus einer C-terminalen Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne (vgl. Abb. 4)¹⁷. Durch die Bindung einer Häm-Gruppe an die Oxygenase-Domäne wird die Dimerisierung eingeleitet und die Bindung des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH₄) ermöglicht¹⁸. Die Bindung von BH₄ an die Oxygenase-Domäne und die Ausbildung eines Zink-Thiolat-Clusters stabilisieren das Dimer^{19,20}.

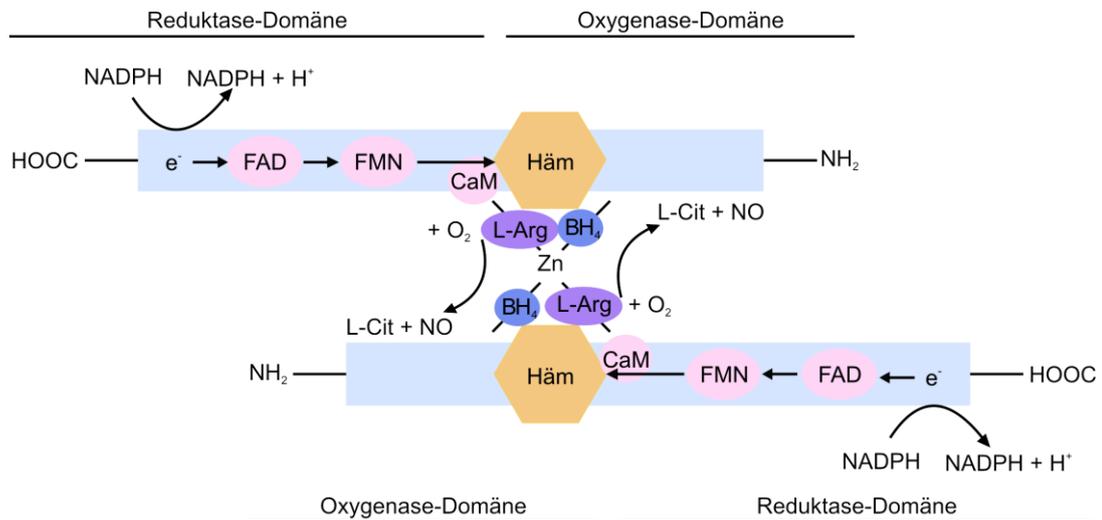


Abb. 4 Aufbau und Funktion der eNOS. Das Enzym eNOS ist als Homodimer aufgebaut. Die Untereinheiten besitzen eine Reduktase- sowie eine Oxygenase-Domäne und sind über ein Zink-Thiolat-Cluster miteinander verbunden. In der Reduktase-Domäne werden von NADPH stammende Elektronen über eine Transportkette auf eine Häm-Gruppe übertragen. Dies ermöglicht die Bindung von O₂ an die Oxygenase-Domäne. Mit Hilfe des Cofaktors BH₄ kann nun L-Arginin zu L-Citrullin und NO umgesetzt werden.

In der Reduktase-Domäne befinden sich Bindestellen für NADPH, FAD, FMN und Calmodulin. Über diese Moleküle werden Elektronen von der Reduktase-Domäne auf die Häm-Gruppe übertragen. Dies ermöglicht die Bindung von O₂ in der Oxygenase-Domäne und die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO ²¹.

Es wurde beschrieben, dass sich die Anzahl der gebundenen BH₄-Moleküle auf die Enzymaktivität auswirkt. Ist kein BH₄-Molekül im eNOS-Dimer gebunden, entsteht statt NO das Superoxid O²⁻, ist ein BH₄-Molekül gebunden, so werden NO und O²⁻ gebildet. Nur wenn zwei BH₄-Moleküle an das eNOS-Dimer binden, wird ausschließlich NO freigesetzt ¹⁶.

1.2.2 Regulation der Enzymaktivität

Wie bei jedem Enzym ist die Aktivität der eNOS abhängig von der Verfügbarkeit des Substrates, der Cofaktoren (vgl. Abb. 4) und der assoziierten Proteine. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Calmodulin (CaM) zu. Für eine effektive NO-Synthese ist die Bindung von Ca²⁺-Calmodulin (Ca²⁺-CaM) an die eNOS erforderlich. Entsprechend besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ca²⁺-Level und der Enzymaktivität. Durch die Bindung von Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin an entsprechende M3- oder β2-Rezeptoren des Endothels wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), zu Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ bindet dann an den entsprechenden Rezeptor im sarkoplasmatischen Retikulum, wodurch vermehrt Ca²⁺ freigesetzt und die NO-Produktion gesteigert wird.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit sind co- und posttranslationale Modifikationen, die zum einen die Interaktion von eNOS mit CaM beeinflussen können und zum anderen die intrazelluläre Lokalisation der eNOS bestimmen. Folgende Modifikationen wurden beschrieben:

a) Acylierung

Der Begriff Acylierung beschreibt die Bindung von Fettsäuren an Aminogruppenreste von Proteinen. Abhängig von der Säure, die gebunden wird, findet man in der Literatur auch die Begriffe Palmitoylierung und Myristoylierung. Ersteres beschreibt die Bindung von Palmitinsäure an einen Cysteinrest, während mit Myristoylierung die Kopplung von Myristinsäure an einen N-terminalen Glycinrest gemeint ist.

Für die eNOS wurden sowohl Palmitoylierung als auch Myristoylierung nachgewiesen. Die Bindung der Myristinsäure an eNOS erfolgt cotranslational, ist irreversibel und hat die Anreicherung von eNOS in cholesterolreichen Arealen der Zellmembran, den Caveolae, zur Folge²². Durch posttranslationale, reversible Palmitoylierung der Cysteinreste 15 und 26 (Nummerierung basiert auf der humanen eNOS-Sequenz) wird eNOS in den Caveolae verankert²³. In den Caveolae sind außerdem Proteine angereichert, die sich abhängig von der Cholesterolkonzentration in die Zellmembran einlagern. Dazu gehört unter anderem das Caveolin-1²⁴. Die Interaktion mit Caveolin-1 inhibiert die eNOS, da die Bindung von CaM verhindert wird²⁵. Die Bindung von CaM an die eNOS ist aber für die Enzymaktivität von entscheidender Bedeutung, da der Elektronentransfer von der Reduktase- zur Oxygenase-Domäne durch die Bindung von Ca²⁺-CaM ermöglicht wird²⁶. Die inhibierende Wirkung von Caveolin-1 kann durch hohe Level an Ca²⁺-CaM aufgehoben werden^{25,27}.

b) Phosphorylierung

Die eNOS verfügt über eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen, die aktivierende oder inhibierende Wirkung haben können. Oft steht die Wirkung im Zusammenhang mit CaM. Eine Schlüsselrolle kommt dabei bestimmten Serin- und Threoninresten zu²⁸. Eine Phosphorylierung am Serinrest 617 beispielsweise scheint die

Calmodulinbindung zu verstärken ²⁹, während eine Phosphorylierung am Serinrest 1177 die Freisetzung von CaM verhindert ^{28, 30}. Ein phosphorylierter Threoninrest 495 hingegen, schwächt die Bindung von CaM an die eNOS ab ³¹.

c) S-Nitrosylierung

Neben Acylierung und Phosphorylierung ist die S-Nitrosylierung, also die Anlagerung von NO an Cysteinreste, ein dritter posttranslationaler Regulationsmechanismus der eNOS-Aktivität. Modifiziert werden die Positionen Cys94 und Cys99, welche in das Zink-Thiolat-Cluster eingebunden sind ³². Das verwendete NO wird wahrscheinlich vom Enzym selbst zur Verfügung gestellt ³². Bedingt durch die Beteiligung der Cysteinreste am Zink-Thiolat-Cluster resultiert die S-Nitrosylierung in einer Inhibition der eNOS.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Mechanismen, wirkt sich auch die durch den Blutfluss verursachte Scherspannung auf die eNOS-Aktivität aus. Der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt ³³. Die Reaktion erfolgt wahrscheinlich in zwei Phasen: Einer Ca²⁺-abhängigen ersten Phase, bei der viel NO produziert wird, folgt eine Ca²⁺-unabhängige zweite Phase, in der die NO-Produktion auf ein gleichbleibendes, reduziertes Level eingestellt wird ^{33, 34, 35}.

In die Regulation der eNOS sind also viele Faktoren involviert, die zum Teil miteinander interagieren. So entsteht ein äußerst komplexes System, das noch nicht umfassend verstanden ist. Ähnlich komplex wie die Enzymregulation ist die Wirkung von NO, auf die im nachfolgenden Abschnitt eingegangen wird.

1.2.3 Wirkung von NO

Im Jahr 1998 erhielten Robert F. Furchgott, Louis Ignarro und F. Murad für ihre Arbeit an die Wirkung von NO auf Endothelzellen den Nobelpreis. 1980 untersuchte Robert F. Furchgott die Funktion des Endothels im Bezug auf die Relaxation glatter Muskelzellen ³⁶. 1988 gelang es L. Ignarro NO als den relaxierenden Faktor zu identifizieren ³⁷. Mittlerweile weiß man, dass sich NO nicht nur auf glatte Muskelzellen, sondern auch auf Leukozyten, Thrombozyten und oxidativen Stress auswirkt. Die Hauptaspekte der Wirkung von NO sind im Folgenden kurz zusammengefasst:

a) Wirkung von NO auf die glatte Muskulatur

Wie unter 1.2.1 beschrieben, wird NO vom Enzym eNOS in den Endothelzellen gebildet. Durch Diffusion gelangt es von dort entweder in die glatten Muskelzellen

oder ins Blut. Im Blutplasma wird NO zu Nitrit (NO_2^-) oxidiert und reagiert dann mit Oxyhämoglobin zu Nitrat (NO_3^-), als welches es dann über den Urin ausgeschieden wird³⁸. Die zuletzt genannte Reaktion läuft ähnlich auch in den Erythrozyten ab. Des Weiteren kann NO dort mit Oxyhämoglobin in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung zu Nitrosylhämoglobin oder S-Nitrosohämoglobin reagieren³⁸. Hierdurch wird verhindert, dass zu viel NO in der Gefäßwand akkumuliert.

In der glatten Muskulatur (vgl. Abb. 5) hingegen wird NO nicht abgebaut, sondern bindet an die lösliche Guanylylcyclase (sGC). Diese wird dadurch aktiviert und synthetisiert vermehrt zyklisches GMP (cGMP). cGMP wiederum steuert die Proteinkinase G (PKG). Diese Kinase ist in eine Reihe von Prozessen involviert, durch die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesenkt, eine Relaxation der glatten Muskulatur und damit eine Vasodilatation eingeleitet wird.

Zum einen aktiviert die PKG K^+ -Ionenkanäle, welche sich daraufhin öffnen und einen gradientenabhängigen Ausstrom von K^+ -Ionen ermöglichen³⁹. Daraus resultiert eine Hyperpolarisation der Zelle, die wiederum den Einstrom von Ca^{2+} durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle verringert⁴⁰. Zum zweiten wird das IP_3 -Rezeptor-assoziierte Molekül (*IP₃ receptor associated cGMP dependent kinase substrate*, IRAG) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von der PKG phosphoryliert⁴¹. Dies führt zur Schließung von Ca^{2+} -Ionenkanälen und einer entsprechend verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Zusätzlich phosphoryliert die PKG Phospholamban. Dadurch nimmt die Interaktion von Phospholamban mit der SERCA (*sarcoplasmatic reticulum ATPase*) und entsprechend auch ihre Inhibition ab⁴². Als Folge steigt die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen ins SR⁴³. Ein vierter PKG-abhängiger Mechanismus ist die Aktivierung der Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase (*myosin light chain phosphatase*, MLCP). Diese dephosphoryliert die leichte Kette des Myosins, wodurch die Aktin-Myosin-Interaktion gehemmt wird und eine Relaxation der glatten Muskulatur eintritt.

NO beeinflusst aber nicht nur die Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, sondern auch die DNA-Synthese und damit die Proliferation glatter Muskelzellen⁴⁴. Da diese unter anderem bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques von Bedeutung ist (vgl. 1.1.3) kann NO in diesem Zusammenhang eine vasoprotektive Funktion zugesprochen werden.

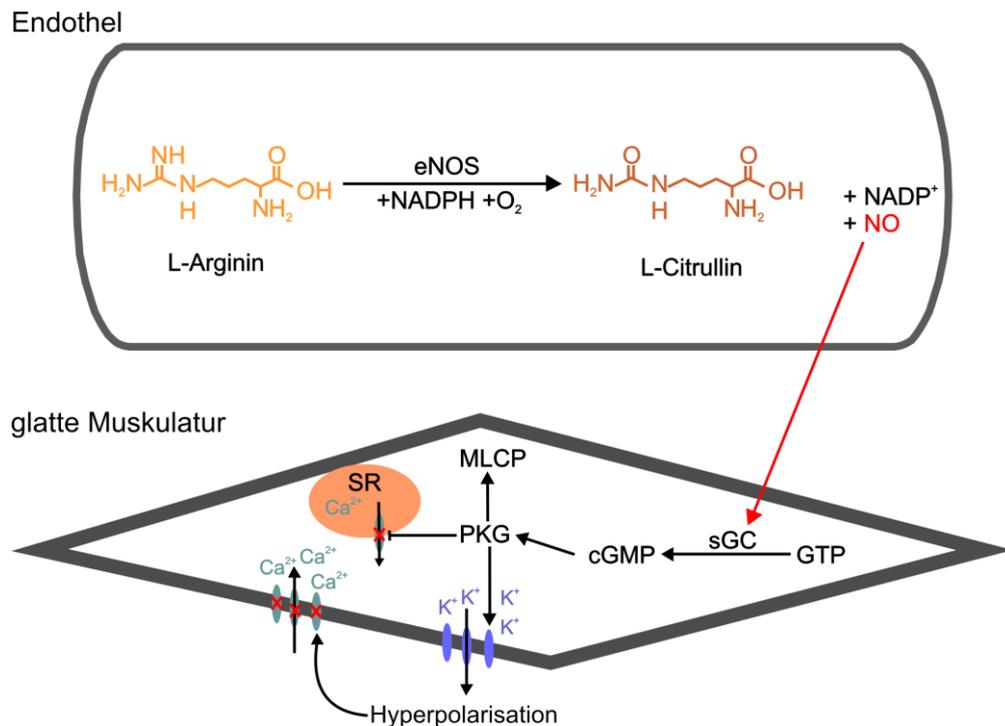


Abb. 5 Wirkung von NO auf die glatte Gefäßmuskulatur. In den Endothelzellen produziertes NO gelangt durch Diffusion in die glatten Muskelzellen und aktiviert dort die sGC. Über cGMP als Botenmolekül wird die PKG aktiviert. Durch Phosphorylierung von K⁺-Kanälen ermöglicht sie einen K⁺-Ausstrom, der in einer Hyperpolarisation der Zelle resultiert. Als Folge wird der Einstrom von Ca²⁺-Ionen durch die L-Typ-Ca²⁺-Kanäle vermindert. Des Weiteren inhibiert die PKG durch Phosphorylierung eines IP₃-Rezeptor-assoziierten Moleküls den Ausstrom von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und hemmt durch Aktivierung der Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase die Interaktion von Aktin und Myosin. Alle Effekte führen zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

b) Wirkung von NO auf Leukozyten und Thrombozyten

Neben der glatten Gefäßmuskulatur wirkt NO auch auf Thrombozyten und Leukozyten. In Gegenwart von NO wird zum einen die Thrombozytenaggregation inhibiert^{45, 46}. Ursache ist möglicherweise auch hier ein Anstieg des cGMP-Levels, durch den, wie in den glatten Muskelzellen, die PKG aktiviert wird. Über Phosphorylierung von Phospholamban wird die SERCA aktiviert und der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel sinkt⁴⁷. Wie dieser Mechanismus letztendlich die Aggregation von Thrombozyten verhindert, ist noch nicht vollständig geklärt.

Zum anderen stört NO die Leukozytenadhäsion. Damit Leukozyten an das Endothel binden können, müssen bestimmte Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 exprimiert werden⁴⁸. NO wirkt sich nachweislich auf die Expression von VCAM-1 aus: Eine

Inhibition der NO-Synthese steigert die Adhäsion von Leukozyten ⁴⁹ während die Verwendung eines NO-Donors die Adhäsion verringert ⁵⁰.

Auch in diesem Zusammenhang wird die vasoprotektive Funktion des NO deutlich: Die Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe ist ein entscheidender Schritt im Entstehungsprozess eines atherosklerotischen Plaques. Die fortschreitende Gefäßverengung kann durch die Aggregation von Thrombozyten und der daraus resultierenden Bildung eines Thrombus maßgeblich verstärkt werden. Durch NO werden beide Prozesse abgeschwächt.

c) NO und oxidativer Stress

Nicht so eindeutig wie die Wirkung auf glatte Muskelzellen und Blutzellen ist die Beteiligung von NO am oxidativen Stress. Diese basiert hauptsächlich auf dem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und hat unter anderem die Proliferation glatter Muskelzellen und die Aktivierung von Matrix-Metallproteasen (MMP) zur Folge ⁵¹. Beide Prozesse begünstigen die Entstehung atherosklerotischer Plaques. Schlüsselenzyme für die Entstehung von ROS sind unter anderem die NADPH-Oxidase, die Superoxid-Dismutase in ihrer membranständigen (SOD) oder extrazellulären (eSOD) Form und die eNOS. Die SOD katalysiert die Reaktion von O^{2-} und H^+ zu H_2O_2 und O_2 , reguliert also das O^{2-} -Level. Bei oxidativem Stress liegt durch eine verstärkte Aktivität der NADPH-Oxidase mehr O^{2-} vor ³, welches nicht vollständig von der Superoxid-Dismutase abgebaut werden kann, und mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagiert ⁵². $ONOO^-$ wiederum verursacht zum einen DNA-Schäden und oxidiert zum anderen BH_4 , den Cofaktor der eNOS (vgl. 1.2.1), sowie das Zink-Thiolat-Cluster ^{53,54}. Dadurch kommt es in der eNOS-Reaktion zu einer Abkoppelung der O_2 -Reduktion von der NO-Produktion, sodass statt NO das Superoxid O^{2-} freigesetzt und der oxidative Stress verstärkt wird ⁵⁵. Andererseits aktiviert NO sowohl die Häm-Oxygenase-1 (HO-1) als auch die extrazelluläre Superoxid-Dismutase in der glatten Gefäßmuskulatur ^{56,57}. HO-1 setzt Häm zu Biliverdin um, welches dann von der Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert wird. Dabei entstehen Kohlenstoffmonoxid (CO) und Fe^{2+} ⁵⁸. Bilirubin wirkt zum einen als Radikalfänger ⁵⁹ und inhibiert zum anderen die Superoxid-Dismutase ⁶⁰, während CO die sGC aktiviert ⁶¹. Fe^{2+} wird an Ferritin gebunden, sodass letztendlich das intrazelluläre Ferritin-Level ansteigt. Für Ferritin wurden ebenfalls antioxidative Effekte beschrieben ^{56,62}. Die eSOD ist eine Form der drei in Säugetieren

vorkommenden SOD-Formen und ist unter anderem in der extrazellulären Matrix der Gefäßwand lokalisiert ist. Wie die anderen SOD-Formen setzt die eSOD ebenfalls O^{2-} um und vermindert damit den oxidativen Stress⁵⁷.

Obwohl NO, indem es mit O^{2-} zu $ONOO^-$ reagiert, den oxidativen Stress unterstützen kann, überwiegen die durch Aktivierung der HO-1 und eSOD hervorgerufenen antioxidativen Effekte, sodass NO auch hier eine eher vasoprotektive Funktion bescheinigt werden kann.

Zusammengefasst, verfügt NO über ein großes vasoprotektives Potential und ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion notwendig. Die Grundvoraussetzung für eine normale NO-Produktion ist ein intaktes Endothel. Im Rahmen von Atherosklerose beziehungsweise bei der Entfernung atherosklerotischer Plaques wird das Endothel häufig geschädigt (vgl. 1.1.3) und die NO-Produktion beeinträchtigt. Daher wäre in Bezug auf Atherosklerose die eNOS – wie oben schon erwähnt – ein guter Ansatzpunkt für Gen- und/oder Zellersatztherapie.

1.3 Modulatoren des Gefäßsystems – Protein-Tyrosin-Phosphatase

SHP2

Im vorherigen Abschnitt wurde das Enzym eNOS, seine Bedeutung für die Gefäßfunktion sowie die Möglichkeit einer eNOS-basierten Therapie für Atherosklerose beschrieben. Neben der eNOS existieren allerdings noch weitere Faktoren und Enzyme, die das Gefäßsystem beeinflussen. Auf einen davon – die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 soll nun eingegangen werden.

Die Enzymfamilie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) wird generell in mehrere Untergruppen geteilt. Eine davon ist die der „klassischen“ PTPs. Diese besitzen eine etwa 240 Aminosäuren lange PTP-Domäne, die gezielt Phosphotyrosinbindungen spaltet und von regulatorischen Sequenzen umgeben ist. Sie werden unterteilt in Transmembran-, rezeptorähnliche und Nicht-Transmembran-PTPs. Zur letzten Gruppe gehören auch Enzyme, die Src-Homologie-2-Domänen (SH 2) enthalten. Eine davon ist die Src-Homologie-Domänen-Protein-Tyrosin-Phosphatase 2 (SHP2), welche vom Gen *PTPN11* codiert wird^{63,64}. SHP2 besitzt zwei hintereinander geschaltete N-terminale SH-Domänen, daran anschließend eine PTP-Domäne und zwei C-terminale Tyrosinreste.

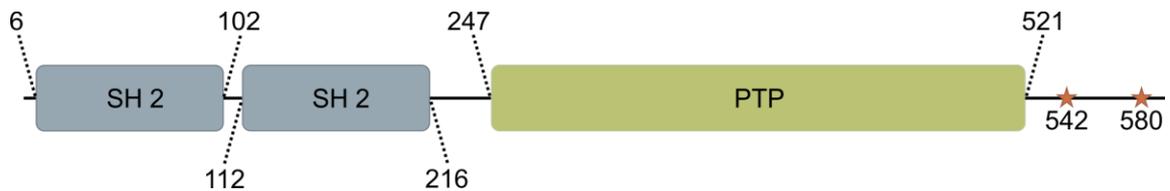


Abb. 6 Schematischer Aufbau von SHP2 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 besitzt zwei N-terminale SH2-Domänen (Aminosäuren 6-102 und 112-216), eine PTP-Domäne (Aminosäuren 247-521) und zwei C-terminale Tyrosinreste (Aminosäuren 442 beziehungsweise 580, markiert durch Sterne).

Für SHP2 wurde vielfach eine onkogene Wirkung beschrieben. Es wurden Beteiligungen am Noonan-Syndrom, unterschiedlichen Leukämieformen sowie die Assoziation mit Lungen- und Dickdarmtumoren, Neuroblastomen und Melanomen beschrieben. Eine Verbindung zu Magenkarzinomen ausgelöst durch das Bakterium *Helicobacter pylori* wird vermutet. Die Ursache liegt vermutlich in mutierten SHP2-Formen, die inhibierende Komponenten von wachstumsstimulierenden Signalwegen dephosphorylieren. Beteiligt sein könnten der ERK- und der Akt-Signalweg⁶⁴. Außerdem könnte die Tatsache, dass SHP2 in die DNA-Replikation und -Reparatur involviert ist, von Bedeutung sein⁶⁵. Möglicherweise sind die Reparaturfähigkeiten der mutierten Varianten eingeschränkt.

Aktuell richtet sich das Interesse immer mehr auf die Funktion, die SHP2 bei der Angiogenese einnimmt. Im Jahr 2007 konnte von Mannell et al. gezeigt werden, dass eine SHP2-Inhibition *in vitro* und *in vivo* eine verminderte Angiogenese nach sich zieht. Weiter beschreiben sie, nach Stimulation mit FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), an der wahrscheinlich SHP2 beteiligt ist. Durch die PI3K werden anschließend sowohl der Akt als auch der MAPK-Signalweg aktiviert. Dies resultiert in gesteigertem Wachstum und einer höheren Überlebensrate von Endothelzellen, wodurch die Bildung neuer Gefäße begünstigt wird.⁶⁶ Außerdem ist SHP2 in weitere Signalwege involviert, die die Angiogenese betreffen. Es interagiert in Endothelzellen unter anderem mit dem VEGF-Rezeptor 2 (*vascular endothelial growth factor*) und dem Angiotensin-Rezeptor Tie2^{67,68}. Des Weiteren erhält SHP2 die Integrität der endothelialen Barriere aufrecht. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zieht eine SHP2-Inhibition eine gesteigerte Permeabilität des Endothels nach sich, da die Stabilität der *Adherens junctions* – genauer gesagt die Interaktion von VE-Cadherin und β -Catenin – beeinträchtigt ist^{69,70}. In diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung ist die Assoziation von SHP2 und PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*). PECAM-1 ist an der interzellulären

Verbindung des Endothels ebenso beteiligt wie an der Angiogenese. Die Funktion ist abhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung und entsprechend von SHP2. Die Bindung an SHP2 und eine Kolokalisation in der Zellmembran tritt unter anderem als Antwort auf eine H₂O₂-Exposition – also im Rahmen von oxidativem Stress – auf ⁷¹.

Die bis hier beschriebenen Interaktionen von SHP2 beschränken sich hauptsächlich auf das Endothel. Aber auch in der glatten Muskulatur ist SHP2 in Prozesse involviert, die für die Gefäßfunktion wichtig sind. In Rattenaorten wird beispielsweise in der Neointima, welche sich oft nach Gefäßoperationen durch Proliferation und Migration glatter Muskelzellen bildet, eine lokal erhöhte SHP2-Expression beobachtet ⁷². Grund hierfür ist wahrscheinlich die Interaktion von SHP2 mit dem PDGF-Rezeptor (*platelet derived growth factor*), der in die Proliferation von glatten Muskelzellen involviert ist ^{73,74}.

Zusammenfassend betrachtet, ist SHP2 also ein vielversprechender gentherapeutischer Ansatzpunkt, um die Angiogenese (beispielsweise in Tumoren) zu modulieren oder die Bildung von Restenosen nach einer Operation zu verringern. Um solche Gentherapien für SHP2 oder auch die eNOS (vgl. 1.2) zu realisieren, ist ein erfolgreicher Transgenteransfer erforderlich. Hierfür eignen sich insbesondere virale Vektoren, auf die im nachfolgenden Abschnitt eingegangen wird.

1.4 Virale Vektoren in der Gentherapie

Innerhalb der letzten Jahre hat die Gentherapie zur Behandlung von Krankheiten immer mehr an Bedeutung gewonnen: Starteten im Zeitraum von 1990-1999 483 klinische Studien zu unterschiedlichen Gentherapien, so waren es von 2000-2009 schon 1008. (Quelle: Datenbank des „Journal of Gene Medicine“). Bis zum Jahr 2014 befanden sich 59,2 % in Phase I und nur 3,6 % in Phase III, sodass zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussage darüber gemacht werden kann, wie effektiv diese Therapien wirklich sind und ob sie im Menschen tatsächlich umgesetzt werden können. Der entscheidende Faktor für eine erfolgreiche Gentherapie ist das effiziente Einbringen des gewünschten Transgens. Generell können hierbei zwei Vorgehensweisen unterschieden werden: der nicht-virale und der virale Genteransfer. Der Vorteil der nicht-viralen Verfahren wie die Injektion nackter Plasmid-DNA, Elektroporation oder Lipofektion ist eine geringe Immunogenität, die Nachteile sind oftmals hohe zytotoxische Effekte, eine geringe Effizienz und eine transiente Genexpression ⁷⁵. Daher wurde für viele Studien auf den viralen Genteransfer zurückgegriffen, für den mittlerweile unterschiedliche virale Vektoren etabliert sind. Ihre

Vor- und Nachteile sind im Folgenden kurz aufgeführt.

- a) Adenovirale Vektoren (AdV) nehmen bis zu 8 kbp heterologe DNA auf, lassen sich mit hohen Titern produzieren und transduzieren sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen. Das virale Genom liegt nach der Transduktion episomal vor, die Transgenexpression ist also transient⁷⁶. AdVs können eine starke Immunantwort hervorrufen⁷⁷.
- b) Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV) nehmen bis zu 5 kbp heterologe DNA auf und transduzieren ruhende sowie proliferierende Zellen. Zur erfolgreichen Transduktion benötigen sie einen Helfervirus oder ein Helferplasmid⁷⁶. Nach der Transduktion liegt das virale Genom entweder episomal vor oder ist zufällig ins Hostgenom integriert⁷⁸. Eine Sequenzhomologie mit dem humanen Chromosom 19q13.4 bietet die Option auf eine ortsspezifische Integration⁷⁹. Auf Grund ihres breiten Tropismus können sie viele unterschiedliche Gewebetypen transduzieren. Zusätzlich wirkt sich die Auswahl des Serotypes auf die Transduktionseffizienz in unterschiedlichen Geweben aus. So wurde für den Serotyp 9 (AAV9) eine gute Transduktionseffizienz in Kardiomyozyten beschrieben⁸⁰, während AAV1, 5 und 6 Endothelzellen transduzieren^{81, 82, 83}. Im Zielgewebe kann die Expression des Transgens dann über geeignete Promotoren gesteuert werden.
- c) Retrovirale Vektoren (RV) nehmen bis zu 8 kbp heterologe DNA auf, lassen sich mit hohen Titern produzieren und sind nur schwach immunogen. Sie transduzieren ausschließlich ruhende Zellen. Das virale Genom wird dabei zufällig ins Wirtsgenom integriert, wodurch Insertionsmutagenesen auftreten können. Diese sind oft mit der Aktivierung von Protoonkogenen, die unter Einfluss des Enhancers in der LTR-Region (*long terminal repeat*) geraten, assoziiert⁷⁶.
- d) Lentivirale Vektoren (LV) bilden eine Untergruppe der RVs mit vergleichbaren Eigenschaften hinsichtlich der Aufnahmekapazität für heterologe DNA, des hohen Titers und der Immunogenität. Im Gegensatz zu RVs können LVs sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen transduzieren, da sie ihr Genom aktiv in den Kern der Wirtszelle transportieren^{76, 79}. Das Risiko von Insertionsmutagenesen ist auch bei LVs vorhanden, wird allerdings durch unterbrochene LTR-Sequenzen vermindert⁷⁶.

Für eine langfristig angelegte Gentherapie insbesondere mit großen Transgenen, wie beispielsweise eNOS, eignen sich also RVs und LVs am besten, da sie eine stabile Transgenexpression garantieren. Im Vergleich zu RVs haben LVs den Vorteil, dass sie

auch proliferierende Zellen transduzieren können. Da aus diesen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit LVs gearbeitet wurde, sollen sie unter 1.5 näher beschrieben werden.

1.5 Lentiviren und lentivirale Vektoren

Die Gattung der Lentiviren gehört innerhalb der Familie der Retroviren (*Retroviridae*) zur Unterfamilie der Orthoretroviren. Retroviren sind behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom (ssRNA) und einem Durchmesser von 80-120 nm⁸⁴. Zwei Kopien der ssRNA, welche mit Nukleokapsidproteinen assoziiert sind, befinden sich zusammen mit Enzymen (reverse Transkriptase, Integrase, Protease) in einer konischen Proteinhülle, dem Kapsid. Eine Schicht von Matrixproteinen umgibt das Kapsid und interagiert mit der Virushülle, die aus einer Lipiddoppelschicht durchsetzt mit viralen Hüllproteinen besteht (vgl. Abb. 7).

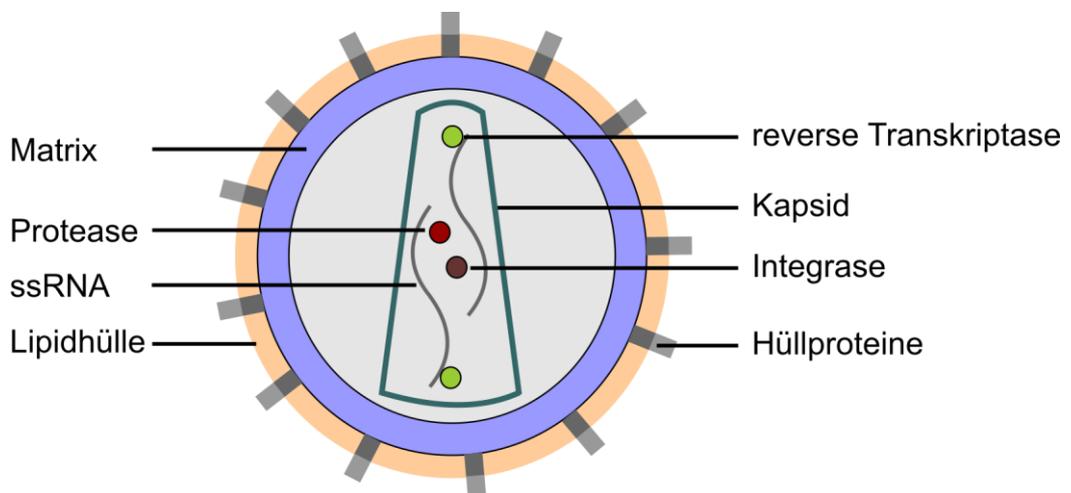


Abb. 7 Schematischer Aufbau eines Lentivirus. Die äußere Lipidhülle eines Lentivirus ist mit virenspezifischen Hüllproteinen durchsetzt und interagiert mit einer innen liegenden Proteinmatrix. An diese grenzt das Kapsid an, welches das Genom und wichtige lentivirale Enzyme umschließt. Nicht dargestellt sind die Nukleokapsidproteine, die mit der ssRNA interagieren.

Im Bereich der Gentechnik sind Lentiviren als Genvektoren von besonderem Interesse, da sie auf Grund ihres Replikationszyklus die stabile Transduktion ruhender und proliferierender Zellen erlauben.

1.5.1 Genom und Replikationszyklus eines Lentivirus

Das lentivirale Genom enthält unter anderem die drei Gene *gag*, *pol* und *env*. Matrix-, Kapsid und Nucleokapsidproteine werden vom *gag*-Gen codiert; reverse Transkriptase, Integrase und Protease vom *pol*-Gen. Die Codierung der Hüllproteine übernimmt das *env*-Gen. Zusätzlich besitzen Lentiviren noch eine Reihe regulatorische, sogenannte akzessorische, Gene, die je nach Lentivirus variieren können. Dazu gehören beim lentiviralen HI-Virus (HIV, humanes Immundefizienzvirus), auf dem die meisten lentiviralen Vektorsysteme basieren (vgl. 1.5.2), die Gene *tat* und *rev*. Während Tat (*transactivator of transcription*) die Transkriptionseffizienz verbessert, steigert Rev (*regulator of expression of virion proteins*) die Expression. Zwei LTRs enthalten Informationen zur Steuerung der Genexpression, reversen Transkription und Integration in das Zielgenom. Weitere regulatorische Elemente sind der Polypurintrakt (PPT) als Startpunkt für die reverse Transkription und das Verpackungssignal Ψ ⁸⁵.

Der Replikationszyklus eines Retrovirus beginnt mit der Bindung der Hüllproteine an ihren Rezeptor auf der Wirtszelle und anschließender Fusion von Virushülle und Zellmembran. Das Kapsid wird ins Zytoplasma freigesetzt und in seinem Inneren wird die ssRNA durch die reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Bei den meisten Retroviren gelangt die DNA während der Zellteilung in den Zellkern. Bei Lentiviren wird sie aktiv transportiert, sodass auch ruhende Zellen infiziert werden können. Im Zellkern wird die virale DNA mit Hilfe der Integrase in die Wirts-DNA eingebaut – diesen Status bezeichnet man als „Provirus“ - und mit Hilfe zellulärer Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II transkribiert. Die gespleißten mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und die viralen Proteine translatiert. Ungespleißte virale RNA verfügt noch über das Verpackungssignal Ψ , wird ebenfalls ins Zytoplasma transportiert und an der Zellmembran zusammen mit Vorläuferproteinen in virale Partikel, sogenannte Virionen, verpackt. Innerhalb der Virionen spaltet die virale Protease dann die Vorläuferproteine, sodass funktionstüchtige virale Proteine entstehen. Erst wenn das Virion den typischen retroviralen Aufbau besitzt, ist die Reifung abgeschlossen und der Virus infektiös.

1.5.2 Lentiviren als Vektoren

Auf Grund ihres Replikationszyklus bieten Lentiviren zwei Aspekte, die sie als Genvektoren besonders interessant machen: 1) Infektion von ruhenden und proliferierenden Zellen, 2) Stabile Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom.

Die meisten lentiviralen Vektoren basieren auf dem murinen Leukämievirus (MLV) oder dem HI-Virus. Prinzipiell werden lentivirale Partikel durch Co-Transfektion von humanen, embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK) mit drei unterschiedlichen Plasmiden – Verpackung-, Transgtransfer- und Hüllplasmid – hergestellt. Das Verpackungsplasmid beinhaltet die lentiviralen Gene *gag*, *pol* und *rev*, welche zur Verpackung der viralen RNA benötigt werden. Aus dem Transgtransferplasmid wurden alle lentiviralen Gene, die für Proteine codieren, entfernt. Noch vorhanden sind die 5'- und 3'-LTRs, das Verpackungssignal Ψ und regulatorische Sequenzen (z. B. für die Integration). Diese flankieren das nachträglich eingebrachte heterologe Transgen mit seinem Promotor. Das dritte Plasmid, das Hüllplasmid, enthält entweder das ursprüngliche Gen *env* oder ein Gen, das für ein alternatives Hüllprotein codiert.

Verschiedene Modifikationen am Transgtransferplasmid haben die Arbeit mit lentiviralen Vektoren sicherer gemacht. Eine Deletion in der U3-Region des 3'-LTRs, die bei der reversen Transkription auf die 5'-LTR der viralen DNA übertragen wird, inhibiert die Transkription des LTRs. Der Virus inaktiviert sich folglich nach Integration seiner DNA selbst, da er nicht vollständig replikationsfähig ist. Solche lentiviralen Vektoren werden als SIN (*self inactivating*) bezeichnet⁸⁶. In einem weiteren Schritt ist es gelungen, das *tat*-Gen durch einen konstitutiv aktiven Promotor zu ersetzen, ohne die Transkriptionseffizienz zu beeinträchtigen⁸⁷. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit, dass durch homologe Rekombination ein voll funktionierender Virus entsteht, verringert.

Zusätzlich zu den Modifikationen des Transgtransferplasmids wurden auch Änderungen am Verpackungsplasmid durchgeführt. Basierend auf diesen Änderungen, unterscheidet man drei Generationen von lentiviralen Vektoren. In der ersten Generation enthielt das HIV-basierte Verpackungsplasmid die Gene *gag*, *pol*, *tat* und *rev* sowie die akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*, welche unter anderem die Synthese und Prozessierung der viralen RNA regulieren sowie für Virulenzfaktoren codieren. Da diese akzessorischen Gene sich nicht auf die Transduktionseffizienz auswirken, wurden sie in der zweiten Generation der Verpackungsplasmide ohne negative Auswirkungen entfernt⁸⁸. Dadurch wurde sichergestellt, dass, sollte zufällig durch homologe Rekombination ein replikationsfähiger Virus entstehen, dieser vermindert infektiös wäre. Seit dem Übergang von der zweiten zur dritten Generation der lentiviralen Vektoren liegen zwei

Verpackungsplasmide vor. Eines enthält die Gene *gag* und *pol* und ein weiteres das Gen *rev*⁸⁷.

Ein Nachteil der HIV-basierten lentiviralen Konstrukte ist der begrenzte Tropismus, für den die Hüllproteine verantwortlich sind. Um den Rahmen der potentiellen Zielzellen zu erweitern, werden oft andere Hüllproteine verwendet. Man nennt diesen Prozess Pseudotypisierung. Oftmals genutzt werden die Hüllproteine des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV). Diese Glykoproteine interagieren mit einem ubiquitären Rezeptor und erlauben so die Infektion unterschiedlichster Zelltypen⁸⁹.

Durch die oben beschriebenen Anpassungen ist es gelungen, den Einsatz von lentiviralen Vektoren so sicher und effektiv zu gestalten, dass sie vermehrt in der Gentherapie eingesetzt werden. In Tiermodellen wurden beispielsweise erfolgreich lentivirale Therapieansätze für β -Thalassämie und die Fanconi-Anämie getestet^{90, 91}. Erste klinische Studien mit Menschen befassen sich unter anderem mit lentiviral basierten Therapien für Parkinson, das Netherton-Syndrom und das erworbene Immundefizienzsyndrom (*acquired immunodeficiency syndrome, AIDS*)^{92, 93, 94}. Auch im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen wird an viralen Gentherapien geforscht. Hier werden oft gewebespezifische Serotypen von adeno-assoziierte Virusvektoren eingesetzt, um eine hohe Transduktionsrate zu gewährleisten⁹⁵. Im Vergleich zu lentiviralen Vektoren haben diese den Nachteil, dass die Transgenexpression meistens nur transient ist (vgl. 1.4) und in einigen Patienten durch Antikörper inhibiert werden kann^{96, 97}. Der limitierende Faktor beim Einsatz lentiviraler Vektoren ist hingegen, sie in einer ausreichend hohen Konzentration im Zielgewebe anzureichern⁹⁸. Eine Möglichkeit, lentivirale Vektoren lokal zu konzentrieren, besteht darin, sie mit magnetischen Nanopartikeln (MNPs) zu kombinieren. Auf die unterschiedlichen MNP-Typen, ihren Aufbau, ihre magnetischen Eigenschaften und ihre Einsatzgebiete wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

1.6 Magnetische Nanopartikel

MNPs setzen sich aus einem magnetischen Kern und einer Hüllschicht zusammen. Ihr Durchmesser liegt im Nanometerbereich. Der magnetische Kern besteht meistens aus Magnetit- oder Maghemit-Partikeln (F_3O_4 oder $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Die umgebende Beschichtung dient zum einen der Stabilisierung der magnetischen Kernpartikel und ermöglicht zum anderen Modifikationen der MNP-Eigenschaften. So können beispielsweise unterschiedliche Hüllpolymere die Biokompatibilität der MNPs beeinflussen und die

Assoziation mit Antikörper erlaubt die gezielte Bindung an Proteine ⁹⁹. Als Beschichtung werden unter anderem organische Moleküle wie Dextran ¹⁰⁰, Polyethylenglykol (PEG) ¹⁰¹ und Polyethylenimin (PEI) ¹⁰² oder anorganische Verbindungen wie Gold ¹⁰³ oder Siliziumoxid ¹⁰⁴ verwendet (vgl. Abb. 8 A, B). Mehrere MNPs können zu Strukturen wie Nanosphären (engl.: *nanospheres*, vgl. Abb. 8 C), Nanokapseln (engl.: *nanocapsules*, vgl. Abb. 8 D) oder Microblasen (engl.: *microbubble*, vgl. Abb. 8 E) zusammengefasst werden. Dazu werden sie entweder in eine feste Polymermatrix eingebettet ^{99,105}, in wässriger/ölicher Suspension von einer Polymerhülle umschlossen ^{99,106} oder in eine Lipidhülle integriert ¹⁰⁷.

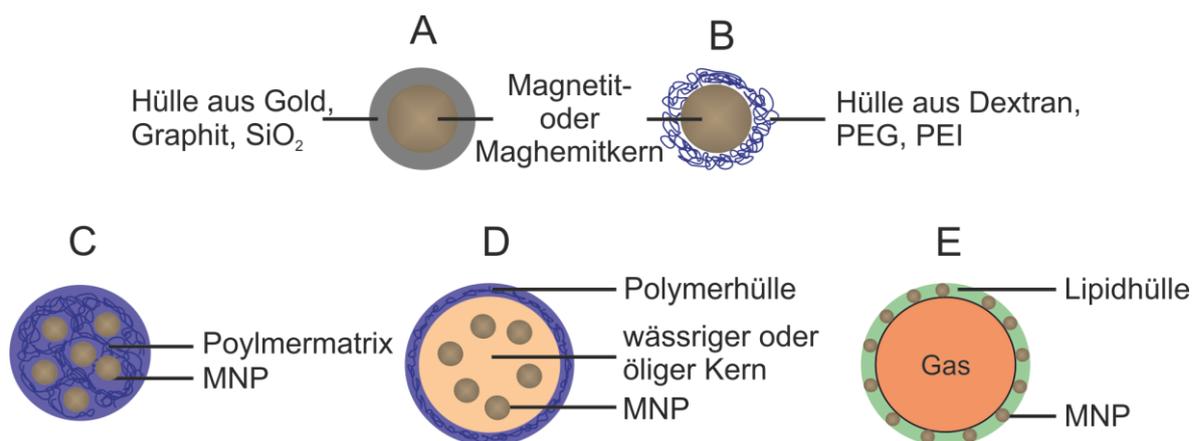


Abb. 8 Aufbau magnetischer Nanopartikel. MNPs bestehen aus einem magnetischen Magnetit- oder Maghemitkern und können mit anorganischen Stoffen (A) wie Gold, Graphit und Siliziumdioxid (SiO_2) oder mit organischen Polymeren (B) wie Dextran, Polyethylenglykol (PEG) oder Polyethylenimin (PEI) beschichtet sein. (C) Nanosphäre (engl.: *nanosphere*): Einbettung mehrerer MNPs in einer festen Polymermatrix. (D) Nanokapsel (engl.: *nanocapsule*): Wässrige oder ölige MNP-Suspension umgeben von einer Polymerhülle. (E) Gasgefüllte Microblase (engl.: *microbubble*) mit integrierten MNPs in der Lipidhülle.

1.6.1 Magnetismus und magnetische Eigenschaften von MNPs

Die bekannteste Form des Magnetismus ist der Ferromagnetismus. Ferromagnetische Stoffe wie Eisen, Kobalt und Nickel besitzen ein eigenes magnetisches Moment. Sie zeigen also bei niedrigen Temperaturen auch ohne externes Magnetfeld eine spontane Magnetisierung. Die Ursache hierfür ist die parallele Ausrichtung der Elektronenspins basierend auf Wechselwirkungen der Spins untereinander. Bei hohen Temperaturen überwiegt die thermische Energie der Elektronen gegenüber diesen Wechselwirkungen und die spontane Magnetisierung geht verloren. Ferromagneten verhalten sich nun wie

Paramagneten (siehe unten). Die Temperaturgrenze, die den Übergang markiert, ist materialspezifisch und wird als Curie-Temperatur bezeichnet. Zusätzlich zu ihrem eigenen magnetischen Moment lassen sich Ferromagneten von einem externen Magnetfeld magnetisieren. Das induzierte innere Magnetfeld ist dem angelegten äußeren Magnetfeld gleichgerichtet.

Paramagneten wie beispielsweise die Gruppe der Alkalimetalle zeigen im Gegensatz zu ferromagnetischen Stoffen unterhalb der Curie-Temperatur ohne externes Magnetfeld keine Magnetisierung. Wird aber ein externes Magnetfeld angelegt, induziert dieses auch in Paramagneten ein internes Magnetfeld. Dieses ist dem externen Feld gleichgerichtet. Im Gegensatz zu Ferromagneten ist die Magnetisierung von Paramagneten schwächer und verschwindet nach Entfernen des externen Feldes wieder.

