

1 Einleitung

1.1 kardiovaskuläre Bypasschirurgie

Die koronare Herzkrankheit mit einer Herzinfarktinzidenz von ca. 194/100000 in Deutschland und einer –Sterblichkeit von 79/100000 ist mit einem Anteil von etwa 30 % an der Gesamtmortalität eine Haupttodesursache. Die stationäre Morbidität der koronaren Herzkrankheit lag 2002 bei 664/100000 Einwohner in Deutschland (Bruckner 2003, BQS Report, www.bqs-outcome.de). Die internistische (konservativ-medikamentöse und interventionelle) Therapie sowie die chirurgische Behandlung der koronaren Herzkrankheit sind ein immenser Kostenfaktor des Gesundheitssystems und gleichzeitig ein attraktiver Markt für Forschung und Entwicklung. Jährlich werden in Deutschland etwa 85000 Herzoperationen durchgeführt, wovon die koronarchirurgischen Eingriffe mit etwa 55000 Operationen den größten Anteil ausmachen (Bruckner 2003, BQS Report, www.bqs-outcome.de).

Der aktuelle Goldstandard der kardiovaskulären Bypasschirurgie ist die Transplantation autologer arterieller (A. thoracica interna) oder venöser (V. saphena magna) Gefäße. Die 10-Jahres-Offenheitsraten liegen bei arteriellen Bypässen bei ca. 90 % und bei den venösen Transplantaten bei ca. 50-70 % [1].

Die koronare Herzkrankheit ist allerdings meist nur ein Symptom einer generalisierten Vaskulopathie, oftmals als Folge eines metabolischen Syndroms bei habituellen und genetisch prädisponierenden Risikofaktoren. Aufgrund lokalisierter oder generalisierter angiopathischer Probleme, können ca. 10 % der Patienten nicht mit autologen Venen oder Brustwandarterien versorgt werden (Tab.1). An erster Stelle sind hier variköse Veränderungen der Beinvenen oder ein postthrombotisches Syndrom mit nachfolgender chronisch venöser Insuffizienz des tiefen Beinvenensystems zu nennen. Starke artherosklerotische Veränderungen, Stenosen oder Fehlanlagen der A. thoracica interna verbieten die Benutzung dieses Gefäßes.

Als eine weitere Problemgruppe stellt sich die zunehmende Anzahl der zu re-

operierenden Bypass-Patienten dar, denen bereits in einer Erstoperation Gefäße entnommen wurden [2] [3].

Die freie Transplantation eines A. radialis Pedikels erlebt aufgrund schonenderer Entnahmepraktiken eine Renaissance mit ähnlich guten Ergebnissen wie ein A. thoracica interna Bypass, jedoch ergeben sich Schwierigkeiten bei insuffizienter Kollateralisierung der arteriellen Versorgung der Hand über die A. ulnaris [4] [5].

Gefäß	Anzahl der Graft	Anteil in %
Vene	49680	89,49
LIMA	46418	83,61
RIMA	3808	6,86
A. radialis	4186	7,14
Viszeralarterie	76	0,14
Biokompoundgraft	729	1,31
Kunststoffgraft	119	0,21

Tab.1:

Arten, Zahlen und Anteile der in der Koronarchirurgie 2002 verwendeten Gefäße (Quelle BQS-Report 2002 - www.bqs-outcome.de)

Die Verwendung eines freien Viszeralarterientransplantats birgt zusätzlich die Risiken eines Zwei-Höhlen-Eingriffs. Außerdem wurde über postoperative Vasospasmen des Transplantates berichtet [6].

Bei einem potentiellen Bedarf von ca. 5000 Transplantaten pro Jahr allein in Deutschland ist die Suche nach einer Alternative zu autologen Gefäßtransplantaten eine wichtige Aufgabe.

1.1.1 Alternativen zu autologen kardiovaskulären Bypässen

Aufgrund eines geringen Durchmessers von max. 3-4 mm und einer verhältnismäßig langen Kontaktstrecke mit einer Gefäßwand stellen die Thrombogenität der luminalen Oberfläche und die hohe Wandspannung des Gefäßersatzes ein Problem dar. Die Verwendung von allogenen oder xenogenem Gefäßmaterial analog zur Herzklappen transplantation stellt sich nicht nur durch einen wesentlich höheren Bedarf an Spendermaterial als ethisch und logistisch problematisch dar. Eine Dezellularisierung zur Prävention einer Abstoßungsreaktion, wie bei biologischen Herzklappen durchgeführt, bewirkt ein Freiliegen der thrombogenen extrazellulären Matrix. Trotzdem gibt es Ansätze

zum Gebrauch kryokonservierter autolog endothelialisierter Venentransplantate [7].

Die Ergebnisse des Einsatzes von Gefäßprothesen aus Kunststoff analog zur arteriellen Bypasschirurgie der großen Gefäße waren enttäuschend. Aufgrund der kleinen Durchmesser von 3-4 mm war die Thrombogenität der luminalen Oberflächen so hoch, dass ein thrombotischer Verschluss meist nach zu kurzer Zeit eintrat, noch ehe sich eine Neointima formieren konnte [8].

Daher wurden in den letzten Jahren zunehmend Versuche unternommen, im Rahmen des sogenannten „Tissue engineering“ Gefäßersatz aus biologischen oder künstlichen Materialien zu generieren [9] [3].

