

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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