Auch diamagnetische Stoffe wie Bismut und Kohlenstoff magnetisieren sich in einem externen Magnetfeld. Allerdings ist hier das interne Magnetfeld dem äußeren Magnetfeld entgegengerichtet. Daher haben Diamagneten die Eigenschaft aus einem inhomogenen Magnetfeld herauszuwandern, werden also abgestoßen, während Ferro- und Paramagneten angezogen werden.

Eine weitere Form des Magnetismus ist der Superparamagnetismus. Reduziert man die Größe eines ferromagnetischen Stoffes unterhalb eines kritischen Punktes, so verhält er sich superparamagnetisch, das heißt er weist unterhalb der Curie-Temperatur ohne externes Magnetfeld keine eigene Magnetisierung mehr auf, da die einzelnen magnetischen Domänen voneinander separiert wurden und nicht mehr miteinander interagieren können¹⁰⁸. Beim Anlegen eines externen magnetischen Feldes magnetisieren sich superparamagnetische Stoffe, verlieren diese Magnetisierung nach Entfernen des Feldes aber wieder. Sie verhalten sich also wie Paramagneten, allerdings mit dem Unterschied, dass das induzierte Magnetfeld stärker ist⁹⁹.

Ob MNPs nun ferro-, para- oder diamagnetisch sind, lässt sich anhand von zwei Größen entscheiden: der magnetischen Induktion B und dem magnetischen Feld H . Für die beiden Größen besteht folgender Zusammenhang: $B = \mu \times H$. Hierbei ist μ die magnetische Permeabilität eines Partikels, welche angibt wie durchlässig ein Material für ein Magnetfeld ist. Aus ihr lässt sich die magnetische Suszeptibilität χ berechnen. Es gilt: $\chi = \mu - 1$. Für Ferromagneten ist $\mu \gg 1$ ($\chi \gg 0$). Für Paramagneten gilt $\mu > 1$ ($\chi > 0$) und für Diamagneten $\mu < 1$ ($\chi < 0$)⁹⁹. Superparamagnetische MNPs entsprechen, wie oben schon erwähnt, sehr kleinen Teilchen ferromagnetischer Stoffe.

1.6.2 Einsatzgebiete von MNPs

Ihre magnetischen Eigenschaften und die Möglichkeit, die Hüllschicht zu modifizieren, sind der Grund, warum MNPs in vielen unterschiedlichen Bereichen eingesetzt werden.

Im Labor werden MNPs standardmäßig zur Aufreinigung von Proteinen ¹⁰⁹, DNA ¹¹⁰, eukaryotischen ¹¹¹ und prokaryotischen Zellen ¹¹² genutzt. In der Medizin sind zwei wichtige Anwendungsgebiete die Magnetresonanztomographie (MRT, engl.: *magnetic resonance imaging, MRI*), wo unter anderem superparamagnetische Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel (zum Beispiels Resovist® ¹¹³) eingesetzt werden ¹¹⁴, und die Krebstherapie. So konnten im Mausmodel Tumore mit MNP-gekoppelten Chemotherapeutika wie Gemcitabin oder Epirubicin durch Applikation eines lokalen magnetischen Feldes behandelt werden ^{115, 116}. Eine noch genauere Lokalisierung kann erreicht werden, wenn die MNPs mit Substanzen konjugiert werden, die sich gegen tumorspezifische Oberflächenmoleküle richten ¹¹⁷. Eine weitere Möglichkeit der Krebstherapie stellt die MNP-basierte Hyperthermie dar. Hierbei werden in Tumorgewebe angereicherte MNPs einem magnetischen Wechselfeld aufgesetzt. Dadurch heizen sie sich auf und geben die Wärme an das umliegende Gewebe ab. Schon bei einer Temperatur zwischen 42 und 45 °C werden die Tumorzellen irreversibel geschädigt ¹¹⁸. In experimentellen Ansätzen und ersten klinischen Studien wird mittlerweile die Hyperthermie auch in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie eingesetzt. Ein weiterer Forschungsansatz beschäftigt sich damit, ob mit chemotherapeutischen Substanzen gekoppelte MNPs für die hyperthermische Therapie eingesetzt werden können ¹¹⁹. Generell werden solche Nanopartikel, an die beispielsweise Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe oder Radionuklide gebunden sind und die so mehr als eine Aufgabe erfüllen können, als multifunktionale beziehungsweise multimodale Nanopartikel bezeichnet ¹²⁰.

In den letzten zehn Jahren haben MNPs außerdem auf dem Gebiet der gentechnischen Veränderungen von Zellen wesentlich an Bedeutung gewonnen. Es gibt hauptsächlich drei Methoden, die verwendet werden, um Transgene in eine Zielzelle einzubringen: Transfektion, Elektroporation oder Transduktion. Eine neue Variante, die Magnetofektion, kombiniert die Verwendung von MNPs mit den Mechanismen der Transfektion oder Transduktion ¹²¹. Genvektoren werden an MNPs gebunden (vgl. Abb. 9), sodass mit Hilfe eines magnetischen Feldes Transfektionen beziehungsweise Transduktionen zielgerichtet durchgeführt werden können. Dadurch wird die Effizienz erheblich gesteigert, da die

Kombination von MNPs und Magnetfeld eine schnelle Akkumulation und eine hohe Konzentration der Vektoren im Zielgewebe begünstigt ^{122, 123}. Beschrieben wurde dieser Effekt schon für alle Arten von Nukleinsäuren, verschiedene Transfektionsreagenzien und virale Konstrukte ¹²⁴. Zusätzlich bietet die Magnetofektion die Möglichkeit, beispielsweise transduzierte Zellen gleichzeitig zu magnetisieren, sodass sie unter Flussbedingungen mit Hilfe eines Magnetfeldes zurückgehalten werden können ¹²⁵. Dies ist ein vielversprechender Ansatz für Zellersatz- und/oder Gentherapien, auf die unter 1.7 konkreter eingegangen wird.

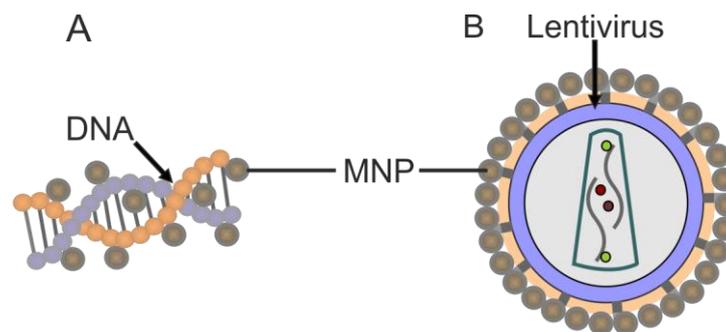


Abb. 9 Bindung magnetischer Nanopartikel an DNA und Lentiviren. Interaktion von MNPs mit DNA (A) oder Lentivirus (B) im Rahmen der Magnetofektion.

1.7 MNP-basierte Therapieansätze

Die Tatsache, dass MNPs von Zellen aufgenommen werden können und diese magnetisieren, ermöglicht eine zielgerichtete Zellpositionierung mit Hilfe eines magnetischen Feldes. Forschungsergebnisse der letzten 6 Jahre belegen, dass unter anderem endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) ¹²⁶ und differenzierte Endothelzellen *in vitro* mit MNPs beladen und magnetisiert werden können ^{125, 127, 128}. Des Weiteren ist es möglich, MNP-beladene Endothelzellen *ex vivo* und *in vivo* in Arterien, deren Blutfluss unterbrochen ist, zurückzuhalten. Dazu werden die magnetisierten Zellen in den Blutkreislauf injiziert und entweder durch bereits magnetisierte Stents ¹²⁹, normale Stents und ein externes Magnetfeld ¹³⁰ oder ein externes Magnetfeld ohne vorherige Stentimplantation ^{125, 128} lokal angezogen. Wie Hofmann et al. zeigten, ist es des Weiteren möglich, magnetisierte und transduzierte Endothelzellen *in vivo* bei persistierendem Blutfluss durch außen am Gefäß anliegende Magnete zurückzuhalten. Neben diesem Ansatz zur Therapie geschädigter Gefäße, beispielsweise

nach Entfernung eines atherosklerotischen Plaques, besteht auch die Option, die Funktion ischämischer Gehirnareale mit Hilfe magnetisierter EPCs zu verbessern. Nach systemischer Injektion der MNP-beladenen EPCs können diese durch ein magnetisches Feld gezielt zum ischämischen Gehirnareal geleitet werden, steigern dort die VEGF-Expression und die Kapillardichte und vermindern das atrophe Volumen¹³¹.

Die oben beschriebenen Ansätze könnten verbessert werden, wenn MNPs nicht nur zur Magnetisierung, sondern auch zur therapeutischen Modifikation von Zellen eingesetzt würden. So können Endothelzellen beispielsweise mit SOD- oder Katalase-beladenen MNPs behandelt werden¹²⁷. Ebenfalls möglich ist die MNP-gekoppelte lentivirale Transduktion mit einem funktionellen Gen wie eNOS¹²⁸. Mit beiden Ansätzen könnte nicht nur geschädigtes Endothel ersetzt, sondern gleichzeitig auch noch die Resistenz gegen oxidativen Stress verbessert werden. Bei der Verwendung von eNOS als therapeutisches Gen, müssen allerdings das Expressionslevel und die NO-Produktion kontrolliert werden, da eine zu hohe NO-Produktion den oxidativen Stress auch verstärken könnte (vgl. 1.2.3). Nichtsdestotrotz bietet die Kombination aus Zellersatz- und Gentherapie einen Ansatz, um die Gefäßfunktion zum Beispiel nach Entfernung einer atherosklerotischen Plaques durch Thrombendarteriektomie oder Ballonangioplastie dauerhaft zu verbessern und Restenosen vorzubeugen.

Das Einsatzgebiet von MNPs ist nicht allein auf die Zellmagnetisierung beschränkt. MNPs können auch dazu verwendet werden, beispielsweise anti- oder pro-angiogenetische Faktoren sowie virale Vektoren lokal anzureichern. Entsprechend ist neben der oben beschriebenen kombinierten Zellersatz- und Gentherapie auch eine reine, MNP-basierte Gentherapie möglich. So könnte beispielsweise dysfunktionales, aber noch vollständig erhaltenes Endothel durch Applikation eines geeigneten Magnetfeldes mit den oben bereits erwähnten SOD- oder Katalase-beladenen MNPs behandelt werden, um die Funktion zu verbessern. Auch eine direkte Transduktion des geschädigten Endothels mit Komplexen aus lentiviralen Vektoren und MNPs wäre denkbar. Ein weiteres Angriffsziel neben dem Endothel sind Tumore oder ischämische Areale. Durch den Einsatz von MNPs, die mit pro- oder anti-angiogenetischen Faktoren gekoppelt sind, beziehungsweise durch gezielte lentivirale Transduktion könnte in solchen Bereichen beispielsweise die Angiogenese inhibiert oder verstärkt werden.

1.8 Zielsetzung

Die Forschung an Zellersatz- und Gentherapien nimmt stetig zu, da sie bei Krankheiten, die bisher gar nicht oder nur unzureichend behandelt werden können, einen alternativen Ansatzpunkt bieten. Durch die Kombination mit magnetischen Nanopartikeln besteht die Möglichkeit, die Therapien so zu lokalisieren, dass eventuelle Nebeneffekte minimiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf magnetischen Nanopartikeln und lentiviralen Vektoren, Strategien zu entwickeln, um zum einen Endothelzellen in atherosklerotischen Gefäßen zu ersetzen und zum anderen die Angiogenese zu modulieren. Hofmann et al. verwendeten bereits 2008 Komplexe aus Nanopartikeln und einem lentiviralen eGFP-Konstrukt, um Endothelzellen zu transduzieren und so zu magnetisieren, dass sie *ex vivo* mit Hilfe zweier Stabmagnete zurückgehalten werden konnten ¹²⁵. Darauf aufbauend sollten in der vorliegenden Arbeit, die lentivirale Transduktion und die Magnetisierung von Endothelzellen mit Hilfe von MNPs optimiert werden. Des Weiteren sollte das von Hofmann et al. verwendete Reporter-gen eGFP durch ein funktionelles Gen ersetzt werden. Im Hinblick auf eine Therapiemöglichkeit für atherosklerotisch geschädigte Gefäße wurde das Enzym eNOS gewählt. ENOS-überexprimierende und durch MNPs magnetisierte Endothelzellen sollten dann das native Endothel in murinen Aorten ersetzen und dessen Funktion übernehmen beziehungsweise verbessern. Parallel dazu wurden MNPs und lentivirale Vektoren dazu eingesetzt, um lokal die Angiogenese zu modulieren – ein Ansatz, der insbesondere für die Krebstherapie interessant sein dürfte. Da von Mannell et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die anti-angiogenetische Wirkung eines SHP2-*knockdowns* bewiesen wurde ⁶⁶, wurde in der vorliegenden Arbeit ein lentivirales *small hairpin*-Konstrukt verwendet, um die SHP2-Expression und damit die Angiogenese zu inhibieren. Der Einsatz von Lentivirus-MNP-Komplexen sollte in diesem Ansatz die lokale Transduktion gewährleisten.

2. Material und Methoden

2.1 verwendete Materialien

2.1.1 Software

Bezeichnung	Hersteller
Axiovision Release 4.8	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
CorelDRAW Graphics Suite X4	Corel Corporation (München, Deutschland)
FlowJo 7.6	FlowJo, LLC (Oregon, USA)
FlowMax 3.0	Partec GmbH (Münster, Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
Rotorgene-Q Series Software 1.7	Qiagen (Hilden, Deutschland)
WCIF Image J	programmiert von Wayne Rasband (National Institute of Mental Health, Bethesda, USA)

Tab. 1 Software

2.1.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
CyFlow Space	Partec GmbH (Münster, Deutschland)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gelkammern für Elektrophorese	BioRad (München, Deutschland)
Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Laborzentrifuge Rotanta 460 R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetheizrührer	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Magnetplatte	Chemicell (Berlin, Deutschland)

Magnetspitzen	eigene Herstellung; Verwendung folgender Magnete: N50 Stabmagnet (STM-30x50-N) als Basis, www.magnet-shop.de ; Weicheisen-spitzen aus Armco Telar 57, AK Steel GmbH, Köln, Deutschland)
Magnetständer	eigene Herstellung, Verwendung folgender Magnete: N44 Quadermagnet (QM-20x05x02-N), N50 Quadermagnet (QM-10x04x02-G), www.magnet-shop.net
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Observer Z1 mit Apotome	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
PCR-Gerät	Biometra (Göttingen, Deutschland)
PCR-Gerät, Realtime Rotor Gene Q	Corbett Research, jetzt Vertrieb über Qiagen (Hilden, Deutschland)
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Gilson (Limburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Integra Bioscience (Fernwald, Deutschland)
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Spannungsgerät PeqPower 300	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Spannungsgerät PowerPAC HC	BioRad (München, Deutschland)
Spectrophotometer Nanodrop	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Stereomikroskop AxioZoom V16	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Taunusstein, Deutschland)
Thermoblock (mit Heiz-/Kühlfunk-tion)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Thermomixer HLC	Ditabis (Pforzheim, Deutschland)
Tischzentrifuge 5424R (mit Kühlfunktion)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vakuumpumpe mit Filter	Vacuubrand (Wertheim, Deutschland)
Vortexer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Western Blot Trans-Blot Turbo	BioRad (München, Deutschland)
Western Blot Zubehör	BioRad (München, Deutschland)
Wippe Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

Tab. 2 Geräte

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Cryoröhrchen; 1,8 ml	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Deckgläser	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Filterpapier	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Immersionsöl Immersol TM 518 F	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Nitrocellulosemembran Protran BA 85	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Objektträger	Menzel-Gläser über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Petrischale	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus (Winsen/Luhe, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 4er Streifen für PCR	LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 0,2 ml, 0,5 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 5 ml für Durchflusszytometer	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

Serologische Pipetten; 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Zählkammer; Neubauer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflasche; 25 cm ²	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturplatte; 6 well, 24 well, 96 well	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturplatte; 6 well mit Glasboden (#P06-1.5H-N)	In Vitro Scientific (Sunnyvale, USA)
Zellkulturplatte; 96 well mit Glasboden (#265300)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturschale; 10 cm	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturschal; 15 cm	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

Tab. 3 Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Chemikalien und gekaufte Lösungen

Bezeichnung	Artikelnr.	Lieferant
1,10-Phenanthrolin Monohydrat	77500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-bromo-3-chloro-propanol	718076	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Propanol	A0900	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	69947	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
A23187	C7522	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Accutase	L11-007	PAA (Pasching, Österreich)
Acrylamid 4K-Lösung (40 %); Mix 37,5 : 1	A1577	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Ammoniumacetat	A7330	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat ((NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O)	F3754	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	215589	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	M3148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bromphenolblau	B8026	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	C4901	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DEPC Wasser	AM9906	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Diaminofluorescein-FM (DAF-FM)	D2196	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium	14190-094	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
ECL Western Blotting Analysis System	RPN2109	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis (Fluka)	10981	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Entellan [®]	1.07961.1000	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Entwickler für Röntgenfilme	P7042	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Eosin G-Lösung; 0,5 %; wässrig	X883.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eselserum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ethanol; 70 %	27668	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Essigsäure; 100%	1.00063.1011	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung; 1 %	46067	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E4884	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fixierer für Röntgenfilme	P7167	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fötale Kälberserum (FKS)		PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Gelatine	G2500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Geniticindisulfat (Neomycin, G418)	11811031	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	G4500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	49767	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	G8898	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hank's Balanced salt solution (HBSS ^{+/+}) mit Magnesium und Calcium	14025-050	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Hank's Balanced salt solution (HBSS ^{-/-}) ohne Magnesium und Calcium	14175-046	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Hoechst 33342; 1 mg / ml	B2261	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hydroxylaminhydrochlorid (NH ₂ OH x HCl)	159417	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	P9333	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	P5655	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumhexacyanoferrat(II) (K ₄ Fe(CN) ₆)	P9387	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	223468	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kollagenase IV	LS004188	Worthington (Lakewood, USA)
Magermilchpulver	1.15363.0500	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	M8150	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Methanol	A068	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magnetische Nanopartikel (MNPs)		Dr. Mykhaylyk (TU München)
Matrigel	354234	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
N-Nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid (L-NAME)	N5751	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumacetat (NaAc, C ₂ H ₃ NaO ₂)	S2889	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	S5586	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	D6750	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Natriumdodecylsulfat (SDS, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$)	L4390	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	S6297	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	1.06498.0500	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Natriumnitroferricyanid(II)-dihydrat (SNP)	228710	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	11140-035	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
NOC-12	487955-10	Calbiochem über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Nonidet P40 (IGEPAL CA 630)	I3021	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Phalloidin konjugiert mit Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat (TRITC)	P1951	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Proteinmarker Precision Plus Dual Color	161-0374	BioRad (München, Deutschland)
Proteaseinhibitoren ohne EDTA	11873580001	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
RNA-Ladepuffer	R1386	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Salzsäure, rauchend	A0659	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure, konzentriert	07208	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Tetramethyldiamin (TEMED)	T7024	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)
Trichloressigsäure	T6399	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton-X100	93418	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	T5941	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) Thermo Scientific (Waltham, USA)
TRIzol®	15596-018	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/EDTA 0,05 % (w/v)	25300-096	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Tween20	P9416	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Tab. 4 Chemikalien

2.1.5 Puffer und angesetzte Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
0,1 % (w/v) Phenanthrolin	100 mg Phenanthrolin in 100 ml H ₂ O lösen, 2 Tropfen konzentrierte HCl zugeben, erwärmen bis die Lösung klar ist.
Acetatpuffer	25 g Ammoniumacetat in 10 ml H ₂ O lösen, 70 ml Essigsäure zugeben, mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen.
Dissoziationspuffer	5 mM Glukose 6 mM HEPES

	<p>5 mM KCl 12 mM KH₂PO₄ 1 mM MgSO₄ 130 mM NaCl 5 mM NaHCO₃</p>
Eisenstocklösung / Eisenstandardlösung	<p>392,8 mg Ammonium- eisen(II)-sulfat in 2 ml H₂SO₄ und 10 ml H₂O lösen, tropfenweise 0,01 M KMnO₄ zugeben, bis der Farbumschlag (schwach pink) dauerhaft ist, mit H₂O auf 100 ml auffüllen; Herstellung der Eisenstan- dardlösung durch 1: 25 Verdünnung der Eisenstock- lösung mit H₂O.</p>
MOPS-Puffer	<p>10 mM EDTA 200 mM MOPS 50 mM NaAc</p>
RIPA-Puffer	<p>2 mM EDTA 150 mM NaCl 25 mM Tris-HCl 10 % Glycerol 0,1 % Natriumdeoxycholat 1 % Nonidet P40 0,1 % SDS pH 7,5</p>
SDS-Laufpuffer (10x)	<p>1,92 M Glycin 0,25 M Tris-HCl 1 % SDS pH 8,8</p>
SDS-Probenpuffer (5x)	<p>60 mM Tris-HCl 7,5 % β-Mercaptoethanol</p>

	0,1 % Bromphenolblau 30 % Glycerol 15 % SDS
Semidryblot-Puffer	192 mM Glycin 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
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8

Tab. 5 Puffer

2.1.6 Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit	PF032	Calbiochem über Millipore (Schwalbach, Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	04744926001	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Quantitect [®] SYBR Green PCR Kit	204143	Quiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Micro Kit	74004	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Superscript VILO cDNA Kit	1174-050	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 6 Kits

2.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	41965-039	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Endothelial cell growth medium (ECGM, Endothelzellmedium)	201 0111	Provitro (Berlin, Deutschland)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	21980-032	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 7 Zellkulturmedien

2.1.7.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
15 % DMEM	Kultivierung von Nährzellen	15 % (v/v) FKS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol
15 % DMEM	Kultivierung von undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen)	15 % (v/v) FKS 100 U / ml Penicillin 1000 U / ml Lif 100 µg / ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol
20 % IMDM	Differenzierung von mES-Zellen	20 % (v/v) FKS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium für mES-Zellen	Kryokonservierung von mES-Zellen	20 % DMSO (v/v) in FKS
ECGM	Kultivierung von Endothelzellen	4,5 % (v/v) Zusätze 100 / ml Penicillin

		100 µg / ml Streptomycin
Einfriermedium für Endothelzellen	Kryokonservierung von Endothelzellen	10 % DMSO (v/v) in FKS

Tab. 8 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

2.1.7.2 Zellkulturzusätze und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 % Gelatine-Lösung	1 g Gelatine in 100 ml DPBS autoklavieren
0,1 % Gelatine-Lösung	1 % Gelatine 1:10 mit DPBS verdünnen
Kollagenase IV	2000 U / ml Stocklösung in HBSS ^{-/-} ; Endkonzentration: 280 U / ml
Leukämie inhibierender Faktor (Lif)	10 ⁶ U / ml Stocklösung; Endkonzentration 10 ³ U / ml
Geniticindisulfat (Neomycin, G418)	300 mg / ml Stocklösung in DPBS; Endkonzentration 300 µg / ml

Tab. 9 Zellkulturzusätze und Lösungen

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Bovine pulmonalerterielle Endothelzellen (bPAEC)

Primäre bovine Endothelzellen aus der Pulmonalarterie, bestellt über Provitro (Berlin, Deutschland) bei Cell applications, Inc. (San Diego, USA).

D3 mES-Zellen

Murine embryonale Stammzellen, präpariert aus der Blastocyste einer 129S4/SvPas-Maus, bestellt bei American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA).

D3 Flt1-eGFP mES-Zellen

Transgene murine embryonale Stammzellen mit D3-Hintergrund. Die Zellen exprimieren unter dem Flt1-Promotor das eGFP-Reportergen, können über Neomycin selektioniert werden und wurden 2012 von Herz et al. charakterisiert ¹³².

Murine embryonale Fibroblasten

Primäre, murine, embryonale Fibroblasten mit Neomycin-Resistenz (PMEF-NL) zur Kultivierung von mES-Zellen, bestellt bei Millipore (Schwalbach, Deutschland).

2.1.9 Primer

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

Bezeichnung	Artikelnummer
18S-rRNA-Primer (murin)	QT01036875
Mm_RN18s_2_SG Quantitect primer assay	
eGFP-Primer	QT01171611
Control_EGFP_1_SG Quantitect primer assay	
eNOS-Primer (human)	QT00089033
Hs_NOS3_1_SG Quantitect primer assay	
SHP2-Primer (murin)	QT00103362
Mm_Ptpn11_1_SG Quantitect primer assay	

Tab. 10 Primer für qRT-PCR

2.1.10 Lentivirale Vektoren

Verwendet wurden selbst inaktivierende (SIN), VSV.G pseudotypisierte Lentiviren der dritten Generation basierend auf dem lentiviralen rrl-Vektor. Bei lentiviralen Konstrukten dieser Generation liegt der Transgentransfervektor getrennt vom Vektor mit den Verpackungskonstrukten (pMDL/pRPE, RSV-rev, pMD.G) vor.

Alle lentiviralen Konstrukte wurden designt und produziert von der Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn).

2.1.10.1 Verpackungskonstrukte

pMDLg/pRPE

Expression der HIV-Gene *gag* und *pol* unter Kontrolle des Promotors des Cytomegalievirus (CMV).

RSV-rev

Expression des *regulator of expression of virion proteins (rev)* unter Kontrolle des Promotors des Rous-Sarkom-Virus (RSV).

pMD.G

Expression des Hüllproteins (*env*) VSV.G unter Kontrolle des CMV-Promotors.

2.1.10.2 Transgentransfervektoren

rrl-CMV-eNOS

Expression der humanen endothelialen NO-Synthase unter dem CMV-Promotor.

rrl-CMV-eNOS-IRES-eGFP

Expression der humanen endothelialen NO-Synthase unter dem CMV-Promotor, verbunden über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit der eGFP-Sequenz.

rrl-156

Kontrollvektor ohne Transgenkassette.

hplm-H1-sh-SHP2

Expression einer *small hairpin (sh)* RNA zum SHP2-*knockdown* unter Kontrolle des H1-Promotors.

rrl-PGK-tomato-H1-sh-SHP2

Expression des Reportergens *tomato* unter Kontrolle des Promotors der Phosphoglyceratkinase (PGK); Expression einer shRNA zum SHP2-*knockdown* unter Kontrolle des H1-Promotors.

2.1.11 Magnetische Nanopartikel (MNPs)

Alle verwendeten MNPs wurden von der Arbeitsgruppe Plank (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapie, TU München) hergestellt. Sie bestehen aus einem Eisen(II,III)-oxid-Kern (Fe_3O_4 , Magnetit) und einer Hüllschicht. Kerndurchmesser und Zusammensetzung der Hüllschicht variieren abhängig von der Art des Nanopartikels. In

Tab. 11 und Tab. 12 sind die Eigenschaften der verwendeten Nanopartikel zusammengefasst.

	PALD1-Mag4	PALD2-Mag1
Kerndurchmesser [nm]	2,3	4
Hüllschicht	Palmytoyldextran mit Zonyl FSE	Palmytoyldextran mit Zonyl FSA
Elektrokinetisches Potential [mV] a) in Wasser b) in HBSS⁺⁺	a) - 37 ± 1,6 b) - 8,6 ± 0,8	a) - 31,4 ± 0,9 b) - 8,8 ± 0,3
Hydrodynamischer Partikeldurchmesser in wässriger Lösung [nm]	77 ± 29	55 ± 11
Magnetisches Moment der Partikel m_{eff} [A m²]	2,2 x 10 ⁻¹⁷	6,45 x 10 ⁻¹⁶

Tab. 11 verwendete MNPS (PALD-Beschichtung)

	NDT-Mag1	PEI-Mag2	SO-Mag5
Kerndurchmesser [nm]	11,6	9	7
Hüllschicht	1,9-Nonandithiol mit Zonyl FSA	Zonyl FSA mit ver- zweigtem Polyethy- lenimin (25 kDa)	Siliziumdioxid mit Phosphonat- gruppen
Elektrokinetisches Potential [mV] a) in Wasser b) in HBSS⁺⁺	a) - 16,6 ± 2,0 b) - 7,5 ± 1,3	a) + 55,4 ± 1,6 b) + 13,4 ± 1	a) - 38 ± 2 b) - 9,2 ± 0,4

Hydrodynamischer Partikeldurchmesser in wässriger Lösung [nm]	42,6 ± 6,2	63 ± 36	40 ± 14
Magnetisches Moment der Partikel m_{eff} [A m²]	2,2 x 10 ⁻¹⁹	8,7 x 10 ⁻²⁰	3,3 x 10 ⁻¹⁹
Publikation	Mykhaylyk et al. 2009	Mykhaylyk et al. 2007, 2009, 2010; Tresilwised et al. 2010	Mykhaylyk et al. 2012

Tab. 12 verwendete MNPs (sonstige Beschichtung)

2.1.12 Antikörper

2.1.12.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verwendung & Verdünnung	Artikelnr.	Lieferant
anti- α -Aktin der glatten Muskulatur (murin)	Maus IgG2a	IF; 1:800	A5228	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
anti- β -Aktin, Peroxidase gekoppelt	Maus IgG1	WB; 1:40000	A3854	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
anti-CD31 (bovin)	Kaninchen	IF; 1:800		Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Newman (Universität von Wisconsin, USA)
anti-CD31 (murin)	Ratte IgG2a	IF; 1 :800	550274	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-eNOS (human)	Maus	IF; 1:500	610297	BD Biosciences

	IgG1			(Heidelberg, Deutschland)
anti-eNOS (human), Peroxidase gekoppelt	Kaninchen	WB; 1:1000	Sc-654	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti-GFP	Maus IgG2a	WB; 1:1000	632381	Clonotech (Mountain View, USA)
anti-Ki67	Kaninchen	IF, 1:100	Ab15580	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
anti-SHP2 (human)	Maus IgG1	WB; 1:500	Sc-7384	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Tab. 13 primäre Antikörper; WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenzfärbung

2.1.12.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Artikelnr	Lieferant
Esel-anti-Maus Cy3	715-165-151	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Esel-anti-Kaninchen Cy5	711-175-152	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Esel-anti-Ratte Cy5	712-175-150	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ziege-anti-Maus, Peroxidase gekoppelt	115-035-145	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ziege-anti-Kaninchen, Peroxidase gekoppelt	111-035-144	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)

Tab. 14 sekundäre Antikörper

2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem geeigneten Inkubator. Alle Medien und Zusätze wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.2.1 Auftauen von Endothelzellen

Alle Zelllinien befanden sich zur dauerhaften Lagerung in der Gasphase eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks. Bei den verwendeten Endothelzellen handelte es sich um bovine pulmonalarterielle Endothelzellen (bPAECs). Das Auftauen der Endothelzellen erfolgte für 2 - 3 min in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Endothelzellmedium gemischt und auf einer 25cm²-Flasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.2 Kultivierung von Endothelzellen

Nach dem Auftauen wurden die Endothelzellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in 25cm²-Zellkulturflaschen in Endothelzellmedium (Zusammensetzung vgl. 2.1.7.1) kultiviert. Zu 80 % konfluente Zellen wurden passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Accutase für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 4 ml Endothelzellmedium aufgenommen und diese Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur (RT) für 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden 200 000 Zellen in einer neuen 25cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Für weiterführende Versuche wurden die Zellen entweder in 6well-, 24well-, 96well-Zellkulturplatten ausgesät oder auf Deckgläsern, beschichtet mit 0,1 % Gelatine.

2.2.3 Einfrieren von Endothelzellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese, wie unter 2.2.2 beschrieben, zunächst abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Mit Einfrieremedium wurde die Zellzahl auf 5×10^5 / ml eingestellt. 1ml-Aliquots wurden in Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C in speziellen mit Isopropanol gefüllten Behältern eingefroren und nach 2 Tagen in den Stickstofftank überführt.

2.2.4 Beladung von Endothelzellen mit MNPs

Zur Beladung von Endothelzellen mit MNPs wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal mit HBSS^{+/+} gewaschen. Die benötigte Menge an MNPs wurde in HBSS^{+/+} verdünnt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann für 30 min auf einer Magnetplatte im Inkubator platziert. Nach der Inkubation wurde die MNP-Suspension durch Endothelzellmedium ersetzt. In einigen Versuchen wurde 12 h nach der Beladung eine lentivirale Transduktion wie unter 2.2.6 beschrieben durchgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Magnetisierungseffizienz von MNPs

Endothelzellen wurden in einer 6well-Zellkulturplatte ausgesät (200 000 Zellen / well) und 12 h nach dem Aussäen wie unter 2.2.4 beschrieben mit MNPs beladen. 24 h, 72 h oder 120 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mit 500 µl Accutase abgelöst. Nach 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion mit 500 µl Endothelzellmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, welches in einem Magnetständer positioniert war. Um die Retention der beladenen Zellen zu garantieren, wurde die Zellsuspension langsam an der Rückseite des Reaktionsgefäßes, an der die Magnete anlagen, hineinpipettiert. Ohne mit der Pipettenspitze die Rückseite des Reaktionsgefäßes zu berühren wurde nach 30 s der Überstand abgenommen, in ein weiteres 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 250 µl Endothelzellmedium resuspendiert (nicht magnetische Fraktion). Die im Magnetständer zurückgehaltenen Zellen wurden ebenfalls in 250 µl Endothelzellmedium aufgenommen (magnetische Fraktion). Die Zellzahl beider Fraktion wurde mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt.

2.2.6 MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von Endothelzellen

Endothelzellen wurden entweder in einer 6well-Zellkulturplatte (200 000 Zellen / well) oder in einer 24well-Zellkulturplatte (15 000 Zellen / well) ausgesät. Die lentivirale Transduktion erfolgte 24 h nach dem Aussäen der Zellen beziehungsweise im Falle einer vorherigen MNP-Beladung 12 h nach der Beladung. Um die benötigte Anzahl infektiöser Viruspartikel (IP) zu berechnen, wurde die Anzahl der zu transduzierenden Zellen mit der *multiplicity of infection* (MOI) multipliziert. Mit Hilfe des Verhältnisses von biologischem zu physikalischem Virustiter konnte daraus die Menge der Viruspartikel (VP) berechnet werden. Versuchsabhängig wurde entweder mit 40 fg Fe / VP oder 4000 fg Fe / IP

transduziert. Zunächst wurde die benötigte Menge von Lentivirus (LV) und MNPs für 20 min bei RT in HBSS^{+/+} inkubiert (Transduktionsvolumen für 24well / 6 well: 500 µl / 1000 µl). Anschließend wurde das Medium von den zu transduzierenden Zellen entfernt, einmal mit HBSS^{+/+} gewaschen und die LV-MNP-Suspension appliziert. Die Zellen wurden für 30 min auf einer Magnetplatte im Inkubator platziert. Nach der Transduktion wurde die LV-MNP-Suspension durch Endothelzellmedium ersetzt und die transduzierten Zellen wurden für 12 – 120 h kultiviert. Folgende Ansätze wurden als Kontrolle durchgeführt: Transduktion mit LV ohne MNPs in HBSS^{+/+} für 30 min, Transduktion mit LV ohne MNPs über Nacht in Medium, Zugabe von MNPs ohne LV in HBSS^{+/+} und Transduktion mit einem leeren lentiviralen Konstrukt (rrl-156) mit MNPs in HBSS^{+/+}.

2.2.7 Bestimmung der magnetischen Ansprechbarkeit MNP-beladener Endothelzellen

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. O. Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München, Deutschland) wurde die magnetische Ansprechbarkeit von Endothelzellen, die mit Hilfe von MNPs transduziert und magnetisiert worden waren, untersucht. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.2.6 beschrieben transduziert, 72 - 120 h kultiviert, mit 4 % PFA (vgl. 2.6.1) fixiert, in DPBS aufgenommen und zur Messung nach München geschickt. Die Zellsuspension wurde einem definierten magnetischen Gradientenfeld ausgesetzt und ihre optische Dichte zu unterschiedlichen Zeitpunkten spektrophotometrisch gemessen¹³³. Basierend auf der Klärungsgeschwindigkeit konnten das magnetische Moment der beladenen Zellen sowie ihr Eisengehalt berechnet werden¹³⁴.

2.2.8 Bestimmung des Eisengehaltes MNP-beladener Endothelzellen mittels Magnetpartikelspektroskopie

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Eberbeck (Arbeitsgruppe Biomagnetismus, PTB Berlin, Deutschland) wurde mittels Magnetpartikelspektroskopie (MPS) der Eisengehalt von Endothelzellen, die wie unter 2.2.6 beschrieben transduziert worden waren, 72 - 120 h nach der Transduktion bestimmt. Die transduzierten Zellen wurden zunächst mit 4 % PFA fixiert (vgl. 2.6.1) und anschließend in 3 % Gelatine immobilisiert. Diese Messtechnik wurde hauptsächlich für Zellen mit geringer Eisenbeladung eingesetzt.

2.2.9 Kolorimetrisches Eisennachweisverfahren

Für das kolorimetrische Eisennachweisverfahren wurden Endothelzellen verwendet, die, wie unter 2.2.6 beschrieben, transduziert und 72 - 120 h kultiviert worden waren. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst (vgl. 2.2.2) und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension sollte bei Eisenmengen < 10 pg / Zelle zwischen 200 000 und 500 000 Zellen enthalten. Bei höheren Eisenmengen sind 100 000 bis 200 000 Zellen ausreichend. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt mit 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet einmal mit DPBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut der Überstand entfernt und das Pellet entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt verwendet. Um das Zellpellet zu lysieren, wurde es über Nacht bei 65 °C in 250 µl einer Mischung aus 3 M Salzsäure und $0,61$ M Trichloressigsäure inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 rpm. Der klare Überstand wurde für die Messung verwendet. Zu 50 µl des Überstandes wurden 20 µl einer 10% igen (w/v) Hydroxylaminhydrochloridlösung, 100 µl Ammoniumacetatpuffer (vgl. Tab. 5) und 50 µl einer $0,1\%$ igen (w/v) Phenanthrolinlösung pipettiert. Hierbei war zu beachten, dass das Probenvolumen die 50 µl nicht überschreiten durfte und dass die einzelnen Lösungen in der richtigen Reihenfolge hinzugefügt werden mussten. Für die Kalibrierungskurve wurden unterschiedliche Volumina der Eisenstandardlösung, welche durch Verdünnung der Eisenstocklösung unmittelbar vor Beginn der Messung hergestellt wurde, mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Hierzu wurden ebenfalls 20 µl einer 10% igen (w/v) Hydroxylaminhydrochloridlösung, 100 µl Ammoniumacetatpuffer und 50 µl einer $0,1\%$ igen (w/v) Phenanthrolinlösung pipettiert. Alle Proben wurden für 20 min bei RT inkubiert und anschließend am Plattenreader bei 510 nm gemessen. Aus der Kalibrierungskurve konnte die Eisenkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden. Unter Kenntnis der anfangs lysierten Zellzahl konnte daraus der Eisengehalt pro Zelle berechnet werden.

2.2.10 Angiogeneseassay

Um das angiogenetische Potential beladener und transduzierter Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein Angiogeneseassay in Matrigel durchgeführt. Das Matrigel wurde über Nacht auf Eis im Kühlschrank aufgetaut. Eine 24well-Zellkulturplatte wurde mit 250 µl Matrigel / well beschichtet. Dazu wurde die gekühlte Zellkulturplatte auf Eis unter der Sterilbank platziert und das Matrigel mit gekühlten Pipettenspitzen in die wells pipettiert.

Anschließend wurde die Platte für 30 min in den Inkubator überführt, bis das Matrigel polymerisierte. Die Zellen wurden wie unter 2.2.4 und 2.2.6 beladen und transduziert und 72 beziehungsweise 120 h nach der Transduktion, wie unter 2.2.2 beschrieben, abgelöst. $0,6 \times 10^5$ Zellen / well in 500 μ l Endothelzellmedium wurden auf der mit Matrigel beschichteten Zellkulturplatte ausgesät. Die Gefäßbildung wurde 12 h später mikroskopisch dokumentiert.

2.2.11 Diaminofluoresceinassay

Die NO-Produktion und damit die Aktivität der eNOS wurde mit Hilfe von Diaminofluorescein (DAF) nachgewiesen. Das verwendete schwach fluoreszierende DAF-FM reagiert in Gegenwart von NO zu Triazolofluorescein, welches um den Faktor 160 stärker fluoresziert und mit Hilfe eines geeigneten Plattenreaders ($\lambda_{\text{Anregung}} = 485 - 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 515 - 535 \text{ nm}$) nachgewiesen werden kann

Für die DAF-Messung wurden die Zellen in einer 6well-Zellkulturplatte (2×10^5 Zellen / well) ausgesät und 12 h später, wie unter 2.2.6 beschrieben, transduziert. Versuchsabhängig wurden sie 48 h oder 96 h nach Transduktion auf eine 24well-Zellkulturplatte umgesetzt (10^5 Zellen / well), um für die Messung eine gleichmäßige Zellverteilung zu gewährleisten. Die Messung erfolgte entweder 72 h oder 120 h nach der Transduktion. Inhibitoren wie L-NAME (100 μ M) wurde eine Stunde vor der Messung dem Medium zugesetzt. Für die Messung wurden die Zellen dann mit HBSS^{+/+} gewaschen und für 1 h mit 3 mM L-Arginin und 5 μ M DAF in HBSS^{+/+} bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 3 mM L-Arginin, 5 μ M DAF und 100 μ M SNP behandelt. Als weitere Positivkontrolle wurde in leere wells 3mM L-Arginin, 5 μ M DAF und 100 μ M NOC-12 in HBSS^{+/+} gegeben. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 200 μ l / well. Nach einstündiger Inkubation wurde der Überstand in eine 96well-Platte mit Glasboden überführt und bei einer Anregung von 485 nm die Emission bei 535 nm an einem Plattenlesegerät gemessen.

2.2.12 Apoptoseassay

Die Apoptose wurde mit Hilfe eines AnnexinV-FITC-Kits der Firma Calbiochem durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden im 6well ausgesät und, wie unter 2.2.6 beschrieben, transduziert. 72 h beziehungsweise 120 nach der Transduktion wurde das Medium abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellen mit DPBS

gewaschen und anschließend mit Accutase abgelöst. Nach 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion mit dem zuvor abgenommenen Medium abgestoppt und die Zellzahl bestimmt. Pro Ansatz wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen in ein frisches Gefäß überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet einmal mit kaltem DPBS gewaschen und für 15 min auf Eis im Dunkeln mit 1,25 µl AnnexinV-FITC in 0,5 ml Bindungspuffer inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Propidiumiodid in 0,5 ml Bindungspuffer wurde die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen im Durchflusszytometer ermittelt.

2.2.13 Kultivierung von Nährzellen

Als Nährzellen wurden murine embryonale Fibroblasten mit Neomycinresistenz von Millipore (vgl. 2.1.8) verwendet. Nach dem Auftauen wurden 5×10^5 Zellen in einer 10cm-Zellkulturschale, beschichtet mit 0,1 % Gelatine, ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und durch fünfminütige Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10 ml 15 % DMEM wurde die Zellsuspension für 5 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml 15 % DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden 1:3 auf 15cm-Schalen ausgesät und expandiert. Zur Teilungsinaktivierung wurden die Zellen, wie oben beschrieben, abgelöst, mit einer Einzeldosis Röntgenstrahlen von 15 Gy bestrahlt und eingefroren. Für die Kultivierung von mES-Zellen wurden $0,5 \times 10^5$ Nährzellen pro cm^2 in 25 cm^2 -Flaschen ausgesät.

2.2.14 Auftauen von mES-Zellen

Alle Zelllinien befanden sich zur dauerhaften Lagerung in der Gasphase eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks. Das Auftauen der Zellen erfolgte für 2 - 3 min in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml 15 % DMEM mit LIF ($10^3 \text{ U} / \text{ml}$ Medium) gemischt und auf einer 25 cm^2 -Flasche mit Nährzellen ($0,5 \times 10^5$ Zellen / cm^2) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei transgenen mES-Zellen wurde dem Medium nun auch Neomycin ($300 \mu\text{g} / \text{ml}$ Medium) zugesetzt.

2.2.15 Kultivierung von mES-Zellen

Um ein konfluentes Wachstum und damit die Differenzierung der mES-Zellen zu vermeiden, wurden diese alle 2 - 3 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium von den

Zellen entfernt, diese wurden einmal mit DPBS gewaschen und für 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml 15 % DMEM abgestoppt und die Zellsuspension für 5 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden von der berechneten Zellzahl 1×10^6 für die Nährzellen abgezogen, da dies in etwa die Anzahl der Nährzellen in einer 25cm²-Flasche entspricht (vgl. 2.2.13). 2×10^5 Zellen wurden in 5 ml 15 % DMEM mit Lif (10^3 U / ml Medium) auf eine neue mit Nährzellen beschichtete Zellkulturflasche ausgesät. Bei transgenen mES-Zellen wurde dem Medium auch Neomycin (300 µg / ml Medium) zugesetzt.

2.2.16 Einfrieren von mES-Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese, wie unter 2.2.15 beschrieben, zunächst abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Die Zellzahl wurde mit 15 % DMEM auf 10^6 / 0,5 ml eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Einfriermedium gemischt, sodass 10^6 Zellen / ml vorlagen. 1ml-Aliquots wurden in Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C in speziellen mit Isopropanol gefüllten Behältern eingefroren und nach 2 Tagen in den Stickstofftank überführt.

2.2.17 Ansetzen einer Massenkultur

Um die Differenzierung der mES-Zellen in *Embryoid bodies* (EBs) zu starten, wurden die Zellen, wie unter 2.2.15 beschrieben, abgelöst und die Zellzahl bestimmt. 2×10^6 Zellen wurden in 10 ml 20 % IMDM in einer nicht oberflächenbehandelten Petrischale ausgesät und auf einem Schüttler mit 80 rpm bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um das Anwachsen der Zellen zu vermeiden. Nach 2 - 3 Tagen wurde diese Massenkultur verdünnt. Dazu wurde zunächst das Medium mit den EBs aus der Schale in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 - 10 min stehen gelassen, um ein Absinken der EBs zu ermöglichen. Das überschüssige Medium wurde bis auf 5 ml entfernt und die EBs vorsichtig in dem restlichen Medium resuspendiert. Es wurden 3 x 5 µl entnommen und auf den Deckel einer Petrischale pipettiert, um die Anzahl der EBs zu bestimmen. Jeweils 750 EBs wurden in 10 ml 20 % IMDM in eine neue Petrischale überführt und bis zum gewünschten Differenzierungstag auf dem Schüttler im Inkubator platziert. Bei längeren Differenzierungen wurde das Medium 4 Tage nach dem Verdünnen gewechselt. Hierzu

wurden die Schalen vorsichtig konzentrisch geschwenkt, bis die EBs in der Schalenmitte angereichert waren. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt.