1.1.2 Architektur arterieller Gefäße

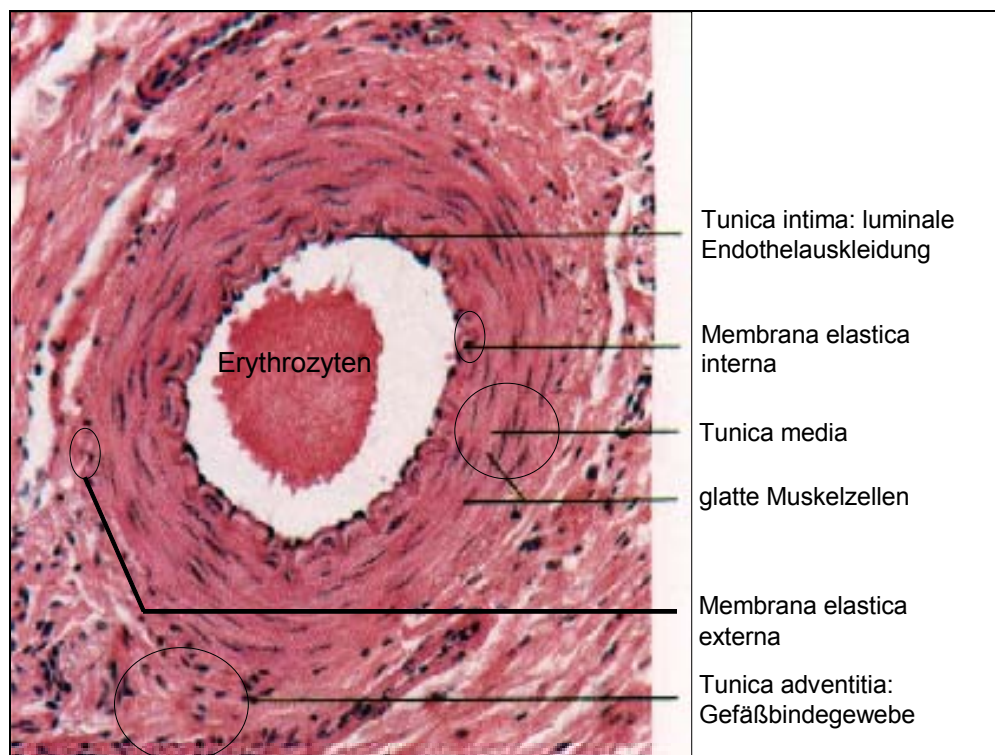


Abb. 1: Architektur arterieller Gefäße

Querschnitt einer Arterie, HE-Färbung, 195 x Vergrößerung, Quelle: Geneser Farbatlas der Histologie, Deutscher Ärzteverlag 1987

Der strukturelle Aufbau von arteriellen Gefäßen besteht aus einer Dreischichtung (Abb.1).

Von luminal her unterscheidet man die Tunica intima bestehend aus Endothelzellschicht und Basalmembran, die Tunica media bestehend aus glatten Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und einer durch Kollagen- und Elastinfasern gebildeten Bindegewebsmatrix und die Tunica adventitia, eine Binde- und Fettgewebsschicht, die für eine sichere Einlagerung in das umgebende Gewebe sorgt. Außerdem sorgen zirkuläre elastische Fasernetzwerke vor allem die subendotheliale Membrana elastica interna und -externa für eine gute Anpassung an die periodischen Druck- und Volumenänderungen. Die muskuläre Tunica media ist vegetativ innerviert und für die Regulation der Gefäßweite, des Blutflusses und des lokalen und systemischen Blutdruckes zuständig. Um einen dauerhaften künstlichen Gefäßersatz zu erzeugen, muss man sich der Funktionen und der Interaktion der einzelnen Komponenten bewusst sein.

1.1.3 Funktionen der Endothelzellen

Die luminale Endothelzellschicht ist eine die Gefäßwand auskleidende, einschichtige Zellbarriere, die direkt dem strömenden Blut ausgesetzt ist. Aus dem strategisch wichtigen Kontaktbereich zweier Kompartimente bzw. Organsysteme ergeben sich zahlreiche kommunikative und regulative Funktionen dieser Zellen.

Die Produktion von NO aus L-Arginin durch die endotheliale Nitratoxidase und die nachfolgende Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur ist eine seit langem bekannte und therapeutisch genutzte Eigenschaft der Endothelzellen [10]. Die Tragweite der endothelialen lokalen Regulation des Gefäßtonus in Abhängigkeit von metabolischen, inflammatorischen und humoralen Faktoren wird im Konzept der endothelialen Dysfunktion bei der Entstehung der Arteriosklerose deutlich [11].

Die Regulation des aktiven und passiven Stofftransports vom Blut in die Gewebe und vice versa ist v.a. im kapillären Bereich eine Aufgabe des Endothels.

Über die Bildung von Prostacyclin und Expression des von-Willebrand-Faktors üben Endothelzellen einen entscheidenden lokalen Einfluss auf die Regulation der Thrombozytenfunktion und Blutgerinnung aus [12]. Unter inflammatori-

schen Bedingungen sind Endothelzellen in der Lage, Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Selectine an der luminalen Oberfläche zu exprimieren und damit u.a. die Extravasation von Leukozyten zu steuern. Dies macht Endothelzellen zu wichtigen lokalen Regulatoren des Immunsystems [13] [14] [15]. Besonders ausführlich sind bei Endothelzellen die Wirkungen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ , mit ihren Signaltransduktionskaskaden und der Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF κ B untersucht worden [16] [17].

1.1.4 Tissue -Engineering von Gefäßprothesen

Der Ersatz von großen Arterien oder -teilen durch gewebte Kunststoffprothesen aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon ©, Gore Tex ©) oder Polyethylenterephthalat (Dacron ©) ist seit langem klinischer Alltag. Durch das Vorbehandeln der luminalen Oberflächen mit Patientenblut (preclotten) kann die Thrombogenität der Oberfläche erheblich gesenkt werden. Innerhalb einiger Wochen bildet ein solcher Gefäßersatz eine Neointima aus patienteneigenen Bindegewebs- und Endothelzellen aus, so dass eine dauerhafte Funktion als Blutleiter gewährleistet ist. Die Schwachstellen dieser Gefäße stellen die Anastomosen dar.

Je kleiner der Durchmesser der zu transplantierenden Prothesen wird, umso bedeutsamer werden die Probleme der frühen thrombotischen Okklusion und der fehlenden Adaptation an einen veränderten Blutfluss. Neue Strategien zur Verbesserung der Biokompatibilität solcher Prothesen mit neuartigen und weniger thrombogenen Beschichtungen aus Kunststoffen, Biomolekülen oder Zellen sind bereits in klinischer Erprobung [3].

