

1 Einleitung

Angiogenese, die Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen durch Migration, Proliferation und Differenzierung aktivierter Endothelzellen, kommt physiologischerweise nur im Embryo und Fetus sowie beim Adulten in der Plazenta, im Rahmen zyklischer Prozesse im Ovar und bei der Entwicklung der Milchdrüse vor (Risau, 1997). Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit pathologischen Prozessen wie beispielsweise dem Tumorstadium verbunden. Erst durch die Ausbildung eines eigenen Gefäßsystems kann ein Tumor über eine bestimmte Größe wachsen und metastasieren (Folkman, 1995). Durch Inhibition der Angiogenese, die so genannte Anti-Angiogenese, könnte abnormes Wachstum (z.B. von Tumoren) unterdrückt werden. Im Mittelpunkt einer anti-angiogenen Therapie stehen dabei aktivierte vaskuläre Endothelzellen, welche aufgrund ihrer exponierten Lage zum Blut geeignete Zielzellen für einen Gentransfer darstellen. Mittels spezieller Vektoren kann man genetische Information in diese Zellen zu therapeutischen Zwecken einbringen (Gentherapie). Durch den Einsatz von Endothelzell-spezifischen genregulatorischen Elementen, z.B. Promotoren und Enhancern, kann eine Zelltyp-spezifische Expression des Transgens erzielt werden.

In dem Bemühen, Tierversuche auf das unerlässliche Maß zu reduzieren, müssen die Effekte eines Gentransfers sowie Methode und Effizienz Endothelzell-spezifischer genregulatorischer Elemente *in vitro* getestet werden. Hierfür ist es notwendig, realitätsnahe *in vitro*-Modelle der Angiogenese mikrovaskulärer Endothelzellen zu etablieren, also solche, in denen die Endothelzellen dreidimensionale kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen bilden. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Zellkulturmodellen humaner Endothelzellen handelt es sich zum größten Teil um zweidimensionale Modelle (Vailhé et al., 2001), in denen sich kapillarähnliche Strukturen planar zur Kulturschalenoberfläche bilden. Eine dreidimensionale Organisation kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen wird nur nach Kultivierung von Endothelzellen unter Einsatz dreidimensionaler Polymere beschrieben (Auerbach et al., 2000; Vailhé et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Hauptziele. Das erste Ziel bestand in der Etablierung realitätsnaher *in vitro*-Modelle der Angiogenese muriner und humaner mikrovaskulärer Endo-

thelzellen für Transfektionsexperimente. Dabei sollten die zellulären Mechanismen der einzelnen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* durch licht- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung intensiv charakterisiert werden. Insbesondere sollten Informationen über die Lumenbildung im Inneren kapillarähnlicher Strukturen gewonnen werden.

Das zweite Ziel der Arbeit war die Durchführung von Transfektionsversuchen in den etablierten *in vitro*-Modellen der Angiogenese. Als Vektor diente Plasmid-DNA, in welche das Reportergen Luciferase sowie die zu untersuchenden Genelemente kloniert wurden. Es wurde die Polyfektion mittels aktivierten Dendrimeren (Tang et al., 1996), welche schnell und effizient mit der Plasmid-DNA Komplexe bilden, angewandt. In ersten Versuchen sollte die Effizienz verschiedener Endothelzell-spezifischer Promotoren nach Transfektion muriner und humaner Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* bestimmt werden. Im Anschluss erfolgte dann die Untersuchung der Steigerung der Promotoraktivität durch zusätzliche genregulatorische Elemente (Enhancer-/Intron-Sequenzen). Darüber hinaus sollten morphologische Veränderungen transfizierter Endothelzellen auf licht- und elektronenmikroskopischer Basis untersucht werden, um einerseits Aussagen über die Aufnahme der Transfektionskomplexe in die Zellen sowie deren Weg in den Zellkern zu machen und andererseits mögliche morphologische Schädigungen der Zellen infolge der Transfektion zu beurteilen und abzuschätzen.