2.2.18 Dissoziation von EBs

Für weiterführende Versuche wurden EBs, deren Generierung unter 2.2.17 beschrieben wurde, zu Einzelzellen dissoziiert. Die EBs zweier Petrischalen wurden in ein 50ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Absinken der EBs wurde das Medium entfernt und zweimal mit je 10 ml DPBS gewaschen. Die Kollagenase-IV-Stocklösung wurde mit Dissoziationspuffer auf 280 U / ml verdünnt. Der verdünnten Kollagenase wurde 1 μ M CaCl_2 zugefügt. Pro 50ml-Reaktionsgefäß wurde 1 ml Kollagenaselösung auf die EBs gegeben, die anschließend für 10 min bei 37 °C und 800 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert wurden. Die im Überstand befindlichen Einzelzellen wurden zum Abstoppen der Reaktion in 8 ml 20 % IMDM überführt. Die verbliebenen EBs wurden nach Zugabe frischer Kollagenaselösung erneut für 10 min im Thermoschüttler inkubiert. Hiernach wurden die Einzelzellen aus dem Überstand ebenfalls in 20 % IMDM überführt und für 5 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Für weiterfolgende Versuche wurden die Einzelzellen auf 6well-Zellkulturplatten, beschichtet mit 0,1 % Gelatine, ausgesät. Eine effiziente Differenzierung der mES-Zellen zu Endothelzellen wurde erreicht, indem die EBs am zehnten Tag nach dem Ansetzen der Massenkultur dissoziiert, mit einer Dichte von 10^6 Zellen / well ausgesät und für weitere 10 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert wurden. Dabei wurde täglich das Medium (3 ml / well) gewechselt.

2.2.19 Quantifizierung der Gefäßbildung

Um die Gefäßbildung der differenzierenden mES-Zellen zu quantifizieren, wurde die Gefäßlänge in μm sowie die Anzahl der Verzweigungspunkte mit dem Programm WCIF ImageJ ermittelt.

2.2.20 Homogene MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von mES-Zellen

Für die MNP-vermittelte lentivirale Transduktion der mES-Zellen wurden EBs dissoziiert und auf 6well-Zellkulturschalen ausgesät (10^6 Zellen / well, vgl. 2.2.18). Einen Tag nach

der Dissoziation wurden die Zellen mit $7,74 \times 10^8$ VP und 300 fg Fe / VP transduziert (vgl. 2.2.6).

2.2.21 Magnetspitzenvergleich

Um die optimale Magnetkonfiguration für die lokalen Transduktionsversuche zu ermitteln, wurden eine 3mm- und eine 1mm-Magnetspitze bezüglich ihrer Anziehung von LV/MNP-Komplexen getestet. Beide Magnetspitzen wurden von der Arbeitsgruppe Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, TU München) designt und in der Werkstatt des Instituts für Physiologie I (Universität Bonn) gebaut.

Für die Anziehungsversuche wurden $7,74 \times 10^8$ VP des lentiviralen Leervektors rrl-156 mit 300 fg Fe / VP für 20 min bei RT in 1 ml HBSS^{+/+} inkubiert. Eine leere 6well-Zellkulturplatte mit Glasboden wurde in einer Halterung über der Magnetspitze befestigt und der ganze Aufbau wurde auf einem Horizontalschüttler positioniert. Die LV-MNP-Suspension wurde in ein leeres well gegeben und für 30 min mit 125 rpm geschüttelt. Das Ergebnis wurde mit dem Stereomikroskop Stereo Zoom S4E dokumentiert.

2.2.22 Lokale MNP-vermittelte lentivirale Transduktion von mES-Zellen

Die ersten Versuche zur lokalen Transduktion wurden mit nativen D3 Zellen und einem CMV-eGFP-Lentivirus in Kombination mit dem MNP SO-Mag5 durchgeführt, um die optimale Kondition zu ermitteln. Nach Optimierung des Transduktionsprotokolls wurde mit D3 Flt1-eGFP-Zellen und dem PGK-tomato-H1-sh-SHP2-Lentivirus weitergearbeitet. Um die MNP-vermittelte Transduktion lokal durchzuführen, wurden EBs dissoziiert und auf speziellen 6well-Zellkulturplatten mit Glasboden (10^6 Zellen / well) ausgesät. Die Transduktion erfolgte an Tag 8 nach der Dissoziation. Um eine lokale Transduktion zu erreichen, wurde die Zellkulturplatte in einer Halterung über einer 1mm-Magnetspitze positioniert. Diese Konstruktion wurde auf einem Schüttler platziert. Für die Transduktion wurde auf Grund der kleineren zu transduzierenden Fläche mit $3,865 \times 10^7$ VP beziehungsweise $1,9325 \times 10^7$ eine geringere Virusmenge verwendet als bei der homogenen Transduktion (vgl. 2.2.19). Die Fe-Menge pro VP blieb mit 300 fg konstant. LV und MNPs wurden bei RT für 20 min in HBSS^{+/+} inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch die LV-MNP-Suspension ersetzt. Die Zellen wurden über der Magnetspitze auf dem Schüttler positioniert und für 10 min mit 125 rpm geschüttelt. Danach wurden sie einmal mit HBSS^{+/+} gewaschen. Nach der Zugabe von

frischem Medium wurden sie aus der Halterung entnommen und in den Inkubator überführt.

2.3 *Ex-vivo*-Aortenperfusion

Die Versuche zur *Ex-vivo*-Perfusion sowie die anschließende Verarbeitung der Aorten (Fixierung, Kryokonservierung, Gefrierschnitte, Färbungen) wurden von S. Vosen (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt. Verwendet wurde die 8 - 12 Wochen alte CD1-Wildtyp-Mäuse (bezogen über Charles River, Sulzfeld, Deutschland), denen die Aorta entnommen und mit Hilfe eines Drahtes ($d = 1 \text{ mm}$) deendothelialisiert wurde. Die Aorta wurde dann auf zwei stumpfe, in einer Perfusionskammer positionierte Kanülen aufgezogen. Zum Verschließen der Intercostalgefäße wurden diese mit einem LötKolben kauterisiert. Die Perfusionskammer wurde mit $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem DMEM ohne weitere Zusätze gefüllt und die Magnethalterung, an/um die Aorta gelegt. Nach Anschließen der Perfusionskammer an die *Ex-vivo*-Perfusionseinheit, bestehend aus einer Rollerpumpe und einem Schlauchsystem, wurde die Perfusion gestartet. $10 \text{ ml } 37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes DMEM wurden in die *Ex-vivo*-Perfusionseinheit gefüllt und von der Pumpe mit einer Geschwindigkeit von $4,5 \text{ ml / min}$ weitergeleitet. 2×10^5 Zellen in $800 \text{ } \mu\text{l}$ Endothelzellmedium wurden in die Perfusionseinheit injiziert und für 30 min durch die Aorta perfundiert. Nach 30 min wurde die Perfusion gestoppt und das Ergebnis mit einem Stereomikroskop dokumentiert. Für weitere Analysen wurden Cryoschnitte und immunhistochemische Färbungen von der Aorta angefertigt.

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um bPAECs, welche mit MNPs und einem CMV-eGFP-Lentivirus wie unter 2.2.4 und 2.2.6 beschrieben beladen und transduziert wurden. Versuchsabhängig wurden sie 72 h beziehungsweise 120 h nach Transduktion wie unter 2.2.2 beschrieben abgelöst und für die Perfusion verwendet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus kleineren Proben (bis zu 5×10^5 Zellen) erfolgte mit Hilfe des Kits RNeasy Micro von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Bei größeren Proben wurde das TRIzol[®]-Reagenz verwendet. Dieses Verfahren basiert auf dem von Chomczynski und Sacchi 1987 beschriebenen Protokoll¹³⁵. Die Zellen wurden in $1 \text{ ml TRIzol}^{\text{®}}$ abgeschabt und in ein $1,5\text{ml}$ -Reaktionsgefäß überführt. Nach

fünfminütiger Inkubation bei RT wurde den Proben 100 µl 3-Bromo-3-chloro-propan (oder alternativ Chloroform) zugegeben und sie wurden für 30 s geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 min mit 11800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt lagen drei Phasen vor: eine untere phenol- und chloroformhaltige Phase (rot, klar), in der die Proteine gelöst sind, eine DNA-haltige Interphase (weiß, trüb) und eine wässrige, oberer Phase (farblos, klar), in welcher die RNA gelöst ist. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, nach Zugabe von 500 µl 2-Propanol gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min mit 11800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierte RNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Nach der Trocknung wurde die RNA in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit wurden mit Hilfe des Nanodrop Spectrophotometers bestimmt. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

2.4.2 Gelelektrophoretische Qualitätskontrolle der RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurde die benötigte Agarosemenge in MOPS-Puffer gelöst und bis zum Siedepunkt in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurde Ethidiumbromid in einer Verdünnung von 1:40000 zugefügt und das Gel in einer geeigneten Kammer gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Laufkammer mit MOPS-Puffer überführt. 200 ng RNA wurden mit RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 15 min bei 80 V und wurde anschließend mit einem Geldokumentationssystem aufgenommen.

2.4.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland).

Ansatz:

4 µl Reaktionsmix (5x)

2 µl Enzymmix (10x)

x µl RNA (100 ng)
ad 20 µl DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Synthese für 60 min bei 42 °C, bevor die Reaktion bei 85 °C für 5 min beendet wurde. Die fertige cDNA wurde kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde das RotorGene SYBR Green PCR Kit zusammen mit QuantiTect Primern, beides von Qiagen (Hilden, Deutschland), verwendet.

Ansatz:

7,5 µl SYBR Green Mastermix
1,5 µl QuantiTect Primer
0,2 µl cDNA (Verdünnung 1:10 ≈ 0,1 ng)
5,8 µl Wasser

Nach Platzierung der Proben im RotorGene-Q-PCR-Gerät wurde folgendes Programm gestartet:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	5 s
Primerhybridierung und Elongation	60 °C	10 s
	4 °C	∞

} 35 Zyklen

Zur Bestimmung der relativen Genexpression, wurde die ΔCt -Methode gewählt. Hierbei ergibt sich die relative Genexpression aus $2^{-\Delta Ct}$. Dabei ist Ct definiert als Zyklus-Schwellenwert (*Cycle Threshold*) und ΔCt als $Ct(\text{Gen von Interesse}) - Ct(\text{Referenzgen})$. Als Referenzgen wurde immer das der 18S rRNA verwendet. Um einen Vergleich zwischen unterschiedlichen qPCRs zu ermöglichen, wurde zur Auswertung immer der gleiche Schwellenwert gewählt. Sollte die PCR zusätzlich auf eine Kontrollbedingung

normalisiert werden, wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewählt. $\Delta\Delta Ct$ wurde folgendermaßen bestimmt: $\Delta Ct(\text{Versuchskondition}) - \Delta Ct(\text{Kontrollkondition})$.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation erfolgte von Zellen, die in einer 6well-Zellkulturplatte ausgesät worden waren. Das Medium wurde entfernt, die Zellen wurden einmal mit kaltem DPBS gewaschen, nach Zugabe von 100 μl RIPA-Puffer abgeschabt und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach zehnmütiger Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Wenn die Messung der Proteinkonzentration nicht direkt im Anschluss erfolgte, wurden die Proteinextrakte bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific (Thermo Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben in einer 96well-Platte. Dieses Nachweisverfahren basiert darauf, dass Cu^{2+} im alkalischen Milieu mit Proteinen Chelatkomplexe bildet und dabei zu Cu^{1+} reduziert wird. In einem zweiten Schritt bilden sich dann Chelatkomplexe aus Cu^{1+} und Bicinchoninsäure (BCA), die kolorimetrisch nachgewiesen werden.

2.5.3 Western Blot

2.5.3.1 SDS-PAGE

Zum Nachweis einzelner Proteine wurden die Extrakte nach der Laemmli-Methode gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde zuerst 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 und nach der Polymerisation 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. 10 μg (Versuche zur eNOS-Überexpression) beziehungsweise 40 μg (Versuche zum SHP2-*knockdown*) Protein pro Probe wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das polymerisierte Gel wurde in der Laufkammer mit SDS-Laufpuffer (1x) platziert und die Proben zusammen mit einem 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.

2.5.3.2 Semidry-Blot

Die aufgetrennten Proteine (vgl. 2.5.3.1) wurden, um eine nachfolgende Immundetektion einzelner Proteine zu ermöglichen, mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu wurde das Gel in Semidry-Blotpuffer auf die Nitrocellulosemembran gelegt, in der Semidry-Blotkammer auf einem ebenfalls in Puffer getränktem Filterpapier platziert und mit einem weiteren Filterpapier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei einer konstanten Spannung von 25 V.

2.5.3.3 Immundetektion

Per Immundetektion nachgewiesen wurden die Proteine eNOS, SHP2, eGFP und als Referenz sowie Ladekontrolle β -Aktin. Zuerst wurde die Membran, um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, für 30 min mit 5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers (vgl. 2.1.12.1) erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C in 5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST oder bei RT für 2 h. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Bindung des Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers (vgl. 2.1.12.2) erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurde erneut für 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper entfiel, wenn der primäre Antikörper schon mit einer Peroxidase konjugiert war.

Die Proteine von Interesse wurden über die an die Antikörper gekoppelte Peroxidase mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Die beiden Reagenzien des ECL-Analyse-Systems wurden 1:1 miteinander gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Überschüssige Lösung wurde entfernt und das Chemilumineszenzsignal mit Hilfe von Röntgenfilmen in der Dunkelkammer detektiert. Die Filme wurden für 1 min entwickelt, 1 min mit Wasser gewaschen, 1 min fixiert und anschließend getrocknet.

Die Analyse der Filme erfolgte mit der Software WCIF Image J. Ermittelt wurde die auf β -Aktin normalisierte, relative Proteinexpression.

2.5.4 LDH-Assay

Um eventuelle toxische Effekte nach Beladung beziehungsweise Transduktion von Zellen mit MNPs nachzuweisen, wurde das Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Im 96 well wurden $0,17 \times 10^5$ Zellen / well ausgesät. 12 h später wurden sie entweder, wie unter 2.2.4 beschrieben, mit MNPs beladen oder, wie unter 2.2.6 beschrieben, lentiviral transduziert. Nach dem Entfernen der LV/MNP-Suspension wurden 100 µl Endothelzellmedium auf die Zellen gegeben. Nach 72 h beziehungsweise 120 h wurde die Toxizität der Nanopartikel durch Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium gemessen. Dazu wurden pro well 100 µl Reaktionsmix zugegeben und für weitere 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion das Tetrazoliumsalz Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) zum Farbstoff Formazan reduziert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung konnte die Absorption des Formazans bei 492 nm (Referenz 620 nm) am Plattenlesegerät gemessen werden. Für die Lysekontrolle wurden native Zellen für 15 min mit Lyselösung inkubiert und dann wie die anderen Ansätze behandelt. Als weitere Kontrollen wurden Endothelzellmedium beziehungsweise unbehandelte Zellen, wie oben beschrieben, mit den Reagenzien inkubiert. Alle Ansätze wurden als Triplets gemessen

2.6 Immunhistochemische und histologische Methoden

2.6.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Zur Fixierung von Zellen wurden diese einmal mit DPBS gewaschen und 15 min bei RT mit 4 % PFA inkubiert. Anschließend wurde das PFA entfernt, einmal mit DPBS gewaschen und die Zellen wurden bis zur immunhistochemischen Färbung in DPBS bei 4 °C aufbewahrt.

Perfundierte Aorten wurden unmittelbar nach der Perfusion für eine Stunde bei RT in 4 % PFA inkubiert, anschließend mit DPBS gewaschen und kryokonserviert.

2.6.2 Indirekte immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden PFA-fixierte (vgl.2.6.1), auf Deckgläsern gewachsene Zellen verwendet. Um eine Austrocknung der Zellen zu vermeiden, wurden alle nachfolgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte für 10 min mit 0,2 % (v/v) TritonX-100

in DPBS. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch eine zwanzigminütige Inkubation mit 5 % (v/v) Eselserum (Spezies des sekundären Antikörpers) in DPBS blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper beziehungsweise mit Phalloidin-TRITC (50 µg/ml), verdünnt in DPBS mit 5 % (v/v) Eselserum, erfolgte für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS erfolgte die Inkubation mit dem Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper, verdünnt in 1 µg/ml Hoechst 33342 in DPBS, ebenfalls für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit einem Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis eingedeckt, für 24 h bei RT im Dunkeln getrocknet und danach bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.6.3 Histologische Färbungen

2.6.3.1 Preußisch Blau

Um internalisiertes Eisen in Zellen sichtbar zu machen, wurde die Preußisch-Blau-Färbung angewandt. Verwendet wurden PFA-fixierte (vgl. 2.6.1), auf Deckgläsern gewachsene Zellen. 5 % (w/v) Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung wurde unter dem Abzug 1:1 mit 5 % (v/v) HCl gemischt. Mit dieser Färbelösung wurden die Zellen für 20 min inkubiert und anschließend dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Um das Zytoplasma anzufärben, wurde eine Eosinlösung verwendet (vgl. 2.6.3.2).

Die Anfärbung des Eisens in perfundierten Aorten wurde mit Gefrierschnitten direkt auf dem Objektträger durchgeführt. Verwendet wurde die gleiche Färbelösung wie für die fixierten Zellen. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis eingedeckt und für 24 h getrocknet.

2.6.3.2 Eosinfärbung

Zur Anfärbung des Zytoplasmas wurden fixierte Zellen (vgl. 2.6.1) für 5 min bei RT mit wässriger Eosin G-Lösung (0,5 %) inkubiert. Die Zellen wurden kurz mit Aqua dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % Isopropanol, jeweils für 5 min) entwässert. Abschließend wurden die Zellen für 5 min in Xylol inkubiert und mit Entellan[®], einem wasserfreien Eindeckmedium, eingedeckt. Nach Trocknung der Färbung für 24 h bei RT erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

2.7 Mikroskopie

Für Fluoreszenzaufnahmen von immunhistochemischen Färbungen (vgl. 2.6.2) wurde ein Zeiss Observer Z1 mit Apotom, einer XBO 75 Fluoreszenzlampe und einer AxioCam MRm sowie die AxioVision-Software von Zeiss verwendet.

Für die Aufnahmen von Zellen in Kultur sowie von histologischen Färbungen (vgl. 2.6.3) wurde ein Zeiss Axiovert 200 M (mit XBO 72 Fluoreszenzlampe), einer AxioCam MRC und die AxioVision-Software von Zeiss verwendet.

2.8 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 (vgl. 2.1.1) verwendet. Zur Untersuchung der Signifikanz wurde der t-Test beziehungsweise eine Analyse der Varianz (Analysis of Variance, ANOVA, Posttest: Bonferroni, Tukey oder Dunnett) durchgeführt. Ein Effekt wurde als signifikant eingestuft, wenn $p < 0,05$ war. Alle Werte sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

2.9 Kooperationsübersicht

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

	durchgeführt von	Institut
Aortenperfusion, Gefrierschnitte und immunhistochemische Färbungen der Aorten	Sarah Vosen	Institut für Physiologie I, Universität Bonn
Viruspräparation	Dr. Katrin Zimmermann	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn
Virusbindungsstudien	Christina Trück	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn
Design der Magnetspitzen	Dr. Bernhard Gleich	Zentralinstitut für Medizintechnik, TU München
Herstellung der MNPs	Dr. Olga Mykhaylyk	Institut für Experimentelle Onkologie, TU München

Tab. 15 Kooperationsübersicht

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe magnetischer Nanopartikel Methoden zu entwickeln, die neue Therapieansätze für Dysfunktionen und eventuell auch Erkrankungen des Gefäßsystems bieten. Hierbei gab es zwei Schwerpunkte:

1. Kombination von Zellersatz- und Gentherapie zur Behandlung von Atherosklerose
2. Lokale Modulation der Angiogenese durch punktgenaue lentivirale Transduktion als Therapieansatz für Tumorerkrankungen

Um Zellersatz- und Gentherapie miteinander zu kombinieren, sollten Endothelzellen mit Hilfe von MNPs so magnetisiert werden, dass sie unter Flussbedingungen bei Applikation eines magnetischen Feldes zielgerichtet in einer Mousaorta positioniert werden konnten. Um den therapeutischen Effekt zu steigern, sollten diese Endothelzellen vorab ebenfalls mit Hilfe von MNPs lentiviral transduziert werden, sodass sie die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) überexprimieren. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, beispielsweise nach Entfernung eines atherosklerotischen Plaques, die Gefäßwand mit Endothelzellen neuzubesiedeln und dadurch die Gefäßfunktion wiederherzustellen.

Bezüglich der lokalen Modulation der Angiogenese wurde ein anderer Ansatzpunkt verfolgt. Komplexe aus MNPs und lentiviralen Vektoren (LVs) wurden mit einem lokalen Magnetfeld kombiniert, um so eine punktuelle Transduktion zu erreichen. Verwendet wurde ein lentivirales *small-hairpin*-Konstrukt, wodurch die Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 und damit die Angiogenese verringert werden sollte. Solch eine Vorgehensweise könnte beispielsweise in der Krebstherapie von Interesse sein, da sie die zielgerichtete Inhibition der Gefäßbildung in Tumoren ermöglichen würde.

Für die Kombination von Zellersatz- und Gentherapie werden MNPs benötigt, die Endothelzellen magnetisieren und die lentivirale Transduktionseffizienz steigern. Die beiden Anwendungsbereiche Magnetisierung und Transduktion stellen unterschiedliche Anforderungen an die physikalischen Eigenschaften der MNPs. Für die Magnetisierung ist ein starkes magnetisches Moment erforderlich, für die Transduktion eine hohe Virusbindungskapazität. Entsprechend war der erste Schritt, unterschiedliche MNPs hinsichtlich dieser Eigenschaften zu untersuchen.

3.1 Verwendung von NDT-Mag1 und PEI-Mag2 zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um geeignete MNPs zur Magnetisierung und Transduktion von Endothelzellen zu identifizieren, ihre Eigenschaften zu charakterisieren und zu testen, ob zwei unterschiedliche MNPs miteinander kombiniert werden können. Das angestrebte Ziel war, die Zellen zum einen so zu magnetisieren, dass sie unter Flussbedingungen in einem Gefäß zurückgehalten werden konnten, und zum anderen ein funktionelles Transgen effizient in ihr Genom zu integrieren. Durch die Expression dieses Transgens sollte die Gefäßfunktion unterstützt beziehungsweise verbessert werden.

Alle Versuche wurden mit bovinen Endothelzellen aus der Pulmonararterie (*bovine pulmonary artery endothelial cells*, bPAECs) durchgeführt, da diese im Vergleich zu humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (*human umbilical vein endothelial cell*, HUVECs) schneller proliferieren.

3.1.1 Identifizierung geeigneter Nanopartikel zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen

Zur Bestimmung der Magnetisierungseffizienz wurden bPAECs mit 25 pg Eisen (Fe) / Zelle beladen. Nach Rücksprache mit Dr. O. Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München) wurden auf Grund ihrer Beschichtung und ihrer magnetischen Eigenschaften PALD1-Mag4, PALD2-Mag1, PEI-Mag2 und NDT-Mag1 (vgl. Tab. 11 und Tab. 12) verwendet. Die Analyse der Magnetisierungseffizienz erfolgte 12 h nach MNP-Applikation mit Hilfe eines Magnetständers für 1,5ml-Reaktionsgefäße (Abb. 10 A). Durch die an der Rückwand des Reaktionsgefäßes anliegenden Magnete wurde die Zellsuspension in eine magnetische und eine nicht-magnetische Fraktion getrennt, sodass der relative Anteil magnetischer Zellen bestimmt werden konnte. Die beste Magnetisierungsrate von $80,00 \pm 0,71$ % wurde mit NDT-Mag1 erreicht (Abb. 10 B). Nach Beladung mit PALD2-Mag1 beziehungsweise PEI-Mag2 wurden signifikant weniger Zellen zurückgehalten ($72,00 \pm 0,41$ beziehungsweise $69,00 \pm 3,72$). Die geringste Magnetisierungseffizienz zeigte PALD1-Mag4 mit einem Anteil von $4,75 \pm 2,43$ % magnetischer Zellen

Die Analyse der Virusbindungskapazität wurde durchgeführt von C. Trück (AG Pfeifer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn). Hierzu wurden ein lentivirales Konstrukt und MNPs im Verhältnis von 1, 10, 30, 100, 300 oder 1000 fg Fe pro Viruspartikel (VP) miteinander inkubiert. Das ungebundene Virus wurde mit einem p24-ELISA

nachgewiesen. Davon ausgehend, dass das restliche Virus gebunden vorliegt, wurden Virusbindungskurven erstellt. Diese sind in Abb. 10 C dargestellt. PEI-Mag2 zeigte die beste Virusbindung: Bei einem Verhältnis von 30 fg Fe / VP waren 100 % des Virus gebunden. Mit den Partikeln PALD1-Mag4 beziehungsweise PALD2-Mag1 wurde eine maximale Virusbindung von 88 % beziehungsweise 85 % erreicht. Allerdings war hier das Eisen-VP-Verhältnis mit 1000 fg Eisen / VP für PALD1-Mag4 beziehungsweise 150 fg Fe / VP für PALD2-Mag1 höher als bei PEI-Mag2. Die schwächsten Bindungseigenschaften zeigte NDT-Mag1: Bei einem Verhältnis von 1000 fg Fe / VP, waren 36 % des Virus gebunden.

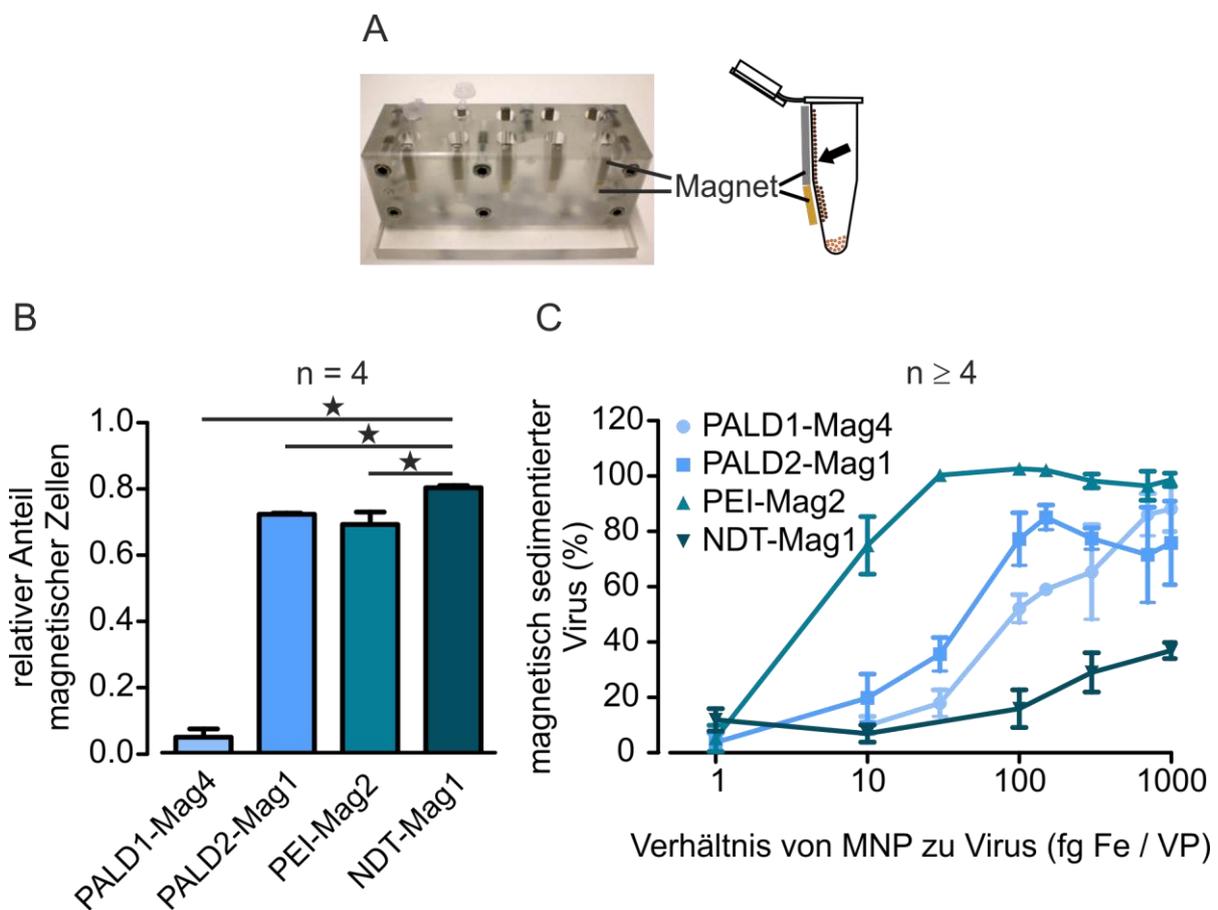


Abb. 10 Identifizierung von MNPs zur optimalen Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von bPAECs. (A) Schematische Darstellung des Magnetständers zur Selektion MNP-beladener, magnetischer Zellen. (B) Magnetisierungseffizienz von PALD1-Mag4-, PALD2-Mag1-, PEI-Mag2- und NDT-Mag1-beladenen bPAECs (25 pg Eisen / Zelle); *p < 0,05. (C) Virusbindungskapazität in Abhängigkeit vom Eisen-VP-Verhältnis. Durchgeführt von C. Trück (AG Pfeifer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sich NDT-Mag1 (NDT) zur Magnetisierung von bPAECs eignet, PEI-Mag2 (PEI) hingegen zur Transduktion. Folglich sollte eine

Kombination beider MNPs Endothelzellen erfolgreich magnetisieren und effizient transduzieren. Um die Kombination beider MNPs zu testen, wurden in den nachfolgenden Versuche bPAECs zur Magnetisierung zuerst mit 25 pg Fe NDT / Zelle beladen und anschließend mit 40 fg Fe PEI / VP transduziert (entspricht etwa 3,5 pg Fe / Zelle). In Kontrollansätzen wurden die Zellen nur mit einem MNP behandelt. Sie wurden also entweder mit 25 pg Fe / Zelle beladen oder mit 40 fg Fe / VP transduziert.

3.1.2 Magnetisierung von Endothelzellen mit NDT-Mag1 und/oder PEI-Mag2

Um die Magnetisierungseffizienz der Kombination von NDT und PEI im Detail zu untersuchen, wurden bPAECs mit dem entsprechenden MNP allein oder Komplexen aus lentiviralem Vektor und MNP (LV/MNP) für 30 min auf einer Magnetplatte beladen. Im Falle einer Kombination beider MNPs wurden die Zellen zunächst mit NDT inkubiert und 12 h später mit LV/PEI-Komplexen transduziert. Für alle Versuche wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) von 20 und ein lentivirales CMV-eGFP-Konstrukt verwendet. Die Auswertung erfolgte 72 h nach der Transduktion, da zu diesem Zeitpunkt von einer Transgenexpression ausgegangen werden konnte.

Zur ersten Einschätzung der intrazellulären MNP-Aufnahme wurde eine Preußisch-Blau-Färbung durchgeführt (Abb. 11 A-F). Eine Transduktion der Zellen mit 40 fg Fe PEI / VP (LV/PEI(0,04)) oder 40 fg Fe NDT / VP (LV/NDT(0,04)) resultierte in einer geringen intrazellulären Eisenaufnahme (Abb. 11 A, B). Wurden die Zellen hingegen mit 25 pg Fe PEI / Zelle (PEI(25)) oder 25 pg Fe NDT / Zelle (NDT(25)) beladen, konnte mehr Eisen in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11 C, D). Eine Vorbeladung mit 25 pg Fe NDT / Zelle und anschließender Transduktion mit 40 fg Fe PEI / VP (NDT(25) + LV/PEI(0,04)) erhöhte die Eisenaufnahme im Vergleich zu NDT(25) nicht.

Um das Ergebnis der Preußisch-Blau-Färbung zu bestätigen, wurde der Eisengehalt pro Zelle entweder mittels MPS-Messung (*magnetic particle spectroscopy*, vgl. 2.2.8) oder über die magnetische Ansprechbarkeit (vgl. 2.2.7) der Zellen ermittelt. Für LV/PEI(0,04)- und LV/NDT(0,04)-transduzierte Zellen kam wegen des geringen Eisengehaltes pro Zelle die sensitivere MPS-Messung zum Einsatz. Der Eisengehalt von PEI(25)- und NDT(25)-beladenen Zellen sowie von Zellen, die mit einer Kombination beider Partikel erst magnetisiert und dann transduziert worden waren (NDT(25) + LV/PEI(0,04)), wurde hingegen über die magnetische Ansprechbarkeit der Zellen bestimmt. Die Inkubation mit PEI(25) resultierte in einer Eisenaufnahme von etwa 3,6 pg Fe / Zelle (Abb. 11 G). Die

Applikation von NDT(25) führte unabhängig von der anschließenden Transduktion mit LV/PEI(0,04) zu einer Aufnahme von ungefähr 8 pg Fe / Zelle. Nach Transduktion mit LV/PEI(0,04) oder LV/NDT(0,04) konnte ein Eisengehalt von 0,5 - 0,6 pg Fe / Zelle nachgewiesen werden.

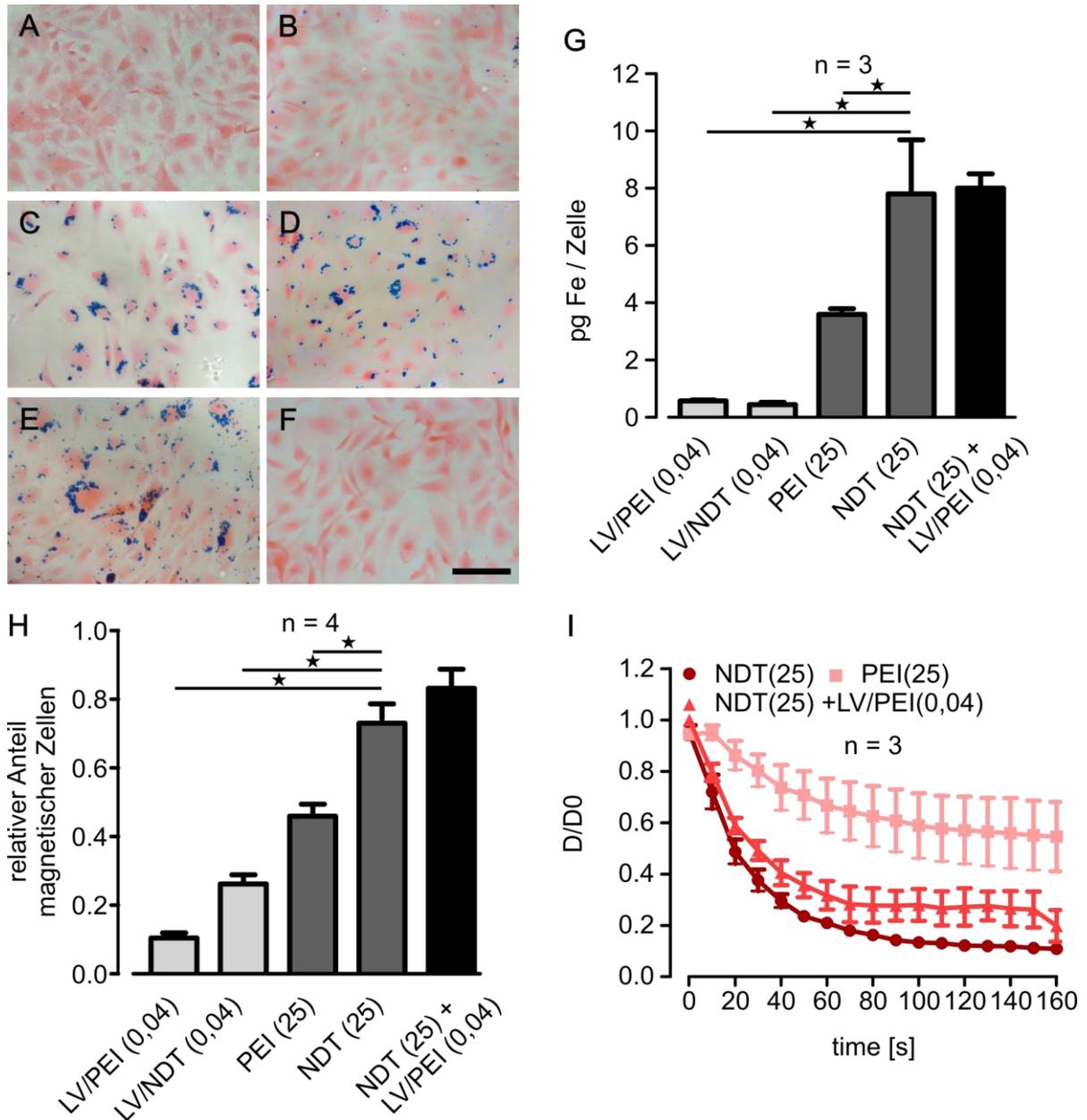


Abb. 11 Analyse der magnetischen Eigenschaften von bPAECs nach der Beladung mit NDT und/oder PEI. (A-F) Preußisch-Blau-Färbung des internalisierten Eisens von MNP-beladenen Zellen; rot = Eosin, blau: Eisen, Maßstabsbalken = 50 μ m, (A) LV/PEI(0,04), (B) LV/NDT(0,04), (C) PEI(25), (D) NDT(25), (E) NDT(25) + LV/PEI(0,04), (F) native bPAECs. (G) Eisengehalt in pg / Zelle ermittelt durch MPS-Messung (LV/PEI(0,04), LV/NDT(0,04)) oder über die magnetische Ansprechbarkeit der Zellen (PEI(25), NDT(25), NDT(25) + LV/PEI(0,04)). (H) Analyse der Magnetisierungseffizienz mit Hilfe des Magnetständers; *p < 0,05. (I)

Sedimentationskurven von beladenen und transduzierten bPAECs in einem magnetischen Feld. Durchgeführt in Kooperation mit Dr. O. Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München)

Das Verhalten der beladenen Zellen in einem Magnetfeld wurde mit Hilfe zweier Verfahren analysiert. Zum einen wurden die Magnetisierungseffizienz der einzelnen Konditionen mit dem unter 3.1.1 erwähnten Magnetständer (Abb. 10 A) ermittelt. Mit dieser Methode konnten nach Applikation von LV/PEI(0,04) und LV/NDT(0,04) $10,5 \pm 1,44$ % beziehungsweise $26,25 \pm 2,66$ % der Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes zurückgehalten werden (Abb. 11 H). Eine Erhöhung der applizierten Eisenmenge von $3,5$ pg Fe / Zelle, welche bei einer Transduktion mit LV/MNP(0,04) ohne Vorbeladung vorliegt, auf 25 pg Fe / Zelle erhöhte den Anteil magnetischer Zellen auf $46,5 \pm 3,75$ % (PEI(25)) beziehungsweise auf $73 \pm 4,45$ % (NDT(25)). Durch die Kombination von NDT und PEI wurde eine Magnetisierungsrate von $83,25 \pm 5,54$ % erreicht. Damit lag nach Beladung mit NDT(25) + LV/PEI(0,04) ein signifikanter Unterschied zu allen anderen Konditionen außer NDT(25) vor. Zum anderen wurde die magnetische Ansprechbarkeit NDT- und PEI-beladener Zellen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abb. 11 I). Zellen, die entweder nur mit NDT(25) beladen oder anschließend noch mit LV/PEI(0,04) transduziert wurden, reagierten schneller auf ein magnetisches Feld, als solche, die mit PEI(25) beladen worden waren. Entsprechend wiesen PEI(25)-beladene Zellen ein magnetisches Moment von $2,2 \pm 0,1 \times 10^{-13}$ Am² auf, Zellen, die mit NDT(25) oder der Kombination beider Partikel behandelt wurden, hingegen $5,6 \pm 0,8 \times 10^{-13}$ Am² beziehungsweise $5,8 \pm 0,4 \times 10^{-13}$ Am².

Zusammenfassend betrachtet, führte die alleinige Transduktion mit LV/PEI(0,04) oder LV/NDT(0,04) sowie die Beladung mit PEI(25) zu einer schwachen Magnetisierung der Zellen. Eine Beladung mit NDT(25) oder die Verwendung einer Kombination aus NDT(25) zur Magnetisierung und LV/PEI(0,04) zur Transduktion hingegen magnetisierte die Zellen ausreichend, um sie in einem der hier verwendeten magnetischen Felder zurückzuhalten.

3.1.3 Lentivirale Transduktion von Endothelzellen mit NDT-Mag1 und/oder PEI-Mag2

Zur Überprüfung des Einflusses der ausgewählten MNPs auf die Transduktionseffizienz wurden bPAECs mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt mit oder ohne MNPs transduziert (MOI 20). Die Analyse der eGFP-Expression erfolgte 72 h nach der Transduktion.

Gewählt wurden folgende Ansätze: lentivirale Transduktion für 30 min ohne MNPs (LV 30'), lentivirale Transduktion über Nacht ohne MNPs (LV ün), Transduktion mit 40 fg Fe PEI oder NDT / VP ((LV/PEI(0,04), LV/NDT(0,04)), Transduktion mit einer NDT-Menge, die 25 pg Eisen pro Zelle entspricht (LV/NDT(25)) oder Vorbeladung der Zellen mit 25 pg Fe NDT / Zelle und anschließende Transduktion mit 40 fg Fe PEI / VP (NDT(25) + LV/PEI(0,04)).

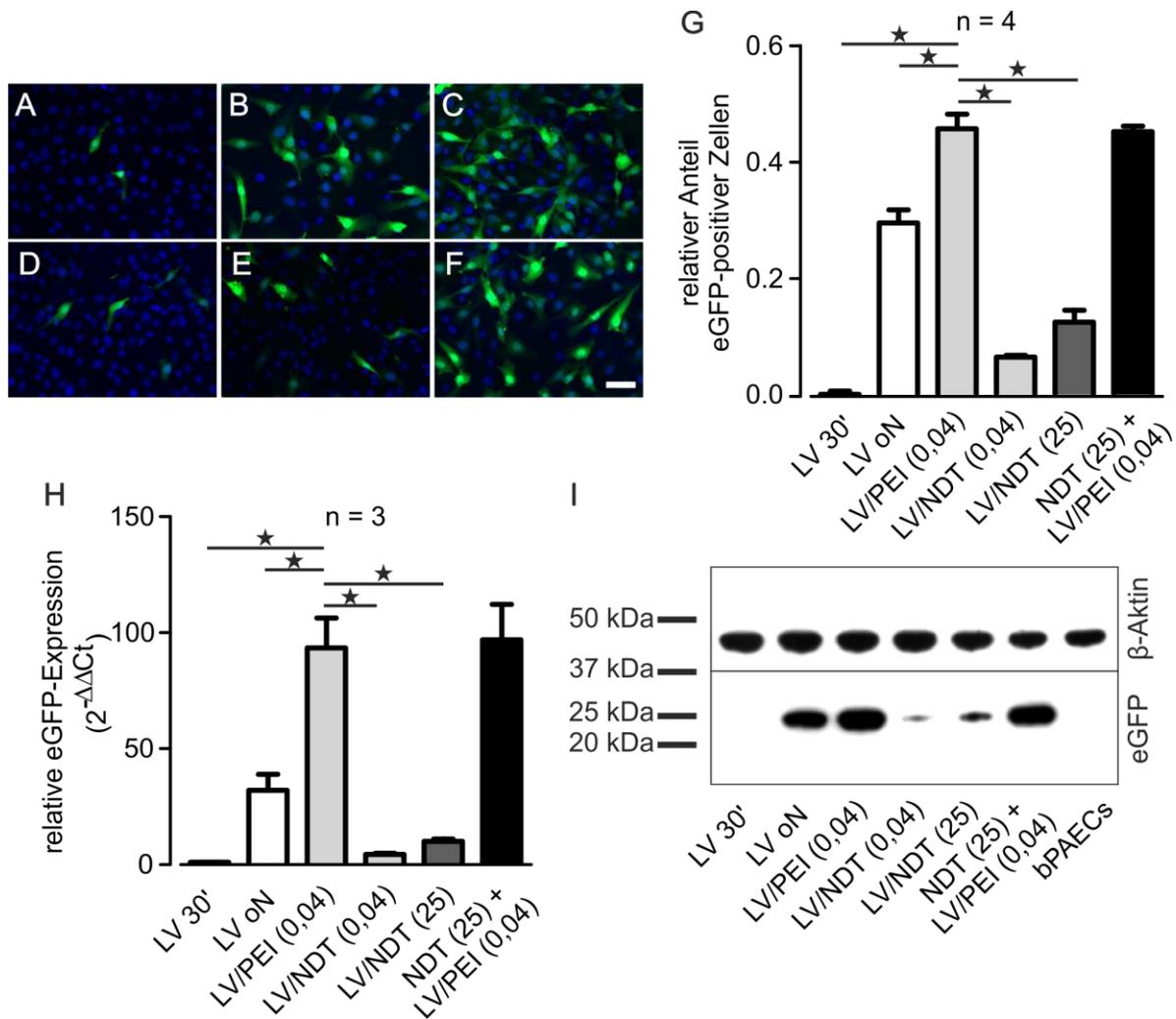


Abb. 12 Analyse der eGFP-Expression 72 h nach LV/NDT- oder LV/PEI-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 20). (A-F) Fluoreszenzaufnahmen von bPAECs; blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μ M, (A) LV 30', (B) LV ün, (C) LV/PEI(0,04), (D) LV/NDT(0,04), (E) LV/NDT(25)), (F) NDT(25) + LV/PEI(0,04). (G) Quantifizierung der Transduktionseffizienz durch Auszählen eGFP-positiver Zellen; *p < 0,05. (H) Analyse der eGFP-Expression auf mRNA-Ebene via qRT-PCR; *p < 0,05. (I) Analyse der eGFP-Expression auf Proteinebene via Western Blot.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abb. 12 A-F) zeigten, dass die Anzahl eGFP-positiver Zellen abhängig vom gewählten Ansatz variierte. Die quantitative Auswertung ergab

für LV/PEI(0,04) mit $45,75 \pm 2,5$ % den höchsten Anteil eGFP-exprimierender Zellen (Abb. 12 G). Die Vorbeladung mit 25 pg NDT pro Zelle beeinflusste dieses Ergebnis nicht signifikant (NDT(25) + LV/PEI(0,04): $45,25 \pm 0,95$). Bei der lentiviralen Standardtransduktion über Nacht ohne MNPs exprimierten $29,5 \pm 2,26$ % Zellen eGFP. Der prozentuale Anteil eGFP-positiver Zellen nach Transduktion mit LV/NDT(0,04) ($6,5 \pm 0,29$ %) und LV/NDT(25) ($12,5 \pm 2,02$ %) blieb unter diesem Wert. Die Transduktion mit Lentivirus für 30 min ohne MNPs lieferte keine nennenswerte Ausbeute transduzierter Zellen. Sowohl die Analyse der eGFP-Expression auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene bestätigten dieses Ergebnis. Die Transduktion mit NDT(25) + LV/PEI(0,04) steigerte das eGFP-mRNA-Level signifikant im Vergleich zu allen anderen Konditionen außer LV/PEI(0,04) (Abb. 12 H). Auf Proteinebene zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 12 I). Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass LV/PEI(0,04) mit oder ohne NDT-Vorbeladung die Transduktionseffizienz im Vergleich zur Standardtransduktion über Nacht ohne MNPs steigerte, dass allerdings weder LV/NDT(0,04) noch LV/NDT(25) zur lentiviralen Transduktion geeignet waren.