Die *in vitro* Besiedlung von künstlichen Gefäßprothesen mit Endothelzellen stellt einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der Biokompatibilität der luminalen Oberfläche dar [18] [19] [20] [21]. Mit einer vollständigen Bedeckung der Kunststoffmatrix entfällt der auslösende Faktor einer lokalen Thrombozytenaktivierung. Derzeit ist die Verwendung autologer Endothelzellen der Goldstandard. Dazu werden entweder Endothelzellen aus einer entnommenen Vene analog zur Gewinnung von Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC)

isoliert (s.u.), oder aus abgesaugtem subkutanem Fettgewebe mikrovaskuläre Endothelzellen an spezifischen Oberflächenmolekülen erkannt und über immunologische Verfahren aussortiert. Anschließend folgt eine Phase der *in vitro* Kultivierung und Vermehrung des Zellmaterials, bis genügend Zellen zur Besiedlung einer Gefäßprothese vorhanden sind [20] [22]. Die Besiedlung erfolgt mittlerweile in speziellen Perfusionsapparaturen in denen schrittweise arterielle Drücke und Durchflussraten mit entsprechenden pulsatilen Scherkräften aufgebaut werden, um die anwachsenden Zellen auf die Bedingungen nach der Transplantation vorzubereiten [18]. Die Kunststoffgefäßprothesen aus PTFE oder Dacron® werden dazu meist noch mit speziellen Polymerfilmen, Fibrin, Fibronectin oder anderen Materialien beschichtet, um die Adhärenz der Endothelzellen an das inerte Material zu verbessern [23].

Dem Ziel eines adäquaten Gefäßersatzes kommen *in vitro* generierte biologische Transplantate noch einige Schritte näher [24]. Durch die Verwendung einer Kollagenmatrix zur Aussaat der verschiedenen beteiligten Zelltypen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen kann nicht nur eine annähernd natürliche Architektur und Festigkeit, sondern auch eine selbständige Einheilung des Transplantats und eine aktive Anpassung an veränderte Bedingungen erreicht werden [9].

Dennoch befinden sich letztgenannte Ansätze in der Phase des Tierversuchs wohingegen *in vitro* autolog endothelialisierte Prothesen bereits seit längerem im klinischen Einsatz sind [22] [25] [20].

1.1.5 Klinische Bedeutung künstlich generierter kardiovaskulärer Gefäße

In gut etablierten Modellen werden kleinkalibrige, *in vitro* generierten Kunststoff- oder biologischen Gefäßprothesen kleinen Säugetieren wie Mäuse, Ratten, Kaninchen und auch Großsäugern transplantiert [9].

Am Menschen werden großkalibrige Gefäßprothesen, künstliche Herzklappen oder dezellularisierte allogene Gefäße mit autologen Endothelzellen besiedelt und mit gutem Erfolg transplantiert [26]. Die mit dem jeweiligen Goldstandard vergleichbaren Resultate dieser Verfahren rechtfertigen bisher jedoch nicht den enormen zusätzlichen Aufwand [20] [27] [25].

Der Schritt der klinischen Anwendung am menschlichen Herzen fällt in vielfacher Hinsicht recht schwer. Zum einen sind die Offenheitsraten des üblichen autologen kardiovaskulären Gefäßersatzes so gut, dass sich künstliche Gefäßprothesen im Rahmen von klinischen Studien am Goldstandard orientieren müssen. Bei der Verwendung dieser Prothesen in anderweitig nicht zu versorgenden Patienten stellt sich das ethische Problem der bestmöglichen Versorgung und immer das Abwägen, ob gut etablierte, risikoärmere, jedoch weniger erfolgreiche Alternativen (s.o.) das Mittel der Wahl sind. Angesichts der vitalen OP-Indikation und dem Risiko des operativen Eingriffes ist die Etablierung neuer Therapieverfahren mit erheblichen Risiken für die Patienten verbunden. Trotzdem gibt es eine experimentelle Studie der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Charité, Berlin, deren Ergebnisse bei der Verwendung künstlicher *in vitro* endothelialisierter Bypassprothesen durchaus mit autologem Gefäßersatz vergleichbar sind [22].

1.2 Allogene Endothelzelltransplantate

Ein Hauptproblem des Einsatzes *in vitro* endothelialisierter Gefäßprothesen ist die umständliche Gewinnung und Kultur von autologen Endothelzellen. Die Entnahme und Präparation autologer Venen und die mehrwöchige *in vitro* Generierung ausreichender Zellmengen ist einerseits ein zeitaufwändiges Unterfangen. Andererseits sind die Quantität und auch die Qualität der gewonnenen Zellen v.a. in Bezug auf deren proliferative Potenz vom Alter des Patienten und der vaskulären Grunderkrankung abhängig, so dass nicht jeder Versuch der Zellkultivierung gelingt. Aber gerade das mit der dringlichen OP-Indikation einhergehende, enge Zeitfenster erfordert eine ständige Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigen, endothelialisierten Gefäßprothesen, um in dieser Situation einen therapeutischen Vorteil zu erwirken.

Ein ständig verfügbarer Zellpool, aus dem bei Bedarf innerhalb weniger Stunden bis Tage geeignetes Transplantationsmaterial generiert werden könnte, wäre eine Bank aus allogenen Endothelzellen.

Die Isolation humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen ist seit mehr als 30 Jahren ein gut etabliertes Verfahren der Zellkultur [28]. Solche fetalen Zel-

len besitzen ein großes Proliferations- und Differenzierungspotential und sind nur in geringem Maße durch kumulative Noxen oder Erkrankungen vorbelastet.

Humane Nabelschnüre sind ethisch unbedenklich und im Allgemeinen in großer Zahl in Geburtskliniken verfügbar. Ihre Aufarbeitung nach den Regeln des GMP stellt lediglich ein logistisches und personelles Problem dar. Die Kryokonservierung und das Wiederauftauen der benötigten Zellen gelingt ebenfalls problemlos. Die Anzucht in genau definierten serumarmen Medien ist möglich, zur Kultur benötigtes Serum könnte dem Patienten entnommen werden. Die meisten Medienzusätze sind inzwischen auf rekombinanter Basis erhältlich und so von ethischen und infektionsbiologischen Gesichtspunkten aus betrachtet unbedenklich.

