

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

Gentherapeutische Modifikation der MHC I -
Oberflächenexpression humaner Endothelzellen zur
Reduktion der allogenen Immunogenität

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Beyer

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. med. S. Felix
 3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Laube

Datum der Promotion: 22.09.2006

Zusammenfassung

Hintergrund: Alternativ zu autologem arteriellen oder venösen Gefäßersatz bietet sich in der kardialen Bypasschirurgie die Verwendung kleinkalibriger PTFE-Prothesen mit Durchmessern von 3-4 mm an. Die Thrombogenität dieser sehr englumigen Gefäßprothesen ist allerdings hoch und die hohen Spontanverschlussraten erschweren derzeit eine Verwendung. Die Besiedlung solcher Gefäßprothesen mit Endothelzellen im Rahmen des Tissue-Engineering erhöht die Offenheitsraten deutlich und lässt künstlichen Gefäßersatz in die Nähe breiter klinischer Anwendung rücken.

Oftmals besitzen jedoch Patienten mit vaskulären Erkrankungen kein adäquates Gewebe, um autologe Endothelzellen isolieren und kultivieren zu können.

Allogene humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wären aufgrund ihrer einfachen Verfügbarkeit eine gute Alternative, jedoch stellt sich in diesem Fall das Problem der Transplantatabstoßung aufgrund von MHC - Inkompatibilitäten.

Spender MHC I-Moleküle, als eines der Hauptangriffsziele bei der zellulären Abstoßung stellen daher einen interessanten Ansatz für eine molekulare Immunmodulation dar. Eine MHC I Oberflächenreduktion der Transplantatzellen könnte die allospezifische Abstoßung drastisch minimieren und so ein Transplantatüberleben ohne Immunsuppression ermöglichen.

Eine Reduktion der MHC I Oberflächenexpression kann durch ein Antikörperfragment („Intrabody“), das MHC I bindet, erzielt werden. Durch eine Retentionssequenz wird der Intrabody im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und kann dort MHC I binden und so die Oberflächenexpression verhindern.

Methoden: HUVEC wurden mit adenoviralen Vektoren für den anti-MHC I Intrabody, für ein EGFP-Reporter gen und für die Kontrollvektoren (β -Gal oder AAT) transduziert. Die MHC I Oberflächenexpression auf den Endothelzellen wurde nach den Transduktionen durchflusszytometrisch bestimmt. Ein Calcein-release Zytotoxizitätsassay wurde durchgeführt um eine funktionelle

Wirksamkeit des Intrabodys im *in vitro* Abstoßungsmodell nachzuweisen.

Ergebnisse: Eine Transduktionseffizienz von über 95 % beim adenoviralen Gentransfer zeigt die hohe Effektivität der adenoviralen Transduktion.

Intrabody exprimierende HUVEC zeigen eine dramatische MHC I Oberflächenreduktion bis hin zum phänotypischen „Knock-out“. Dieser Effekt ließ sich durch eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nicht aufheben.

Intrabody exprimierende Zellen waren in einem Zytotoxizitätstest vor der Lyse durch allospezifische zytotoxische Lymphozyten geschützt.

Schlussfolgerungen: Bei der Verwendung Intrabody exprimierender allogener HUVEC zur Besiedlung künstlicher Gefäßprothesen wären geringere Abstoßungsreaktionen zu erwarten. Das wäre ein Schritt in die Richtung, solche Zellen als Alternative zu autologen Endothelzellen zu nutzen.

Schlagwörter:

Intrabodies, MHC I, HUVEC, Tissue engineering, adenoviraler Gentransfer, Immunomodulation, Zytotoxizitätsassay

Abstract

Background: The seeding of small calibre vascular polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts with endothelial cells provides an increase of biocompatibility of the graft surface. The harvest and *ex vivo* culture of autologous endothelial cells is highly delicate. Allogeneic human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) could be a potential cell source - however, rejection might occur due to major histocompatibility complex (MHC) mismatches. Lowering cell surface MHC I expression on endothelial cells by gene transfer of an anti-MHC I intrabody might reduce graft failure. The intrabody consists of a single-chain variable fragment (sFv) of an anti-MHC I antibody, carrying a terminal KDEL sequence to retain the molecule together with the MHC I inside the endoplasmic reticulum.

Methods: Adenoviral gene transfer was used to express the intrabody in HUVEC. The MHC I surface expression was measured 48 h after transduction by flow cytometry. Functional effects of the intrabody expression were analyzed in a calcein release cytotoxicity assay.

Results: A transduction efficiency of more than 95 % with EGFP-Adenovirus indicates a sufficient gene transfer into HUVEC. Intrabody-adenovirus transduced HUVEC show a massive reduction of MHC I surface expression creating almost a complete “knockout” phenotype. Stimulation with inflammatory cytokines could not overcome this effect. The cell lysis of anti-MHC I intrabody-expressing HUVEC in a cytotoxicity assay is reduced when compared to the level of a MHC mismatched control.

Conclusion: Our data indicate that anti MHC I intrabody transduced HUVEC with reduced levels of surface MHC I show lower rates of allospecific rejection and might be used as allogeneic donor cells for the seeding of artificial vascular grafts.