3.1.4 Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen nach Behandlung mit NDT-Mag1 und PEI-Mag2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich bPAECs mit NDT magnetisieren lassen, PEI zur Transduktion verwendet werden kann und eine Kombination die Vorteile beider MNPs miteinander vereint, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Behandlung mit NDT und/oder LV/PEI-Komplexen für Endothelzellen toxisch ist oder sich negativ auf zellspezifische Charakteristika auswirkt. Alle Transduktionsversuche wurden erneut mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt und einer MOI von 20 durchgeführt.

Zum Ausschluss der Toxizität wurde die Menge an Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium 24 h nach Beladung mit NDT(25), LV/PEI(0,04) oder der Kombination NDT(25) + LV/PEI(0,04) kolorimetrisch bestimmt. Die gemessenen Werte wurden als prozentualer Anteil der Lysekontrolle angegeben. Keine der verwendeten Konditionen wies einen signifikanten Unterschied zu nativen Zellen auf (Abb. 13 A). Wurde allerdings die MNP-Menge zur Beladung der Zellen von 25 pg / Zelle auf 100 pg / Zelle erhöht, konnte ein signifikanter Anstieg der LDH von $13,13 \pm 3,22$ (NDT(25)) auf $28,88 \pm 2,49$ (NDT(100)) und damit ein toxischer Effekt beobachtet werden.

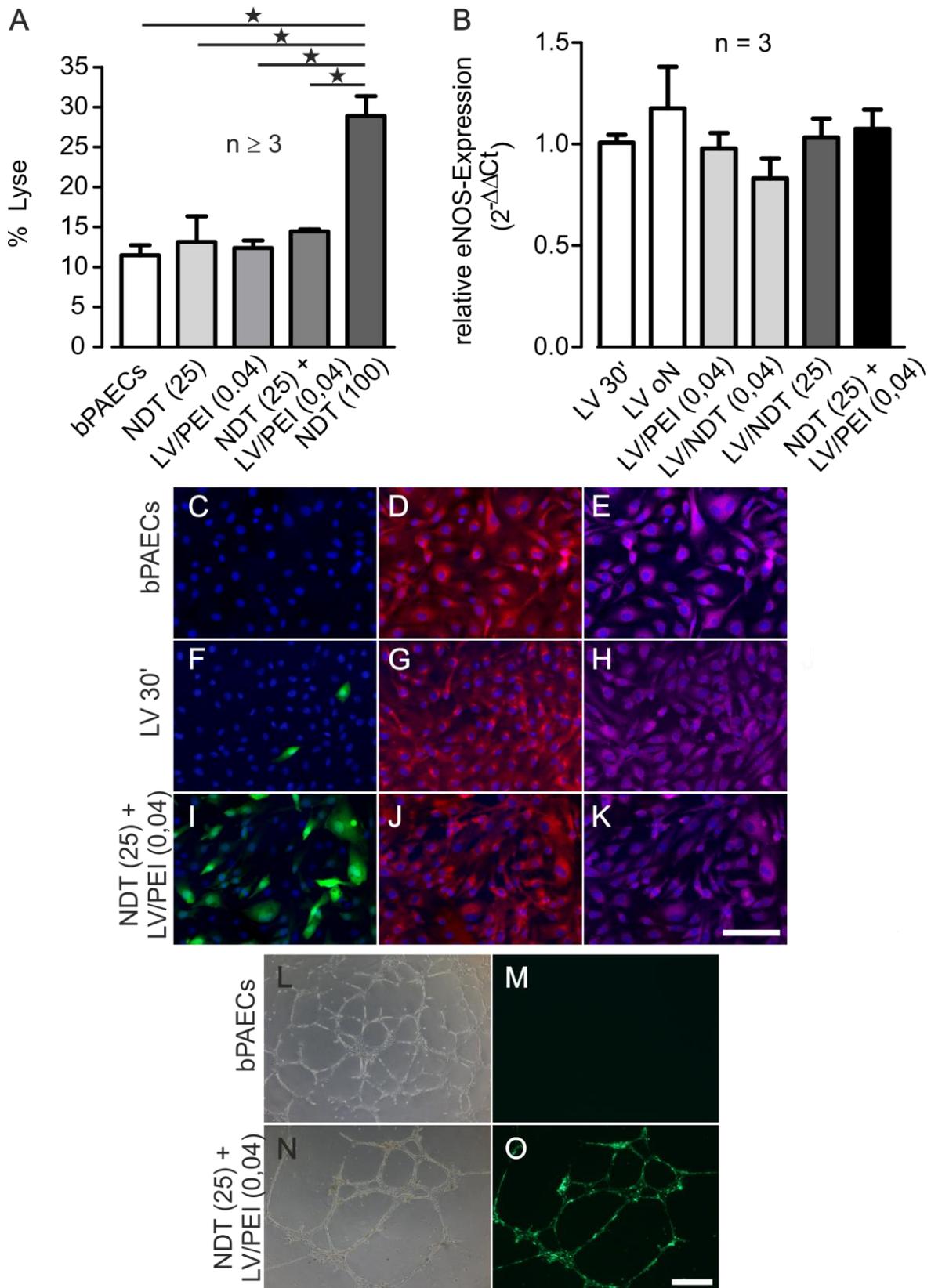


Abb. 13 Viabilität und zellbiologische Eigenschaften von bPAECs nach Vorbeladung mit NDT und LV/PEI-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 20). (A) Bestimmung der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) nach Behandlung von bPAECs mit NDT(25) + LV/PEI(0,04). Werte sind angegeben als prozentualer Anteil der Lyse-Kontrolle *p < 0,05. (B) Analyse der eNOS-Expression via qRT-PCR 72 h nach

der Transduktion. (C-K) Immunhistochemische Färbungen von nativen oder transduzierten bPAECs 72 h nach der Transduktion; blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = eNOS, magenta = CD31, Maßstabsbalken = 100 µm. (C-E) native bPAECs, (F-H) LV 30', (I-K) NDT(25) + LV/PEI(0,04). (L-O) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von Endothelzellnetzwerken in Matrigel, Maßstabsbalken = 500 µm. (L, M) native bPAECs, (N, O) NDT(25) + LV/PEI(0,04).

Um auszuschließen, dass sich die Beladung mit NDT(25) und die Transduktion mit LV/PEI(0,04) negativ auf endothelzellspezifische Eigenschaften auswirkten, wurde unter anderem die eNOS-Expression untersucht, da dieses Enzym entscheidend zur Endothelzellfunktion beiträgt. Mittels qRT-PCR wurde das eNOS-Expressionslevel auf mRNA-Ebene bestimmt. Weder die lentivirale Transduktion über Nacht noch die Verwendung von NDT und PEI änderte die eNOS-Expression im Vergleich zu Kontrollversuchen mit lentiviraler Transduktion für 30 min (Abb. 13 B).

Ebenfalls unbeeinflusst blieb das intrazelluläre eNOS-Expressionsmuster, welches mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen untersucht wurde (Abb. 13 C-K). Native bPAECs exprimierten eNOS schwach im Zytoplasma und punktuell verstärkt in Nähe des Zellkerns (Abb. 13 D). Diese Lokalisation wurde weder durch normale lentivirale Transduktion (Abb. 13 G) noch durch MNP-vermittelte Transduktion (Abb. 13 J) verändert.

Parallel zur eNOS-Expression wurde auch die CD31-Expression (*cluster of differentiation 31 = platelet endothelial cell adhesion molecule = PECAM-1*) immunhistochemisch analysiert, da diese ein Maß für die Endothelzellintegrität ist. Unabhängig von den Transduktionsbedingungen wurde in bPAECs eine homogene, zytoplasmatische CD31-Verteilung beobachtet (Abb. 13 E, H, K).

Als letzter Funktionalitätsparameter wurde das angiogenetische Potential MNP-beladener und transduzierter bPAECs untersucht (Abb. 13 L-O). Native bPAECs bildeten, wenn sie auf Matrigel ausgesät wurden, Netzwerke (Abb. 13 L, M). Das gleiche Verhalten konnte für NDT(25)-beladene und LV/PEI(0,04)-transduzierte Zellen beobachtet werden (Abb. 13 N, O).

Somit war in bPAECs weder die Behandlung mit NDT(25) + LV/PEI(0,04) toxisch noch wurde die Expression endothelzellspezifischer Proteine wie eNOS und CD31 oder die Fähigkeit, Netzwerke auszubilden, beeinflusst.

3.1.5 Retention NDT-Mag1-beladener Endothelzellen nach PEI-Mag2-vermittelter lentiviraler Transduktion an der Gefäßwand unter Flussbedingungen

Wie die vorangegangenen Versuche zeigten, konnte durch die Kombination von NDT und LV/PEI Endothelzellen erfolgreich magnetisiert und effizient transduziert werden. Da diese Vorgehensweise die charakteristischen Eigenschaften der Zellen nicht beeinflusste, war der nächste Schritt im Hinblick auf eine Zellersatztherapie, die Zellen in einer Mauseorta unter physiologischen Flussbedingungen *ex vivo* zurückzuhalten. Diese und alle nachfolgenden *Ex-vivo*-Perfusionen wurden in Kooperation mit S. Vosen (AG Wenzel, Institut für Physiologie 1, Universität Bonn) durchgeführt.

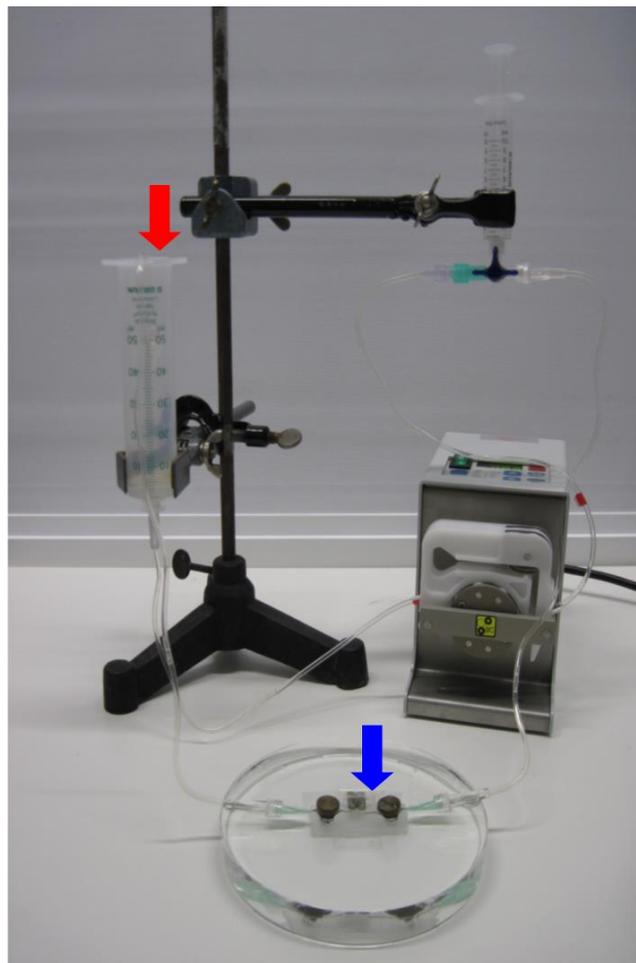


Abb. 14 Aufbau der *Ex-vivo*-Perfusionseinheit. Die *Ex-vivo*-Perfusionseinheit besteht aus der Perfusionskammer (blauer Pfeil), Rollerpumpe und Schlauchsystem. Die Injektion der beladenen und transduzierten bPAECs (NDT(25) + LV/PEI(0,04), CMV-eGFP-Konstrukt, MOI 20) erfolgte 72 h nach der Transduktion an der markierten Stelle (roter Pfeil).

Verwendet wurde eine Perfusionsanlage bestehend aus einer Perfusionskammer, einer Rollerpumpe und einem Schlauchsystem (Abb. 14). 200 000 bPAECs, die mit NDT(25) beladen und mit LV/PEI(0,04) (CMV-eGFP-Konstrukt, MOI 20) transduziert worden waren, wurden 72 h nach der Transduktion in das System injiziert (Abb. 14, roter Pfeil) und für 30 min durch eine in der Perfusionskammer auf zwei Kanülen aufgespannte Mauseorta (Abb. 14, blauer Pfeil) perfundiert. Das zur Retention der Zellen benötigte magnetische Feld wurde von zwei, der Aorta anliegenden Stabmagneten (5 x 14 mm, NdFeB, N40) generiert (Abb. 15 A).

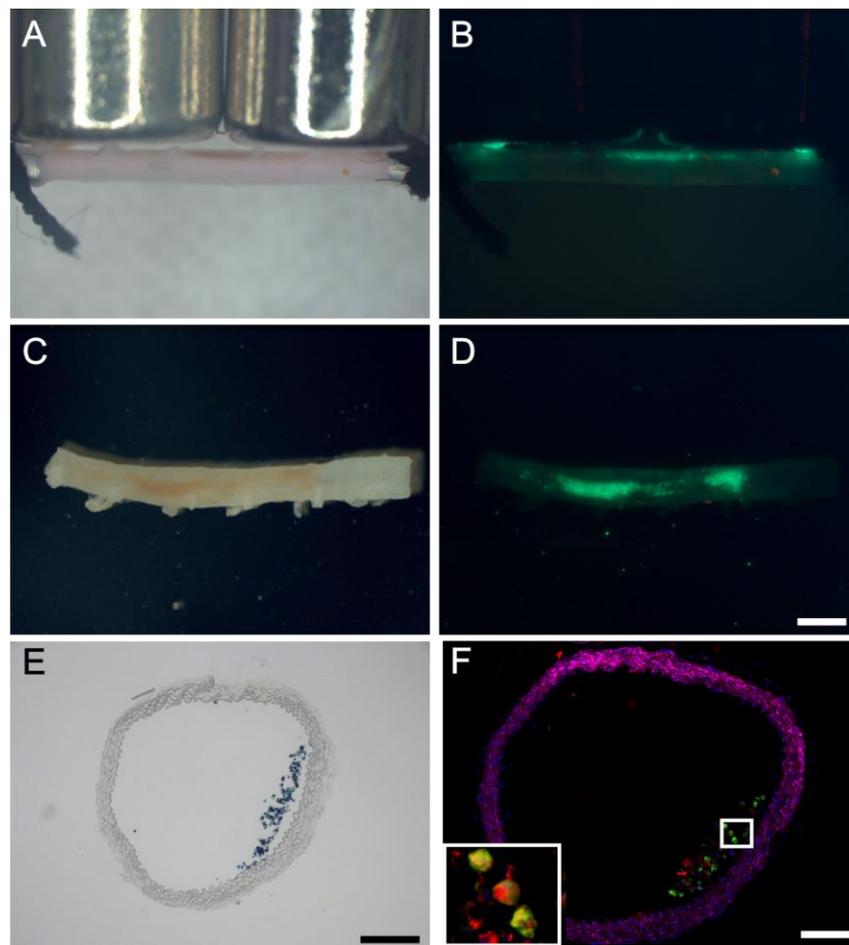


Abb. 15 Retention von bPAECs nach Vorbeladung mit NDT und LV/PEI-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt unter Flussbedingungen in einer Mauseorta. (A, B) Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen der Aorta mit den anliegenden Stabmagneten direkt nach der Perfusion; Maßstabsbalken = 1000 μ m. (C, D) Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme der Aorta außerhalb der Perfusionskammer; Maßstabsbalken = 1000 μ m. (E) Preußisch-Blau-Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; Maßstabsbalken = 200 μ m. (F) Immunhistochemische Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; blau = Hoechst, grün = eGFP, magenta = α -Aktin der glatten Muskulatur (*alpha smooth muscle actin*), rot = CD31, Maßstabsbalken = 100 μ m. Alle Aufnahmen wurden von S. Vosen zur Verfügung gestellt.

Das stereomikroskopisch dokumentierte Ergebnis der Perfusion zeigte eine lokale Ablagerung der transduzierten Zellen an der Gefäßwand, an welcher die Magnete positioniert waren (Abb. 15 A-D). Zur genaueren Analyse wurden Gefrierschnitte hergestellt, die dann zur Anfärbung des Eisens (Preußisch-Blau-Färbung) sowie für immunhistochemische Färbungen verwendet wurden (Abb. 15 E, F). Mit diesen Färbungen konnte gezeigt werden, dass die zurückgehaltenen Zellen Eisen enthielten (Abb. 15 E), eGFP-positiv waren, und CD31 exprimierten (Abb. 15 F). Eine Nahaufnahme zeigte des Weiteren, dass sich die Signale von eGFP und CD31 überlagerten, es sich bei den zurückgehaltenen Zellen also um transduzierte Endothelzellen handelte.

3.1.6 ENOS-Überexpression und funktioneller Stickstoffmonoxidnachweis in NDT-Mag1-beladenen bPAECs nach PEI-Mag2-vermittelter lentiviraler Transduktion

Wie in 3.1.5 gezeigt wurde, können bPAECs, die zuerst mit 25 pg NDT / Zelle beladen und anschließend mit 40 fg PEI / VP transduziert worden waren, durch Applikation eines Magnetfeldes unter Flussbedingungen zurückgehalten werden. Da eine Zellersatztherapie mit Endothelzellen, die lediglich eGFP exprimieren, nicht zielorientiert ist, wurde in den nachfolgenden Versuchen das bisher zur Transduktion verwendete lentivirale CMV-eGFP-Konstrukt durch ein lentivirales CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt ersetzt. Durch die Transduktion mit diesem Konstrukt sollte in transduzierten bPAECs im Vergleich zu nativen Zellen eine stärkere eNOS-Expression erreicht werden. Zusätzlich erlaubte die Verwendung des Reportergens eGFP eine Visualisierung der transduzierten Zellen.

Zuerst wurde die Transduktionseffizienz des CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstruktes in bPAECs bestimmt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 20 transduziert. Gewählt wurden die unter 3.1.3 beschriebenen Ansätze. Fluoreszenzaufnahmen 72 h nach der Transduktion (Abb. 16 A-F) vermittelten den Eindruck, dass PEI auch bei Verwendung des eNOS-Konstruktes am effizientesten transduzierte. Die Quantifizierung der eGFP-positiven Zellen bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 16 G). Nach Transduktion mit LV/PEI(0,04) waren $15,5 \pm 1,66$ % der Zellen eGFP-positiv. Die vorherige Beladung mit NDT beeinflusste dieses Ergebnis nicht signifikant (NDT(25) + LV/PEI(0,04): $13,25 \pm 1,44$ %). Weder durch die Transduktion mit LV über Nacht ($9,25 \pm 1,38$ %) noch mit LV/NDT(0,04) ($6,5 \pm 1,71$ %) oder mit LV/NDT(25) ($6,5 \pm 0,87$ %) wurde diese Transduktionsrate erreicht.

Anhand immunhistochemischer Färbungen (Abb. 16 H-P), wurde überprüft, ob sich die eNOS- und CD31-Expression 72 h nach der Transduktion mit dem eNOS-Konstrukt

verändert hatte. Die beobachtete eNOS-Expression in bPAECs entsprach dem zuvor schon beschriebenen Muster (vgl. 3.1.4). Weder lentivirale Transduktion für 30 min noch die Vorbeladung der Zellen mit NDT und die Transduktion mit Hilfe von PEI veränderten die intrazelluläre eNOS- und CD31-Lokalisation. Ein verstärktes eNOS-Signal in transduzierten Zellen deutete auf ein höheres eNOS-Expressionslevel hin (Abb. 16 O, Pfeile).

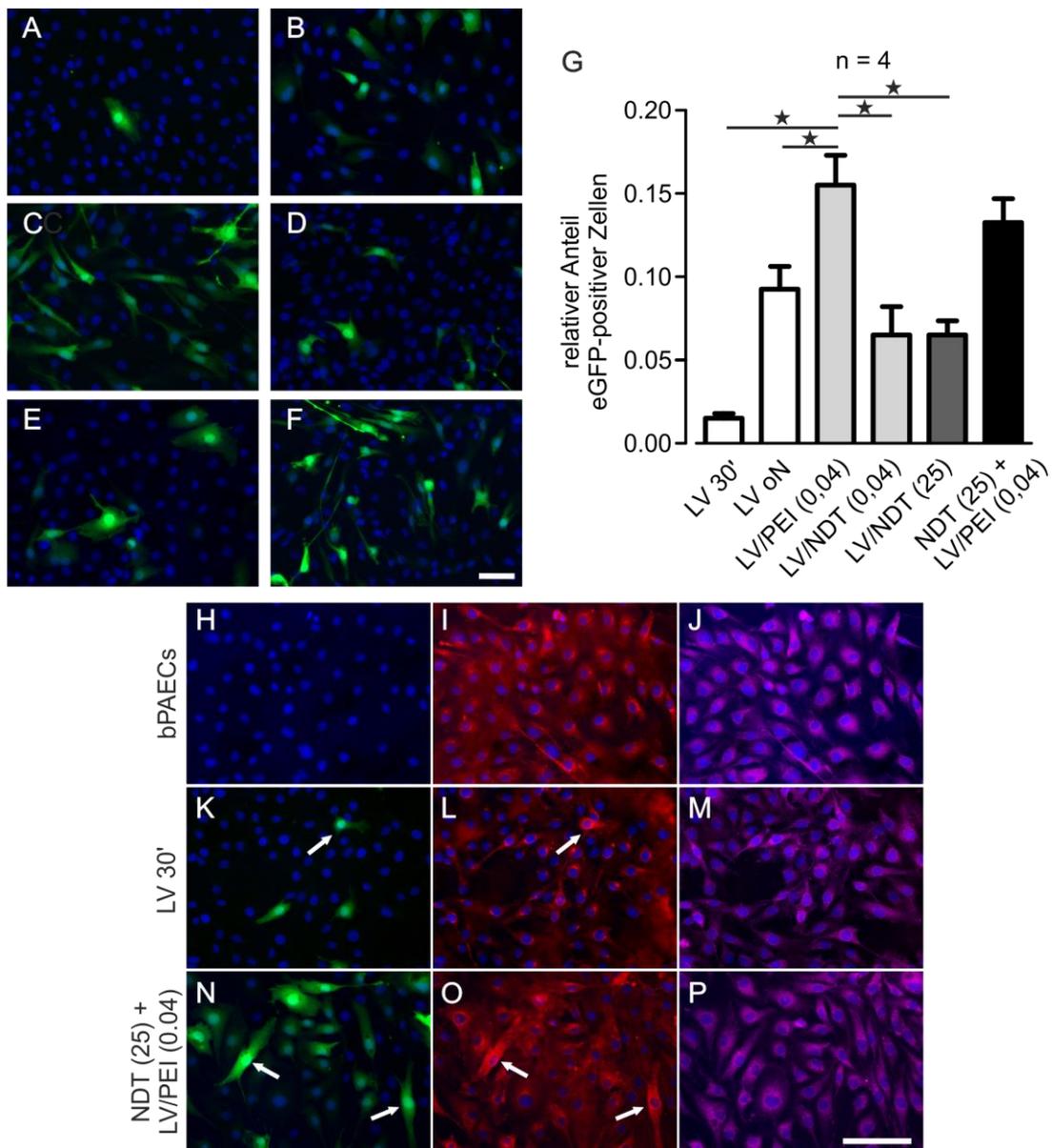


Abb. 16 Analyse der Transduktionseffizienz des lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstruktes in bPAECs 72 h nach der Transduktion (MOI 20). (A-F) Fluoreszenzaufnahmen von bPAECs; blau = Hoecht, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μ m. (A) LV 30', (B) LV ün, (C) LV/PEI(0,04), (D) LV/NDT(0,04), (E) LV/NDT(25), (F) NDT(25) + LV/PEI(0,04). (G) Quantifizierung der Transduktionseffizienz anhand eGFP-positiver bPAECs; *p < 0,05. (H-P) Immunhistochemische Färbungen von bPAECs nach Transduktion mit einem CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt.

Pfeile markieren transduzierte Zellen mit starkem eNOS-Signal; blau = Hoechst, grün = eGFP, magenta = CD31, rot = eNOS, Maßstabsbalken = 100 µm. (H-J) native bPAECs, (K-M) LV 30', (N-P) NDT(25) + LV/PEI(0,04).

Um die funktionelle Aktivität dieser überexprimierten eNOS zu bestätigen, wurde eine NO-Messung mit Diaminofluorescein (DAF) 72 h nach der Transduktion durchgeführt. Das verwendete DAF-FM reagierte mit dem freigesetzten NO zu einem fluoreszenten Benzotriazolderivat. Die gemessene Fluoreszenzintensität korrelierte mit der NO-Produktion der Zellen. Da die Anregungswellenlänge von DAF mit 485 nm nah an der von eGFP (475 nm) liegt, wurde, um eine Beeinflussung der Messung durch die Anwesenheit von eGFP von vornherein auszuschließen, zur Transduktion ein lentivirales CMV-eNOS-Konstrukt ohne eGFP-Expressionskassette gewählt. Nach Magnetisierung der Zellen mit NDT und PEI-vermittelter Transduktion konnte im Vergleich zu nativen bPAECs eine signifikant höhere NO-Produktion (1280 Einheiten im Vergleich zu 966 Einheiten) nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte nach 30-minütiger Transduktion ohne MNPs (LV 30') nicht beobachtet werden. Da die Applikation von NDT und PEI ohne LV (NDT(25) + PEI(0,04)) keinen Anstieg der NO-Produktion zur Folge hatte, konnte des Weiteren ein Effekt der MNPs auf die NO-Produktion ausgeschlossen werden (Abb. 17). Als Positivkontrolle wurde der NO-Donor Natriumnitroferrocyanid(II)-dihydrat (*sodium nitroprusside dihydrate*, SNP) verwendet.

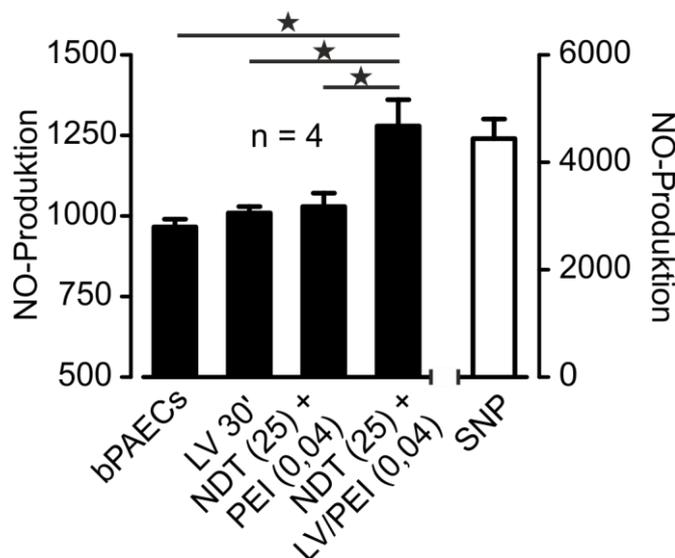


Abb. 17 Untersuchung der NO-Produktion in bPAECs 72 h nach der Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eNOS-Konstrukt (MOI 20). NO-Produktion in bPAECs nach magnetischer Vorbeladung und/oder lentiviraler Transduktion. SNP (Werte auf der rechten y-Achse) wurde als Positivkontrolle verwendet; *p < 0,05.

Die Kombination von NDT und PEI steigerte also nicht nur wie bisher gezeigt die Transduktionseffizienz mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt (vgl. 3.1.3), sondern ebenso die Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eNOS-Konstrukt. Die daraus resultierende eNOS-Überexpression konnte als erhöhte NO-Produktion gemessen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wäre eine Zellersatztherapie mit MNP-beladenen, eNOS-überexprimierenden Endothelzellen, die mit Hilfe eines magnetischen Feldes im geschädigten Gefäß zurückgehalten werden können, möglich.

3.2 Verwendung von SO-Mag5 zur Magnetisierung und lentiviralen Transduktion von Endothelzellen

Die unter 3.1 beschriebene Vorbeladung mit NDT und anschließende PEI-vermittelte Transduktion stellt eine hohe Belastung für die Zellen dar, da sie zum einen innerhalb von 12 h zweimal für jeweils 30 min in Pufferlösung statt in Medium inkubiert werden und zum anderen die Polyethyleniminbeschichtung des PEI-Partikels toxisch wirken kann¹³⁶. Um die Belastung der Zellen während Beladung und Transduktion zu minimieren und den Transduktionsprozess zu vereinfachen, wurde im Folgenden daran gearbeitet, beide Schritte kombiniert mit einem MNP ohne PEI-Beschichtung durchzuführen. In Vorversuchen erwies sich SO-Mag5 (SO) als vielversprechend.

3.2.1 Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen mit SO-Mag5

Um eine magnetische Retention der transduzierten Zellen in einer perfundierten Mausaorta zu gewährleisten, war ein kritischer Aspekt, die applizierte Eisenmenge pro Zelle konstant zu halten, um dadurch eine gleichbleibende Magnetisierung der Zellen zu garantieren. Da sich die Anzahl infektiöser Viruspartikel (IP) im Gegensatz zur Anzahl der VP proportional zur Zellzahl verhält, wurde für die Versuche mit SO eine konstante Eisenmenge pro IP statt wie bisher pro VP eingesetzt. Die Umrechnung der Transduktionsbedingungen von 40 fg Fe PEI / VP aus den vorherigen Versuchen ergab etwa 300 fg Fe PEI / IP (LV/PEI(300), ca. 15 pg Fe / Zelle). Entsprechend wurden 300 fg Fe SO / IP (LV/SO(300)) und als Vergleichskondition eine höhere Eisenmenge von 4000 fg Fe SO / IP (LV/SO(4000), ca. 200 pg Fe / Zelle) eingesetzt. Um spätere Transduktionen mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt, effizienter zu gestalten, wurde die MOI von 20 auf 50 erhöht.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Magnetisierungseigenschaften von SO analysiert. Dazu wurden bPAECs mit LV/PEI(300), LV/SO(300) beziehungsweise LV/SO(4000) unter

Verwendung eines lentiviralen CMV-eGFP-Konstruktes transduziert (MOI 50). Die Auswertung erfolgte 72 h nach der Transduktion.

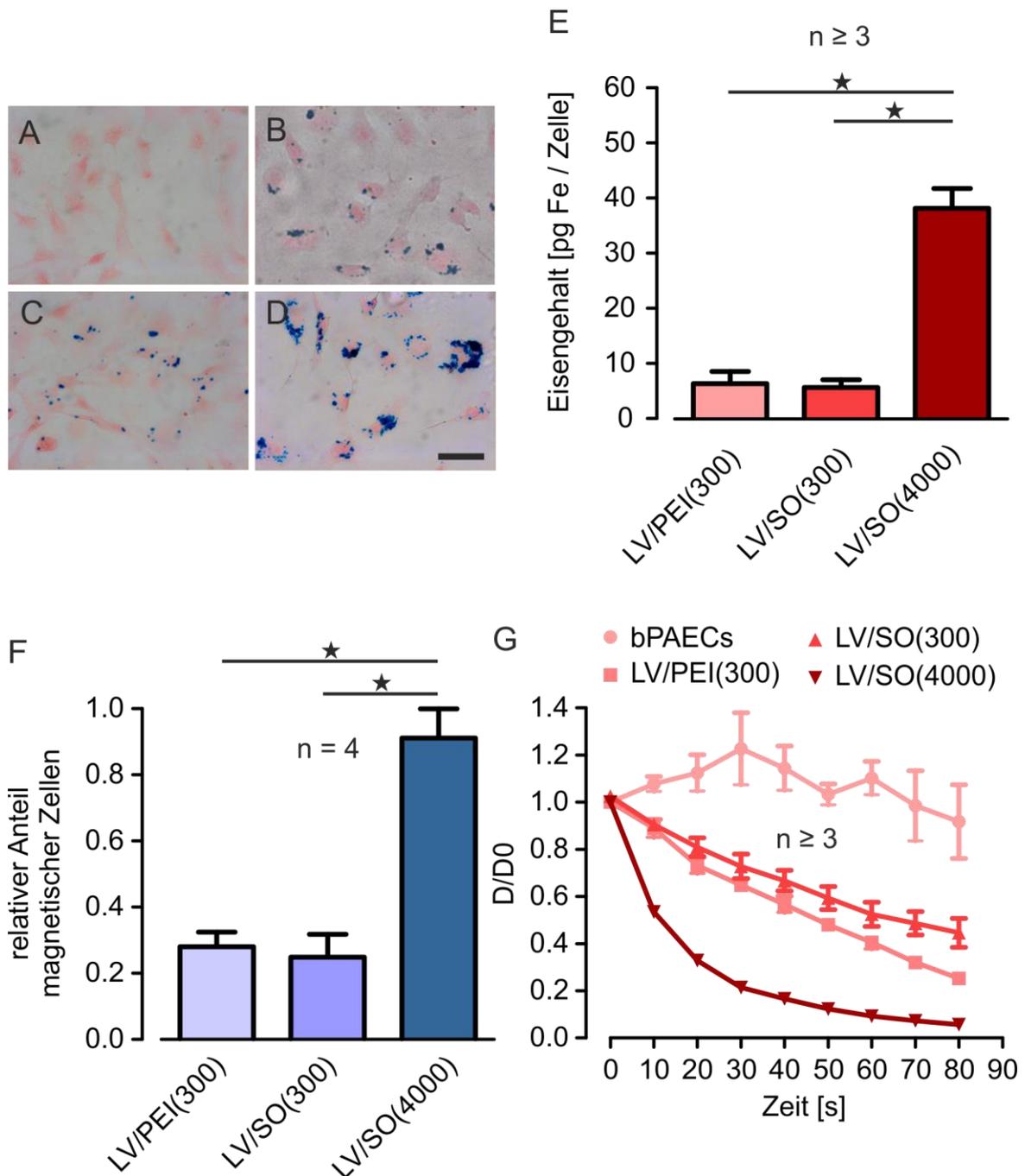


Abb. 18 Analyse der magnetischen Eigenschaften von bPAECs 72 h nach LV/SO- oder LV/PEI-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 50). (A-D) Preußisch-Blau-Färbung des internalisierten Eisens 72 h nach der Transduktion; rot = Eosin, blau = Eisen; Maßstabsbalken = 50 μ m. (A) native bPAECs, (B) LV/SO(300), (C) LV/SO(300), (D) LV/SO(4000). (E) Analyse der Magnetisierungseffizienz mit Hilfe des Magnetständers (vgl. Abb. 10 A); * $p < 0,05$. (F) Messung des Eisengehaltes in pg / Zelle mittels eines kolorimetrischen Verfahrens; * $p < 0,05$. (G) Sedimentationskurven nativer und transduzierter bPAECs in einem

magnetischen Feld. Durchgeführt in Kooperation mit Dr. O. Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München).

Histologische Färbungen (Abb. 18 A-D) zeigten eine hohe Eisenaufnahme in bPAECs, die mit LV/SO(4000) transduziert worden waren (Abb. 18 D). Dies korrelierte mit dem kolorimetrisch bestimmten Eisengehalt pro Zelle. Während der Eisengehalt in bPAECs nach der Transduktion mit LV/PEI(300) und LV/SO(300) bei etwa 6 pg Eisen pro Zelle lag, wurde nach der Transduktion mit LV/SO(4000) $44,19 \pm 6,78$ pg Eisen pro Zelle nachgewiesen (Abb. 18 E).

Die Reaktion der beladenen Zellen auf ein Magnetfeld wurde, wie auch schon bei der Verwendung von NDT und PEI (vgl. 3.1.2), mit Hilfe zweier Verfahren analysiert. Mit Hilfe des Magnettracks wurde der Anteil magnetischer Zellen quantifiziert. Nach Transduktion mit LV/SO(4000) waren $91,25 \pm 8,69$ % der Zellen magnetisiert, nach Transduktion mit LV/SO(300) oder LV/PEI(300) waren es $25 \pm 6,8$ % beziehungsweise $28,25 \pm 4,2$ %. (Abb. 18 F). Zusätzlich wurde die magnetische Ansprechbarkeit der Zellen ermittelt (vgl. 3.1.2) und in Form einer Sedimentationskurve dargestellt. Zellen, die mit LV/SO(4000) transduziert worden waren, reagierten schneller auf ein magnetisches Feld als mit LV/SO(300) oder LV/PEI(300) transduzierte Zellen (Abb. 18 G).

Anschließend wurde die SO-vermittelte im Vergleich zur PEI-vermittelten Transduktion betrachtet. Verwendet wurde ein lentivirales CMV-eGFP-Konstrukt. In Fluoreszenzaufnahmen 72 h nach der Transduktion (Abb. 19 A-E) ließ sich visuell kein Unterschied zwischen den Konditionen LV/PEI(300) und LV/SO(4000) feststellen (Abb. 19 C, E). Die Quantifizierung der eGFP-positiven Zellen bestätigte diese Vermutung. Nach Transduktion mit LV/PEI(300) waren $69,07 \pm 1,73$ % der Zellen eGFP-positiv. Die Verwendung von LV/SO(300) und LV/SO(4000) lieferte $59,13 \pm 4,13$ % beziehungsweise $67 \pm 4,11$ % eGFP-positive Zellen. Damit war sowohl die Transduktion mit LV/PEI(300), LV/SO(300) als auch die mit LV/SO(4000) signifikant effizienter als die Standardtransduktion mit Applikation des Lentivirus ohne MNPs über Nacht ($27,38 \pm 3,38$ %), unterschieden sich in ihrem Transduktionsergebnis aber nicht voneinander.

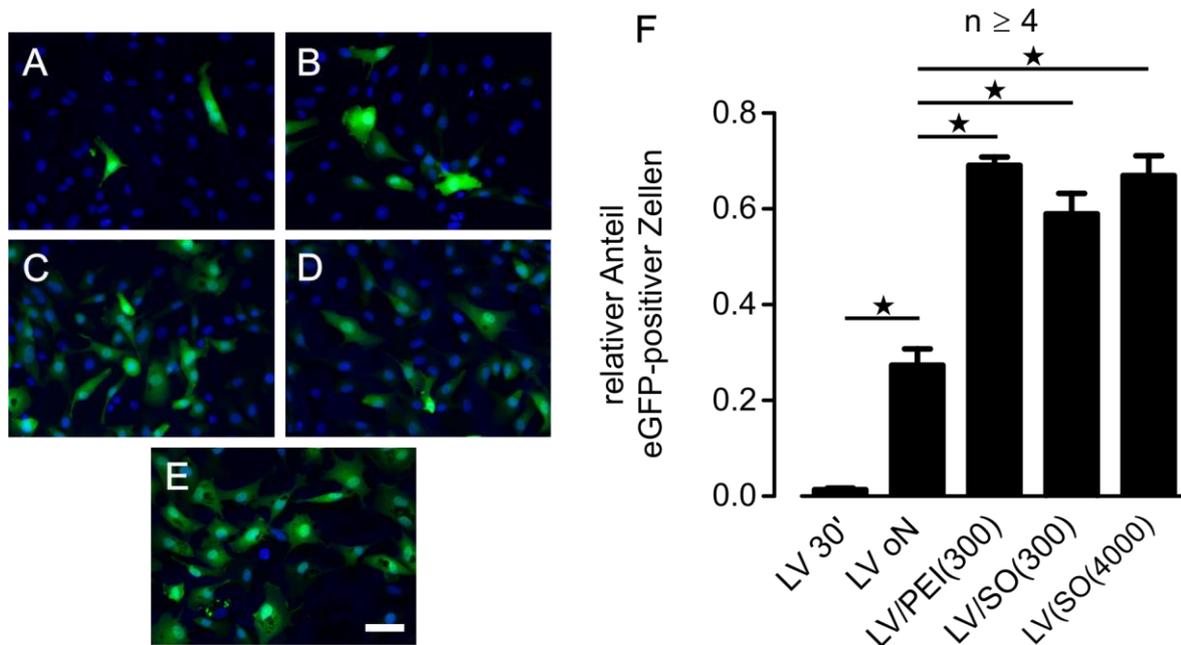


Abb. 19 Analyse der LV/SO-vermittelten Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt in bPAECs 72 h nach der Transduktion (MOI 50). (A-E) Fluoreszenzaufnahmen transduzierter bPAECs; blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μ m. (A) LV 30', (B) LV üN, (C) LV/PEI(300), (D) LV/SO(300), (D) LV/SO(4000). (F) Quantifizierung der Transduktionseffizienz anhand eGFP-positiver Zellen; *p < 0,05.

Fasst man die hier beschriebenen Ergebnisse zusammen, so eignet sich im Hinblick auf die Retention transduzierter Zellen unter Flussbedingungen die Verwendung von LV/SO(4000). Sie weist das höchste Magnetisierungspotential auf und transduziert effizient. Entsprechend wurden die weiterführenden Versuche mit dieser Kondition durchgeführt.

3.2.2 Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen 72 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Die Transduktion mit 4000 fg SO / IP mit einer MOI von 50 entspricht einer applizierten Eisenmenge von 200 pg / Zelle. Um auszuschließen, dass diese Eisenmenge zytotoxisch ist oder sich auf endothelzellspezifische Eigenschaften wie die eNOS-Expression oder das angiogenetische Potential der Zellen auswirkt, wurden immunhistochemische Färbungen und ein Matrigel-basierter Angiogeneseassay durchgeführt. Für alle Versuche wurden bPAECs mit LV/SO(4000) und einem CMV-eGFP-Konstrukt transduziert (MOI 50). Die Analyse wurde 72 h nach der Transduktion durchgeführt.

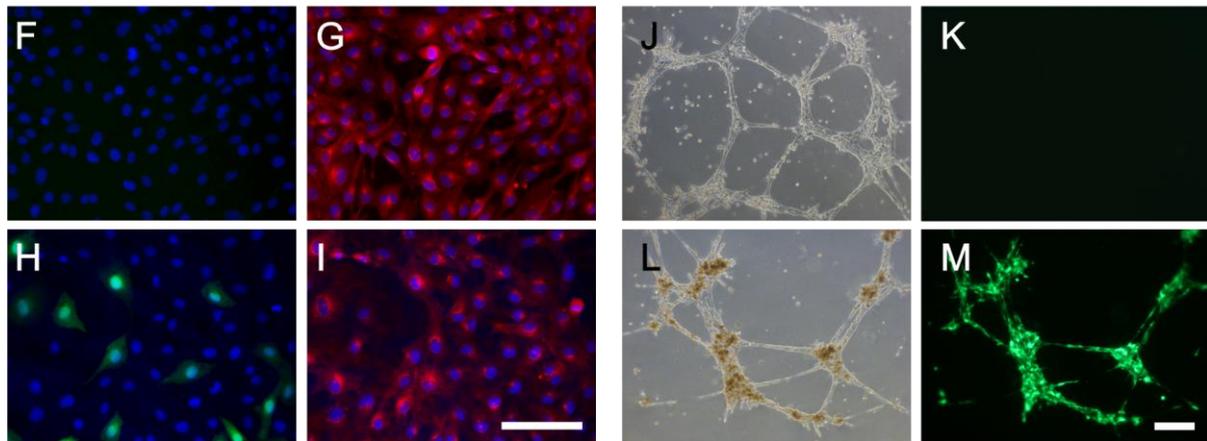
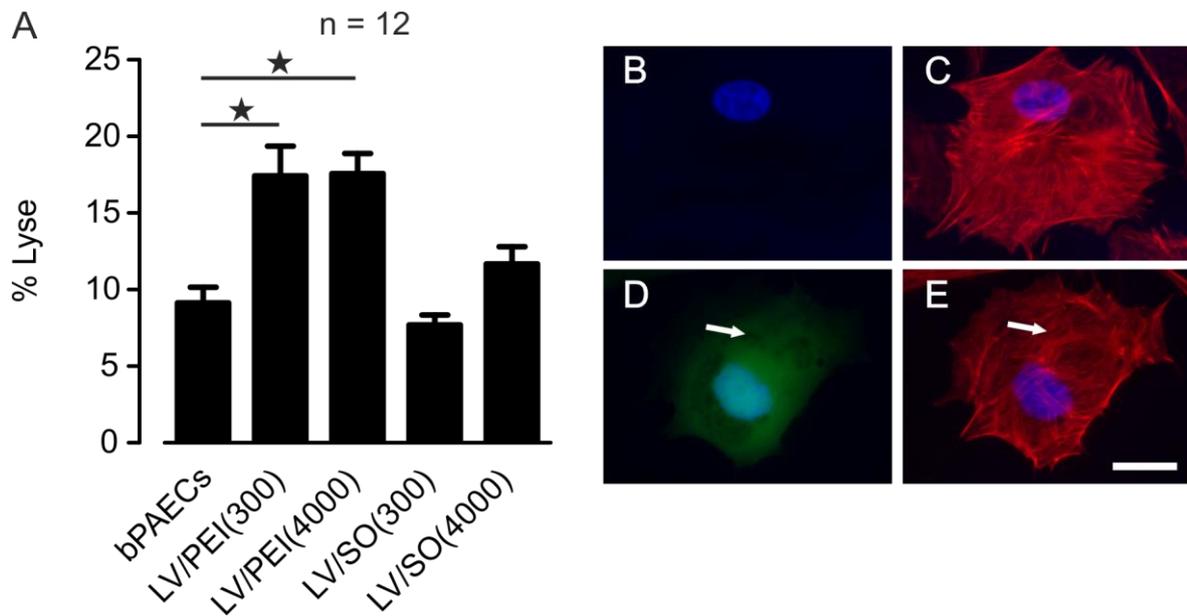


Abb. 20 Viabilität und zellbiologische Eigenschaften von bPAECs 72 h nach der Transduktion mit LV/SO und einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 50). (A) Bestimmung der LDH-Freisetzung nach PEI- oder SO-vermittelter lentiviraler Transduktion. Werte sind angegeben als prozentualer Anteil der Lyse-Kontrolle; * $p < 0,05$. (B-E) Färbung des Aktinzytoskeletts in nativen (B, C) und LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs (D, E) mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin. Die Pfeile markieren intrazelluläre MNPs; blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = Aktin, Maßstabsbalken = 20 μm . (F-I) Immunhistochemische Färbungen von nativen (F, G) oder LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs (H, I); blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = eNOS, Maßstabsbalken = 100 μm . (J-M) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von Endothelzellnetzwerken in Matrigel; Maßstabsbalken = 200 μm . (J, K) native bPAECs, (L, M) LV/SO(4000).

Die Toxizitätsanalyse erfolgte mittels eines LDH-Nachweises. Sowohl die Transduktion mit LV/PEI(300) als auch mit LV/PEI(4000) führte zu einem signifikanten Anstieg der freigesetzten LDH (Abb. 20 A) und damit einem zytotoxischen Effekt. Zwischen diesen beiden Konditionen konnte kein Unterschied beobachtet werden. Nach Verwendung von

LV/SO(300) und LV/SO(4000) wurde im Vergleich zu nativen Zellen kein erhöhtes LDH-Level detektiert.