Die im Allgemeinen kalkulierte proliferative Potenz liegt bei mindestens 16 Zellverdopplungen (Information der Fa. Cascade Biologics, www.cascadebio.com). Die Zellverdopplungszeit bei optimalen Kulturbedingungen dauert etwa 30 Stunden (Information der Fa. Cascade Biologics, www.cascadebio.com) und die Besiedlung von Gefäßprothesen in modernen pulsatilen Durchflussskammern etwa drei bis fünf Tage [18]. So könnten ca. 7 Tage nach einer Anforderung fertig besiedelte Gefäßprothesen versandt und transplantiert werden. Diese Zeitspanne wäre für die meisten Fälle einer koronaren Bypassoperation ausreichend.

Das größte Hindernis bei der Verwendung allogener Zellen und Organe jedoch stellt die auf HLA-Unterschieden zwischen Spender und Empfänger beruhende Transplantatabstoßung dar.

1.3 Grundlagen der Rejektion von Transplantaten

Bei der Transplantation von kernhaltigen allogenen Zellen wird bedingt durch die HLA-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger eine T-Zell-vermittelte Immunantwort initiiert, die zu einer akuten Rejektion eines HLA-diskordanten Transplantates führt [29] [30] [31] [32].

Aus diesem Grunde wird vor einer Transplantation ein Vergleich zwischen dem HLA-Haplotyp des Spenders und Empfängers durchgeführt, um aus einer

Gruppe potentieller Empfänger den Ähnlichsten herauszusuchen. Weiterhin wird im Rahmen eines cross-matches analog zur transfusionsmedizinischen Untersuchung überprüft, ob der potentielle Empfänger z.B. im Rahmen einer vorangegangenen Transfusion bereits gegen Spenderantigene vorsensibilisiert ist, um eine hyperakute Abstoßungsreaktion durch präformierte Antikörper zu vermeiden. In einer gemischten Lymphozytenkultur werden minor-Histokompatibilitäts-Antigene (minor H-antigens, mHC) und deren Fähigkeit, chronische Abstoßungsreaktionen seitens des Empfängers auszulösen, überprüft.

Die Transplantatabstossung allogener Organe oder Gewebe beginnt mit einer adäquaten und sicheren Erkennung von Alloantigenen, und der nachfolgenden Aktivierung der verschiedenen Effektormechanismen des Immunsystems [33].

Der Prozess der Erkennung von körperfremden Geweben und der nachfolgenden Generierung allospezifischen Effektorzellen, läuft im wesentlichen über zwei Wege [34]. Bei der direkten Antigenpräsentation wandern Antigenpräsentierende Zellen (APZ) des Spenders in die regionalen Lymphknoten des Empfängers ein und induzieren dort über die Präsentation von Fremdantigenen des Major- und Minor-Typs die zelluläre Antwort des Empfängers. Bei der indirekten Form ist die Prozedur von Fremdantigenen durch APZ des Empfängers der erste Schritt zur Lymphozytenaktivierung und einer nachfolgenden, langsameren Form der Abstoßung [32] [35]. Außerdem besitzen auch nicht hämatopoetische spendereigene Körperzellen wie Endothelzellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und können direkt eine allospezifische Lymphozytenaktivierung und nachfolgende Transplantatabstoßung initiieren [36] [37].

Als Zielmolekül der Fremderkennung durch aktivierte CD8+ T-Lymphozyten dienen spendereigene MHC I-Moleküle die durch Bindung an den T-Zell-Rezeptor-Komplex (TZR) eine zytotoxische Antwort der T-Zelle auslösen.

Weitere Effektorstrecken der Transplantatabstoßung sind einerseits die humorale B-Zellantwort mit der Bildung von Alloantikörpern gegen Transplantatantigene, und andererseits die Bildung allospezifischer CD4+ T-Zellen, die neben

der Aufgabe der CD8+- und B-Zell-Aktivierung selbst inflammatorische Eigenschaften besitzen und über apoptoseinduzierende Signale oder über die Schaffung eines inflammatorischen Milieus zur Abstoßung allogener Zellen führen können [31].

Synergistisch zur zellulären Abstoßung bewirken angeborene, unspezifische Teile des Immunsystems wie z.B. Komplement-System, NK-Zellen und Phagozyten eine weitere inflammatorische Reaktion und Transplantatschädigung [29] [38].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass HLA-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger für die Sensibilisierung gegen Alloantigene verantwortlich sind. Die Aktivierung von allospezifischen zytotoxischen CD8+- und CD4+ - Effektorzellen und Alloantikörper bildenden B-Zellen und deren klonale Expansion sind die Effektoren des spezifischen Abstoßungsprozesses, der durch die Bildung von Gedächtniszellen dauerhaft unterhalten wird [36].

Die erfolgreiche Unterdrückung akuter Abstoßungsprozesse durch immunsuppressive Medikamente hat die derzeitigen Erfolge in der Transplantationsmedizin ermöglicht. Das Langzeitüberleben allogener Transplantate wird durch die chronischen Abstoßungsprozesse limitiert [39] [40].

1.3.1 Expression und Antigenpräsentation durch MHC I-Moleküle

Das Genlocus des MHC I-Moleküls auf dem Chromosom 6 enthält u.a. die drei unterschiedlichen MHC Klassen A, B und C. Vom Genlocus einer Klasse sind bis zu 100 verschiedene Allele bekannt, die alle mit einer bestimmten Häufigkeit in der Population vertreten sind. Aufgrund der co-dominanten Expression maternaler und paternaler hochpolymorpher Allele in drei unterschiedlichen HLA Klasse I-Molekülen auf einer Körperzelle erklärt sich die Diversität der Individuen aufgrund Ihrer MHC I-Haplotypen. Die Wahrscheinlichkeit desselben MHC I-Haplotyps beträgt bei homozygoten Zwillingen 100 %, bei Geschwistern nur noch 25 % und ist bei weiter abnehmendem Verwandtschaftsgrad stark fallend.