Keywords:

Keywords: Intrabodies, MHC I, HUVEC, tissue engineering, adenoviral transduction, immunomodulation, cytotoxicity assay

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1 Einleitung	12
1.1 kardiovaskuläre Bypasschirurgie	12
1.1.1 Alternativen zu autologen kardiovaskulären Bypässen	13
1.1.2 Architektur arterieller Gefäße	14
1.1.3 Funktionen der Endothelzellen	15
1.1.4 Tissue -Engineering von Gefäßprothesen	16
1.1.5 Klinische Bedeutung künstlich generierter kardiovaskulärer Gefäße	17
1.2 Allogene Endothelzelltransplantate	18
1.3 Grundlagen der Rejektion von Transplantaten	19
1.3.1 Expression und Antigenpräsentation durch MHC I-Moleküle	21
1.3.2 Effektormechanismen der zellulären Abstoßung	24
1.3.3 Die Rolle des Endothels im Prozess der Transplantatabstoßung	25
1.4 Strategien zur Abstoßungsprävention	26
1.4.1 Gentherapeutische Verfahren	27
1.4.2 Angriffspunkte einer molekularen Immunmodulation	28
1.4.3 Ansätze zur MHC I Reduktion	29
1.5 Aufgabenstellung	35
2 Geräte und Materialien	36
2.1 Allgemeine technische Geräte	36
2.2 Geräte und Material für die Zellkultur	36
2.2.1 Chemikalien und Zusätze	36
2.2.2 Plastikmaterialien	37
2.2.3 allgemein verwendete Zusätze, Medien und Puffer	37
2.2.4 vorhandene Zellen	38
2.2.5 Aufarbeitung humaner Nabelschnüre	38
2.2.6 EBV-Transformation humaner Nabelschnurblutlymphozyten	39
2.3 Geräte und Materialien für Gentransfers	39
2.3.1 Adenovirale Konstrukte	39

2.3.2	adenovirale Transduktion	40
2.4	Geräte und Materialien für Durchflußzytometrie	40
2.4.1	Antikörper	41
2.4.2	Lösungen für Durchflusszytometrie:	42
2.5	Geräte und Materialien für Zytotoxizitätsassays	42
3	Methoden	43
3.1	Überblick über die Abfolge angewandter Methoden	43
3.2	Endothelzellkultur	43
3.2.1	Isolierung humaner Nabelschnurendothelzellen	43
3.2.2	Kultur der HUVEC	44
3.2.3	Passage der HUVEC	44
3.2.4	Kryokonservierung der HUVEC	45
3.2.5	Identifikation der HUVEC als endotheliale Zellen	45
3.3	Lymphozytenkulturen	45
3.3.1	Allgemeine Abfolge der Lymphozytenkulturen	46
3.3.2	Gewinnung humaner Nabelschnurleukozyten	46
3.3.3	Generierung humaner B-lymphoblastoider Zellen	47
3.3.4	Kultur der BLC	47
3.3.5	Kryokonservierung und Auftauen der BLC	47
3.3.6	Gewinnung humaner peripherer Blutlymphozyten	48
3.3.7	HLA-Typisierung der Zellen	48
3.3.8	CD8+-Zellisolation aus PBMC	48
3.3.9	Kokultur zur Generierung allospezifischer CTL	49
3.4	Adenovirale Transduktionen	51
3.5	Durchflußzytometrie	51
3.6	Ermittlung der Transduktionseffizienz	52
3.7	Ermittlung der MHC I-Oberflächenexpression	52
3.8	Expression anderer Oberflächenmarker auf Endothelzellen	53
3.9	Oberflächenmarker der BLC	53
3.10	Oberflächenmarker der T-Lymphozytenkulturen	53
3.11	Zytotoxizitätsassays	53
3.11.1	Labeln mit Calcein-AM	55

3.11.2	Aussaat der Effektorzellen	55
3.11.3	Messen der Calcein Fluoreszenzintensität im Kulturüberstand	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Morphologische und zellbiologische Eigenschaften der HUVEC	56
4.2	Konstitutive Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf HUVEC	60
4.3	Expression von Oberflächenmolekülen auf HUVEC unter proinflammatorischen Kulturbedingungen	62
4.4	Effizienz der adenoviralen Transduktion von HUVEC	64
4.5	MHC I Oberflächenexpression untransduzierter und adenoviral transduzierter HUVEC	67
4.6	Vergleich der MHC I-Oberflächenexpression Zytokin stimulierter untransduzierter und adenoviral transduzierter HUVEC	69
4.6.1	MHC I Expression auf HUVEC unter Stimulation mit hohen IFN γ -Dosen	72
4.7	Einfluss der Intrabody Transduktion auf die Expression anderer Oberflächenmarker	73
4.8	Funktionelle Effekte der MHC I-Downregulation durch adenoviralen Transfer des Intrabody	76
4.8.1	HLA-Phänotypisierung der verwendeten Zellen	76
4.8.2	Gewinnung von autologen BLC-Stimulatorzellen	77
4.8.3	Generierung allospezifischer CTL	79
4.8.4	Markierungen der Zielzellen mit Calcein	82
4.9	Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays	84
4.9.1	Analyse der Zellyseraten bei der Verwendung von BLC als Zielzellen	85
4.9.2	Analyse der Zellyseraten bei der Verwendung von HUVEC als Zielzellen	87
4.9.3	Analyse der Zytotoxizität bei der Verwendung Intrabody- bzw. Kontrollvektor transduzierter HUVEC als Zielzellen	89
5	Diskussion	93
5.1	Überblick	93