Dass die Transduktion mit LV/SO(4000) keine negativen Eigenschaften auf die Integrität der Endothelzellen hatte, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen überprüft. Diese ergaben, dass sich weder das Aktinzytoskelett (Abb. 20 B-E) noch das eNOS-Expressionsmuster (Abb. 20 F-I) der transduzierten Zellen von dem nativer Zellen unterschied. Sowohl in nativen als auch in LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs wurde eine verstärkte eNOS-Expression in Nähe des Zellkerns beobachtet.

Als weiterer Parameter wurde das angiogenetische Potential mit Hilfe eines Matrigel-Assays untersucht. Sowohl native als auch mit LV/SO(4000) transduzierte bPAECs zeigten in Matrigel das Bestreben, netzwerkähnliche Strukturen zu bilden (Abb. 20 J-M).

Damit bestätigten alle Versuche, dass die Transduktion mit LV/SO(4000) die charakteristischen Endothelzeleigenschaften nicht beeinflusste.

3.2.3 Radialsymmetrische Retention von SO-Mag5-beladenen und lentiviral transduzierten Endothelzellen an der Gefäßwand unter Flussbedingungen

Die Ergebnisse der vorherigen Versuche zeigten, dass bPAECs mit SO in einem Schritt magnetisiert und lentiviral transduziert werden konnten. Die eingesetzte Eisenmenge von 4000 fg SO / IP war weder toxisch noch beeinflusste sie endothelzellspezifische Eigenschaften. Im nächsten Schritt sollten mit SO beladene und transduzierte Zellen radialsymmetrisch unter Flussbedingungen in einer Mausaorta durch ein Magnetfeld zurückgehalten werden.

Um diese radialsymmetrische Verteilung zu erreichen, wurde die unter 3.1.5 beschriebene Perfusionsanlage modifiziert. Statt der zuvor verwendeten seitlich anliegenden zwei Stabmagnete (vgl. Abb. 14) wurden nun 4 x 3 Quadermagnete (2 x 2 x 10 mm, NdFeB, N35) in einer Haltevorrichtung (Abb. 21 B) platziert, welche die Aorta umschloss. Die Stärke des magnetischen Feldes sowie die optimale Anordnung der Magnete in der Haltevorrichtung wurden von der Arbeitsgruppe Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, TU München) berechnet. Abb. 21 A zeigt die komplette Perfusionsanlage, mit Perfusionskammer, Rollerpumpe und Schlauchsystem. Die zur Perfusion verwendeten Zellen wurden mit LV/SO(4000) und einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt transduziert. 72 h nach der Transduktion wurden 200 000 Zellen in das Perfusionssystem injiziert und für 30 min durch

eine, auf zwei Kanülen aufgespannte Aorta perfundiert. Anschließend wurde die Verteilung der Zellen stereomikroskopisch dokumentiert (Abb. 21 C, D).

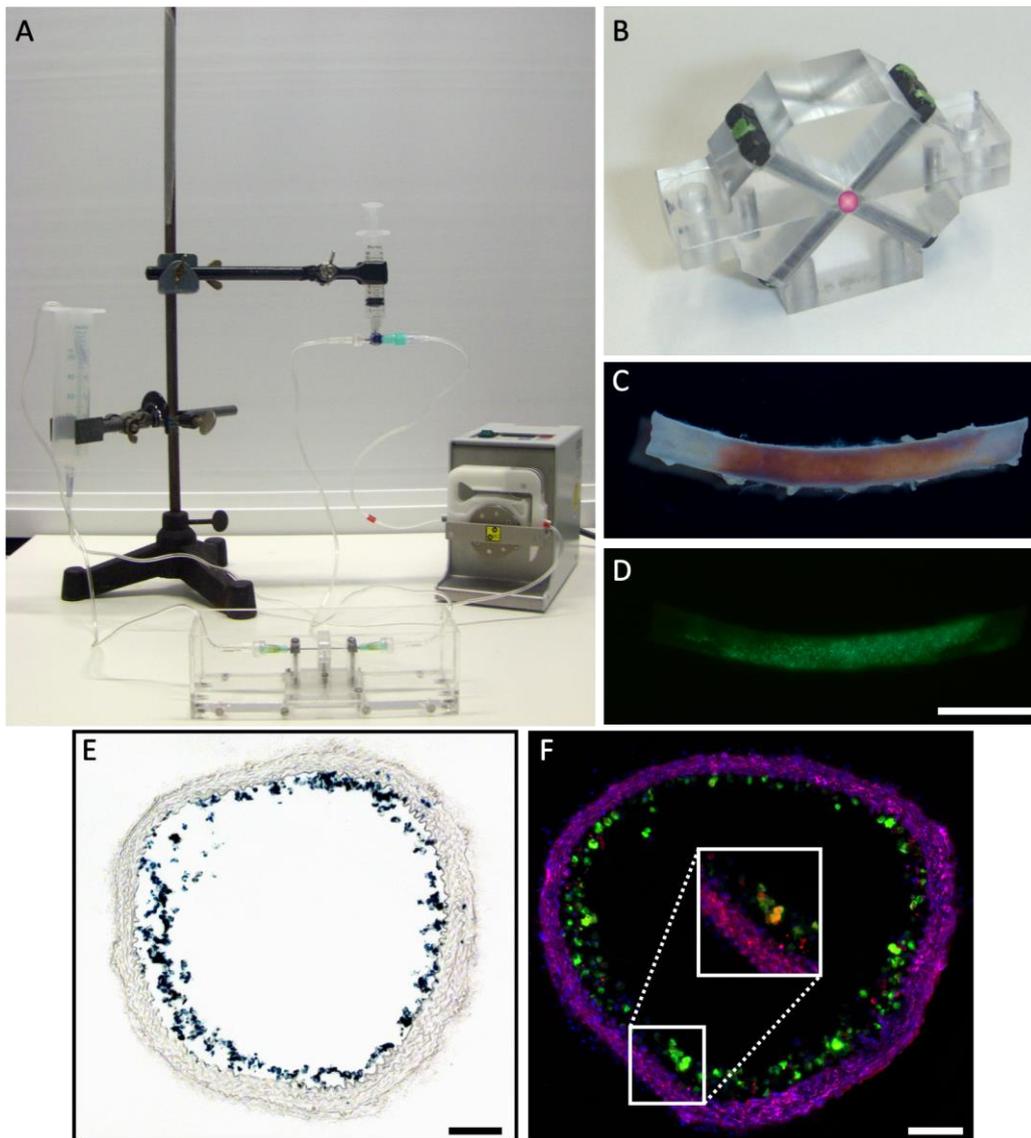


Abb. 21 Radialsymmetrische Retention von bPAECs nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt unter Flussbedingungen in einer Mauseorta. (A) Perfusionsanlage mit angepasster Perfusionskammer für die Magnethalterung zur Erzeugung eines radialsymmetrischen magnetischen Feldes. Die Injektion der transduzierten bPAECs (LV/SO(4000), CMV-eGFP-Konstrukt MOI 50) erfolgte 72 h nach der Transduktion. (B) Magnethalterung mit 4 x 3 Stabmagneten. Die Position der Aorta wird markiert durch den Punkt in der Mitte. (C, D) Stereomikroskopische Aufnahme der perfundierten Aorta im Durchlicht (C) beziehungsweise als Fluoreszenzaufnahme (D); grün = eGFP, Maßstabsbalken = 2 mm. (E) Preußisch-Blau-Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; blau = Eisen; Maßstabsbalken = 100 μ m. (F) Immunhistochemische Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; blau = Hoechst, grün = eGFP, magenta = α -Aktin der glatten Muskulatur (*alpha smooth muscle actin*), rot = CD31. Die Vergrößerung zeigt einen charakteristischen Wandbereich. Alle Aufnahmen wurden von S. Vosen zur Verfügung gestellt.

Im Bereich des zuvor angelegten magnetischen Feldes waren die perfundierten Zellen als braune, homogene Ablagerung in der Aorta zu erkennen (Abb. 21 C). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte auch die eGFP-Expression der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21 D). Um zu überprüfen, ob eine radialsymmetrische Verteilung der Zellen vorlag, wurden Gefrierschnitte angefertigt, die dann zur Anfärbung des Eisens (Preußisch-Blau-Färbung) sowie für immunhistochemische Färbungen verwendet wurden (Abb. 21 E, F). Mit diesen Färbungen konnte gezeigt werden, dass die zurückgehaltenen Zellen, Eisen enthielten (Abb. 21 E), eGFP-positiv waren und CD31 exprimierten (Abb. 21 F). Eine Nahaufnahme verdeutlichte des Weiteren, dass sich die Signale von eGFP und CD31 überlagerten, es sich bei den zurückgehaltenen Zellen also um transduzierte Endothelzellen handelte. In einigen Bereichen lagen diese zurückgehaltenen Zellen nicht mehr der Gefäßwand an. Dies wurde wahrscheinlich durch Scherkräfte während des Schneidens verursacht.

3.2.4 SO-Mag5-vermittelte Transduktion von Endothelzellen mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt

Da für eine therapeutische Anwendung, das Reporter-gen eGFP durch das funktionelle Gen eNOS ersetzt werden sollte, wurde die SO-vermittelte Transduktion ebenfalls mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt untersucht. Transduziert wurde mit einer MOI von 50 und LV/SO(4000). Als Vergleichskonditionen wurden LV 30', LV üN, LV/PEI(300) und LV/SO(300) gewählt.

Fluoreszenzaufnahmen der Zellen 72 h nach der Transduktion (Abb. 22 A-E) zeigten keinen Unterschied zwischen den Konditionen LV/PEI(300) und LV/SO(4000) (Abb. 22 C, E). Die Quantifizierung der eGFP-positiven Zellen ergab nach Transduktion mit LV/PEI(300) $26,20 \pm 2,52$ % eGFP-positive Zellen. Die Verwendung von LV/SO(300) und LV/SO(4000) lieferte $21,14 \pm 2,6$ % beziehungsweise $28,91 \pm 1,29$ % eGFP-positive Zellen. Damit war die Transduktion mit LV/SO(4000) signifikant effizienter als die mit LV/SO(300), allerdings nicht signifikant unterschiedlich zur Transduktion mit LV/PEI(300). Sowohl die Transduktion mit LV/PEI(300) als auch die mit LV/SO(4000) waren signifikant effizienter als die Standardtransduktion mit Applikation des Lentivirus über Nacht ohne MNPs ($13,43 \pm 2,11$ %).

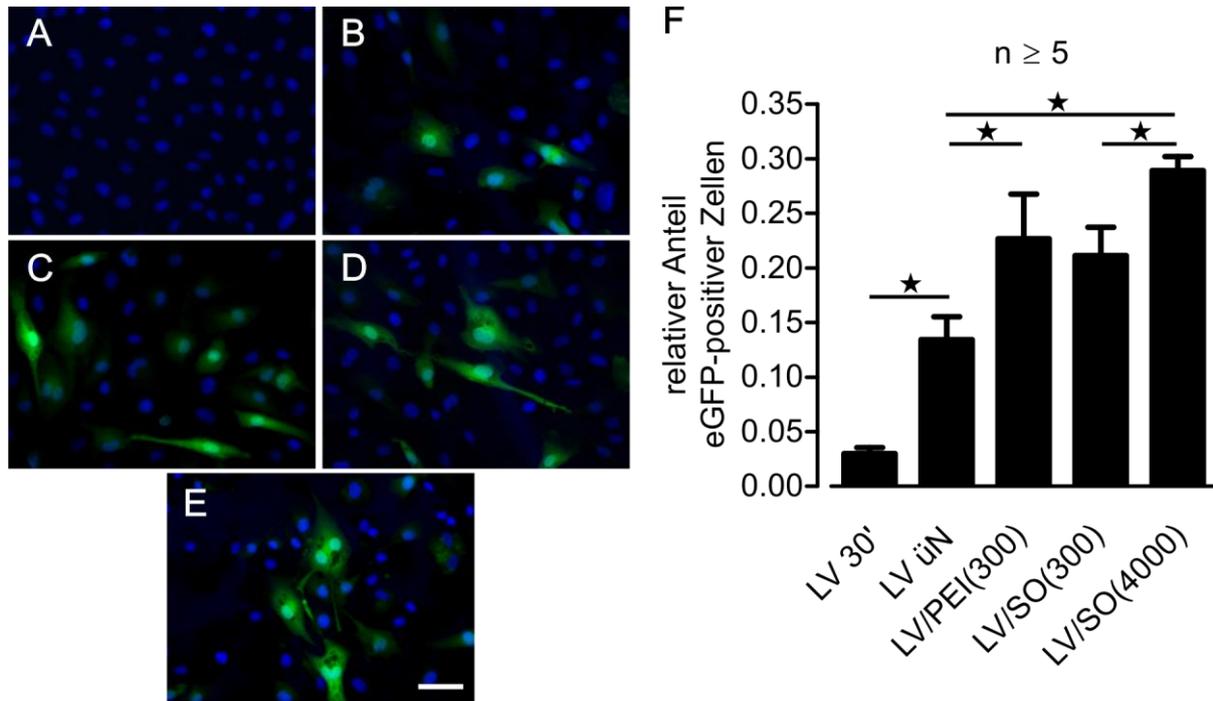


Abb. 22 Analyse der LV/SO-vermittelten Transduktion mit einem CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt in bPAECs nach 72 h (MOI 50). (A-E) Fluoreszenzaufnahmen transduzierter bPAECs; blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 µm. (A) LV 30', (B) LV üN, (C) LV/PEI(300), (D) LV/SO(300), (E) LV/SO(4000). (F) Quantifizierung der Transduktionseffizienz anhand eGFP-positiver Zellen; *p < 0,05.

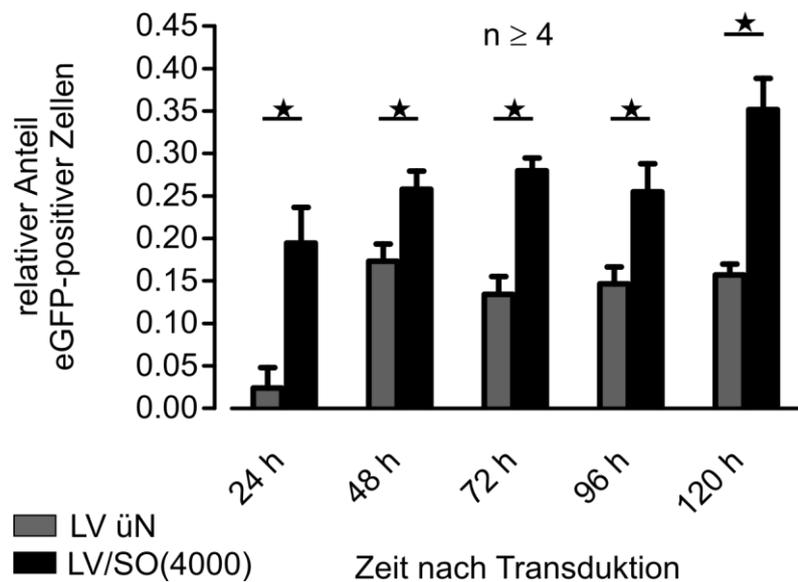


Abb. 23 Zeitabhängige Quantifizierung eGFP-positiver Zellen nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt (MOI 50); p < 0,05.

Um den optimalen Zeitpunkt für nachfolgende Zellersatzversuche zu bestimmen, wurde die eGFP-Expression nach lentiviraler Transduktion über Nacht ohne MNPs oder mit

LV/SO(4000) im Zeitraum von 24 h bis 120 h nach der Transduktion analysiert (Abb. 23). Zu allen Zeitpunkten war die Transduktionsrate nach SO-vermittelter Transduktion signifikant höher als nach lentiviraler Transduktion ohne MNPs über Nacht. 96 h nach der Transduktion mit LV/SO(4000) waren $25,5 \pm 3,3$ % der Zellen eGFP-positiv, nach 120 h waren es $35,2 \pm 3,67$ %. Damit bestand zwischen diesen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied, aber die Tendenz einer höheren Transgenexpression 120 h nach der Transduktion.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Versuche zur funktionellen Analyse der eNOS-Expression und *Ex-vivo*-Perfusionen 120 h nach der Transduktion durchgeführt.

3.2.5 Magnetisierung von Endothelzellen 120 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Die unter 3.2.1 beschriebenen Magnetisierungseigenschaften von SO wurden 72 h nach der Transduktion ermittelt. Um zu überprüfen, ob sich die Magnetisierung der Zellen weitere 48 h später änderte, wurden die gleichen Versuche erneut durchgeführt und dieses Mal 120 h nach der Transduktion ausgewertet. Verwendet wurden die Konditionen LV/SO(300) und LV/SO(4000) in Kombination mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt. Die Konditionen LV/PEI(300) und LV/PEI(4000) wurden auf Grund ihrer zuvor nachgewiesenen Toxizität (vgl. 3.2.2) nicht untersucht.

Die Preußisch-Blau-Färbung zeigte eine höhere Eisenaufnahme in LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs verglichen mit LV/SO(300)-transduzierten bPAECs. (Abb. 24 A-C). Dies korrelierte mit dem kolorimetrisch bestimmten Eisengehalt pro Zelle. Nach Transduktion mit LV/SO(300) wurden $6,27 \pm 0,52$ pg Eisen pro Zelle nachgewiesen, nach Transduktion mit LV/SO(4000) waren es $34,79 \pm 6,53$ pg Eisen pro Zelle (Abb. 24 D).

Die Reaktion der beladenen Zellen auf ein Magnetfeld wurde erneut mit Hilfe zweier Verfahren analysiert. Die Quantifizierung magnetischer Zellen mit Hilfe des Magnetständers ergab $20 \pm 2,48$ % magnetische Zellen nach Transduktion mit LV/SO(300) im Gegensatz zu $77,75 \pm 2,53$ magnetischen Zellen nach Transduktion mit LV/SO(4000) (Abb. 24 E). Im Vergleich der Kondition LV/SO(4000) 72 h und 120 h nach der Transduktion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 24 F). Die Analyse der magnetischen Ansprechbarkeit der Zellen ergab eine höhere Sedimentationsgeschwindigkeit (Abb. 24 G) und ein höheres magnetisches Moment der LV/SO(400)-transduzierten Zellen ($4,03 \times 10^{-13}$ Am²) im Vergleich zu LV/SO(300)-transduzierten Zellen ($1,29 \times 10^{-13}$ Am²).

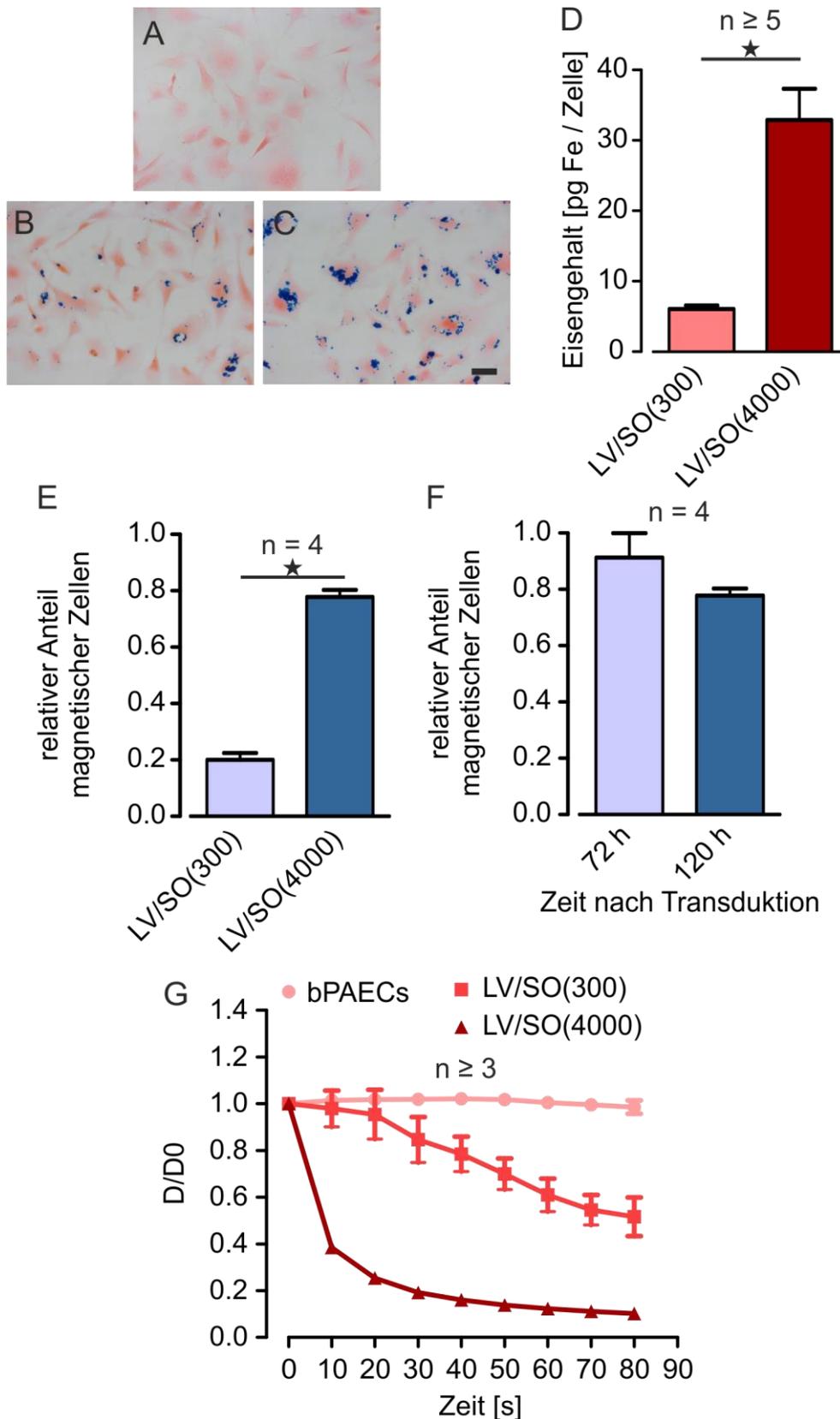


Abb. 24 Analyse der magnetischen Eigenschaften von bPAECs 120 h nach der Transduktion mit LV/SO und einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 50). (A-C) Preußisch-Blau-Färbung des internalisierten Eisens; rot = Eosin, blau = Eisen; Maßstabsbalken = 50 μ m. (A) native bPAECs, (B) LV/SO(300), (C) LV/SO(4000). (D) Analyse der Magnetisierungseffizienz mit Hilfe des Magnetständers (vgl. Abb. 10 A); * $p < 0,05$. (E) Vergleich der

Magnetisierungsrate LV/SO(4000)-transduzierter bPAECs 72 h und 120 h nach der Transduktion. (F) Messung des Eisengehaltes in pg / Zelle mittels eines kolorimetrischen Verfahrens; *p < 0,05. (G) Sedimentationskurven nativer und transduzierter bPAECs in einem magnetischen Feld. Durchgeführt in Kooperation mit Dr. O. Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München).

Daraus ergab sich eine konstant starke Magnetisierung auch 120 h nach der Transduktion. Eine Injektion der LV/SO(4000)-Zellen 120 h nach der Transduktion in das *Ex-vivo*-Perfusionssystem resultierte in einer radialsymmetrischen Retention der Zellen vergleichbar mit der nach 72 h (Daten nicht gezeigt.).

3.2.6 Zellbiologische Eigenschaften von Endothelzellen 120 h nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Auch 120 h nach der SO-vermittelten Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt wurden ein LDH-Assay, immunhistochemische Färbungen sowie ein Matrigel-basierter Angiogeneseassay durchgeführt (vgl. 3.2.2).

Wie schon 72 h nach der Transduktion erwies sich die Verwendung von PEI auch 120 h nach der Transduktion als toxisch, während im Vergleich zu nativen Zellen weder die Verwendung von LV/SO(300) noch von LV/SO(4000) einen LDH-Anstieg zur Folge hatte (Abb. 25 A).

Des Weiteren zeigten immunhistochemische Färbungen (Abb. 25 B-E), dass die Transduktion mit LV/SO(4000) die Integrität der Aktinfilamente auch 120 h nach der Transduktion nicht beeinflusste, da sich die Anordnung der Filamenten in transduzierten Zellen nicht von der nativer Zellen unterschied und auch keine verstärkte Stressfaserbildung beobachtet werden konnte. Ebenso unbeeinflusst blieb das eNOS-Expressionsmuster. Sowohl in nativen als auch in LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs konnte die zuvor beschriebene Lokalisation in Kernnähe nachgewiesen werden (Abb. 25 F-I). Als weiterer Funktionalitätsparameter wurde das angiogenetische Potential der transduzierten bPAECs untersucht (Abb. 25 J-M). Sowohl native (Abb. 25 J, K) als auch LV/SO(4000)-transduzierte bPAECs (Abb. 25 L, M) bildeten Netzwerke in Matrigel.

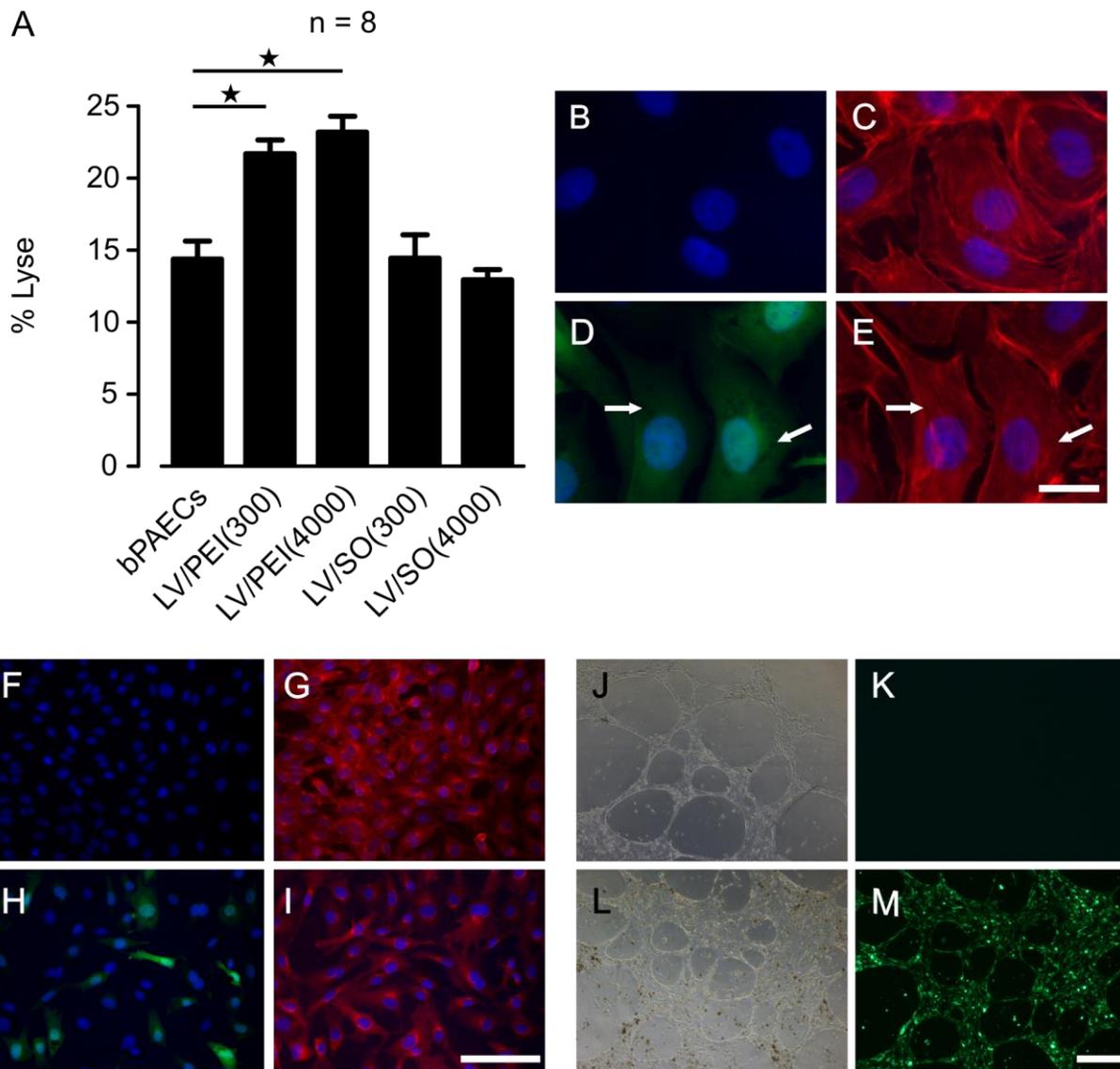


Abb. 25 Viabilität und zellbiologische Eigenschaften von bPAECs 72 h nach der Transduktion mit LV/SO und einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 50). (A) Bestimmung der LDH-Freisetzung nach PEI- oder SO-vermittelter Transduktion. Werte sind angegeben als prozentualer Anteil der Lyse-Kontrolle; * $p < 0,05$. (B-E) Färbung des Aktinzytoskeletts in nativen (B, C) und LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs (D, E) mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin. Die Pfeile markieren intrazelluläre MNPs; blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = Aktin, Maßstabsbalken = 20 μm . (F-I) Immunhistochemische Färbungen von nativen (F, G) oder LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs (H, I); blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = eNOS, Maßstabsbalken = 100 μm . (A-C) native bPAECs, (D-I) LV/SO(4000). (J-M) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von Endothelzellnetzwerken in Matrigel, Maßstabsbalken = 200 μm . (J, K) native bPAECs, (L, M) LV/SO(4000).

3.2.7 Proliferation von Endothelzellen nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Zusätzlich zu immunhistochemischen Färbungen und dem Angiogeneseversuch wurde die Auswirkung von SO beziehungsweise LV/SO-Komplexen auf die Proliferation von bPAECs untersucht.

Hierzu wurden die Zellen mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt entweder ohne Zugabe von SO für 30 min (LV 30') beziehungsweise über Nacht (LV ün) oder unter Verwendung von 4000 fg Fe SO pro IP (LV/SO(4000)) transduziert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit einer entsprechenden Menge SO ohne Virus behandelt (SO(4000)). 72 h und 120 h nach der Transduktion wurde die Zellzahlen bestimmt und daraus die Wachstumsraten berechnet. Wie Abb. 26 A zeigt, teilten sich mit SO(4000) beladene beziehungsweise mit LV/SO(4000) transduzierte Zellen innerhalb von 72 h nach der Transduktion langsamer als native Zellen oder solche, die lentiviral ohne SO transduziert worden waren. Im Zeitraum von 72 h bis 120 h nach der Transduktion glichen sich die Wachstumsgeschwindigkeiten an.

Dies spiegeln auch die berechneten Wachstumsraten wider (Abb. 26 A, Tabelle). Innerhalb der ersten 72 h nach der Transduktion wuchsen SO-behandelte und LV/SO(4000)-transduzierte Zellen mit einer Geschwindigkeit von etwa 1400 Zellen / h. Wurden die Zellen ohne SO transduziert lag die Wachstumsrate bei 3700 Zellen / h. Native Zellen erreichten mit 4600 Zellen / h die höchste Wachstumsgeschwindigkeit. Im weiteren Zeitverlauf bis 120 h glichen sich die Wachstumsraten an und lagen für SO-beladene oder lentiviral mit oder ohne SO transduzierte Zellen zwischen 6000 Zellen / h und 7000 Zellen / h. Native Zellen erreichten zu diesem Zeitpunkt eine Rate von 8500 Zellen / h.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Proliferationsmarker Ki67 immunhistochemisch nachgewiesen und die Anzahl Ki67-positiver (Ki67+) Zellen bestimmt. Die Anzahl der Ki67+ Zellen in nativen Zellen wurde gleich 100 % gesetzt und die Ergebnisse der anderen Ansätze darauf normiert. Die Beladung mit SO beziehungsweise die Transduktion mit LV/SO(4000) reduzierte die Anzahl Ki67+ Zellen signifikant auf $47,9 \% \pm 5,36 \%$ und $52,43 \pm 6,62 \%$ (Abb. 26 B). Die lentivirale Transduktion für 30 min oder über Nacht ohne SO zeigten keinerlei Effekt (Abb. 26 B). 120 h nach der Transduktion konnte auch bei den SO-behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied mehr zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 26 C).

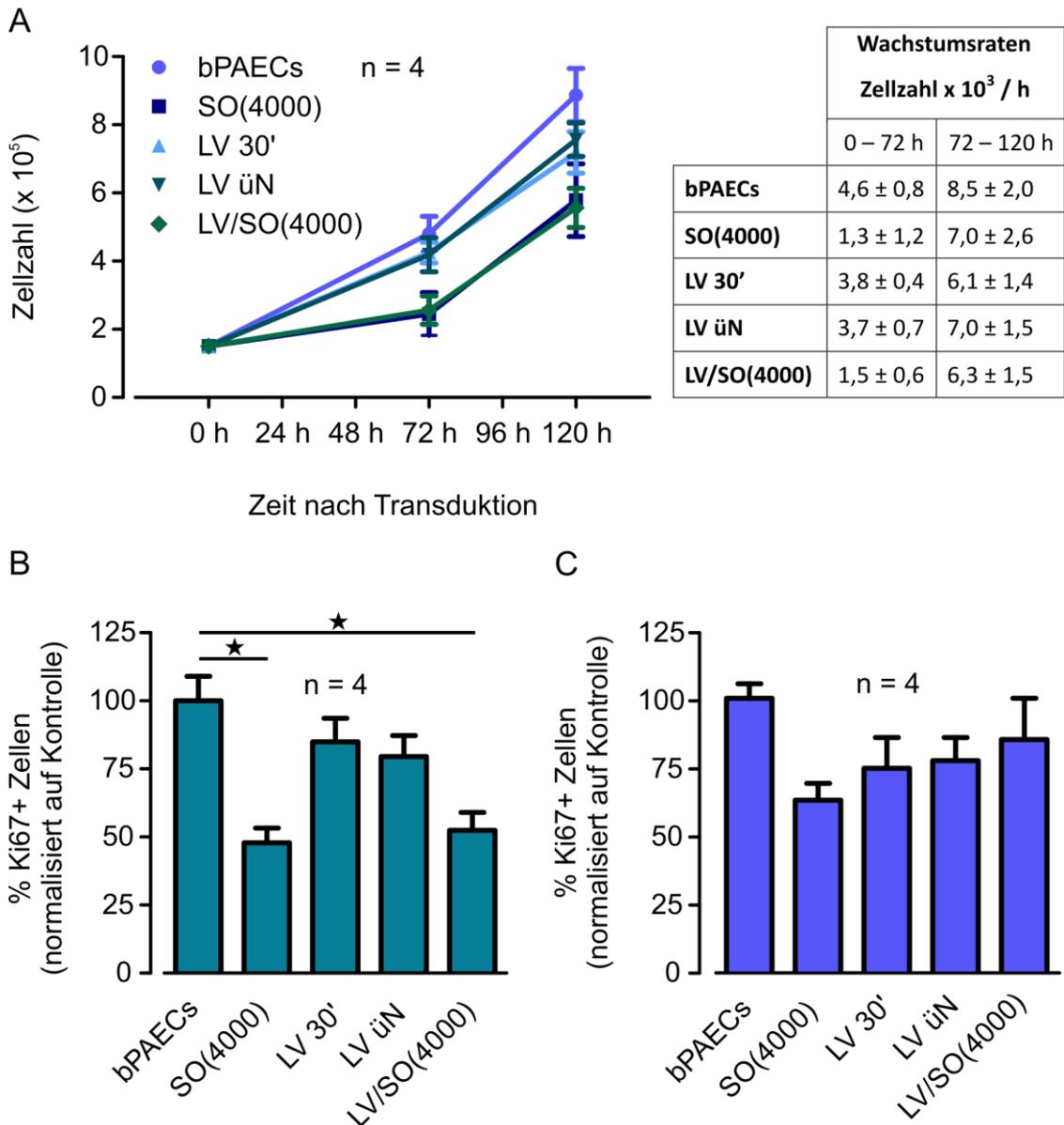


Abb. 26 Proliferationsverhalten von bPAECs nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (MOI 50) (A) Darstellung der Zellzahl im Zeitverlauf nach der Transduktion sowie der entsprechenden Wachstumsraten; nativ = unbehandelte Zellen, SO = Beladung mit 200 pg SO-Mag5 / Zelle, LV 30' = lentivirale Transduktion für 30 min ohne SO, LV üN = lentivirale Transduktion über Nacht ohne SO, LV/SO(4000) = lentivirale Transduktion mit 4000 fg Fe SO-Mag5 / IP für 30 min. (B) Analyse der Ki67-positiven Zellen 72 h nach der Transduktion; $p < 0,05$. (C) Analyse der Ki67-positiven Zellen 120 h nach der Transduktion.

Die verringerte Zellzahl der SO(4000)-beladenen beziehungsweise LV/SO(4000)-transduzierten Zellen in den ersten 72 h nach der Transduktion könnte ein Hinweis auf Apoptose oder Nekrose sein. Daher wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit FITC-gekoppeltem Annexin V und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI-positive Zellen (PI+) wurden als nekrotisch betrachtet, FITC-positive (FITC+) als früh-apoptotisch und doppelt

positive Zellen (PI+ FITC+) als spät-apoptotisch. Die Summe aller markierten Zellen (PI+, FITC+, PI+ FITC+) ergab die Anzahl der sterbenden Zellen. Es wurden die gleichen Ansätze wie für die Proliferationsversuche gewählt. Statt des CMV-eGFP-Konstruktes wurde der lentivirale Kontrollvektor rrl-156 ohne Transgenkassette verwendet. Die Analyse erfolgte 72 h nach der Transduktion. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich etwa 10 % der nativen oder lentiviral transduzierten (LV 30', LV ün) in einem früh apoptotischen, spät apoptotischen oder nekrotischen Stadium. Die Beladung mit SO(4000) beziehungsweise die Transduktion mit LV/SO(4000) erhöhte den prozentualen Anteil sterbender Zellen nicht signifikant auf etwa 15 %. Wurden die Zellen als Positivkontrolle 24 h vor der Analyse ohne Serum inkubiert, waren zum Zeitpunkt der Analyse etwa 34 % nekrotisch, früh- oder spät-apoptotisch, also signifikant mehr als in allen anderen Ansätzen.

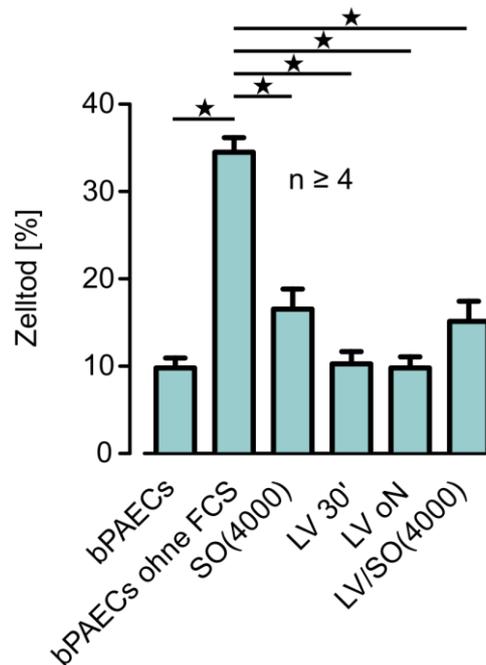


Abb. 27 Apoptose und Nekrose in bPAECs 72 h nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit dem Kontrollvektor rrl-156 (MOI 50). Darstellung des prozentualen Anteils nekrotischer, früh- und spät-apoptotischer Zellen; bPAECs = unbehandelte Zellen, bPAECs ohne FCS = Inkubation für 24 h ohne Serum, SO = Beladung mit 200 pg SO-Mag5 / Zelle, LV 30' = lentivirale Transduktion für 30 min ohne SO, LV ün = lentivirale Transduktion über Nacht ohne SO, LV/SO(4000) = lentivirale Transduktion mit 4000 fg SO-Mag5 / IP für 30 min; p < 0,05.

Basierend auf diesen Ergebnissen, konnte ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit SO ein erhöhtes Zellsterben induziert und dies die Ursache für die verringerten Zellzahlen ist.

3.2.8 ENOS-Überexpression im Zeitverlauf nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Die zuvor beschriebenen Versuche zeigten, dass bPAECs auch 120 h nach der Transduktion mit LV/SO(4000) ausreichend magnetisiert waren, um unter Flussbedingungen zurückgehalten zu werden, und dass durch die Behandlung ihre endothelzellspezifischen Eigenschaften nicht verändert wurden. Weiterführend sollte nun die eNOS-Überexpression im Zeitverlauf nach Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt auf mRNA- und Proteinebene analysiert werden. Hierzu wurden bPAECs mit LV/SO(4000) und einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt transduziert (MOI 50). In regelmäßigen Abständen nach der Transduktion wurden RNA und Proteine extrahiert und via qRT-PCR beziehungsweise Western Blot untersucht. Als Kontrollen wurden native bPAECs und bPAECs, die lentiviral ohne MNPs über Nacht transduziert worden waren, verwendet.

Native bPAECs wiesen 48 h nach der Transduktion auf mRNA-Ebene eine relative eNOS-Expression (normiert auf die Expression der 18S rRNA) von $0,05 \pm 0,01$ auf, die sich im Zeitverlauf nicht signifikant änderte (Abb. 28 A). Durch lentivirale Transduktion über Nacht wurde die eNOS-Expression im Vergleich zu nativen bPAECs zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht. Nach 48 h wurde ein Expressionslevel von $0,26 \pm 0,05$ nachgewiesen. Dieses stieg bis 96 h nach Transduktion auf $0,5 \pm 0,03$ an. Nach 120 h konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden (Abb. 28 A). Die Transduktion mit LV/SO(4000) erhöhte das eNOS-Expressionslevel im Vergleich zur lentiviralen Transduktion über Nacht zu allen untersuchten Zeitpunkten nochmals signifikant (Abb. 28 A). Nach Verwendung von SO konnte 48 h nach der Transduktion ein eNOS-mRNA-Level von $2,96 \pm 0,59$ nachgewiesen werden. Der 72h-Wert war mit $3,13 \pm 0,51$ annähernd unverändert. 96 h nach Transduktion sank das eNOS-mRNA-Level auf $2,06 \pm 0,33$ und blieb 120 h nach der Transduktion mit $1,9 \pm 0,28$ auf diesem Niveau. Trotz dieser Verringerung ergab sich auch zu den späteren Zeitpunkten eine 4-5fach gesteigerte eNOS-Expression verglichen mit der lentiviralen Transduktion über Nacht. Auf Proteinebene zeigten native bPAECs im Zeitverlauf ein konstantes eNOS-Expressionslevel (normiert auf die β -Aktin-Expression, Abb. 29 B). Die lentivirale Transduktion über Nacht resultierte in einem Anstieg des eNOS-Proteinlevels von $0,18 \pm 0,11$ nach 24 h auf $0,5 \pm 0,1$ nach 120 h. Nach Transduktion der Zellen mit LV/SO(4000) wurde zwischen 24 h und 48 h ein Anstieg von $0,22 \pm 0,1$ auf $0,61 \pm 0,24$ beobachtet. 72 h nach Transduktion wurde ein eNOS-Expressionslevel von $0,8 \pm 0,17$ erreicht. Dieses hielt sich konstant auch 120 h nach der Transduktion. 72 h, 96 h und 120 h

nach der Transduktion war das Expressionslevel in LV/SO(4000)-transduzierten Zellen im Vergleich zu nativen Zellen signifikant erhöht.

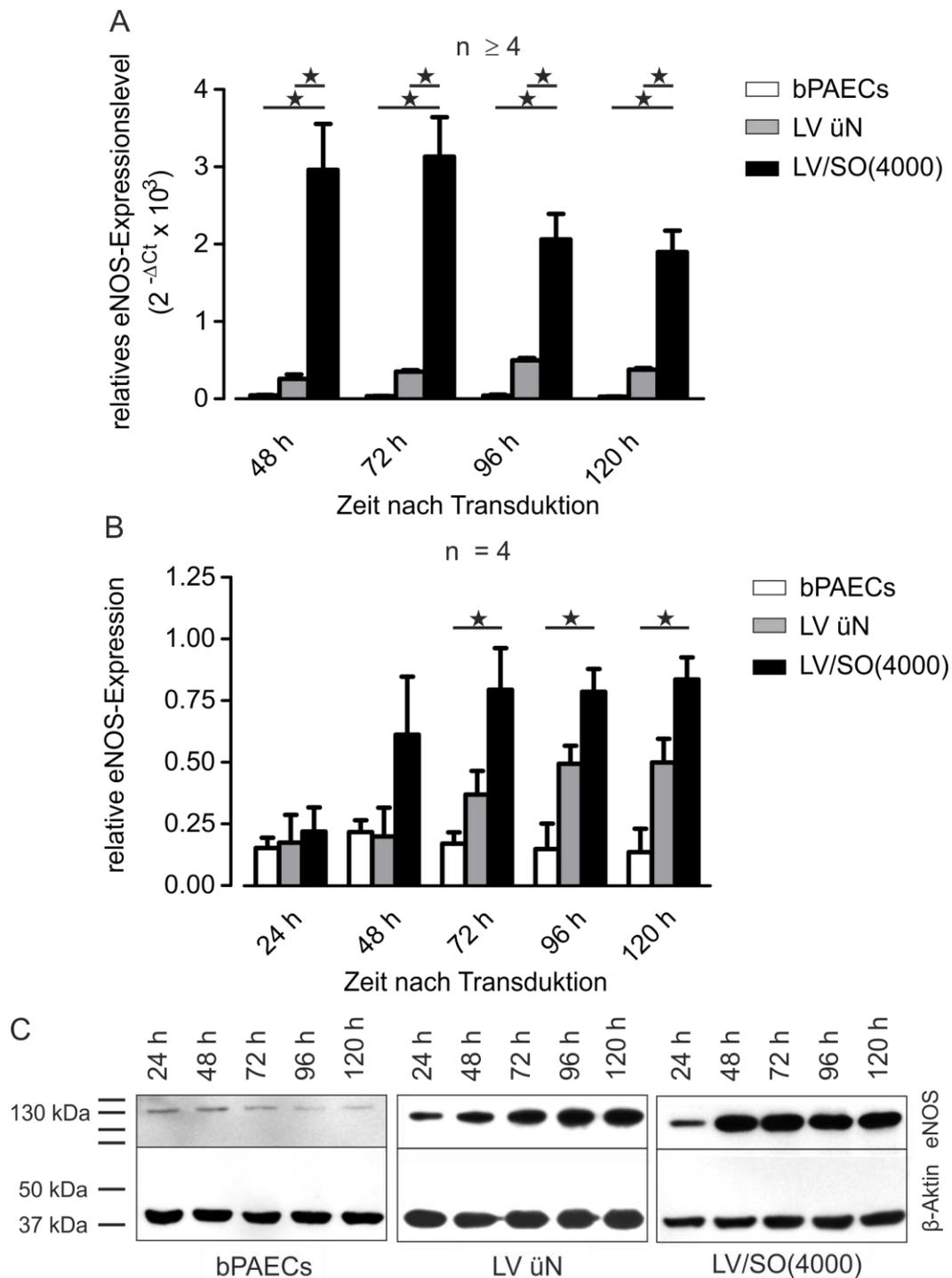


Abb. 28 Analyse der eNOS-Überexpression im Zeitverlauf auf mRNA- und Proteinebene nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt (MOI 50). (A) Untersuchung des relativen eNOS-Expressionslevel auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR; * $p < 0,05$. (B) Semiquantitative Auswertung der eNOS-Expression auf Proteinebene via Western Blot; * $p < 0,05$. (C) Repräsentative Western Blots von nativen (links), über Nacht (Mitte) oder LV/SO(4000) (rechts) transduzierten bPAECs.