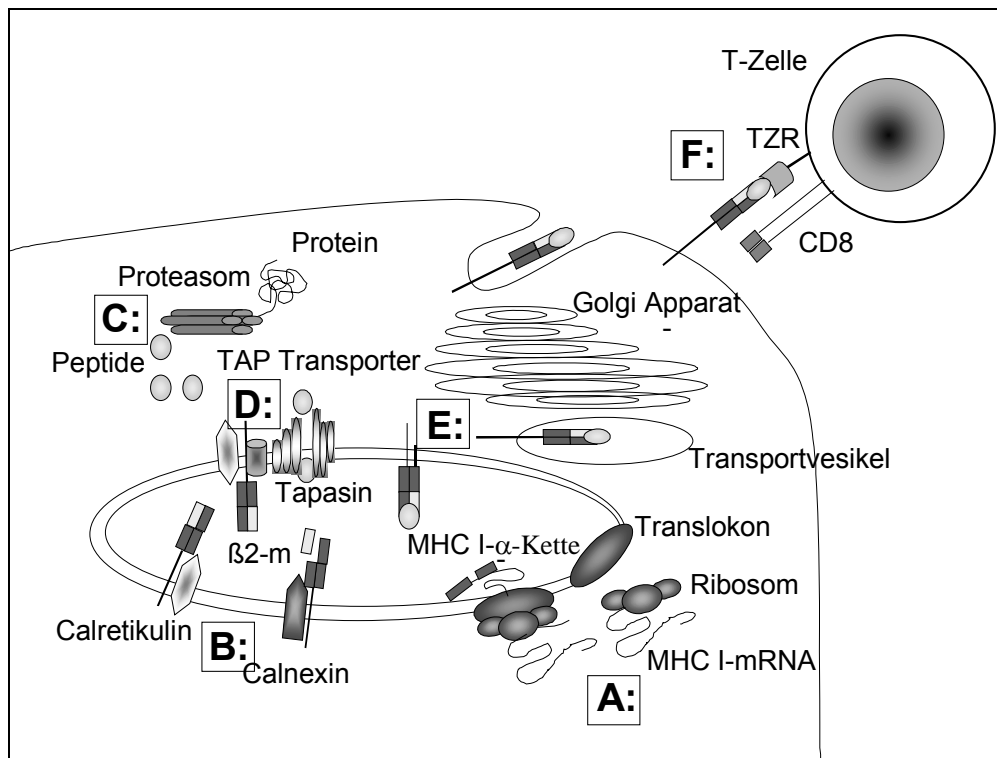


Abb. 2: Ablauf der Proteinsynthese, Faltung, Modifikation, Peptidbeladung und Oberflächenexpression von MHC I Molekülen

A): Translation der MHC I-mRNA in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) durch den Ribosomen-Translokon-Komplex

B): Aggregation des β_2 -Mikroglobulin (β_2 -m) an die MHC I- α -Kette im Komplex mit den Chaperonen Calnexin bzw. Calretikulin

C): Spaltung endogener Proteine durch das Proteasom und Transport der Peptidketten durch den TAP-Transporter in das rER

D): Anlagerung des MHC I Moleküls an den TAP Transporter mit Hilfe der beiden Chaperone Calretikulin und Tapasin und Peptidbeladung des MHC I-Moleküls

E): Transport des stabilen MHC I-Peptid-Komplexes via Golgi-Apparat an die Zelloberfläche

F): Kontakt einer zytotoxischen T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) und das CD 8 Molekül mit dem Oberflächen MHC I-Peptid-Komplex

MHC I-Heterodimere bestehen aus einer α -Kette mit 3 Domänen und einer assoziierten β_2 -Microglobulin Kette. Während die α_3 -Domäne mit der Transmembrankomponente für die Verankerung des MHC I-Moleküls in der Zellmembran verantwortlich ist, bilden die α_1 - und α_2 -Domänen im endgültig gefalteten MHC I-Molekül eine Spalte, die unterschiedliche Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge mit variabler Affinität bindet und daraufhin eine stabile

spezifische Konformation einnimmt. Diese, in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz des Peptids eingenommene spezifische Konformation des MHC I-Moleküls ist die Basis der Erkennung durch CD8⁺-T-Lymphozyten und die Unterscheidung zwischen „Selbst“ oder „Fremd“ [41].

Die Hauptaufgabe des MHC I-Moleküls ist die Präsentation endogen synthetisierter Peptide an der Zelloberfläche. Die Synthese und Faltung des MHC I-Moleküls und die Assemblierung mit dem entsprechenden Peptid finden im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) Kompartiment der Zelle statt (Abb.2). Eine Gruppe von stabilisierenden Komolekülen und Chaperonen sorgen für eine stabile Konformation des entstehenden MHC I-Moleküls. Die translatierte MHC I-mRNA wird durch ein Translokon mit dem Ribosomenkomplex an das rER der Zelle gebunden und die α -Proteinkette in das ER-Kompartiment synthetisiert (Abb. 2A).

Die α -Kette assembliert mit einem Chaperon und vorübergehend mit membrangebundenem Calnexin bis sie eine β_2 -Mikroglobulinkette bindet (Abb. 2B). Der Komplex bindet nun das Transmembranprotein Calretikulin und ist so in der Lage, sich mit Hilfe des Tapasins - einem weiteren Chaperon - an einen Transporter - das heterodimere TAP-Molekül - zu binden. Das Tap-Transportmolekül transportiert im zytosolischen Proteasomenkomplex generierte Peptidfragmente ATP-abhängig ins ER und fügt diese in den MHC I-Komplex ein (Abb. 2D). Durch die Peptidintegration erhält das entstandene vollständige MHC I-Molekül seine endgültige stabile und spezifische Konformation, löst sich vom Calretikulin und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 2E). Durch diesen Prozess wird gewährleistet, dass kein MHC I-Molekül ohne entsprechendes Peptid an die Zelloberfläche gelangt. Unvollständige oder nicht korrekt gefaltete MHC I-Moleküle werden über den lysosomalen Apparat der Zelle wieder abgebaut.