5.2	Hintergrund	93
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	94
5.4	Die Isolation und Kultur humaner Nabelschnurendothelzellen	95
5.5	<i>In vitro</i> Gentransfer in HUVEC	96
5.6	MHC I-Oberflächenreduktion durch den Intrabody	97
5.7	Auswirkungen des adenoviralen Gentransfers auf die Oberflächenexpression anderer Moleküle	98
5.8	Generierung von allospezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten für das Abstoßungsmodell	99
5.9	Bedeutung der Ergebnisse	100

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABS	Humanes AB Serum
ACVB	Aortokoronarer Venenbypass
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintri-phosphat
BLC	B-lymphoblastoid cells – B-lyphoblastoide Zellen
CD	cluster of differentiation
CMV	Zytomegalievirus
CTL	cytotoxic T-lymphocytes – Zytotoxische T-Lymphozyten
d	day - Tag
Dil-Ac-LDL	fluoreszenzmarkiertes acetyliertes Low Density Lipoprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FKS	Fetales Kälberserum
GMP	Good manufacturing practise
Gy	Gray
HLA	Human leukocyte antigen
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells – Humane Nabelschnurvene- nendothelzellen
HSV	Herpes Simplex Virus
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LIMA	Left internal mammarian artery
Max.	Maximal
MHC	Major histocompatibility complex – Haupthisokompatibilitätskomplex
MLC	Mixed lymphocyte culture - gemischte Lymphozytenkultur
Min.	Minimal, mindestens

NK	Natürliche Killerzellen
NFκB	Nuclear factor κB (Transskriptionsfaktor)
OP	Operation
(e)PTFE	(expanded) Polytetrafluorethylene
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immunodeficiency
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TAP	transporter associated with antigen presentation
TZR	T-Zellrezeptor, T-cell-receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
V.	Vena
v.a.	vor allem
vWF	Von Willebrandt Faktor

Anhang

Eidstattliche Erklärung

„Ich, Florian Beyer erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Gentherapeutische Modifikation der MHC I-Oberflächenexpression humaner Endothelzellen zur Reduktion der allogenen Immunogenität“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 6.1.2006

Florian Beyer

Danksagung

Der Grundstein für diese Arbeit wurde im Oktober 1999 während eines Vortrages von Anette Busch im Rahmen des Studentenkongresses der Charité gelegt. Bis heute war es ein langer Weg, und ich danke allen, die mich begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martina Seifert für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation. Ihre Geduld, Motivation und Verständnis sind die Basis für das Gelingen dieser Arbeit gewesen.

Herrn Professor Hans-Dieter Volk danke ich für das Thema der Dissertation und die Möglichkeit, diese am Institut für Medizinische Immunologie zu erarbeiten.

Den Arbeitsgruppenleitern PD Dr. Thomas Ritter, Dr. Gerald Grütz und Dr. Birgit Sawitzki möchte ich für spezielle fachliche Unterstützung, Tipps und Hilfestellungen danken.

Ein besonderes Dankeschön an Dr. Cornelia Doebis für die Zusammenarbeit. Danke an Dres. Sabine Schu, Britt Kieselbach, Christine Brandt.

Für ihre Unterstützung während der Laborarbeit danke ich Elke Effenberger, Heinz Tanzmann und Sabine Brösel.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Immunologie, insbesondere der Truppe aus dem Ida-Simon-Haus für offene Ohren, Tipps und Hilfe.

Ein spezieller Dank an Dr. Katja Klugewitz vom DRFZ für ihre Anregungen.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, ohne die grundsätzlich nichts gegangen wäre.

Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes verzichte ich in der elektronischen Version auf die Veröffentlichung meines Lebenslaufes.

Publikationen

Beyer, F., et al., *Decline of surface MHC I by adenoviral gene transfer of anti-MHC I intrabodies in human endothelial cells-new perspectives for the generation of universal donor cells for tissue transplantation.* J Gene Med, 2004. **6**(6): p. 616-23.

Posterpräsentation:

F. Beyer, A. Busch, A. M. Mhashilkar, W. A. Marasco, E. Effenberger, C. Doebis, H.-D. Volk and M. Seifert, *MHC I downregulation on HUVEC cells—an experimental approach for artificial graft seeding.* Jahrestagung der DGfI 2001, Dresden

Kongressbeiträge:

Seifert, M, Doebis, C, Beyer, F, Busch, A, Schu, S, Brösel, S, Ritter, T, Laube, H, Marasco, WA, Reiser, J and Volk, HD (2004) *Protection of allogeneic vascular endothelial cells by gene transfer of anti-MHC class I intrabodies.* Cytotherapy, 2004. **6**(3): 259