Zusammenfassend konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass die SO-vermittelte Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt eine beschleunigte und verstärkte eNOS-Expression nach sich zog, die auch nach 120 h noch stabil war.

3.2.9 Funktioneller Stickstoffmonoxidnachweis nach SO-Mag5-vermittelter lentiviraler Transduktion

Um nachzuweisen, dass die überexprimierte eNOS auch funktionell aktiv war, wurde ein DAF-basierter NO-Nachweis 120 h nach der Transduktion durchgeführt. Verwendet wurde ein lentivirales CMV-eNOS-Konstrukt ohne eGFP-Expressionskassette (MOI 50), um die Messung durch die eGFP-Fluoreszenz nicht zu beeinflussen (vgl. 3.1.6). Als Kontrollen zur Transduktion mit LV/SO(4000) wurden Zellen für 30 min (LV 30') beziehungsweise über Nacht (LV ün) jeweils ohne SO transduziert. Um einen Einfluss von SO auf die NO-Produktion auszuschließen, wurden außerdem bPAECs nur mit SO beladen (SO(4000)). Zusätzlich dazu wurden Zellen mit dem lentiviralen Kontrollvektor rrl-156 ohne Transgenkassette (KV) und SO (KV/SO(4000)) transduziert, um auszuschließen, dass sich LV/SO-Komplexe auf die NO-Produktion auswirkten. Durch die Verwendung des L-Arginin-Analogons und speziellen eNOS-Inhibitors L-NAME (100 µM) sollte die Spezifität der Messung nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde der NO-Donor SNP eingesetzt.

Wie Abb. 29 zeigt, steigerte die Transduktion durch LV/SO(4000) mit dem CMV-eNOS-Konstrukt die NO-Produktion von bPAECs signifikant im Vergleich zu allen anderen getesteten Konditionen. Native bPAECs produzierten $99,41 \pm 44,43$ Einheiten (E) NO. Durch Inhibition der eNOS mit L-NAME konnte dieser Wert auf $33,82 \pm 13,86$ E verringert werden. Die NO-Produktion von SO(4000)-beladenen Zellen bewegte sich mit $42,42 \pm 28,79$ auf dem gleichen Level. Lentivirale Transduktion für 30 min erhöhte die NO-Produktion nicht signifikant ($166 \pm 39,84$ E), wohl aber die Transduktion über Nacht. Hier stieg die NO-Produktion auf $499,8 \pm 36,82$ E. Ein weiterer signifikanter Anstieg auf $797,9 \pm 47,7$ E wurde durch die Kombination von Lentivirus und SO erreicht. Die Verwendung von L-NAME konnte die NO-Produktion wieder auf $100,8 \pm 39,99$ E senken. Die SO-vermittelte Transduktion mit dem Kontrollvektor rrl-156 zeigte keinen Effekt auf die NO-Produktion ($162,2 \pm 37,91$ E).

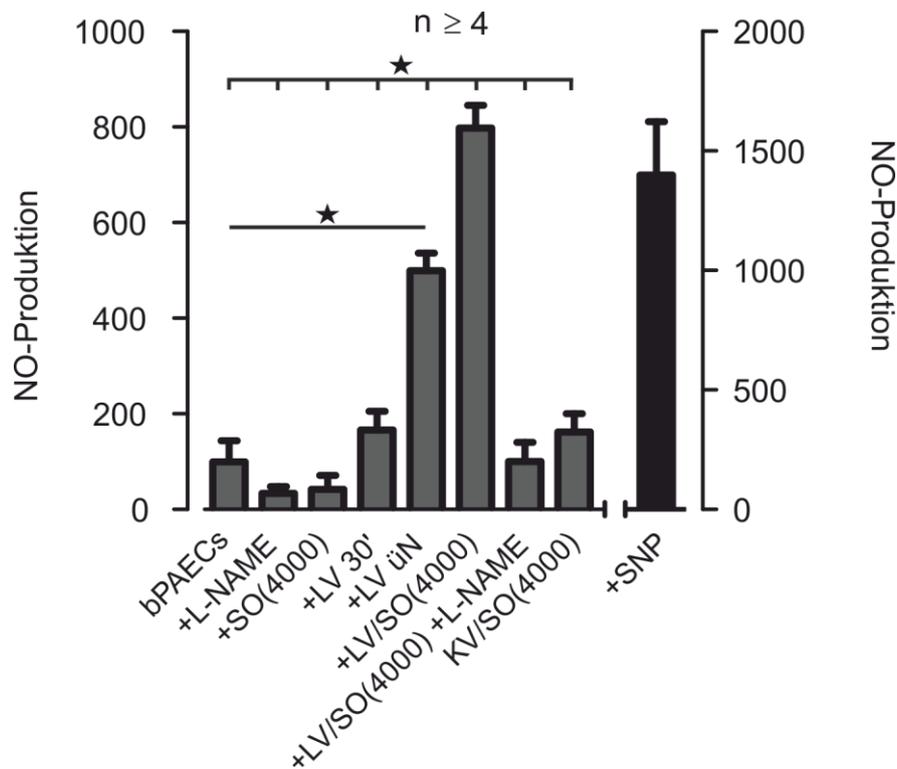


Abb. 29 NO-Messung mittels DAF zum Nachweis der eNOS-Funktionalität. Analyse der NO-Produktion von bPAECs 120 h nach der jeweiligen Behandlung; bPAECs: native Zellen, L-NAME: native Zellen + 100 μ M L-NAME, SO(4000): 200 pg SO / Zelle ohne lentivirales CMV-eNOS-Konstrukt, LV 30': Transduktion für 30 min ohne MNPs (MOI 50), LV ün: Transduktion über Nacht ohne MNPs (MOI 50), LV/SO(4000): Transduktion mit einem lentiviralen CMV-eNOS-Konstrukt und 4000 fg SO / IP (MOI 50), LV/SO(4000) + L-NAME: Behandlung LV/SO(4000)-transduzierter Zellen mit 100 μ M L-NAME, KV/SO(4000): Transduktion mit einem lentiviralen Kontrollvektor ohne Transgenkassette und 4000 fg SO/IP (MOI 50), SNP = Positivkontrolle; * $p < 0,05$.

Zusammenfassend betrachtet, resultierte die SO-vermittelte Transduktion mit einem CMV-eNOS-Konstrukt in einer eNOS-Überexpression, die, verglichen mit allen Kontrollansätzen, signifikant erhöht war und auch funktionell über eine gesteigerte NO-Produktion nachgewiesen werden konnte.

3.2.10 *Ex-vivo*-Perfusion der Mausaorta mit eNOS-überexprimierenden Endothelzellen

Abschließend wurden bPAECs mit LV/SO(4000) und einem lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt transduziert (MOI 50) und 120 h nach der Transduktion für *Ex-vivo*-Perfusionen einer deendothelialisierten Mausaorta eingesetzt (vgl. 3.2.3).

Die Eisenbeladung der perfundierten Zellen sowie deren radialsymmetrische Verteilung wurde durch eine Preußisch-Blau-Färbung von Kryoschnitten der Aorta nachgewiesen (Abb. 30 A). Um den endothelialen Charakter der zurückgehaltenen Zellen zu bestätigen, wurden

immunhistochemische Färbungen gegen eNOS und CD31 ebenfalls von Gefrierschnitten angefertigt (Abb. 30 B). Die Übersichtsaufnahme zeigte eNOS- und CD31-exprimierende Zellen, von denen einige eGFP-positiv waren, in radialsymmetrischer Verteilung entlang der Gefäßwand (Abb. 30 B, C). Da die Aorta vor der Perfusion deendothelialisiert wurde, handelte es sich bei diesen Zellen um die perfundierten bPAECs. Da die zurückgehaltenen Zellen keine einlagige Schicht bildeten, könnten möglicherweise auch weniger als die eingesetzten 200 000 Zellen für die Perfusion verwendet werden.

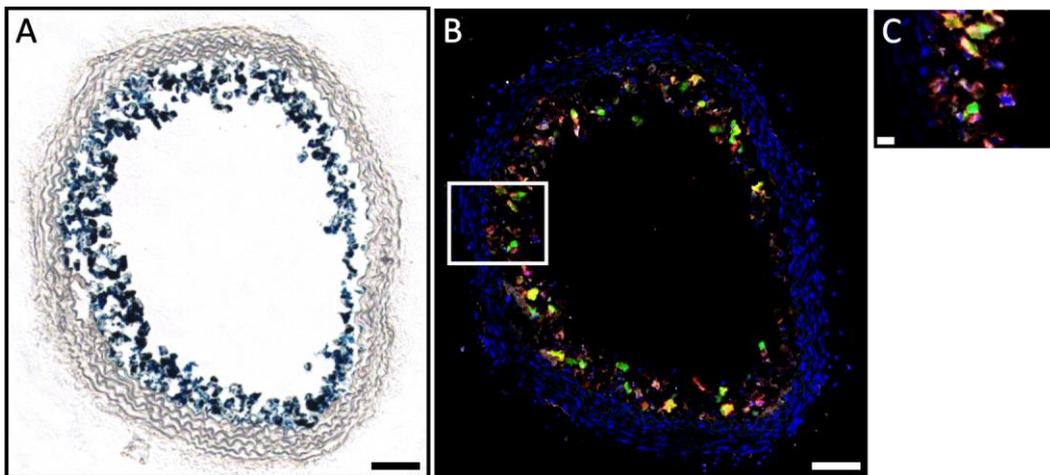


Abb. 30 Radialsymmetrische Retention SO-beladener und eNOS-überexprimierender bPAECs in einer Mauseorta unter Flussbedingungen. (A) Preußisch-Blau-Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; blau = Eisen; Maßstabsbalken = 100 µm. (B) Immunhistochemische Färbung eines Gefrierschnittes der perfundierten Aorta; blau = Hoechst, grün = eGFP, rot = eNOS, weiß = CD31; Maßstabsbalken = 100 µm. (C) Vergrößerte Aufnahme eines Teilbereichs der in (B) gezeigten Aorta; Maßstabsbalken = 20 µm. Alle Aufnahmen wurden von S. Vosen zur Verfügung gestellt.

Zieht man ein Fazit aus den vorangegangenen Versuchen, so ist es möglich, bPAECs effektiv durch Verwendung von 4000 fg SO / IP (MOI 50) zu transduzieren und damit gleichzeitig zu magnetisieren. Der Einsatz des lentiviralen CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstruktes in Kombination mit SO führte zu einer funktionellen Überexpression von eNOS 120 h nach der Transduktion. Des Weiteren konnten diese transduzierten, verstärkt eNOS-exprimierenden Zellen unter Flussbedingungen in einer deendothelialisierten Mauseorta zurückgehalten werden. Somit ist die Kombination von lentiviralen Vektoren und MNPs, insbesondere SO, ein vielversprechender Ansatz für den funktionellen Ersatz von Endothelzellen in geschädigten Gefäßen unter Flussbedingungen.

3.3 Modulation der Angiogenese durch MNP-vermittelte, lentivirale SHP2-Regulation

Die bisher dargestellten Ergebnisse beschäftigten sich damit, Endothelzellen mit Hilfe von MNPs effizient lentiviral zu transduzieren zu magnetisieren. Beide Aspekte sind im Hinblick auf eine kombinierte Zellersatz- und Gentherapie von Bedeutung. MNPs bieten allerdings auch die Option, reine Gentherapien zu verbessern. So ermöglichen sie beispielsweise, eine Transduktion lokal durchzuführen und die Genexpression in nur einem bestimmten Areal zu regulieren. Dadurch könnte zum Beispiel die Gefäßbildung in Tumoren gezielt eingeschränkt werden. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde ein multizelluläres *In-vitro*-Angiogenesemodell entwickelt. Mit Hilfe eines lentiviralen *small-hairpin*-Konstruktes (sh-Konstrukt) sollte in diesem Modell die Auswirkung einer lokalen Regulation der SHP2-Expression auf die Angiogenese untersucht werden

3.3.1 Etablierung eines multizellulären *In-vitro*-Angiogenesemodells

Um *in vitro* an einem multizellulären Modell die Angiogenese untersuchen zu können, wurde ein Differenzierungsprotokoll für embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus der Maus entwickelt. Gearbeitet wurde mit der transgenen ES-Zelllinie D3 Flt1-eGFP, die unter Kontrolle des Flt1-Promotors das Reportergen eGFP exprimiert. Da der Flt1-Promotor eine hohe Spezifität für Endothelzellen aufweist, zeigen diese bei entsprechender Differenzierung der ES-Zellen eine grüne Fluoreszenz. Dies ermöglichte die Visualisierung entstehender Gefäßnetzwerke mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Als optimales Protokoll für die Differenzierung der ES-Zellen zu Endothelzellen und Gefäßnetzwerken, erwies sich folgende Vorgehensweise (Abb. 31 A): Durch das Ansetzen einer Massenkultur wurde die Differenzierung der ES-Zellen zu sogenannten Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*, EBs) induziert. Um ein konstantes Wachstum der EBs zu gewährleisten und Aggregation zu verhindern, wurde die Massenkultur nach drei Tagen verdünnt (d3). Die Dissoziation der EBs zu Einzelzellen erfolgte nach zehn Tagen (d10). Mit diesem Schritt wurden aus dreidimensionalen Aggregaten differenzierender ES-Zellen Einzelzellen gewonnen. Dies war notwendig, da sich EBs als dreidimensionale Strukturen nur schlecht transduzieren lassen. Zum Zeitpunkt der Dissoziation konnten in den EBs grün fluoreszierende, gefäßähnliche Netzwerke beobachtet werden (Abb. 31 B, weiße Pfeile). Wurden diese EBs plattiert statt dissoziiert, sprossen grün fluoreszierende Gefäßnetzwerke aus (Abb. 31 C). Die durch die Dissoziation entstandene

Einzelzellsuspension wurde auf gelatinebeschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Zehn Tage nach dem Aussäen (d20) erfolgte die Analyse der entstandenen Netzwerke durch Fluoreszenzmikroskopie. Pro Ansatz wurden die fünf Areale, die am besten differenziert waren, fotografiert und hinsichtlich Gesamtlänge des Gefäßnetzwerkes, Anzahl der Verzweigungspunkte und Anzahl der geschlossenen Gefäßschleifen ausgewertet (Abb. 31 D).

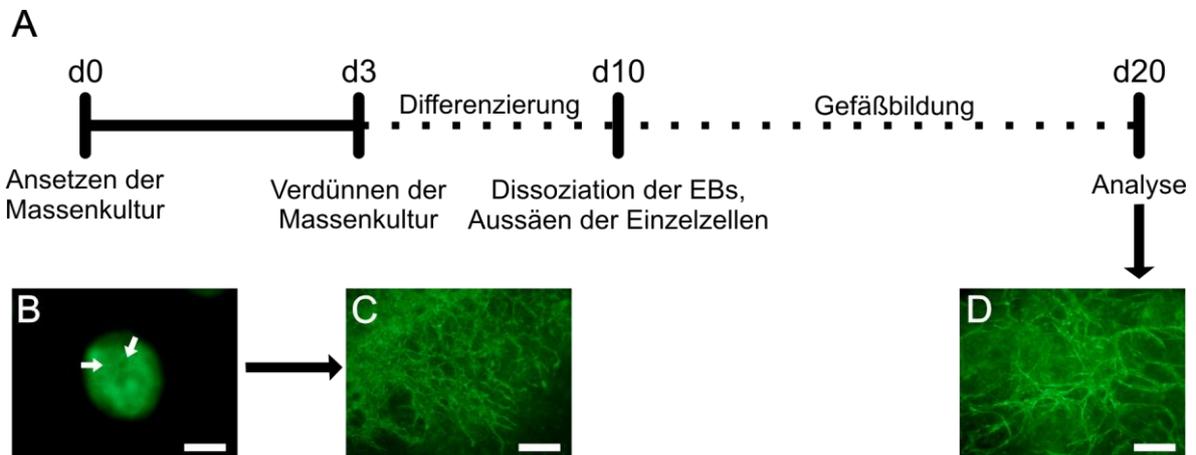


Abb. 31 Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls für das D3 Flt1-eGFP ES-Zell-basierte Angiogenesemodell. (A) Zeitlicher Ablauf des Differenzierungsprotokolls für D3 Flt1-eGFP ES-Zellen. Für die optimale Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes wurden die Zellen zu EBs differenziert, an d10 dissoziiert und als Einzelzellsuspension ausgesät. Die Analyse erfolgte nach weiteren zehn Tagen (d20). (B) Fluoreszenzaufnahme eines EBs an d10. Die weißen Pfeile markieren gefäßähnliche Strukturen; grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μm . (C) Ausprossung gefäßähnlicher Netzwerke aus einem plattierten EB; grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μm . (D) Gefäßbildung an d20, Zeitpunkt der Analyse; grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μm .

3.3.2 MNP-vermittelte Transduktion mit einem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt

Das unter 3.3.1 beschriebene D3 Flt1-eGFP-System wurde dazu verwendet, den Einfluss der SHP2-Expression auf die Angiogenese zu untersuchen. Im ersten Schritt wurde analysiert, ob eine Transduktion mit dem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt (sh-SHP2-Konstrukt) einen SHP2-*knockdown* zur Folge hat und wie sich dieser auf die Angiogenese auswirkt.

Hierzu wurden die Zellen einen Tag nach der EB-Dissoziation lentiviral transduziert (d11, Abb. 32). Um zum einen die Transduktionseffizienz zu steigern und zum anderen in nachfolgenden Versuchen eine lokale Transduktion zu ermöglichen, wurden LV/SO-Komplexe verwendet. Die Zusammensetzung der Komplexe wurde in Vorversuchen ermittelt. Das beste Ergebnis wurde mit $7,73 \times 10^8$ VP und 300 fg Fe SO / VP (LV/SO(300)) erreicht. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer entsprechenden Eisenmenge ohne

Lentivirusapplikation beladen (SO(300)), ohne die Zugabe von SO für 30 min beziehungsweise über Nacht transduziert (LV 30', LV ün) oder mit einer Kombination aus dem lentiviralen Kontrollvektor rrl-156 ohne Transgenkassette (KV) und SO transduziert (KV/SO(300)).

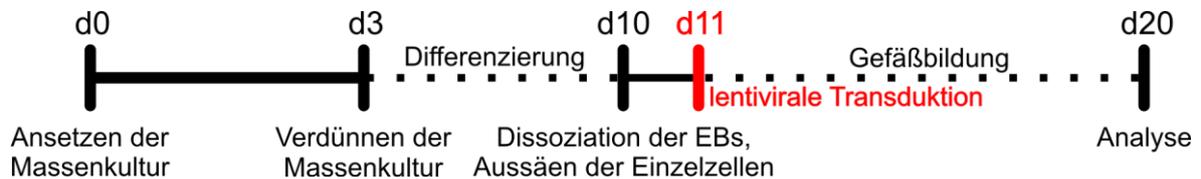


Abb. 32 Zeitlicher Ablauf des Differenzierungsprotokolls mit hplm-H1-sh-SHP2-Transduktion an d11. Um die Auswirkung eines SHP2-*knockdowns* auf die Angiogenese zu untersuchen, wurden dissoziierte EBs einen Tag nach der Dissoziation mit dem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt transduziert.

Die SHP2-Expression wurde neun Tage nach der Transduktion (d20) auf Proteinebene via Western Blot untersucht (Abb. 33 A, B). Die relative SHP2-Expression (normiert auf β -Aktin) änderte sich weder durch die Beladung mit SO(300) noch durch 30-minütige Transduktion mit dem sh-SHP2-Konstrukt oder durch die Transduktion mit KV/SO(300). Sowohl die lentivirale Transduktion über Nacht mit dem sh-SHP2-Konstrukt als auch die Kombination mit SO senkten die SHP2-Expression signifikant von $0,29 \pm 0,03$ in unbehandelten Zellen auf $0,23 \pm 0,01$ (LV ün) beziehungsweise $0,15 \pm 0,02$ (LV/SO(300)) (Abb. 33 B).

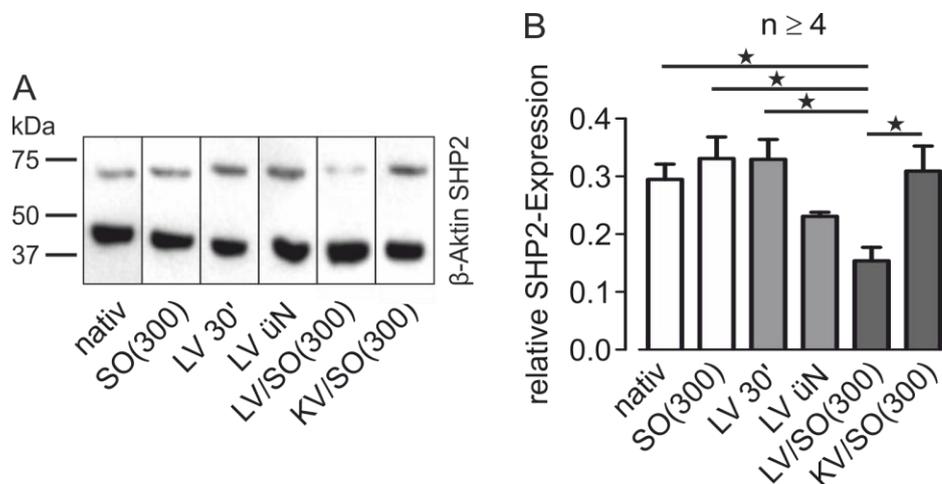


Abb. 33 Analyse der SHP2-Expression auf Proteinebene via Western Blot nach Transduktion mit dem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt. (A) Repräsentativer Western Blot. (B) Quantifizierung der SHP2-Expression normiert auf die β -Aktin-Expression; * $p < 0,05$.

Beide Parameter waren nach der Transduktion mit dem sh-SHP2-Konstrukt über Nacht oder in Kombination mit SO im Vergleich zu nativen Zellen signifikant verringert. Zwischen den Konditionen LV üN und LV/SO(300) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Hinblick auf die Verzweigungspunkte bewirkte schon die Behandlung mit SO(300) beziehungsweise mit KV/SO(300) eine Reduktion. Durch den Einsatz des sh-SHP2-Konstruktes über Nacht oder in Kombination mit SO wurde die Anzahl der Verzweigungspunkte allerdings noch weiter verringert (Abb. 34 H). Dies deutet darauf hin, dass SO auch ohne das sh-SHP2-Konstrukt die Verzweigung des Gefäßnetzwerkes beeinflusst. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen sterischen Effekt der MNPs.

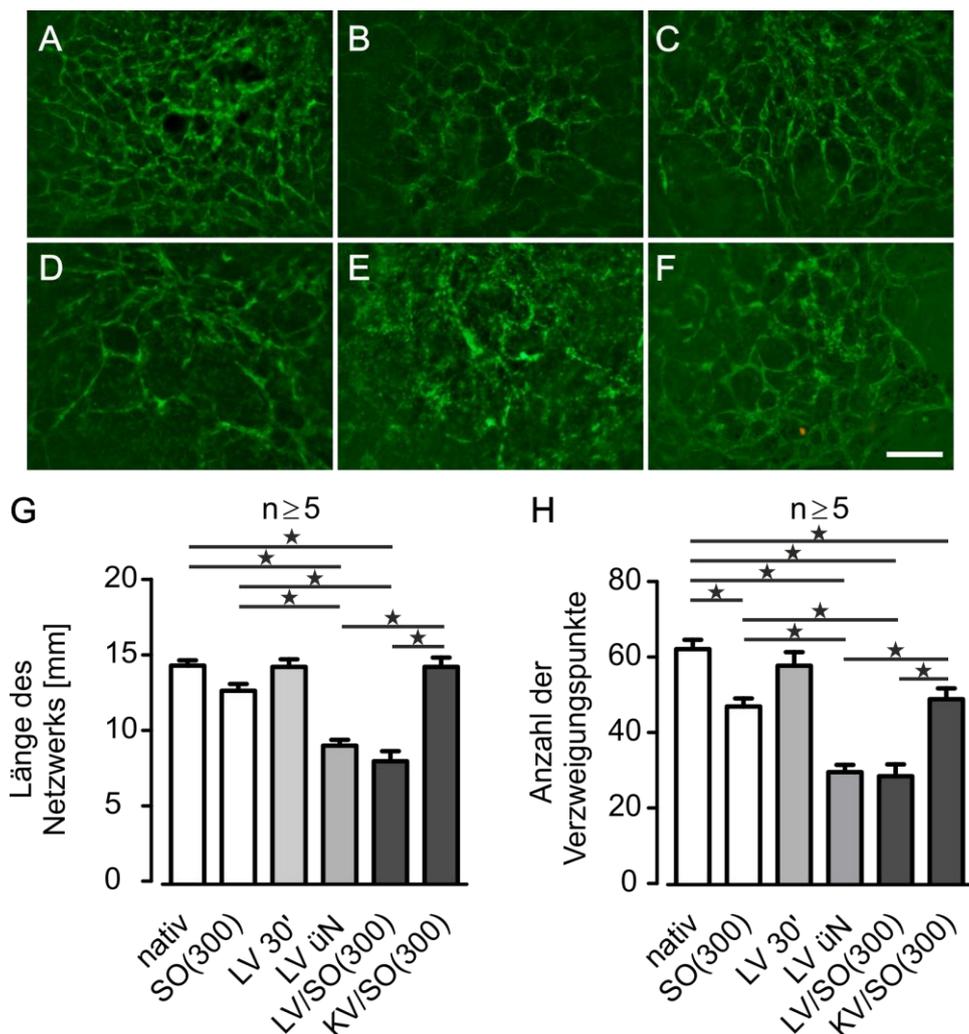


Abb. 34 Quantifizierung der Netzwerkqualität differenzierender D3 Flt1-eGFP Es-Zellen nach Transduktion mit dem lentiviralen hplm-H1-sh-SHP2-Konstrukt. (A-F) Fluoreszenzaufnahmen der gebildeten Netzwerke; grün = eGFP, Maßstabsbalken = 100 μ m. (A) nativ, (B) SO(300), (C) LV 30', (D) LV üN, (E) LV/SO(300), (F) KV/SO(300). (G-I) Quantifizierung der Länge des Gesamtnetzwerkes (G) und der Anzahl der Verzweigungspunkte (H); *p < 0,05.

Mit diesen Versuchen konnte bewiesen werden, dass die Transduktion von differenzierenden D3 Flt1-eGFP-ES-Zellen mit einem lentiviralen sh-SHP2-Konstrukt auf Proteinebene zu einem SHP2-*knockdown* führte. Dieser wirkte sich auf Qualität und Quantität der gebildeten Gefäßnetzwerke aus. Die Verwendung von LV/SO-Komplexen steigerte den SHP2-*knockdown* im Vergleich zur lentiviralen Transduktion über Nacht ohne SO nicht. Allerdings war der Einsatz von SO notwendig, um in nachfolgenden Versuchen eine lokale Transduktion zu ermöglichen.

3.3.3 Vergleich zweier Magnetspitzen zur lokalen Transduktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Transduktion mit dem sh-SHP2-Konstrukt eine Reduktion der SHP2-Expression sowie eine verminderte Anzahl der gebildeten Gefäße zur Folge hatte, wurde im Folgenden daran gearbeitet, die Transduktion auf eine begrenzte Fläche zu lokalisieren. Dazu wurde eine Apparatur bestehend aus einem Horizontalschüttler, einer Halterung für Zellkulturplatten und einer Magnetspitze verwendet (Abb. 35 A, B). Die Haltevorrichtung wurde mit einer Zellkulturplatte auf dem Schüttler platziert und die Magnetspitze darunter positioniert. Die Zugabe von LV/SO-Komplexen erfolgte direkt zu Beginn des 30-minütigen Schüttelprozesses (Abb. 35 C). Durch das Schütteln sollte eine gleichmäßige Durchmischung der Komplexe garantiert und ihre Sedimentation eingeschränkt werden.

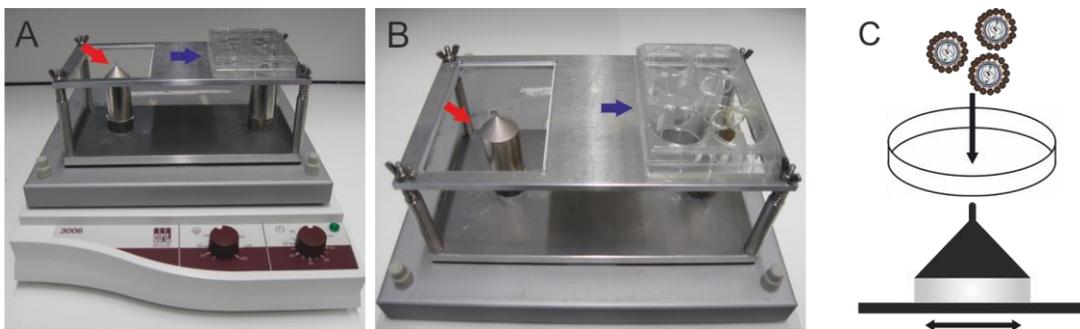


Abb. 35 Apparatur zur lokalen, SO-vermittelten lentiviralen Transduktion. (A, B) Aufnahmen der Apparatur bestehend aus Horizontalschüttler, Haltevorrichtung und Magnetspitze. Rote Pfeile markieren die Magnetspitze, blaue Pfeile die Zellkulturplatte. (C) Schematische Darstellung der Applikation von LV/SO-Komplexen zu Beginn des 30-minütigen Schüttelprozesses.

Es wurden zwei Magnetspitzen miteinander verglichen. Beide wurden von der AG Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, TU München) designt und bestanden aus einem NdFeB-Permanentmagneten mit einer aufgesetzte Spitze aus Weicheisen. Abhängig vom

Durchmesser der Magnetspitze an ihrer dünnsten Stelle wurden eine 1mm-Spitze (Abb. 36 A) und eine 3mm-Spitze (Abb. 36 B) unterschieden. Abb. 36 B und D zeigen den Gradienten der magnetischen Flussdichte der jeweiligen Magnetspitze in T/m. Bei beiden Spitzen ist der Gradient der Flussdichte in unmittelbarer Nähe zur Magnetspitze am stärksten und nimmt zur Peripherie hin ab. Der Unterschied der beiden Spitzen liegt in der Intensität und der Homogenität des magnetischen Feldes. Das magnetische Feld der 1mm-Spitze ist stärker und homogener als das der 3mm-Spitze.

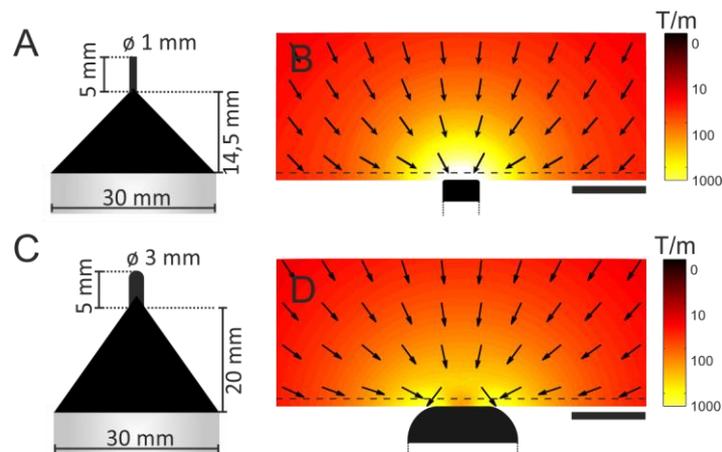


Abb. 36 Vergleich der verwendeten 1mm-Spitze (oben) und der 3mm-Spitze (unten). (A,C) Schematische Darstellung des Magnetspitzenaufbaus; (A) 1mm-Spitze, (C) 3mm-Spitze). (B, D) Darstellung des magnetischen Flussdichtegradienten. Die Farben kodieren für die absoluten Werte, die Pfeile für die Richtung des Magnetfeldes. Die gestrichelte Linie stellt die zu transduzierende Zellschicht dar; (B) 1mm-Spitze, (D) 3mm-Spitze; Maßstabsbalken = 2 mm; zur Verfügung gestellt von der AG Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, TU München).

Um die Ausdehnung der Magnetfelder beider Magnetspitzen zu testen, wurde eine Zellkulturplatte mit Glasboden in der Haltevorrichtung über der jeweiligen Magnetspitze auf einem Horizontalschüttler positioniert. Nach Zugabe von LV/SO-Komplexen bestehend aus $7,73 \times 10^8$ VP des lentiviralen Kontrollvektors rrl-156 ohne Transgenkassette und 300 fg Fe SO / VP (vgl. 3.3.2), wurde der Aufbau für 30 min geschüttelt.

Makroskopisch konnte eine begrenztere Anziehung der LV/SO-Komplexe durch die 1mm-Spitze beobachtet werden (Abb. 37 A, C). Stereomikroskopische Aufnahmen bestätigten dies (Abb. 37 B, D). Die 1mm-Spitze zog die LV/SO-Komplexe auf einer Fläche von etwa 2 mm^2 an, die 3mm-Spitze auf einer Fläche von etwa $6,16 \text{ mm}^2$. Des Weiteren war die Anziehung durch die 1mm-Magnetspitze homogener als die der 3mm-Spitze. Entsprechend wurde die 1mm-Spitze für die nachfolgenden lokalen Transduktionsversuche verwendet.

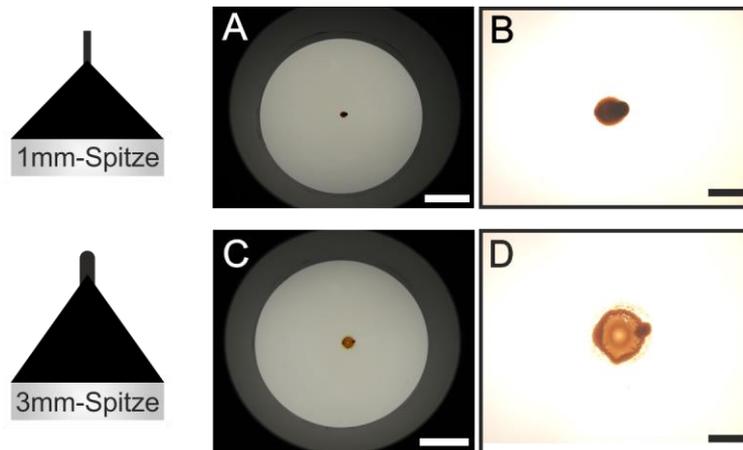


Abb. 37 Anziehung von LV/SO-Komplexen mit der 1mm- beziehungsweise der 3mm-Spitze. Komplexe bestehend aus $7,73 \times 10^8$ VP des lentiviralen Kontrollvektors rrl-156 ohne Transgenkassette und 300 fg Fe SO / VP wurden für 30 min dem Magnetfeld der 1mm-Spitze (A, B) beziehungsweise der 3mm-Spitze ausgesetzt (C, D). (A, C) Übersichtsaufnahme der angezogenen Komplexe; Maßstabsbalken 1 cm. (B, D) Vergrößerte Aufnahme der angezogenen Komplexe; Maßstabsbalken = 2 mm.

3.3.4 Lokale Transduktion embryonaler D3-Stammzellen

Die ersten Pilotexperimente zur lokalen Transduktion wurden mit nativen D3 ES-Zellen und einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt durchgeführt. Die Zellen wurden, wie unter 3.3.1 beschrieben, differenziert und an d11 lokal für 30 min mit Hilfe von 300 fg Fe SO / VP, einer Schüttelvorrichtung und Magnetspitze (vgl. Abb. 35) transduziert. Die Analyse der Transgenexpression erfolgte an d13 (Abb. 38). Auf Grund der im Vergleich zur globalen Transduktion kleineren zu transduzierenden Fläche wurde die Anzahl der VP von $7,73 \times 10^8$ auf $3,865 \times 10^7$ verringert.

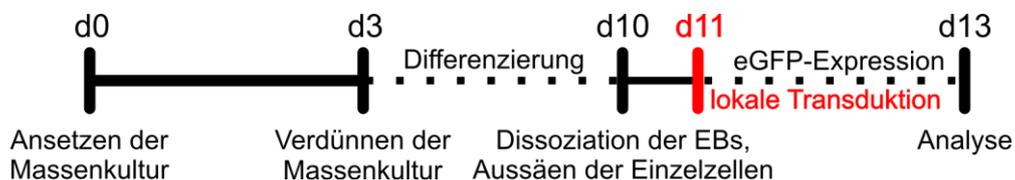


Abb. 38 Ablauf der lokalen SO-vermittelten Transduktion von nativen D3 ES-Zellen mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt. Die Zellen wurden, wie vorab beschrieben, differenziert und einen Tag nach der Dissoziation (d11) lokal transduziert. Die Analyse der eGFP-Expression erfolgte zwei Tage nach der Transduktion.

Um die lokale Ausdehnung der eGFP-Expression einschätzen zu können, wurden mikroskopische Übersichtsaufnahmen bestehend aus mehreren Einzelbildern erstellt (Abb. 39 A). Zu sehen war nach Transduktion mit der Magnetspitze eine starke, zentrale eGFP-Expression auf einer Fläche von etwa $6,6 \text{ mm}^2$ (Abb. 39 B) in dem Bereich, wo während der

Transduktion die Magnetspitze lokalisiert war, und eine schwächere eGFP-Expression in der Peripherie (Abb. 39 C). Damit zeigte sich, dass eine lokale Transduktion mit dem gewählten Versuchsaufbau möglich war.

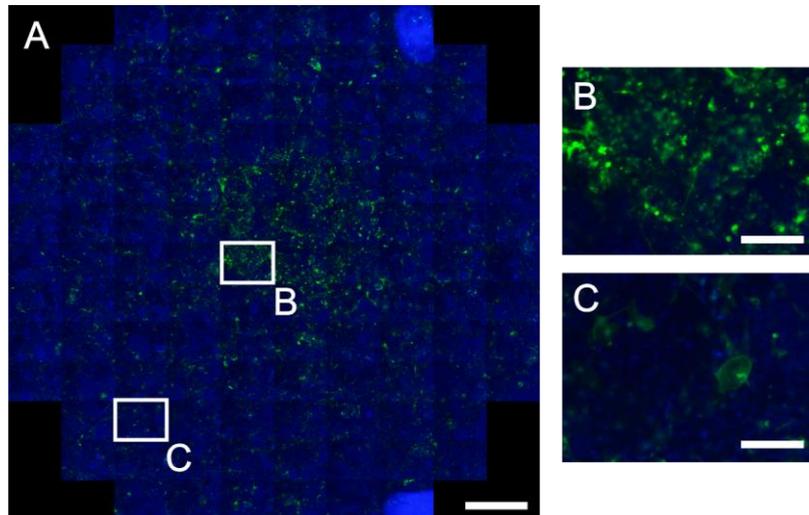


Abb. 39 EGFP-Expression zwei Tage nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (d11). Native D3 ES-Zellen wurden einen Tag nach der Dissoziation (d11) mit Hilfe einer Magnetspitze lokal mit LV/SO-Komplexen bestehend aus $3,865 \times 10^7$ VP CMV-eGFP und 300 fg Fe SO / VP transduziert. Zwei Tage später wurde die eGFP-Expression mikroskopisch dokumentiert (d13). (A) Übersichtsaufnahme bestehend aus mehreren Einzelbildern; blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 1 mm. (B, C) Einzelaufnahmen aus dem Bereich, in dem während der Transduktion die Magnetspitze lokalisiert war (B) beziehungsweise aus der Peripherie (C); blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 200 μ m.

Das finale Ziel der lokalen Transduktionsversuche sollte die Regulation der Gefäßbildung in differenzierenden D3 Flt1-eGFP ES-Zellen und damit der SHP2-*knockdown* in einem entstehenden Gefäßnetzwerk sein. Da die Zellen aber erst ab d16-d18 mit der Ausbildung von Netzwerken beginnen, musste, um ein entstehendes Netzwerk identifizieren zu können, der Transduktionszeitpunkt dem Differenzierungsverhalten der Zellen angepasst und von d11 auf d18 verlegt (Abb. 40).

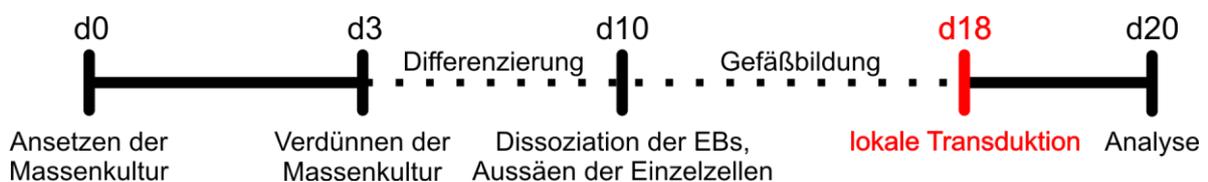


Abb. 40 Ablauf der lokalen Transduktion von nativen D3 ES-Zellen mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt und SO am achten Tag nach der Dissoziation (d18).

Mit diesem angepassten Transduktionsprotokoll wurden erneut zuerst native D3 ES-Zellen mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt und 300 fg Fe SO / VP lokal transduziert. Da in den ersten Versuchen keine reproduzierbare lokale Transduktion erreicht werden konnte, wurden unterschiedliche Parameter verändert. Als geeignete Bedingungen stellten sich eine Transduktionszeit von 10 statt 30 min sowie der Einsatz von $3,865 \times 10^7$ oder $1,9325 \times 10^7$ VP heraus. Wahrscheinlich wurde durch diese Anpassungen eine frühzeitige Sedimentation der LV/MNP-Komplexe verhindert.

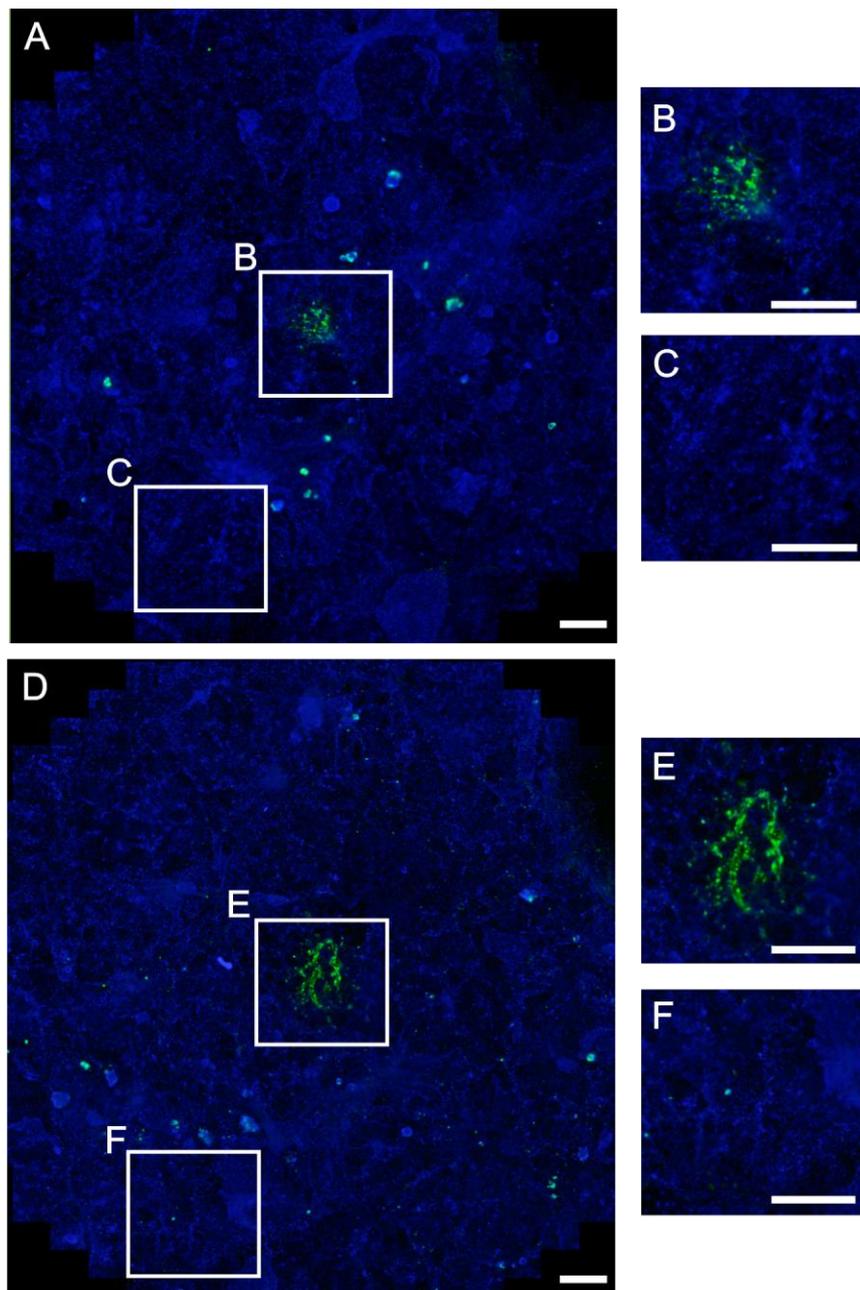


Abb. 41 EGFP-Expression zwei Tage nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit Magnetspitze einem CMV-eGFP-Konstrukt (d18). Native D3 ES-Zellen wurden acht Tage nach der Dissoziation (d18) lokal mit LV/SO-

Komplexen bestehend aus $3,865 \times 10^7$ VP (A-C) oder $1,9325 \times 10^7$ VP (D-F) und 300 fg Fe SO / VP transduziert. Zwei Tage später wurde die eGFP-Expression mikroskopisch dokumentiert (d20). (A, D) Übersichtsaufnahme bestehend aus mehreren Einzelbildern; blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstab = 1 mm. (B+C, E+F) Einzelaufnahmen aus dem Bereich, in dem während der Transduktion die Magnetspitze lokalisiert war (B, E) beziehungsweise aus der Peripherie (C, F); blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 1 mm.