Die Peptide, die vom MHC I-Molekül gebunden werden, entstehen aus dem Abbau intrazytosolischer Proteine durch den Proteasomenkomplex (Abb. 2C). Dieser, aus Tetrameren mit jeweils 7 Untereinheiten bestehende zylindrische Proteinkomplex ist in der Lage, zytosolische Proteine zu entfalten und sie in Peptide von 8-15 Aminosäuren Länge aufzuspalten. Auf diese Weise werden

ständig Peptidfragmente produziert, die einen Überblick über die aktuelle Proteinexpression der jeweiligen Zelle geben. Die Proteosomenaktivität wird durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. IFN- γ reguliert, so dass die Zytokinwirkung nicht nur die quantitative Expression von Oberflächen-MHC I steigert, sondern im Falle einer inflammatorischen Zellaktivierung auch die Qualität der endogen prozessierten Peptide angepasst wird [42] [43]. Im Rahmen einer viralen Infektion gibt die Zelle so ein Signal an antigenspezifische CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 2F) [44].

1.3.2 Effektormechanismen der zellulären Abstoßung

Die Endstrecke der Immunantwort bei der Transplantatabstoßung ist entweder eine akute direkte Zytotoxizität, vermittelt durch alloreaktive CD8+-T-Lymphozyten oder eine verzögert ablaufende chronische Abstoßung durch unspezifische angeborene, oder spezifische Antikörper- und CD4+-T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktionen im perivaskulären Bindegewebe und einer daraus resultierenden Transplantatvaskulopathie.

Die Erkennung fremder Zellen durch CD8+-T-Lymphozyten erfolgt durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) an ein Fremd MHC I-Molekül und bewirkt eine Apoptoseinduktion in der Zielzelle durch zielgerichtet parakrin sezernierte porenbildene Perforinmoleküle und eine anschließende DNA-Fragmentierung mittels der DNase Granzyme [45].

Ein anderer Mechanismus der Apoptoseinduktion ist durch die Interaktion von Fas-Molekülen auf Zielzellen und Fas-Ligand exprimierende CD8+-T-Lymphozyten ausgelöste Reaktionskaskade.

Die direkte Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α in hohen lokalen Konzentrationen könnte ein dritter Weg zur Apoptoseinduktion in Zielzellen sein. Gleichzeitig lösen diese Zytokine auch eine proinflammatorische Reaktion an der Zielzelle u.a. mit einer Überexpression von MHC I aus. Weiterhin verursachen diese Zytokine eine begleitende lokale Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes, unter anderem mit Makrophagenaktivierung.

Die hohe Effektivität der durch Fremd-MHC I ausgelösten zellulären Immunantwort wird durch die große Zahl an TZR realisiert, die in der Lage sind

Fremd-MHC I als solches zu erkennen. Naive CD 8+-T-Zellen brauchen in solchen Fällen für eine direkte Zellaktivierung nur wenig kostimulatorische Hilfe seitens der APZ oder CD4+-T-Zellen, denn sie sind in der Lage, das für eine Aktivierung benötigte IL-2 autokrin zu sezernieren. Eine Erkennung von Fremd-MHC I auf Transplantatzellen führt zu einer massiven T-Zellaktivierung mit einer Proliferation alloreaktiver zytotoxischer CD8+-T-Lymphozyten und zur nachfolgenden Transplantatzerstörung.

1.3.3 Die Rolle des Endothels im Prozess der Transplantatabstoßung

Endothelzellen bilden die Barriere zwischen zirkulierendem Blut und dem extravasalen Kompartiment. Im Rahmen der Transplantationssituation stellen Endothelzellen in vaskularisierten Spenderorganen die erste Population körperfremder Zellen dar, mit denen ein Empfängerorganismus konfrontiert ist[15].

Zytokin-aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt Oberflächenmoleküle aus den Klassen der Integrine und Selektine, die für die Adhäsion und Extravasation von Phagozyten und Lymphozyten verantwortlich sind [14] [13]. Im Rahmen des spezifischen Abstoßungsprozesses wandern so alloreaktive Empfänger-T-Lymphozyten in das subintimale vaskuläre Kompartiment des Transplantates ein. Dieser histologisch als „Endothelitis“ charakterisierte Prozess führt direkt zur Zerstörung allogener Endothelzellen durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten über die bereits beschriebenen Perforin/Granzyme Wirkungen, Fas / Fas-Ligand Interaktionen oder ein apoptoseinduzierendes Zytokinmilieu. Diese akuten Abstoßungsvorgänge führen zum Freiliegen der vaskulären Bindegewebsmatrix und zum thrombotischen Gefäßverschluss.

In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Endothelzellen über die Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen die Funktion von Antigen präsentierenden Zellen übernehmen und mit positiven und negativen regulatorischen Effekten die Einwanderung und Aktivierung allospezifischer T-Zellen in ein Transplantat steuern [46] [47] [48].

Für eine dauerhafte Präsentation von Alloantigenen in den lymphatischen Geweben des Empfängerorganismus sorgen empfängereigene dendritische

Zellen, die in das Transplantat einwandern, dort körperfremde Proteine aufnehmen und prozessieren und anschliessend in den regionalen Lymphknoten Antigene an lymphozytäre Zellen präsentieren [49]. Nachfolgend sind vaskuläre CD4+ T-Zellinfiltrate für die anhaltende lokale Sekretion proinflammatorischer Zytokine und für die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen verantwortlich. Die Alloantigenpräsentation führt darüber hinaus zu einer Produktion allospezifischer Antikörper durch Empfänger B-Zellen und zur Ablagerung von Immunkomplexen vor allem im perivaskulären Bindegewebe des Transplantates [50]. Letztlich wird ein anhaltender Entzündungsprozess initiiert, der zu Umbauvorgängen des vaskulären Bindegewebes und der Proliferation glatter Muskelzellen im Sinne einer arteriosklerotischen Transplantatvaskulopathie zur chronischen Transplantatabstoßung führt.