Für beide Virusmengen wurde in Übersichtsaufnahmen eine starke, zentrale eGFP-Expression detektiert (Abb. 41 A, C). Vergrößerte Aufnahmen dieses transduzierten Bereiches (Abb. 41 B, E) bestätigten diesen Eindruck, während in der Peripherie (Abb. 41 C, F) nur vereinzelt eGFP-positive Zellen auftraten. Die transduzierte Fläche lag zwischen $0,9$ und $1,34 \text{ mm}^2$ und war damit im Vergleich zur Transduktion an d11 kleiner (s.o.). Dies lässt sich damit erklären, dass bei einer Transduktion an d11 die Zellen möglicherweise noch stärker proliferieren als an d18.

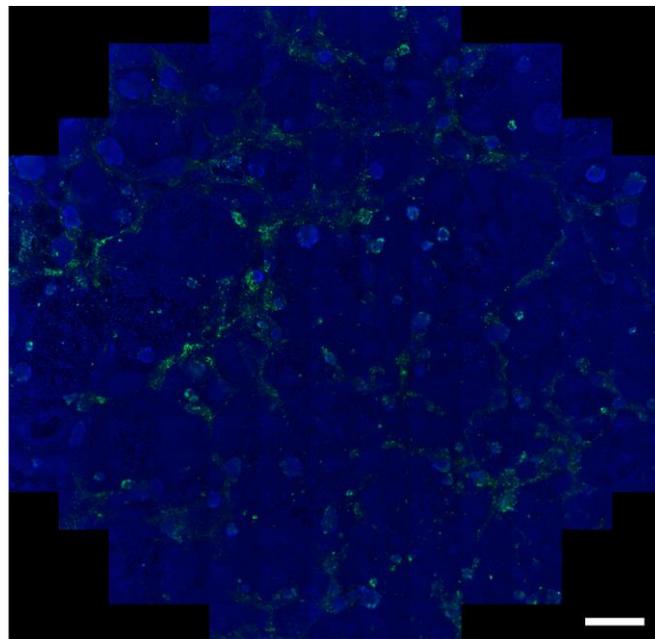


Abb. 42 eGFP-Expression zwei Tage nach LV/SO-vermittelter Transduktion ohne Magnetspitze mit einem CMV-eGFP-Konstrukt (d18). Native D3 ES-Zellen wurden acht Tage nach der Dissoziation (d18) mit LV/SO-Komplexen bestehend aus $3,865 \times 10^7$ VP und 300 fg Fe SO / VP transduziert. Zwei Tage später wurde die eGFP-Expression mikroskopisch dokumentiert (d20); blau = Hoechst, grün = eGFP, Maßstabsbalken = 1 mm.

Um zu auszuschließen, dass eine vergleichbare Transgenexpression auch ohne Verwendung der Magnetspitze auftritt, wurden in einem Kontrollansatz native D3 ES-Zellen an d18 mit $3,865 \times 10^7$ VP eines lentiviralen CMV-eGFP-Konstruktes auf einer Schüttelvorrichtung ohne

Magnetspitze transduziert. Wie Abb. 42 zeigt, war in diesem Falle keine lokale eGFP-Expression zu beobachten.

Eine lokale Transduktion differenzierender D3-ES-Zellen war demnach auch am achten Tag nach der Dissoziation möglich, wenn die Transduktionszeit von 30 auf 10 min verringert wurde. Die Magnetspitze war hierbei unbedingt notwendig, um eine lokale Transgenexpression zu gewährleisten.

3.3.5 Lokale Transduktion von embryonalen, transgenen D3 Flt1-eGFP-Stammzellen

Nachdem mit nativen D3 ES-Zellen und einem CMV-eGFP-Lentivirus überprüft worden war, ob und mit welchen Konditionen eine lokale Transduktion mit Hilfe von SO und eines magnetischen Feldes möglich ist, wurden im Folgenden die zuvor beschriebenen transgenen D3 Flt1-eGFP ES-Zellen verwendet. Des Weiteren wurde das CMV-eGFP-Reporterkonstrukt durch ein funktionelles PGK-tomato-H1-sh-SHP2-Konstrukt, welches zum einen ein rot fluoreszierendes Protein (tomato) unter Kontrolle des PGK-Promotors und zum anderen eine sh-SHP2-Sequenz unter Kontrolle des H1-Promotors exprimiert, ersetzt. Transduziert wurde für 10 min mit $3,865 \times 10^7$ oder $1,9325 \times 10^7$ VP, 300 fg Fe SO / VP am achten Tag nach der Dissoziation (d18). Die Analyse erfolgte zwei Tage später (d20).

In den Übersichtsaufnahmen (Abb. 43 A, D) konnten differenzierende und daher grün fluoreszierende endotheliale Zellen, eine schwache rote Hintergrundfluoreszenz und eine stärkere rote Fluoreszenz in transduzierten Arealen detektiert werden. Nach Transduktion mit $3,865 \times 10^7$ VP konnte keine lokale Expression des rot fluoreszierenden Reporterproteins beobachtet werden (Abb. 43 B, C). Nach Transduktion mit $1,9325 \times 10^7$ VP trat eine verstärkte rote Fluoreszenz im Bereich der vormals positionierten Magnetspitze auf (Abb. 43 E), während in der Peripherie (Abb. 43 F) nur vereinzelt transduzierte Zellen vorlagen.

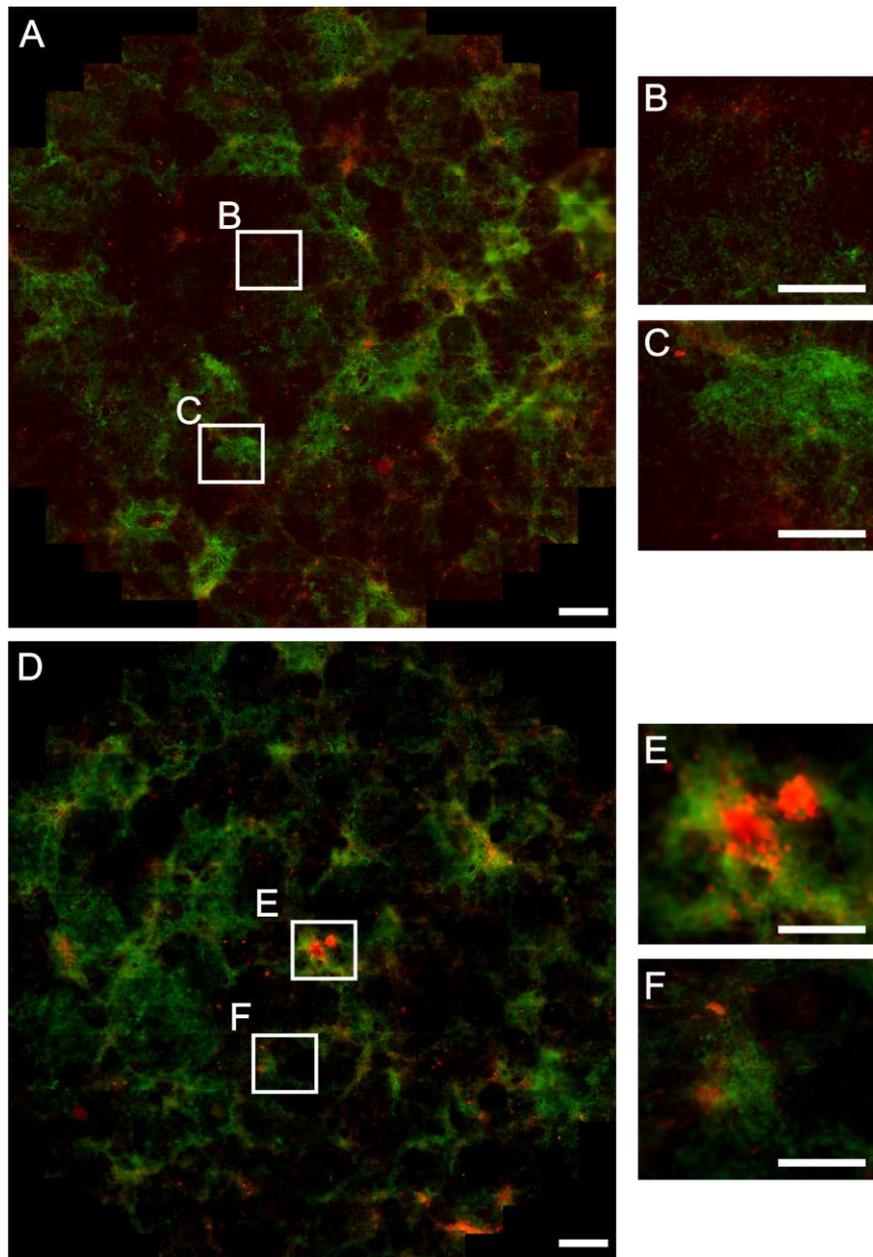


Abb. 43 Tomato-Expression zwei Tage nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem PGK-tomato-H1-sh-SHP2-Konstrukt (d18). Transgene D3 Flt1-eGFP ES-Zellen wurden acht Tage nach der Dissoziation (d18) lokal mit LV/SO-Komplexen bestehens aus $3,865 \times 10^7$ (A-C) beziehungsweise $1,9325 \times 10^7$ VP (D-F) und 300 fg Fe SO / VP transduziert. Zwei Tage später wurde die tomato-Expression mikroskopisch analysiert (d20). (A, D) Übersichtsaufnahme bestehend aus mehreren Einzelbildern; grün = eGFP, rot = tomato, Maßstab = 1 mm. (B+C, E+F) Einzelaufnahmen aus dem Bereich, in dem während der Transduktion die Magnetspitze lokalisiert war (B, E) beziehungsweise aus der Peripherie (C, F); grün = eGFP, rot = tomato, Maßstabsbalken = 500 μm .

Um zu überprüfen, ob auch die lokale Transduktion eines bereits bestehenden, voll ausgebildeten Netzwerkes möglich ist, wurde weiterführend die lokale Transduktion am zehnten Tag nach der Dissoziation (d20) durchgeführt. Die Analyse erfolgte an d22.

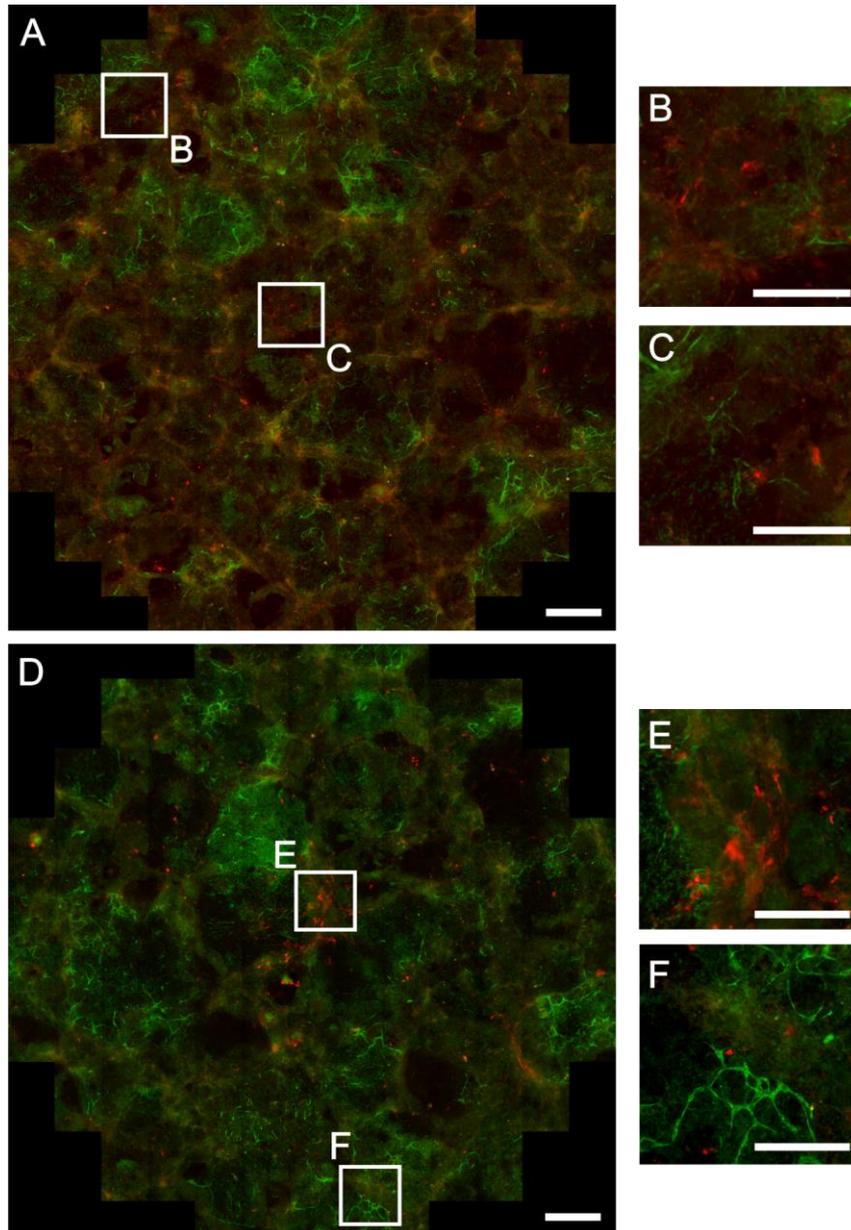


Abb. 44 Tomato-Expression zwei Tage nach LV/SO-vermittelter Transduktion mit einem PGK-tomato-H1-sh-SHP2-Konstrukt (d20). Transgene D3 Flt1-eGFP ES-Zellen wurden zehn Tage nach der Dissoziation (d20) lokal mit LV/SO-Komplexen bestehens aus $3,865 \times 10^7$ (A-C) beziehungsweise $1,9325 \times 10^7$ VP (D-F) und 300 fg Fe SO / VP transduziert. Zwei Tage später wurde die tomato-Expression mikroskopisch analysiert (d22). (A, D) Übersichtsaufnahme bestehend aus mehreren Einzelbildern; grün = eGFP, rot = tomato, Maßstab = 1 mm. (B+C, E+F) Einzelaufnahmen aus dem Bereich, in dem während der Transduktion die Magnetspitze lokalisiert war (B, E) beziehungsweise aus der Peripherie (C, F); grün = eGFP, rot = tomato, Maßstabsbalken = 500 μ m.

Wie auch schon bei der Transduktion an d18 konnten in den Übersichtsaufnahmen (Abb. 44 A, D) differenzierende und daher grün fluoreszierende endotheliale Zellen, eine schwache rote Hintergrundfluoreszenz und eine stärkere rote Fluoreszenz in transduzierten Zellen detektiert werden. Nach Transduktion mit $3,865 \times 10^7$ VP konnte keine lokale Expression des

rot fluoreszierenden Reporterproteins beobachtet werden (Abb. 44 B, C). Nach Transduktion mit $1,9325 \times 10^7$ VP trat eine verstärkte rote Fluoreszenz im Bereich der vormals positionierten Magnetspitze auf (Abb. 44 E), während in der Peripherie (Abb. 44 F) nur vereinzelt transduzierte Zellen vorlagen.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine SO-vermittelte lokale Transduktion von D3 Flt1-eGFP ES-Zellen mit $1,9325 \times 10^7$ VP des PGK-tomato-H1-sh-SHP2-Konstruktes an verschiedenen Zeitpunkten möglich ist und die transduzierten Zellen mit Hilfe des Reporterproteins detektiert werden können. Somit könnte in weiterführenden Experimenten die Auswirkungen eines lokalen SHP2-*knockdowns* auf die Entstehung eines Gefäßnetzwerkes untersucht werden.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln (MNPs) zwei verschiedene Ansätze verfolgt:

1. Geschädigtes Endothel in murinen Aorten sollte *ex vivo* unter Flussbedingungen durch bovine pulmonalarterielle Endothelzellen (bPAECs) ersetzt werden. Hierbei sollten die MNPs zwei Aufgaben erfüllen:
 - a) Magnetisierung der Zellen, um sie auch unter Flussbedingungen mit Hilfe eines magnetischen Feldes an der Gefäßwand zurückhalten zu können.
 - b) Effiziente lentivirale Transduktion der Zellen, um eine Überexpression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) zu garantieren und dadurch eine Verbesserung der Gefäßfunktion zu ermöglichen,

Um diese Aufgaben zu erfüllen, wurden MNPs, abhängig von ihren physikalischen Eigenschaften, einzeln oder miteinander kombiniert eingesetzt.

2. Durch einen *knockdown* der Tyrosinphosphatase SHP2 in differenzierenden embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde eine lokale Modulation der Angiogenese angestrebt. Hierbei sollten die MNPs zusammen mit Hilfe eines geeigneten magnetischen Feldes die lokale lentivirale Transduktion ermöglichen.

4.1 Lentivirale Vektoren

Aus den in 1.4 aufgelisteten Eigenschaften der viralen Vektoren ergibt sich, dass sich für die angedachte MNP-basierte Zellersatztherapie beziehungsweise SHP2-Gentherapie lentivirale Vektoren (LVs) am besten eignen. Sie besitzen eine ausreichende Aufnahmekapazität sowohl für das eNOS- als auch für das SHP2-Konstrukt (> 5000 bp) und ermöglichen eine stabile Transgenexpression⁷⁶. Im Vergleich zu retroviralen Vektoren sind besonders die selbst inaktivierenden LVs der dritten Generation sicherer, da das Risiko von Insertionsmutagenesen verringert ist⁸⁶.

4.1.1 Lentivirale Transduktion von Endothelzellen

Generell ist es schwierig, Transduktionsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen untereinander zu vergleichen, da die Protokolle stark variieren. In der vorliegenden Arbeit wurde in bPAECs nach lentiviraler Applikation über Nacht bei einer MOI (*multiplicity of infection*) von 50 eine Transduktionseffizienz von 28 % (CMV-eGFP) oder 13 % (CMV-eNOS-IRES-eGFP) erreicht. Durch die Verwendung von MNPs konnte diese auf 69 %

(CMV-eGFP) beziehungsweise 28 % (CMV-eNOS-IRES-eGFP) gesteigert werden. Die unterschiedliche Effizienz der beiden Konstrukte lässt sich mit ihrer Größe erklären. Das größere CMV-eNOS-IRES-eGFP-Konstrukt wies die geringere Transduktionseffizienz auf. Die in dieser Arbeit ermittelte Transduktionseffizienz für das CMV-eGFP-Konstrukt von 28 % (s.o.) stimmt mit den Beobachtungen von Trück et al. überein. In bPAECs erreichten sie nach lentiviraler Transduktion mit einem CMV-eGFP-Konstrukt über Nacht ebenfalls eine Transduktionsrate von etwa 30 %, verwendeten allerdings eine geringere MOI¹³⁷.

In vitro konnte im Rahmen dieser Arbeit kein negativer Effekt der LVs auf bPAECs beobachtet werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Dishart et al., die *in vitro* nach lentiviraler Transduktion weder in Endothelzellen noch in glatten Muskelzellen toxische Effekte nachweisen konnten¹³⁸. Für die *In-vivo*-Anwendung von LVs wird nur eine geringe Immunogenität beschrieben^{76, 139, 140}, die aber, beispielsweise durch Anpassung des LV-Produktionsprotokolls, noch weiter minimiert werden kann¹⁴¹. Ob LV/MNP-transduzierte Endothelzellen *in vivo* eine Immunantwort hervorrufen, wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht, allerdings ist davon auszugehen, wenn art- oder körperfremde Zellen verwendet werden. Außerdem wurde bereits beschrieben, dass nach direkter lentiviraler Injektion ins Gehirn transgenexprimierende Zellen eine Immunantwort hervorrufen können¹⁴². Unabhängig von der Immunantwort könnte es *in vivo* generell sinnvoll sein, induzierbare Promotoren zu verwenden, um die Transgenexpression zu steuern und sie erst zu aktivieren, wenn es erforderlich ist¹⁴³.

Ein weiterer Punkt, der in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt wurde, ist, ob das Genom der Endothelzellen durch Integration des lentiviralen Genoms geschädigt wird oder Protoonkogene aktiviert werden. Sollten in weiterführenden Versuchen Komplikationen durch Insertionsmutagenesen auftreten, könnte diese durch den Einsatz sogenannter Selbstmordgene umgangen werden. Selbstmordgene kodieren für ein Enzym, das eine harmlose Substanz in eine tödliche Droge umwandeln kann. Die bekanntesten Beispiele sind die Herpes-simplex-Thymidin-Kinase, welche Ganciclovir in Ganciclovirtriphosphat konvertiert, und die Cytosindeaminase, durch die 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil umgesetzt wird¹⁴⁴.

Auf Grund ihrer stabilen Integration ins Wirtsgenom eignen sich LVs besonders gut für gentherapeutische Ansätze, in denen eine dauerhafte Transgenexpression erwünscht ist. Des Weiteren lassen sie sich mit MNPs kombinieren. Dadurch kann zum einen die Transduktionseffizienz gesteigert werden und zum anderen wird die Magnetisierung oder

lokale Transduktion von Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes ermöglicht.

4.1.2 Lokale lentivirale Transduktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob MNP-vermittelte, lokale Transduktionen mit einem *small-hairpin*-SHP2-Konstrukt möglich sind. Tatsächlich ist es gelungen, embryonale Stammzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien, lokal zu transduzieren. Negative Effekte basierend auf einer zu hohen Konzentration an LVs oder MNPs konnten hierbei nicht beobachtet werden und wären wenn auch eher auf die MNPs als auf die LVs zurückzuführen (vgl. 4.2.2). Als nächstes müsste *in vitro* und *in vivo* die Auswirkungen eines lokalen SHP2-*knockdowns* untersucht werden. Das Ziel bei einer *In-vivo*-Anwendung wäre, LV/MNP-Komplexe systemisch zu verabreichen, mit einem geeigneten magnetischen Feld lokal anzuziehen und mittels eines SHP2-*knockdowns* die Angiogenese zu inhibieren. Hierbei müsste insbesondere auf eine Immunantwort hervorgerufen durch die LV-Injektion geachtet werden. Zwar wird für LVs generell eine geringe Immunogenität beschrieben¹⁴⁵, aber es wurde auch schon eine Aktivierung des Immunsystems nach systemischer LV-Applikation beobachtet¹⁴⁶. Zusätzlich können insbesondere antigenpräsentierende Zellen, wenn sie transduziert werden, eine transgenbasierte Immunantwort hervorrufen. Sollte dies im Rahmen eines lokalen SHP2-*knockdowns* auftreten, wäre es möglich, den verwendeten Vektor so zu verändern, dass hauptsächlich der gewünschte Zelltyp und keine antigenpräsentierende Zellen infiziert werden¹⁴⁷ und so eine Immunantwort zu umgehen.

4.2 MNPs und Toxizität

4.2.1 Toxizität von MNPs in Endothelzellen

Zu dem wichtigen Thema „Toxizität von MNPs“ existieren einige Publikationen, die sich gezielt mit der Auswirkung von MNPs auf Endothelzellen beschäftigen. Ihre gemeinsame Aussage ist: MNPs können – abhängig von der Beschichtung und der eingesetzten Konzentration – toxisch auf Endothelzellen wirken.

In HUVECs (humane Endothelzellen aus der Nabelvene, *human umbilical vein endothelial cells*) wurden für Dextran- oder Zitronensäure-beschichtete MNPs eine herabgesetzte Viabilität, ein verändertes Zytoskelett sowie vermindertes angiogenetisches Potential und eine verlangsamte Migration beschrieben¹⁴⁸. In der gleichen Zelllinie verursachten MNPs mit einer Beschichtung aus 3-Aminopropyltriethoxysilane und Copolymeren der Acryl- und Krotonsäure in geringen Konzentrationen (< 200 µg Fe / ml) keinen dieser Effekte. Bei

höheren MNP-Konzentrationen ($\geq 400 \mu\text{g Fe / ml}$) verringerte sich hingegen die Proliferation und es wurden erhöhte eNOS- und NO-Level sowie ein verringerte Caveolin-1-Expression nachgewiesen¹⁴⁹. Allerdings induzierten die MNPs keine Apoptose¹⁴⁹. Bei *In-vivo*-Versuchen mit Mäusen wurden nach intravenöser MNP-Injektion mit 5 mg Fe / kg oder 20 mg Fe / kg weder gesundheitliche Veränderungen noch Organschäden beobachtet. Nach dreitägiger Injektion mit 20 mg Fe / kg der MNPs wurden erhöhte eNOS-Level, eine gesteigerte NO-Produktion, verringerte Caveolin-1-Level sowie eine Schädigung des Endothels beschrieben. Alle Effekte waren bei MNP-Injektionen über einen längeren Zeitraum als drei Tage reversibel¹⁴⁹. Ähnliche Effekte beschreiben Buyukhatipoglu und Clyne für Endothelzellen aus dem Schwein. Ab einer MNP-Konzentration von $500 \mu\text{g Fe / ml}$ wurde ein erhöhtes ROS-Level, veränderte Zellmorphologie und die Ausbildung von Stressfasern nachgewiesen. Durch Einsatz von ROS-Inhibitoren waren diese Effekte teilweise reversibel¹⁵⁰.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit NDT und PEI lagen die eingesetzten MNP-Konzentrationen mit $5 \mu\text{g Fe / ml}$ unterhalb der publizierten toxischen Level von 400 beziehungsweise $500 \mu\text{g Fe / ml}$. Entsprechend wurden für die kombinierte Anwendung von NDT-Mag1 und PEI-Mag2 keine toxischen Effekte nachgewiesen (vgl. Abb. 13). Dies korreliert mit den Daten von C. Trück (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn), die bei der Transduktion unterschiedlicher Endothelzelllinien mit LV/PEI-Komplexen, die geringe Mengen an PEI-Mag2 (ca. 15 pg Fe / Zelle , beziehungsweise $3 \mu\text{g Fe / ml}$) enthielten, keine Toxizität beobachtete¹⁵¹. Der Einsatz höherer Mengen von NDT-Mag1 und PEI-Mag2 ($\geq 100 \text{ pg Fe / Zelle}$, beziehungsweise $\geq 20 \mu\text{g Fe / ml}$) führte hingegen zu einer signifikant reduzierten Zellviabilität (Daten für PEI-Mag2 nicht gezeigt). Für PEI-Mag2 ist dies im Zusammenhang mit Transfektionen bereits beschrieben worden und wird auf die Zerstörung der Zell-, mitochondrialen und Vesikelmembranen durch die Polyethyleniminbeschichtung zurückgeführt^{136, 152}. Dieselbe Ursache ist auch für die PEI-Mag2-gekoppelte lentivirale Transduktion wahrscheinlich. Im Vergleich dazu ist über die Zytotoxizität von NDT-Mag1 beziehungsweise der Nonandithiolbeschichtung wenig bekannt. Es wird allerdings eine generelle Toxizität von Thiolen beschrieben¹⁵³, sodass eine schädigende Wirkung des Nonandithiols des NDT-Mag1 angenommen werden kann.

Bei der Transduktion von bPAECs mit SO-Mag5 entsprach die gewählte Kondition von $4000 \text{ fg Fe / infektiösem Viruspartikel (IP)}$ einer Eisenmenge von 200 pg / Zelle beziehungsweise einer Eisenkonzentration von $40 \mu\text{g Fe / ml}$ und lag damit zwar unterhalb der für andere

MNPs publizierten kritischen Grenze von 400 beziehungsweise 500 $\mu\text{g Fe / ml}$, allerdings oberhalb der für NDT-Mag1 und PEI-Mag2 kritischen Grenze von 100 pg Fe / Zelle beziehungsweise 20 $\mu\text{g Fe / ml}$ (s.o.). Nichtsdestotrotz zeigte die Applikation der LV/SO-Komplexe weder zytotoxische Effekte noch beeinflusste sie charakteristische Eigenschaften der Endothelzellen. Zu beobachten war allerdings ein verlangsamtes Wachstum innerhalb der ersten 72 h nach der Transduktion, welches nicht auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen war. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Daten von Trueck et al., die für SO-Mag5 in unterschiedlichen Endothelzelllinien keine Toxizität nachweisen konnten¹³⁷. Zum anderen stimmen sie mit den Beobachtungen von Su et al. überein, die ein eingeschränktes Wachstum von HUVECs nach Behandlung mit MNPs, aber weder Nekrose noch Apoptose beschreiben¹⁴⁹. Demnach scheinen SO-Mag5 und die von Su et al. beschriebenen MNPs zwar die Proliferation zu beeinflussen, aber keine Apoptose zu induzieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Interaktion von MNPs mit dem Zytoskelett¹⁴⁸. Zwar konnten im Rahmen dieser Arbeit in immunhistochemischen Färbungen nach MNP-vermittelter Transduktion keine Veränderungen des Aktinzytoskelettes nachgewiesen werden, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der dynamische Auf- und Abbau der Aktinfilamente beziehungsweise der Mikrotubuli durch die Anwesenheit von SO-Mag5 beeinflusst wird¹⁵⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MNPs PEI-Mag2 und NDT-Mag1 toxisch auf Endothelzellen wirken, wenn sie mit einer Konzentration von 100 pg Fe / Zelle oder mehr eingesetzt werden. SO-Mag5 hingegen beeinflusste auch in höheren Konzentrationen von 200 pg Fe / Zelle die Zellviabilität nicht.

4.2.2 Toxizität von MNPs bei lokalen Transduktionen

Nicht so gut untersucht wie die Auswirkungen von MNPs auf Endothelzellen ist der Einsatz von MNPs bei lokalen Transduktionen. Für die lokalen Transduktionen in der vorliegenden Arbeit wurden 1,2 $\mu\text{g Fe}$ beziehungsweise 0,6 $\mu\text{g Fe pro cm}^2$ eingesetzt. Neben der möglichen Toxizität von LV/MNP-Komplexen muss hier auch die Größe der zu transduzierenden Fläche berücksichtigt werden. Eine LV/MNP-Menge, die auf einer Fläche von 10 cm^2 nicht toxisch wirkt, kann auf einer Fläche von 2 mm^2 möglicherweise die Proliferation hemmen oder Apoptose induzieren. So zeigte C. Kilgus (Institut für Physiologie, Universität Bonn) in seiner Dissertation, dass die lokale Transduktion von Kardiomyozyten mit nur 0,42 $\mu\text{g Fe (PEI-Mag2) / cm}^2$ zu gesteigertem Zelltod und Störungen in der elektrophysiologischen Kopplung

fürten. Die Reduktion der Eisenmenge auf $0,21 \mu\text{g Fe} / \text{cm}^2$ konnte diese Probleme zumindest teilweise beheben. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten lokalen Transduktionen die eingesetzte Eisenmenge vorab optimiert (Daten nicht gezeigt). Bei den letztendlich verwendeten Konditionen konnten keine negativen Effekte beobachtet werden. Wahrscheinlich liegt dies an der Zellgröße und der Zelldichte zum Zeitpunkt der Transduktion: Die Fläche von Kardiomyozyten ist größer als die der D3 ES-Zellen, sodass sie während der Transduktion Kontakt zu einer höheren Menge an Partikeln haben. Daher wirken in Kardiomyozyten schon $0,42 \mu\text{g Fe} / \text{cm}^2$ toxisch (siehe oben) während D3 ES-Zellen auch höhere Mengen tolerieren. Des Weiteren wachsen Kardiomyozyten im Monolayer^{155, 156, 157}, während D3-ES-Zellen während der Differenzierung dreidimensionale Multilayer ausbilden. Dadurch sind sie bei einer Transduktion nicht so anfällig für hohe und möglicherweise toxische Mengen an MNPs.

4.3 Gezielter Einsatz von MNPs für Magnetisierung und Transduktion

4.3.1 NDT-Mag1 und PEI-Mag2 – Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen

Die ersten Versuche zur Magnetisierung und Transduktion von bPAECs mit Hilfe von MNPs wurden mit einer Kombination der Partikel NDT-Mag1 und PEI-Mag2 durchgeführt. In früheren Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen wurde bereits das Magnetisierungspotential von NDT-Mag1 für epitheliale H441-Zellen beschrieben¹⁰². Für diese Zelllinie lieferte der Einsatz von $25 \text{ pg Eisen (Fe)} / \text{Zelle}$ das optimale Verhältnis von aufgenommener zu applizierter Eisenmenge. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte die Verwendung derselben Eisenmenge in bPAECs keine toxischen Effekte und führte zu einer Magnetisierungsrate von etwa 75 %. Verglichen mit den H441-Zellen, in denen nach Applikation von $25 \text{ pg Fe} / \text{Zelle}$ etwa $22 \text{ pg Fe} / \text{Zelle}$ nachgewiesen werden konnten¹⁰², war die Eisenaufnahme und damit der Eisengehalt in bPAECs mit etwa $8 \text{ pg Fe} / \text{Zelle}$ geringer. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der Eisengehalt in H441-Zellen 24 h nach der MNP-Applikation bestimmt wurde, in bPAECs aber erst nach 72 h. Der spätere Analysezeitpunkt könnte zu einer Verdünnung der intrazellulären Eisenmenge durch Zellproliferation oder zu einer erhöhten Eisenabgabe geführt haben. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die MNP-Aufnahme verschiedener Zelllinien unterschiedlich effizient ist. Für PEI-Mag2 beschrieben Trück et al. eine hohe Virusbindungskapazität schon bei einem geringen Eisen/Virus-Verhältnis und eine verbesserte lentivirale Transduktion in mehreren

Endothelzelllinien¹³⁷. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Daten von Trück et al. überein. Die Transduktion von bPAECs mit 40 fg Fe / Viruspartikel (VP) steigerte sowohl die Expression des Reportergens eGFP als auch die des funktionellen Gens eNOS signifikant im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Hingegen lieferte die Transduktion mit NDT-Mag1 verglichen mit der lentiviralen Transduktion ohne MNPs über Nacht, welches die Standardtransduktionsmethode ist, keine Verbesserung. Dafür verantwortlich können die niedrige Virusbindungskapazität von NDT-Mag1¹⁵¹ sowie das Fehlen von H⁺-puffernden Polyaminen in der Beschichtung des Partikels sein. Partikel wie PEI-Mag2, deren Beschichtung solche Polyamine enthält, werden verstärkt aus Endosomen ins Zytoplasma freigesetzt¹⁵⁸. Dieser Aspekt ist von Bedeutung, da eine erfolgreiche MNP-vermittelte Transduktion nur ablaufen kann, wenn die Komplexe aus LV und MNPs im Zytoplasma und nicht in den Endosomen vorliegen⁸⁵.

Die Beobachtung von Sanchez-Antequera et al., dass eine Vorbeladung der Zellen die Effizienz der nachfolgenden MNP-vermittelten Transduktion verbessert, konnte hier nicht bestätigt werden¹⁵⁹. Die vorherige Magnetisierung der Zellen mit NDT-Mag1 beeinflusste die lentivirale Transduktion mit PEI-Mag2 nicht. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion der LV/MNP-Komplexe mit den Zellen durch Verwendung einer unter der Zellkulturplatte positionierten Magnetplatte bereits so gut ist, dass sie durch eine Vorbeladung nicht noch weiter gesteigert werden kann. Trotzdem war die Vorbeladung mit NDT-Mag1 notwendig, um die Zellen *ex vivo* unter Flussbedingungen zurückhalten zu können, da PEI-Mag2-beladene Zellen ein wesentlich geringeres magnetisches Moment aufweisen als NDT-Mag1-beladene Zellen. Dass die Kombination aus PEI-Mag2-vermittelter Transduktion und Vorbeladung mit einem weiterem MNP in einem größeren magnetischen Moment resultiert, wurde auch von Trueck et al. beschrieben¹³⁷.

Nachteile einzelner MNPs wie eine geringe Virusbindungskapazität oder ein schwaches Magnetisierungspotential können also durch die Kombination mehrerer MNPs überwunden werden.

4.3.2 SO-Mag5 – Magnetisierung und lentivirale Transduktion von Endothelzellen

Der kombinierte Einsatz von PEI-Mag2 und NDT-Mag1 steigerte die lentivirale Transduktionseffizienz und magnetisierte Zellen so stark, dass sie bei der *Ex-vivo*-Perfusion eines Blutgefäßes durch zwei seitlich an der Gefäßwand positionierte Magnete zurückgehalten werden konnten. Es gibt allerdings zwei Nachteile bezüglich des

kombinierten Einsatzes von NDT-Mag1 und PEI-Mag2. Zum einen bedeutet eine Vorbeladung mit anschließender Transduktion eine Belastung für die Zellen, da sie innerhalb von 12 h zweimal für jeweils 30 min in einer Pufferlösung statt in Medium inkubiert werden. Zum anderen kann die Polyethyleniminbeschichtung des PEI-Mag2-Partikels toxisch wirken¹³⁶. Daher wurde nach einem MNP gesucht, der die Eigenschaften von NDT-Mag1 und PEI-Mag2 miteinander vereint und sowohl ein starkes Magnetisierungspotential besitzt als auch eine hohe Virusbindungskapazität. SO-Mag5 erfüllte diese Voraussetzungen. Um Endothelzellen in einem Schritt mit SO-Mag5 zu beladen und zu transduzieren, war es allerdings notwendig, das Transduktionsprotokoll anzupassen. In den Versuchen mit NDT-Mag1 und PEI-Mag2 wurde, wie es auch in anderen Arbeitsgruppen üblich ist, die zur Transduktion verwendete Eisenmenge pro VP angegeben^{104, 137}. Abhängig vom VP/IP-Verhältnis variiert dadurch allerdings die eingesetzte Eisenmenge pro Zelle (vgl. 2.2.6). Um eine konstante Eisenmenge pro Zelle und damit eine effektive Retention beladener und transduzierter Zellen unter Flussbedingungen zu gewährleisten, wurde in den Versuchen mit SO-Mag5 eine gleichbleibende Eisenmenge pro IP statt pro VP eingesetzt.

Die Analyse der Transduktionseffizienz von SO-Mag5 im Vergleich zu PEI-Mag2 als Positivkontrolle zeigte keinen Unterschied zwischen den Konditionen LV/PEI(300), LV/SO(300) und LV/SO(4000). Die von Trueck et al. beschriebene geringere Transduktionseffizienz von SO-Mag5 im Vergleich zu PEI-Mag2 konnte hier nicht beobachtet werden¹³⁷. Dies liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen Transduktionsprotokollen, insbesondere an der verwendeten MOI. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Verwendung von SO-Mag5 eine MOI von 50 eingesetzt, während Trueck et al. mit einer MOI von 5 transduzierten und damit eine um den Faktor 10 geringere Menge infektiöser Viruspartikel einsetzte¹³⁷.

Auch wenn hinsichtlich der Transduktionseffizienz keine Unterschiede zwischen LV/PEI(300)-, LV/SO(300)- und LV/SO(4000)-transduzierten Zellen beobachtet werden konnte, so variierte doch das Magnetisierungspotential der verschiedenen Komplexe. Dafür gibt es zwei Erklärungen: Zum einen haben verschiedene MNPs unterschiedliche magnetische Eigenschaften. Schon auf Partikelebene besitzt SO-Mag5 im Vergleich zu PEI-Mag2 das größere magnetische Moment (vgl. Tab. 12). Auf Komplexebene zeigten Trueck et al., dass LV/SO-Komplexe schneller sedimentieren als LV/PEI-Komplexe¹³⁷. Beide Beobachtungen deuten auf ein höheres Magnetisierungspotential von SO-Mag5 im Vergleich zu PEI-Mag2 hin. Zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der

applizierten Eisenmenge, der Eisenaufnahme und damit dem Magnetisierungsgrad der Zellen beobachtet werden. Bei erhöhter Eisenapplikation lag in bPAECs eine erhöhte Eisenaufnahme vor. Die Eisenaufnahme scheint hierbei nicht linear zu sein, sondern einer Sättigungskurve zu folgen, wie es für andere MNPs auch schon in epithelialen Zellen, verschiedenen Karzinomzelllinien und Neuroblasten beschrieben wurde^{102, 104, 160}. Eine Korrelation besteht außerdem zwischen der Eisenaufnahme und der Sedimentationskurve in einem magnetischen Feld sowie dem magnetischen Moment. Je höher die applizierte Eisenmenge und damit die Eisenaufnahme, desto größer ist das magnetische Moment der Zellen und desto schneller sedimentieren Zellen in einem magnetischen Feld. Nachdem dies bereits für epitheliale H441-Zellen gezeigt wurde¹⁰², konnte dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit nun auch für die Beladung von bPAECs mit SO-Mag5 nachgewiesen werden.

Diese magnetischen Eigenschaften von SO-Mag5 beziehungsweise von LV/SO(4000)-transduzierten bPAECs erlaubten es, die Zellen *ex vivo* mit Hilfe eines Magnetfeldes unter Flussbedingungen an der Gefäßwand zurückzuhalten. Als Weiterentwicklung der *Ex-vivo*-Perfusionen mit NDT-Mag1-beladenen und PEI-Mag2-transduzierten Zellen, wurde statt der zwei seitlich am Gefäß anliegenden Magnete eine Magnethalterung verwendet, die eine radialsymmetrische Retention der Zellen ermöglichte. Bisher kamen radialsymmetrische Magnetfelder häufig im Bereich der Gewebezüchtung zum Einsatz^{161, 162, 163, 164}. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, bieten sie aber auch die Option, bei einer Zellersatztherapie in Gefäßen geschädigtes Endothel flächendeckend und nicht nur lokal an einer Stelle zu ersetzen. Da weiterführende funktionelle Messungen von S. Vosen (Institut für Physiologie 1, Universität Bonn) im Drahtmyographen ergaben, dass in deendothelialisierten Mausearten die Gefäßfunktion nach einer *Ex-vivo*-Perfusion mit eNOS-überexprimierenden bPAECs wiederhergestellt werden konnte, besteht mit Hilfe von SO-Mag5 und speziell designten Magnetfeldern die Möglichkeit, Zellersatz- und Gentherapie miteinander zu kombinieren.

4.3.3 SO-Mag5 – lokale Transduktion

Eine kombinierte Gen- und Zellersatztherapie ist ein vielversprechender Ansatz, um beispielsweise in atherosklerotisch geschädigten Gefäßen das funktionell beeinträchtigte native Endothel zu ersetzen. Die lokale Modulation der Angiogenese stellt bei anderen Erkrankungen – beispielsweise Krebs – einen vielversprechenden Therapieansatz dar^{165, 166}. So könnte die Angiogenese lokal durch den *knockdown* eines pro-angiogenetischen Faktor

inhibiert und dadurch das Tumorwachstum verringert werden. Um das zu erreichen, käme der Einsatz von MNPs in Kombination mit einem magnetischen Feld in Frage. Wie Kilgus et al. 2012 zeigten, ist die lokale Transduktion von Kardiomyozyten mit Komplexen aus lentiviralen Vektoren und SO-Mag5 möglich ¹⁶⁷. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren für die lokale Transduktion eines ES-Zell-abgeleiteten *In-vitro*-Angiogenesemodells entwickelt. Die Zielstellung war, die Auswirkung eines lentiviralen *SHP2-knockdowns* innerhalb eines Gefäßnetzwerkes zu untersuchen.

Für die lokalen Transduktionsversuche wurden eine 3mm- und eine 1mm-Magnetspitze miteinander verglichen. Beide Spitzen waren in der Lage LV/SO-Komplexe lokal anzureichern, unterschieden sich aber hinsichtlich der Fläche und der Homogenität. Die 3mm-Spitze zog die Komplexe auf einer größeren Fläche und inhomogener an als die 1mm-Spitze. Dies korreliert mit den Beobachtungen von Kilgus et al., die für die 3mm-Spitze bei Zellpositionierungsversuchen mit MNP-beladenen Knochenmarkszellen eine ungleichmäßige Anziehung der Zellen feststellten ¹⁶⁷. Dies lässt sich mit der größeren Fläche der 3mm-Spitze und dem Verlauf beziehungsweise der Dichte der magnetischen Feldlinien, erklären.

Weitere entscheidende Kriterien neben der bereits angesprochenen magnetischen Flussdichte waren die eingesetzte VP-Menge und damit die applizierte Eisenmenge sowie die Transduktionszeit. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen war eine Reduktion der Transduktionszeit von 30 min auf 10 min notwendig, um eine reproduzierbare lokale Transduktion zu erzielen. Ein Grund hierfür könnte die Sedimentation der LV/SO-Komplexe sein. Dass MNPs und auch LV/MNP-Komplexe, wenn sie sich in Suspension befinden, abhängig von der Zeit und ihrer Größe sedimentieren, wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben ^{102, 128, 137, 168, 169}. Daher ist es bei einer längeren Transduktionszeit generell wahrscheinlicher, dass die LV/SO-Komplexe durch Sedimentation auch Bereiche außerhalb des magnetischen Feldes transduzieren. Mit zunehmender Zelldichte und -differenzierung steigt diese Wahrscheinlichkeit an, da die Zellen in dreidimensionalen Multilayern wachsen und so früher in Kontakt mit sedimentierenden LV/SO-Komplexen treten können.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine lokale Transduktion in differenzierenden D3 ES-Zellen mit einem geeigneten magnetischen Feld und LV/SO-Komplexen möglich ist. Somit kann in weiterführenden Versuchen, die Auswirkung eines *SHP2-knockdowns* auf ein entstehendes oder bereits bestehendes Gefäßnetzwerk untersucht werden.

4.4 ENOS als therapeutisches Gen

Für den Einsatz von eNOS als therapeutisches Gen zur Bekämpfung endothelialer Dysfunktion sprechen viele Gründe. So weisen eNOS-*knockout*-Mäuse (eNOS^{-/-}) einen hypertensiven Phänotypen auf, bei dem auch die Gabe von Acetylcholin keine Vasorelaxation induziert¹⁷⁰. Des Weiteren ist in diesen Mäusen die Angiogenese und damit die Wundheilung eingeschränkt¹⁷¹. Die Kreuzung von ApoE-*knockout*-Mäusen (ApoE^{-/-}) mit eNOS^{-/-} führt zu einer Steigerung des Blutdrucks und vergrößerten atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu normalen ApoE^{-/-}¹⁷². Zusammengefasst zeigen diese genetischen Tiermodelle, dass eNOS zur Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion notwendig ist. Bestätigt wird dies durch Studien mit pharmakologischer eNOS-Inhibition durch L-NAME. Die Inhibition der eNOS führt zu erhöhtem Blutdruck^{173, 174}, verstärkter Leukozytenadhäsion¹⁷⁵ und Plättchenaggregation¹⁷⁶.