1.4 Strategien zur Abstoßungsprävention

Die guten Langzeitergebnisse bei Organtransplantationen verdanken wir verschiedenen Immunsuppressiva, die eine Transplantatabstoßung auf ein Minimum reduzieren und bei Nierentransplantationen beispielsweise für Transplantatüberlebenszeiten von 15 Jahren und mehr sorgen.

Cyclosporin A, FK 506 und Rapamycin inhibieren die Aktivierung der T-Lymphozyten durch die Blockade der IL-2 abhängigen Signalkaskade. Antimetabolite wie Azathioprin, Tacrolimus und Mykophenolatmofetil blockieren den *de-novo-pathway* der Purinbasenproduktion in Lymphozyten und damit eine erfolgreiche DNA-Transkription. Glukokortikoide sind ebenfalls in der Lage lymphozytenaktivierende Transkriptionsfaktoren zu inhibieren. Im Falle einer krisenhaften akuten Transplantatabstoßung sind Antikörper gegen den TZR-Komplex wie z.B. OKT3 sehr wirkungsvoll [51].

Die unerwünschten Nebenwirkungen einer dauerhaften medikamentösen Immunsuppression sind eine erhöhte Tumorzinzidenz, dauerhafte Gefährdung durch opportunistische Infektionen und die Reaktivierung latenter viraler Infektionen oder slow-virus-Erkrankungen.

Eine dauerhafte systemische Immunsuppression analog zur Organtransplantation kann keine Therapieoption bei der Transplantation künstlich generierter

Gewebe oder allogener Zellen sein.

Eine weitere Möglichkeit ist die Transplantatakzeptanz durch die Induktion einer Toleranz von Alloantigenen durch den Empfänger.

Die gentherapeutische Veränderung der Immunogenität allogener Spenderzellen und -Gewebe ist der in dieser Arbeit weiter verfolgte Ansatz.

1.4.1 Gentherapeutische Verfahren

Gentherapeutische Verfahren erlauben es, zielgerichtet die Genexpression von Zellen zu modifizieren. Das Einschleusen neuer Gene und deren Expression ermöglicht Eingriffe in den Zellzyklus und –stoffwechsel und in die intra- bzw. interzelluläre Kommunikation.

Fremd-DNA kann durch Transfektion oder virale Transduktion in die Zielzellen eingebracht werden.

Bei der Transfektion werden physikalische (z.B. Elektroporation) oder chemische (z.B. Calcium-Phosphat Präzipitation, Lipofektion) Methoden verwandt, um die Barriere der Zellmembran für Fremd-DNA kurzzeitig passierbar zu machen. Nachteilig wirken sich die geringe Transfereffizienz und erhöhte Toxizität dieser Methoden aus, welche die Transfektion primärer humaner Zellen schwierig gestalten. Allerdings lassen sich durch neue Methoden wie z.B. der Magnetofektion inzwischen auch bei humanen Endothelzellen Transferraten bis zu 39 % erzielen [52].

Für Viren ist das Einbringen ihrer Gene in Wirtszellen elementarer Bestandteil des Replikationszyklus. Die Methoden der viralen Transduktion von Zellen stellen heute die am besten untersuchten und häufigsten verwendeten Methoden des Gentransfers in primäre humane Zellen dar.

Der Gentransfer mit replikationsdefizienten Adenovirus-basierten Vektoren ist ein lange und gut etabliertes Standardverfahren der Gentherapie an humanen primären Zellen und erzielt bei geringer Toxizität hohe Transduktionseffizienzen und eine starke Expression des Transgens. Durch die Verwendung von Polykationen im Transduktionsprozess, konnten die Transduktionseffizienzen im *in-vitro*-Kultursystem so weit gesteigert werden, dass eine Selektion positiv transduzierter Zellen vernachlässigt werden kann.

Nachteilig wirken sich beim adenoviralen Gentransfer die hohe Immunogenität des Vektorsystems und die nur transiente Expression des Transgens aus.

In klinischen Studien löste hohe Frequenz der antiadenovirale Immunität bei den Probanden schwere Überempfindlichkeitsreaktionen mit z.T. letalem Ausgang aus.

Die Deletion adenovirus-assoziiertes Gene reduzierte die Immunogenität der adenoviralen Vektoren neuerer Generation. Die Entwicklung von zellspezifisch wirksamen Adenoviren, die beispielsweise nur Endothelzellen infizieren, soll das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen weiter reduzieren und langfristig den breiten klinischen Einsatz des Vektorsystems ermöglichen.

Neue Möglichkeiten zur viralen Transduktion primärer Zellen wurden durch die Verwendung retroviraler Vektorsysteme eröffnet. Lentivirale Vektoren basieren z.B. auf dem humanen Immunschwäche-Virus (HIV -Typ1 oder -Typ 2). Ähnlich dem adenoviralen Vektorsystem werden in virusproduzierenden Verpackungszelllinien replikationsdefiziente Viruspartikel mit dem Transgen, der reversen Transkriptase und einem für den Zellkontakt elementaren Hüllprotein erzeugt.

Die resultierenden Vektoren ermöglichen eine Integration der Transgen-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in das Genom der Wirtszelle und damit eine stabile Langzeitexpression. Die geringe Immunogenität des retroviralen Vektorsystems reduziert die Wahrscheinlichkeit entzündlicher Reaktionen auf den Gentransfer.

Wichtige Aspekte für den klinischen Einsatz sind die Gewährleistung der Replikationsdefizienz und der Ausschluss eines möglichen onkogenen Potentials der retroviralen Vektoren.

1.4.2 Angriffspunkte einer molekularen Immunmodulation

Die *ex vivo* Generierung künstlichen Gewebeersatzes im Rahmen des „Tissue engineering“ bietet die Möglichkeit, die Eigenschaften verwendeter Zellen während der *in vitro* Kulturphase zu alterieren [53]. Die Verringerung der Immunogenität allogener Zelltransplantate lässt sich durch mehrere Strategien erreichen.