Im Hinblick auf eNOS-basierte Therapien können zwei Ansätze unterschieden werden. Ist das Endothel zwar dysfunktional, aber noch vorhanden, käme eine reine Gentherapie in Frage, um die Funktion des Endothels zu verbessern oder wiederherzustellen. Wurde das Endothel hingegen im Rahmen einer Thrombendarteriektomie so geschädigt, dass dieser Gentherapieansatz nicht mehr möglich ist, könnte eine Zellersatztherapie mit eNOS-überexprimierenden Endothelzellen Erfolg versprechend sein. Erste Versuche in diesem Bereich führten Hofmann et al. 2008 durch. Sie zeigten, dass die *Ex-vivo*-Positionierung MNP-beladener und lentiviral transduzierter Endothelzellen in einem Gefäß möglich ist. Es gelang ihnen, HUVECs mit Hilfe von zwei seitlich an der Aorta positionierten Stabmagneten *ex vivo* unter Flussbedingungen zurückzuhalten¹²⁵. Im Gegensatz zu den unter 3.2.10 beschriebenen Ergebnissen, waren diese Zellen lediglich mit einem lentiviralen CMV-eGFP-Konstrukt transduziert und konnten somit die Gefäßfunktion nicht unterstützen. Des Weiteren wurde durch die seitlich positionierten Magnete keine radialsymmetrische Verteilung erreicht. Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der *In-vivo*-Transduktion des nativen Endothels in Carotiden, also dem oben bereits erwähnten rein gentherapeutischen Ansatz. Eingesetzt wurden bei den Versuchen adenovirale Konstrukte zur verstärkten Expression von eNOS und nNOS^{177, 178, 179}. Nach der Transduktion war in allen Fällen eine verstärkte Reaktion der transduzierten Gefäße auf Acetylcholin und das Ca²⁺-Ionophor A23187 zu beobachten, wodurch ein funktioneller und damit therapeutisch relevanter Effekt bestätigt wurde. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass die adenovirale Transduktion des Endothels nicht unter Flussbedingungen erfolgte, sondern statisch, nach dem Abklemmen einer

Carotide. Eine Vorgehensweise, die in vielen Gefäßen, insbesondere beim Menschen, nicht praktikabel ist und wenn, dann auch nur zeitlich sehr begrenzt durchgeführt werden kann, um Organ- und Gewebeschäden zu vermeiden. Hinzu kommt, dass die adenovirale Transduktion nativen Gefäßendothels Entzündungsreaktionen hervorrufen kann, die dann wiederum die Entstehung atherosklerotischer Plaques unterstützen¹⁸⁰.

Ein limitierender Faktor für die Zellersatz- und Gentherapie zur Behandlung endothelialer Dysfunktion war und ist der Blutfluss. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte MNP-basierten Zellersatztherapie bietet im Gegensatz zu anderen Methoden einen Ansatzpunkt, dieses Problem zu umgehen und die Gefäßfunktion nach Schädigung wiederherzustellen. Des Weiteren legen die hier präsentierten Ergebnisse und der bisherige Stand der Forschung nahe, dass eNOS ein geeignetes Enzym ist, das die Gefäßfunktion positiv beeinflusst. Dieser positive Effekt könnte durch den Einsatz von BH₄, einem Cofaktor der eNOS (vgl. 1.2.1), und L-Arginin noch verstärkt werden. Fallen diese beiden Faktoren unter ein kritisches Level, synthetisiert eNOS nicht nur NO, sondern auch das Superoxid O²⁻³. Dieses wiederum kann mit NO zum Peroxynitrit ONOO⁻ reagieren. Für ONOO⁻ ist beschrieben, dass es sowohl BH₄ als auch das Zink-Thiolatcluster der eNOS oxidiert und damit zur Zerstörung des eNOS-Dimers führt^{3, 54, 181}. Dieser Vorgang wird in der Literatur als „eNOS uncoupling“ bezeichnet und resultiert in einer verstärkten O²⁻-Synthese des Enzyms. In Gefäßarealen mit vorliegender endothelialer Dysfunktion wird das eNOS-uncoupling durch das erhöhte O²⁻-Level (vgl. 1.2.3) noch begünstigt. Dieser Kreislauf könnte durch die Gabe von BH₄ und L-Arginin durchbrochen werden. Für beide Substanzen wurde bereits eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion im Menschen beschrieben^{182, 183}.

4.5 SHP2 als therapeutisches Gen

Die Angiogenese zu beeinflussen, kommt als therapeutischer Ansatz für unterschiedliche Erkrankungen in Frage. Ein prominentes Beispiel für das Einsatzgebiet anti-angiogenetischer Therapien sind Tumore^{165, 184}, während pro-angiogenetische Ansätze in ischämischen Arealen – beispielsweise nach einem Myokardinfarkt – sinnvoll sind¹⁸⁵. Ein zentraler Ansatzpunkt ist dabei die VEGF-Familie (*vascular endothelial growth factor*). In der Krebstherapie wurden VEGF-Blocker eingesetzt, die das Überleben von Patienten, die auf die Therapie ansprachen, verlängerten¹⁸⁶. Allerdings wiesen einige Patienten eine Art Resistenz gegen diese anti-angiogenetische Therapie auf¹⁸⁷. Des Weiteren gab es Kontroversen darüber, ob die Blockade von VEGF beziehungsweise dessen Rezeptoren die Metastasenbildung

steigert¹⁸⁶. Pro-angiogenetische Therapien mit VEGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) lieferten vielversprechende Resultate in Phase-I- und Phase-II-Studien, zeigten in weiterführenden Untersuchungsreihen aber keinen signifikanten Effekt¹⁸⁵.

Die Proteintyrosinphosphatase SHP2 bietet eine weitere Möglichkeit, die Angiogenese zu modulieren. Es wurde mehrfach beschrieben, dass SHP2 die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und damit den Akt-Signalweg aktiviert^{188, 189}. Dieser beeinflusst neben Zellproliferation und -migration auch die Angiogenese und inhibiert Apoptose^{190, 191}. Zusätzlich ist SHP2 in den MAPK/ERK-Signalweg involviert, welcher allgemein Zellproliferation und -differenzierung unterstützt^{192, 193}. Ein weiterer Vorteil von SHP2 ist, dass es an Signalwegen verschiedener Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF (*fibroblast growth factor*), die die Angiogenese beeinflussen, beteiligt ist^{194, 195}. Somit könnte sich eine Veränderung des Expressionslevels von SHP2 stärker auswirken als die Modulation von VEGF oder FGF alleine.

Die unter 3.3.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass ein SHP2 *knockdown in vitro* die Quantität und Qualität gefäßähnlicher Strukturen vermindert. Dies korreliert mit den Daten von Mannell et al., die durch Inhibition von SHP2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Angiogenese unterdrücken konnten⁶⁶. Die Kombination lentiviraler Konstrukte mit MNPs bietet die Möglichkeit, eine Transduktion lokal durchzuführen. Dadurch kann eine gezielte, räumlich begrenzte Transgenexpression erreicht werden. Ein lokaler Einsatz des SHP2-*knockdown*-Konstruktes wäre besonders im Hinblick auf eine räumlich begrenzte Inhibition der Tumoriangiogenese interessant. Hingegen könnten Konstrukte zur SHP2-Überexpression zur lokalen Induktion der Angiogenese in ischämischen Arealen eingesetzt werden. Wie C. Kilgus (Institut für Physiologie, Universität Bonn) in seiner Dissertation zeigte, sind solche lokalen, MNP-vermittelten Transduktionen mit anderen Transgenen wie beispielsweise Channelrhodopsin bereits möglich.

Zusammengefasst ist SHP2 ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Modulation der Angiogenese. Weiterführende Versuche mit geeigneten Konstrukten müssen zeigen, ob sich auch lokal eine verringerte oder verstärkte SHP2-Expression auf die auf die Quantität als auch auf die Qualität von Gefäßnetzwerken auswirkt.

4.6 MNP-basierte Therapieansätze

Wie unter 4.4 bereits angesprochen, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein MNP-basierter Ansatz entwickelt werden, um Endothelzellen unter Flussbedingungen mit Hilfe eines magnetischen Feldes radialsymmetrisch an der Gefäßwand zurückzuhalten. Zwar beschreiben andere Arbeitsgruppen ebenfalls die Retention von MNP-beladenen Zellen unter Flussbedingungen, allerdings war diese entweder auf eine Seite des Gefäßes begrenzt¹²⁵ oder erfolgte radialsymmetrisch unter Zuhilfenahme eines magnetisierbaren Stents¹³⁰. Die hier entwickelte Methode hat den Vorteil, dass eine radialsymmetrische Verteilung von Endothelzellen – und damit eine optimierte Gefäßfunktion – ohne einen Stent möglich ist. Dadurch könnte das Risiko einer Restenose nach Entfernung eines atherosklerotischen Plaques weiter vermindert werden. Um die Methode im Hinblick auf eine Anwendung im Patienten zu verbessern, sollte über Alternativen zu den hier verwendeten bPAECs nachgedacht werden. Optimal wäre der Einsatz humaner induziert pluripotenter Stammzellen (hiPS) des jeweiligen Patienten, da hierbei auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden könnte. Nachweislich lassen sich auch Stammzellen mit MNPs beladen¹⁹⁶, allerdings müsste das hier beschriebene Protokoll an diesen Zelltyp angepasst werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, HUVECs zu verwenden. Hierbei handelt es sich um eine etablierte Zelllinie, deren Transduktions- und Magnetisierungseigenschaften denen von bPAECs ähneln¹⁵¹. Noch besser geeignet wären wahrscheinlich humane arterielle Endothelzellen, deren Einsatz mit MNPs bisher aber nur wenig erforscht ist. Unabhängig von der Art der humanen Endothelzelllinie könnte auf eine immunsuppressive Therapie wahrscheinlich nicht verzichtet werden. Die Zellen wären bei einem akuten Fall aber schneller verfügbar als hiPS.

Neben der oben angesprochenen Zellersatztherapie ist bei Patienten, die eine erhöhte Neigung zu atherosklerotischen Plaques haben, deren Endothel aber noch nicht final durch eine Thrombendarterioektomie oder Ballonangioplastie geschädigt ist, auch eine Gentherapie denkbar¹⁹⁷. S. Vosen (Institut für Physiologie, Universität Bonn) konnte in ihrer Dissertation mit der in Abb. 21 B dargestellten Magnethalterung eine direkte, radialsymmetrische Transduktion des nativen Endothels und damit eine funktionelle Verbesserung erreichen. Statt einer Transduktion wäre eine weitere Option, das Endothel mit NO- oder Statin-freisetzenden MNPs zu behandeln, um die Gefäßfunktion zu unterstützen und zu verbessern^{198, 199}.

Einen weiteren Therapieansatz bietet die in Abschnitt 4.5 kurz beschriebene lokale Transduktion basierend auf Magnetspitzen. Im Gegensatz zur oben erwähnten Magnethalterung erzeugen diese Spitzen kein Magnetfeld, das eine dreidimensionale

Verteilung zulässt. Sie sind jedoch für die lokale Anziehung von LV/MNP-Komplexen oder MNP-beladener Zellen geeignet und ähneln damit der von Ino et al. verwendeten Magnetvorrichtung zur Anziehung magnetisch beladener Zellen ²⁰⁰. Bei Verwendung der Magnetspitzen zur lokalen Transduktion hängt die Ausdehnung des transduzierten Areals von der Fläche der Spitze sowie von der Entfernung zwischen Magnet und Objekt ab. So wird die Fläche des transduzierten Areals mit dem Abstand der Magnetspitze von der Zellkulturschale größer ¹⁶⁷. Bereits angesprochen wurde die Möglichkeit eines lokalen *knockdowns* (vgl. 4.5), um beispielsweise die Tumorangiogenese und damit das Tumorstadium zu hemmen. Als Ansatzpunkt kämen unter anderem Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF oder das Enzym SHP2 in Frage. Statt eines lokalen *knockdowns* könnten auch MNP-gekoppelte Inhibitoren (z.B. der VEGF-Antikörper Bevacizumab) eingesetzt werden. Bisher werden diese meist ohne MNPs appliziert ²⁰¹. Durch die Kombination mit MNPs bestünde die Möglichkeit der lokalen Anziehung sowie der verbesserten intrazellulären Aufnahme der Inhibitoren, sodass möglicherweise schon eine geringe Dosierung effektiv wäre.

Aber nicht nur die Inhibition der Angiogenese beinhaltet Ansatzpunkte für Therapien, sondern auch ihre verstärkte Induktion. So konnten mehrere Arbeitsgruppen die Funktion ischämischer Bereiche nach Injektion VEGF-überexprimierender Zellen verbessern ^{202, 203}. Ye et al. gelang es, durch intramyokardiale Injektion VEGF-überexprimierender Zellen in Infarktgebiete unter anderem die Neovaskularisation sowie den Blutfluss zu erhöhen. Dies resultierte in einer gesteigerten Funktion des infarzierten Herzens ²⁰². Cho et al. injizierten VEGF-überexprimierende Endothelzellen in ischämisches Muskelgewebe und konnten dadurch die Gefäßbildung verbessern und den Verlust von Muskelgewebe durch Nekrose einschränken ²⁰³. Die Überexpression von VEGF oder SHP2 nach MNP-vermittelter, lokaler Transduktion eines ischämischen Bereiches könnte ähnliche Effekte haben und hätte den Vorteil, dass keine körperfremden Zellen injiziert werden müssten.

MNPs bieten also die Möglichkeit, Zellersatz- und Gentherapien auch nach systemischer Applikation lokal durchzuführen und damit effizienter zu gestalten. Ihr Einsatz erlaubt es, neue Methoden zu entwickeln und bereits etablierte Systeme zu verbessern.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden magnetische Nanopartikel (MNPs) mit drei unterschiedlichen Zielen eingesetzt:

1. Magnetisierung von Endothelzellen, um sie mit Hilfe eines magnetischen Feldes unter physiologischen Flussbedingungen an der Gefäßwand zurückhalten zu können und so eine Zellersatztherapie zu ermöglichen.
2. Steigerung der Transduktionseffizienz insbesondere im Hinblick auf große lentivirale Konstrukte mit therapeutischen Genen wie das der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)
3. Zielgerichtete Transduktion, um beispielsweise anti-angiogenetische Gentherapien lokal durchführen zu können.

Die ersten Versuche zur Magnetisierung und gesteigerten Transduktion von Endothelzellen bauten auf der Verwendung zweier MNPs mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. NDT-Mag1 eignete sich auf Grund seiner physikalischen Eigenschaften eher zur Magnetisierung der Zellen, während mit PEI-Mag2 bessere Transduktionsergebnisse erreicht wurden. Durch Verwendung des Partikels SO-Mag5 gelang es in nachfolgenden Versuchen, Magnetisierung und Transduktion in einem Schritt miteinander zu vereinen. Unabhängig davon, ob nun zwei MNPs in Kombination miteinander oder ein MNP alleine verwendet wurde, konnten Endothelzellen durch ihren Einsatz magnetisiert und effizient mit einem funktionellen, lentiviralen eNOS-Konstrukt transduziert werden, ohne dass die MNPs dabei toxisch wirkten. Sowohl Magnetisierungsgrad als auch Transduktionseffizienz waren abhängig vom verwendeten Partikel und der applizierten Eisenmenge. Im Vergleich zur lentiviralen Standardtransduktion über Nacht erhöhte der Einsatz von PEI-Mag2 und SO-Mag5 die Transduktionseffizienz signifikant. Dies ließ sich auch funktionell mit einem erhöhten eNOS-Level sowie einer gesteigerter eNOS-Funktion nachweisen. Des Weiteren wurden die magnetisierten und transduzierten Zellen *ex vivo* unter Flussbedingungen in einer Mauseorta zurückgehalten. Die Vorbeladung mit NDT-Mag1 ermöglichte die Retention Endothelzellen durch seitlich anliegende Magnete an der Gefäßwand. Bei Einsatz von SO-Mag5 wurde sogar eine radialsymmetrische Verteilung der Zellen im Gefäß erreicht. Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem bisherigen Stand der Zellersatztherapie (vgl. 1.7) in Blutgefäßen, so ergeben sich zwei entscheidende Verbesserungen:

1. Es wurden Endothelzellen mit einer verstärkt aktiven eNOS eingesetzt, die dysfunktionales Endothel ersetzen und die Gefäßfunktion verbessern können.

2. Basierend auf der verwendeten Magnetkonfiguration wurde *ex vivo* eine radialsymmetrische Verteilung dieser Zellen ohne Unterbrechung des Blutflusses oder Implantation eines Stents erreicht. Durch Modifikationen der Magnethalterung wäre dieses Ergebnis auch *in vivo* möglich.

Neben diesem Einsatzgebiet wurde SO-Mag5 auch erfolgreich zur direkten lokalen Transduktion verwendet. Sowohl mit dem Reporter-gen eGFP als auch mit einem funktionellen sh-SHP2-Konstrukt gelang die lokale Transduktion differenzierter embryonaler Stammzellen. In weiterführenden Versuchen muss nun der anti-angiogenetische Effekt, der bei globaler Transduktion auftrat, auch lokal nachgewiesen werden. Sollte dies gelingen, wäre die lokale Transduktion mit einem sh-SHP2-Konstrukt ein möglicher Ansatzpunkt für die Krebstherapie. Komplexe aus lentiviralen Konstrukten könnten in Kombination mit MNPs systemisch verabreicht und durch ein geeignetes magnetisches Feld lokal im Tumorgewebe angereichert werden.

Das Einsatzgebiet magnetischer Nanopartikel hat sich von der reinen Verwendung im Labor in Richtung *In-vivo*-Anwendung verschoben. Besonders als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie sowie in der Krebstherapie sind MNPs schon jetzt von großer Bedeutung. Da mittlerweile eine Vielzahl von MNPs mit unterschiedlichen Eigenschaften existiert und neue MNPs beispielsweise mit anderen Beschichtungen produziert werden, sind weitere Einsatzgebiete besonders im medizinischen Bereich denkbar. Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass insbesondere SO-Mag5 ein vielversprechender Kandidat zur Therapie der endothelialen Dysfunktion und der lokalen Modulation der Angiogenese ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie 10 Tabellen*. (Thieme, 2009).
2. Krause, W. J. *Art of Examining and Interpreting Histologic Preparations: A Laboratory Manual and Study Guide for Histology*. (Universal-Publishers, 2004).
3. Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708–1714 (2006).
4. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241 (2000).
5. Watson, A. D. *et al.* Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 13597–13607 (1997).
6. Nakatani, M. *et al.* Mechanisms of restenosis after coronary intervention: difference between plain old balloon angioplasty and stenting. *Cardiovasc. Pathol.* 12, 40–48 (2003).
7. Yin, R.-X., Yang, D.-Z. & Wu, J.-Z. Nanoparticle Drug- and Gene-eluting Stents for the Prevention and Treatment of Coronary Restenosis. *Theranostics* 4, 175–200 (2014).
8. Piper, W. *Innere Medizin*. (Springer-Verlag, 2013).
9. Nicholson, S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* 183, 2293–2302 (1996).
10. Stenger, S., Thüning, H., Röllinghoff, M. & Bogdan, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 180, 783–793 (1994).
11. Rafiee, P. *et al.* Isolation and characterization of human esophageal microvascular endothelial cells: mechanisms of inflammatory activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1277–1292 (2003).
12. Wong, J. M. & Billiar, T. R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv. Pharmacol.* 34, 155–170 (1995).
13. Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837, 837a–837d (2012).
14. Förstermann, U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5, 338–349 (2008).
15. Förstermann, U., Nakane, M., Tracey, W. R. & Pollock, J. S. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur. Heart J.* 14 Suppl I, 10–15 (1993).

16. Albrecht, E. W. J. A., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H. & van Goor, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 199, 8–17 (2003).
17. Hemmens, B. & Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol. Biol.* 100, 1–32 (1998).
18. Klatt, P. *et al.* Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 271, 7336–7342 (1996).
19. List, B. M. *et al.* Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem. J.* 323 (Pt 1), 159–165 (1997).
20. Raman, C. S. *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).
21. Palmer, R. M., Ashton, D. S. & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666 (1988).
22. Shaul, P. W. *et al.* Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271, 6518–6522 (1996).
23. Shaul, P. W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 749–774 (2002).
24. Li, S., Song, K. S. & Lisanti, M. P. Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 271, 568–573 (1996).
25. Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P. & Michel, T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 25907–25912 (1997).
26. 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).
27. Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. & Michel, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272, 15583–15586 (1997).
28. Dudzinski, D. M. & Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* 75, 247–260 (2007).

29. 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).
30. Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605 (1999).
31. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E. & Busse, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.* 88, E68–75 (2001).
32. Erwin, P. A., Lin, A. J., Golan, D. E. & Michel, T. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19888–19894 (2005).
33. Boo, Y. C. & Jo, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 285, C499–508 (2003).
34. Fleming, I., Bauersachs, J. & Busse, R. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J. Vasc. Res.* 34, 165–174 (1997).
35. Fleming, I., Bauersachs, J., Fisslthaler, B. & Busse, R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ. Res.* 82, 686–695 (1998).
36. 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).
37. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. & Chaudhuri, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 181–189 (1988).
38. Kelm, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 273–289 (1999).
39. Alioua, A. *et al.* The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 32950–32956 (1998).
40. Ignarro, L. J. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. (Academic Press, 2000).
41. Schlossmann, J. *et al.* Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Iβ. *Nature* 404, 197–201 (2000).

42. 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).
43. Cohen, R. A. *et al.* Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ. Res.* 84, 210–219 (1999).
44. Nakaki, T., Nakayama, M. & Kato, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 189, 347–353 (1990).
45. Benjamin, N., Dutton, J. A. & Ritter, J. M. Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 102, 847–850 (1991).
46. Moro, M. A. *et al.* cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1480–1485 (1996).
47. Trepakova, E. S., Cohen, R. A. & Bolotina, V. M. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-dependent refilling of Ca²⁺ stores. *Circ. Res.* 84, 201–209 (1999).
48. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135–1143 (2002).
49. Niu, X. F., Smith, C. W. & Kubes, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ. Res.* 74, 1133–1140 (1994).
50. Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W. & Medford, R. M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9114–9119 (1996).
51. Puranik, R. & Celermajer, D. S. Smoking and endothelial function. *Progress in Cardiovascular Diseases* 45, 443–458 (2003).
52. Yokoyama, M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4, 110–115 (2004).
53. Bec, N. *et al.* The role of tetrahydrobiopterin in the activation of oxygen by nitric-oxide synthase. *J. Inorg. Biochem.* 81, 207–211 (2000).

54. Zou, M.-H., Shi, C. & Cohen, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* 109, 817–826 (2002).
55. Förstermann, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch.* 459, 923–939 (2010).
56. Durante, W., Kroll, M. H., Christodoulides, N., Peyton, K. J. & Schafer, A. I. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 80, 557–564 (1997).
57. Fukai, T. *et al.* Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* 105, 1631–1639 (2000).
58. Morita, T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1786–1795 (2005).
59. Doré, S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1276–1282 (2002).
60. Kwak, J. Y., Takeshige, K., Cheung, B. S. & Minakami, S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 369–373 (1991).
61. Kharitonov, V. G., Sharma, V. S., Pilz, R. B., Magde, D. & Koesling, D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2568–2571 (1995).
62. Balla, J. *et al.* Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res* 49, 1030–1043 (2005).
63. Neel, B. G., Gu, H. & Pao, L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 28, 284–293 (2003).
64. Ostman, A., Hellberg, C. & Böhmer, F. D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 307–320 (2006).
65. Tsang, Y. H., Han, X., Man, W. Y., Lee, N. & Poon, R. Y. C. Novel functions of the phosphatase SHP2 in the DNA replication and damage checkpoints. *PLoS ONE* 7, e49943 (2012).
66. Mannell, H. *et al.* Inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-2 suppresses angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Vasc. Res.* 45, 153–163 (2008).

67. Kroll, J. & Waltenberger, J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 32521–32527 (1997).
68. Kontos, C. D. *et al.* Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4131–4140 (1998).
69. Grinnell, K. L., Casserly, B. & Harrington, E. O. Role of protein tyrosine phosphatase SHP2 in barrier function of pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 298, L361–370 (2010).
70. Timmerman, I. *et al.* The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 23, 4212–4225 (2012).
71. Maas, M. *et al.* Reactive oxygen species induce reversible PECAM-1 tyrosine phosphorylation and SHP-2 binding. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H2336–2344 (2003).
72. Seki, N. *et al.* Role of SRC homology 2-containing tyrosine phosphatase 2 on proliferation of rat smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1081–1085 (2002).
73. Markova, B., Herrlich, P., Rönstrand, L. & Böhmer, F.-D. Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor. *Biochemistry* 42, 2691–2699 (2003).
74. Banai, S. *et al.* PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* 97, 1960–1969 (1998).
75. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* 11, 671–681 (2009).
76. 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).
77. Hartman, Z. C., Appledorn, D. M. & Amalfitano, A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.* 132, 1–14 (2008).
78. Kay, M. A., Glorioso, J. C. & Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33–40 (2001).

79. Giacca, M. & Zacchigna, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release* 161, 377–388 (2012).
80. Prasad, K.-M. R., Xu, Y., Yang, Z., Acton, S. T. & French, B. A. Robust Cardiomyocyte-Specific Gene Expression Following Systemic Injection of AAV: In Vivo Gene Delivery Follows a Poisson Distribution. *Gene Ther* 18, 43–52 (2011).
81. Fu, H. *et al.* Targeting Endothelial Cells in Mice with Adeno-Associated Virus Serotype 1 Vector. *Mol Ther* 9, S37–S38 (2004).
82. Hsieh, M.-Y., Liu, Y.-L., Schlachterman, A. & High, K. A. AAV-Mediated Gene Transfer to Endothelial Cells. *Mol Ther* 11, S153–S154 (2005).
83. Chen, S. *et al.* Efficient Transduction of Vascular Endothelial Cells with Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 1 and 5 Vectors. *Hum Gene Ther* 16, 235–247 (2005).
84. Vogt, V. M. & Simon, M. N. Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.* 73, 7050–7055 (1999).
85. Escors, D. & Breckpot, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 107–119 (2010).
86. Zufferey, R. *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72, 9873–9880 (1998).
87. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463–8471 (1998).
88. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15, 871–875 (1997).
89. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8033–8037 (1993).
90. Zhao, H. *et al.* Amelioration of murine beta-thalassemia through drug selection of hematopoietic stem cells transduced with a lentiviral vector encoding both gamma-globin and the MGMT drug-resistance gene. *Blood* 113, 5747–5756 (2009).
91. Jacome, A. *et al.* Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol. Ther.* 17, 1083–1092 (2009).

92. Palfi, S. *et al.* Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 383, 1138–1146 (2014).
93. Di, W.-L. *et al.* Phase I study protocol for ex vivo lentiviral gene therapy for the inherited skin disease, Netherton syndrome. *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 182–190 (2013).
94. Mautino, M. R. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther* 2, 23–43 (2002).
95. Chaanine, A. H., Kalman, J. & Hajjar, R. J. Cardiac gene therapy. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 22, 127–139 (2010).
96. Mimuro, J. *et al.* Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol. Ther.* 21, 318–323 (2013).
97. Raper, S. E., Wilson, J. M. & Nunes, F. A. Flushing out antibodies to make AAV gene therapy available to more patients. *Mol. Ther.* 21, 269–271 (2013).
98. Wolfram, J. A. & Donahue, J. K. Gene Therapy to Treat Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc* 2, e000119 (2013).
99. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 112, 5818–5878 (2012).
100. Berry, C. C., Wells, S., Charles, S. & Curtis, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 24, 4551–4557 (2003).
101. Lutz, J.-F. *et al.* One-pot synthesis of pegylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents. *Biomacromolecules* 7, 3132–3138 (2006).
102. 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).
103. Ahmad, T. *et al.* Gold-coated iron oxide nanoparticles as a T2 contrast agent in magnetic resonance imaging. *J Nanosci Nanotechnol* 12, 5132–5137 (2012).

104. Mykhaylyk, O. *et al.* Erratum to: Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for Optimum and Quantitative Criteria. *Pharm. Res.* (2012). doi:10.1007/s11095-012-0693-9
105. Arias, J. L., Gallardo, V., Linares-Molinero, F. & Delgado, A. V. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 299, 599–607 (2006).
106. Lecommandoux, S., Sandre, O., Chécot, F. & Perzynski, R. Smart hybrid magnetic self-assembled micelles and hollow capsules. *Progress in Solid State Chemistry* 34, 171–179 (2006).
107. Mannell, H. *et al.* Site directed vascular gene delivery in vivo by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles. *Nanomedicine* 8, 1309–1318 (2012).
108. Hülser, T. Strukturelle und magnetische Eigenschaften von Eisenkarbid- und Eisenoxidnanopartikeln. *Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Duisburg-Essen, Duisburg-Essen* (2003). at <http://aglorke.uni-duisburg.de/ag_lorke/people/huelser/Diplomarbeit_TimHuelser.pdf>
109. Safarik, I. & Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol* 2, 7 (2004).
110. Obata, K., Tajima, H., Yohda, M. & Matsunaga, T. Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis. *Pharmacogenomics* 3, 697–708 (2002).
111. Grützkau, A. & Radbruch, A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A* 77, 643–647 (2010).
112. Johne, B., Jarp, J. & Haaheim, L. R. Staphylococcus aureus exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1631–1635 (1989).
113. Kopp, A. F. *et al.* MR imaging of the liver with Resovist: safety, efficacy, and pharmacodynamic properties. *Radiology* 204, 749–756 (1997).
114. Bellin, M.-F. MR contrast agents, the old and the new. *European Journal of Radiology* 60, 314–323 (2006).
115. Gang, J. *et al.* Magnetic poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing Fe₃O₄ and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J Drug Target* 15, 445–453 (2007).

116. Lübke, A. S. *et al.* Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 56, 4686–4693 (1996).
117. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2, 751–760 (2007).
118. Moroz, P., Jones, S. K. & Gray, B. N. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia* 18, 267–284 (2002).
119. Babincov, M., Altanerov, V., Altaner, C., Bergemann, C. & Babinec, P. In vitro analysis of cisplatin functionalized magnetic nanoparticles in combined cancer chemotherapy and electromagnetic hyperthermia. *IEEE Trans Nanobioscience* 7, 15–19 (2008).
120. Yen, S. K., Padmanabhan, P. & Selvan, S. T. Multifunctional iron oxide nanoparticles for diagnostics, therapy and macromolecule delivery. *Theranostics* 3, 986–1003 (2013).
121. Kami, D. *et al.* Application of magnetic nanoparticles to gene delivery. *Int J Mol Sci* 12, 3705–3722 (2011).
122. Scherer, F. *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9, 102–109 (2002).
123. 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).
124. Nayerossadat, N., Maedeh, T. & Ali, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 1, (2012).
125. 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).
126. Wilhelm, C. *et al.* Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells. *Biomaterials* 28, 3797–3806 (2007).
127. Chorny, M., Hood, E., Levy, R. J. & Muzykantov, V. R. Endothelial delivery of antioxidant enzymes loaded into non-polymeric magnetic nanoparticles. *J Control Release* 146, 144–151 (2010).
128. Wenzel, D. *et al.* Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells. *Pharm. Res.* 29, 1242–1254 (2012).
129. Pislaru, S. V. *et al.* Magnetically targeted endothelial cell localization in stented vessels. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1839–1845 (2006).

130. 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).
131. Li, Q. *et al.* Silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles targeting of EPCs in ischemic brain injury. *Biomaterials* 34, 4982–4992 (2013).
132. Herz, K. *et al.* Live monitoring of small vessels during development and disease using the flt-1 promoter element. *Basic Res. Cardiol.* 107, 257 (2012).
133. Mykhaylyk, O., Zelphati, O., Rosenecker, J. & Plank, C. siRNA delivery by magnetofection. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 493–505 (2008).
134. Wilhelm, C. *et al.* Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24, 1001–1011 (2003).
135. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159 (1987).
136. Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C. P. & Amal, R. Polyethylenimine based magnetic iron-oxide vector: the effect of vector component assembly on cellular entry mechanism, intracellular localization, and cellular viability. *Biomacromolecules* 11, 2521–2531 (2010).
137. Trueck, C. *et al.* Optimization of magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer. *Pharm. Res.* 29, 1255–1269 (2012).
138. Dishart, K. L. *et al.* Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 739–748 (2003).
139. Kordower, J. H. *et al.* Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain. *Exp. Neurol.* 160, 1–16 (1999).
140. Lattanzi, A. *et al.* Therapeutic benefit of lentiviral-mediated neonatal intracerebral gene therapy in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3250–3268 (2014).
141. Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., Nuttin, B. & Debyser, Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther* 10, 1933–1940 (2003).

142. Abordo-Adesida, E. *et al.* Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum. Gene Ther.* 16, 741–751 (2005).
143. Osten, P., Grinevich, V. & Cetin, A. Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb Exp Pharmacol* 177–202 (2007). doi:10.1007/978-3-540-35109-2_8
144. Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., de Lima, M. C. P. & Pierrefite-Carle, V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett.* 324, 160–170 (2012).
145. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346–358 (2003).
146. Brown, B. D. *et al.* A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 110, 4144–4152 (2007).
147. Kang, Y. *et al.* Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. *Blood* 106, 1552–1558 (2005).
148. Wu, X., Tan, Y., Mao, H. & Zhang, M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Nanomedicine* 5, 385–399 (2010).
149. Su, L. *et al.* The effect of novel magnetic nanoparticles on vascular endothelial cell function in vitro and in vivo. *J. Hazard. Mater.* 235-236, 316–325 (2012).
150. Buyukhatipoglu, K. & Clyne, A. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J Biomed Mater Res A* 96, 186–195 (2011).
151. Trueck, C. Optimierung des gezielten Lentiviralen Gentransfers mittels Magnetischer Nanopartikel (MNPs). (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2012).
152. Hunter, A. C. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1523–1531 (2006).
153. Munday, R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 659–673 (1989).
154. Soenen, S. J. H., Nuytten, N., De Meyer, S. F., De Smedt, S. C. & De Cuyper, M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 6, 832–842 (2010).
155. Fahrenbach, J. P., Ai, X. & Banach, K. Decreased intercellular coupling improves the function of cardiac pacemakers derived from mouse embryonic stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 642–649 (2008).

156. Tsai, C.-T. *et al.* Angiotensin II induces complex fractionated electrogram in a cultured atrial myocyte monolayer mediated by calcium and sodium-calcium exchanger. *Cell Calcium* 49, 1–11 (2011).
157. Campbell, K. *et al.* Spatial gradients in action potential duration created by regional magnetofection of hERG are a substrate for wavebreak and turbulent propagation in cardiomyocyte monolayers. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 6363–6379 (2012).
158. Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr & Verkman, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 44826–44831 (2003).
159. Sanchez-Antequera, Y. *et al.* Magselectofection: an integrated method of nanomagnetic separation and genetic modification of target cells. *Blood* 117, e171–181 (2011).
160. Calatayud, M. P. *et al.* The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomaterials* 35, 6389–6399 (2014).
161. Ito, A. *et al.* Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 1553–1561 (2005).
162. Perea, H., Aigner, J., Hopfner, U. & Wintermantel, E. Direct magnetic tubular cell seeding: a novel approach for vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs (Print)* 183, 156–165 (2006).
163. Perea, H., Aigner, J., Heverhagen, J. T., Hopfner, U. & Wintermantel, E. Vascular tissue engineering with magnetic nanoparticles: seeing deeper. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 318–321 (2007).
164. Shimizu, K. *et al.* Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 472–478 (2007).
165. Bellou, S., Pentheroudakis, G., Murphy, C. & Fotsis, T. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. *Cancer Lett.* 338, 219–228 (2013).
166. Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S. & Carmeliet, P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 3190–3200 (2013).
167. 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).

168. Cardenas, W. H. *et al.* Particokinetics: computational analysis of the superparamagnetic iron oxide nanoparticles deposition process. *Int J Nanomedicine* 7, 2699–2712 (2012).
169. Yeap, S. P., Ahmad, A. L., Ooi, B. S. & Lim, J. Electrosteric stabilization and its role in cooperative magnetophoresis of colloidal magnetic nanoparticles. *Langmuir* 28, 14878–14891 (2012).
170. Huang, P. L. *et al.* Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239–242 (1995).
171. Lee, P. C. *et al.* Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 277, H1600–1608 (1999).
172. Knowles, J. W. *et al.* Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 105, 451–458 (2000).
173. Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. & Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101, 746–752 (1990).
174. Sander, M., Chavoshan, B. & Victor, R. G. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertension* 33, 937–942 (1999).
175. 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).
176. Radomski, M. W., Palmer, R. M. & Moncada, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5193–5197 (1990).
177. Kullo, I. J. *et al.* Adventitial gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries alters vascular reactivity. *Circulation* 96, 2254–2261 (1997).
178. Ooboshi, H. *et al.* Altered vascular function after adenovirus-mediated overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.* 273, H265–270 (1997).
179. Channon, K. M. *et al.* In vivo gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-Fed rabbits. *Circulation* 98, 1905–1911 (1998).
180. Channon, K. M. *et al.* Acute host-mediated endothelial injury after adenoviral gene transfer in normal rabbit arteries: impact on transgene expression and endothelial function. *Circ. Res.* 82, 1253–1262 (1998).

181. Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G. & Dikalov, S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 22546–22554 (2003).
182. Adams, M. R. *et al.* Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 129, 261–269 (1997).
183. Setoguchi, S., Mohri, M., Shimokawa, H. & Takeshita, A. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 493–498 (2001).
184. Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X. & Claesson-Welsh, L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol. Aspects Med.* 32, 88–111 (2011).
185. Deveza, L., Choi, J. & Yang, F. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. *Theranostics* 2, 801–814 (2012).
186. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307 (2011).
187. Bergers, G. & Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603 (2008).
188. Wu, C. J. *et al.* The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. *Oncogene* 20, 6018–6025 (2001).
189. Zhang, S. Q. *et al.* Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4062–4072 (2002).
190. Karar, J. & Maity, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 4, 51 (2011).
191. Ivins Zito, C., Kontaridis, M. I., Fornaro, M., Feng, G.-S. & Bennett, A. M. SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 199, 227–236 (2004).
192. Shi, Z. Q., Yu, D. H., Park, M., Marshall, M. & Feng, G. S. Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1526–1536 (2000).

193. Hu, Y., Szente, B., Kiely, J. M. & Gimbrone, M. A., Jr. Molecular events in transmembrane signaling via E-selectin. SHP2 association, adaptor protein complex formation and ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 276, 48549–48553 (2001).
194. Mitola, S. *et al.* Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circ. Res.* 98, 45–54 (2006).
195. Hatanaka, K., Lanahan, A. A., Murakami, M. & Simons, M. Fibroblast growth factor signaling potentiates VE-cadherin stability at adherens junctions by regulating SHP2. *PLoS ONE* 7, e37600 (2012).
196. Cromer Berman, S. M., Walczak, P. & Bulte, J. W. M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3, 343–355 (2011).
197. Mäkinen, P. I. & Ylä-Herttuala, S. Therapeutic gene targeting approaches for the treatment of dyslipidemias and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 24, 116–122 (2013).
198. Kubo, M. *et al.* Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 796–801 (2009).
199. Blecher, K. *et al.* Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine* 8, 1364–1371 (2012).
200. Ino, K., Ito, A. & Honda, H. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1309–1317 (2007).
201. Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W. & Loeffler, J. S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 24–40 (2006).
202. Ye, L. *et al.* Transplantation of nanoparticle transfected skeletal myoblasts overexpressing vascular endothelial growth factor-165 for cardiac repair. *Circulation* 116, I113–120 (2007).
203. Cho, S.-W. *et al.* Therapeutic angiogenesis using genetically engineered human endothelial cells. *J Control Release* 160, 515–524 (2012).

7. Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziierte Virusvektoren
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> (Angiotensin konvertierendes Enzym)
AdV	Adenoviraler Vektor
Akt	auch PKB (Proteinkinase B)
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE ^{-/-}	ApoE- <i>knockout</i> -Maus
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> (Basis-Fibroblastenwachstumsfaktor)
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bPAEC	<i>bovine pulmonary artery endothelial cell</i> (bovine pulmonalarterielle Endothelzelle)
Ca ²⁺	zweiwertiges Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cGMP	<i>cyclic GMP</i> (zyklisches GMP)
CMV	Cytomegalievirus beziehungsweise dessen Promoter
CO	Kohlenstoffmonoxid
Ct	<i>cycle threshold</i> (Zyklusschwellenwert)
DAF	Diaminofluorescein
DAG	Diacylglycerin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DES	<i>drug eluting stent</i> (medikamentenfreisetzender Stent)
EB	<i>embryoid body</i> (Embryonalkörperchen)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

eNOS ^{-/-}	eNOS- <i>knockout</i> -Maus
EPC	<i>endothelial progenitor cell</i> (endotheliale Vorläuferzelle)
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i> (extrazelluläre regulierte Kinase)
eSOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fe	Eisen
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i> (Fibroblastenwachstumsfaktor 2)
FMN	Flavonmononukleotid
GES	<i>gene eluting stent</i> (genfreisetzender Stent)
GMP	Guanosinmonophosphat
H ⁺	Hydron / Proton
H1	Histon 1 beziehungsweise dessen Promoter
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK	<i>human embryonic kidney cell</i> (humane, embryonale Nierenzelle)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (Hepatozytenwachstumsfaktor)
hIPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HO-1	Häm-Oxygenase 1
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Endothelzellen aus der Nabelvene)
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
IP	infektiöser Viruspartikel
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRAG	<i>IP₃ receptor associated cGMP dependent kinase substrate</i> (IP ₃ -Rezeptor assoziiertes, cGMP-abhängiges Kinasesubstrat)
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> (interne ribosomale Eintrittsstelle)
K ⁺	einwertiges Kaliumion
KHK	koronare Herzkrankheit
kDa	Kilodalton

LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein geringer Dichte)
LTR	<i>long terminal repeat</i> (lange terminale Wiederholungssequenz)
LV	lentiviraler Vektor
LV 30'	lentivirale Transduktion ohne MNPs für 30 min
LV ün	lentivirale Transduktion ohne MNPs über Nacht
MAPK	Mitogen-aktivierter Proteinkinase
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i> (Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase)
MLV	murines Leukämievirus
MMP	Matrix-Metallprotease
MNP	magnetischer Nanopartikel
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MPS	Magnetpartikelspektroskopie
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> (Magnetresonanztomographie)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinamidadenindunukleotidphosphat
NDT	NDT-Mag1
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
ONNO ⁻	Peroxyinitrit
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor)
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> (Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül 1); Synonym für CD31
PEI	PEI-Mag2
PFA	Paraformaldehyd

PGK	Phosphoglyceratkinase beziehungsweise deren Promoter
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PPT	Polypurintrakt
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse-Transkriptase-PCR
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i> (Expressionsregulator für Virionenproteine)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RV	retroviraler Vektor
SERCA	<i>sarcoplasmatic reticulum ATPase</i> (ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums)
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i> (lösliche Guanylylcyclase)
SHP2	Src-Homologie-Domänen-PTP2
shRNA	<i>small hairpin RNA</i> (Haarnadelstruktur bildende RNA)
SIN	<i>self inactivating</i> (selbstinaktivierend)
SO	SO-Mag5
SOD	Superoxid-Dismutase
SNP	<i>sodium nitroprusside dihydrate</i> (Natriumnitroferricyanid(II)-dihydrat)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
ssRNA	<i>single strand RNA</i> (einzelsträngige RNA)
Tat	<i>transactivator of transcription</i> (Transaktivator der Transkription)
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule 1</i> (vaskuläres Adhäsionsmolekül 1)
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i> (vaskuläres, endotheliales Cadherin)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor)
VP	Viruspartikel

VSV

Vesicular-Stomatis-Virus

Liste der Publikationen

Veröffentlichungen

- Wenzel D., **Rieck S.**, Vosen S., Mykhaylyk O., Trueck C., Eberbeck D., Trahms L., Zimmermann K., Pfeifer A., Fleischmann B. K., 2012, *Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells*, *Pharmaceutical Research*, 29(5): 1242-54
- **Rieck S.**, Zimmermann K., Wenzel D., 2013, *Transduction of murine embryonic stem cells by magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer*, *Methods in molecular biology*, 1058: 89-96

Vorträge

- S. Rieck, S. Vosen, O. Mykhaylyk, C. Trueck, D. Eberbeck, L. Trahms, K. Zimmermann, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, *Combined lentiviral transduction and positioning of endothelial cells by magnetic nanoparticles*, Jahrestagung der THEME Graduiertenschule 10/12

Poster-Beiträge

- S. Rieck, S. Vosen, C. Trück, K. Zimmermann, O. Mykhaylyk, D. Eberbeck, C. Plank, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, *Enhancement of lentiviral transduction and positioning of endothelial cells by use of magnetic nanoparticles (MNPs)*, Jahrestagung der THEME-Graduiertenschule, Bonn 10/11
- S. Rieck, S. Vosen, O. Mykhaylyk, C. Trueck, D. Eberbeck, L. Trahms, K. Zimmermann, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, *Combined lentiviral transduction and positioning of endothelial cells by magnetic nanoparticles*, Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden 03/12
- S. Rieck, H. Mannell, K. Zimmermann, A. Heidsieck, B. Gleich, O. Mykhaylyk, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, *Local modulation of angiogenesis by site-directed gene transfer using magnetic nanoparticles*, Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg 03/13
- S. Rieck, S. Vosen, H. Mannell, K. Zimmermann, A. Heidsieck, B. Gleich, O. Mykhaylyk, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, *Site-directed endothelial cell replacement and modulation of angiogenesis by magnetic nanoparticles and magnetic fields*, "Cardiac Regeneration and Vascular Biology Conference", Venedig 06/2014

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. B. K. Fleischmann und Frau Dr. D. Wenzel dafür danken, dass sie es mir ermöglicht haben, diese Doktorarbeit am Institut für Physiologie anzufertigen und mich dabei so umfassend betreut haben. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst, Herrn Prof. Dr. J. Höhfeld und Herrn Prof. Dr. K. Mohr dafür, dass sie sich bereit erklärt haben, der Prüfungskommission beizutreten.

Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern: Herrn Prof. Dr. A. Pfeifer, Frau Dr. K. Zimmermann und Frau Dr. A. Kretschmann für die Bereitstellung der lentiviralen Vektoren, Herrn Prof. Dr. C. Plank und Frau Dr. O. Mykhaylyk für die Herstellung der magnetischen Nanopartikel, Herrn Dr. B. Gleich und Frau A. Heidsieck für ihre Unterstützung im Bereich Magnetfelder und Magnetspitzen sowie Frau Dr. H. Mannell für den Austausch über SHP2.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen am Institut für Physiologie für die Einarbeitung und die Hilfestellung bei allen auftretenden Problemen bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Ela Matthey, die mir immer als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand, Carsten Kilgus, der mir half, mich mit den Magnetspitzen anzufreunden und mich zwischendurch oft zum Lachen brachte, Astrid Ooms, die mich mit holländischem Lakritz versorgte, und natürlich Sarah Vosen, mit der ich eng zusammen an „unserem“ Nanopartikelprojekt gearbeitet habe und ohne die meine Doktorarbeit nicht die gleiche gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ohne die Unterstützung meiner Eltern hätte ich mein Studium nicht so konzentriert und komplikationslos absolvieren können, wie ich es getan habe. Sie haben mir immer das Gefühl vermittelt, stolz auf mich und für mich da zu sein. Das ist nicht selbstverständlich und dafür danke ich euch! Meine Familie wäre aber nicht komplett ohne meine Brüder. Sie haben dafür gesorgt, dass ich in meinem Leben viel Abwechslung hatte, lenkten mich oft genug von meinen Studien- und Arbeitsproblemen ab und waren immer für mich da, wenn ich sie brauchte.

Dank meiner Familie weiß ich, dass es im Leben wichtigere Dinge als den Beruf gibt und dass sie auch für mich da wären und hinter mir stehen würden, hätte ich nicht studiert, sondern eine andere berufliche Laufbahn eingeschlagen. Ihr seid großartig.