1. : Die Verhinderung einer Sensibilisierung des Immunsystems des Empfängers gegen Transplantatantigene durch die Verhinderung einer Antigenpräsentation
2. : Die Blockade der Effektormechanismen der Immunantwort [54], [55]
3. : Die Protektion allogener Zellen gegen die Effektormechanismen des Immunsystems durch die Überexpression anti-apoptotischer Gene [56]
4. : Die Induktion einer Toleranz oder Anergie des Empfängerimmunsystems gegenüber Spenderantigenen

Unser Ansatz zielt auf die Blockade der CD8-vermittelten Zytotoxizität durch Verminderung der MHC I-Oberflächenexpression allogener Zellen.

1.4.3 Ansätze zur MHC I Reduktion

Eine grundsätzliche Möglichkeit zur Reduktion MHC I Oberflächenexpression wäre der genetische Knock-out von MHC I kodierenden Genen. Hauttransplantate von MHC I-knock-out-Mäusen zeigen keine Abstoßungsreaktionen bei immunkompetenten Empfängertieren [57].

Die MHC I-Translation ist ein komplexer Vorgang mit mehreren beteiligten Komponenten und demzufolge verschiedenen strategischen Angriffspunkten. Allerdings ist diese durch die Polygenie, die kodominante Expression der vielen Allele schwierig zu beeinflussen, ebenso wie eine Blockade der MHC I Expression auf RNA-Ebene.

Deshalb richteten sich die bisherigen Versuche gegen die im ER ablaufenden Prozesse der Proteinbildung und dem Erreichen der korrekten Konformation des Moleküls (Abb. 3).

Die bisherigen Angriffspunkte waren zum einen die Deletion des β 2-Mikroglobulin und die Blockade der Peptidbeladung am TAP-Transporter-System sowie die Inhibition des Proteasomenkomplexes [55], [57] (Abb. 3 A-C).

Außerdem haben zahlreiche Viren molekulare Schutzmechanismen entwickelt, die in den MHC I-Präsentationsweg eingreifen [54] (Abb. 3 D-F).

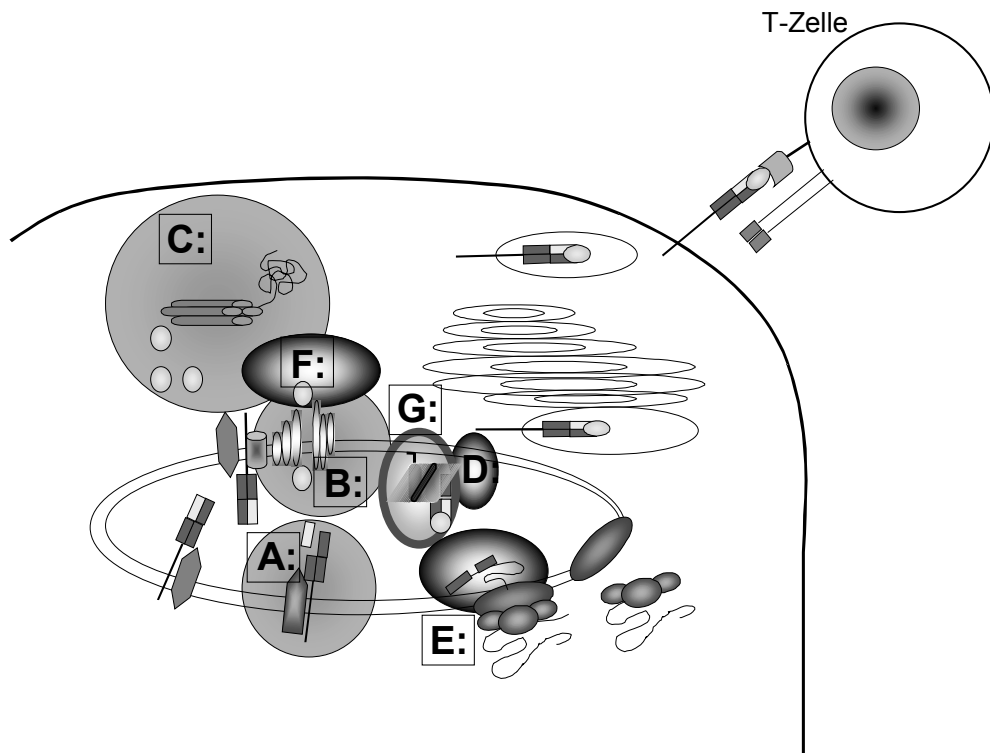


Abb. 3: Angriffspunkte zur Modulation der MHC I Oberflächenexpression

Genetische „Knock-out“-Varianten von **(3 A)**: dem β_2 -Mikroglobulin und dem **(3 B)**: TAP-Transporter führen zu einer verminderten MHC I-Expression.

Die Wirkung von Proteasomeninhibitoren führt zu einer Expression qualitativ veränderter MHC I-Moleküle mit geringerer Immunogenität **(3 C)**.

Virale Mechanismen zur Hemmung der MHC I-abhängigen Antigenpräsentation sind in der Lage den Transport an die Zelloberfläche zu verhindern wie das gp19 **(3 D)**, die MHC I- α -Kette durch das Translokon wieder ins Zytosol zurückzuschleusen wie die CMV-Proteine US 3 und 11 **(3 E)** oder wie das adenovirale ICP 47 den Peptidtransport via TAP-Transporter zu behindern **(3 F)**.

Der „Intrabody“, ein artifizielles, im rER retiniertes und MHC I-spezifisches Antikörperfragment, bindet MHC I im ER und verhindert dessen Oberflächenexpression **(3 G)**.

Die Generierung eines „anti-MHC I-Intrabodys“ - eines künstlich generierten Moleküls, das spezifisch MHC I-Moleküle im ER bindet und deren Transport zur Zelloberfläche verhindert, stellt einen neuartigen Ansatz zur MHC I Oberflächenreduktion dar (Abb. 3 G).

1.4.3.1 Ansätze am β_2 Mikroglobulinsystem und dem TAP Transporter

Die fehlende Assoziation der MHC I- α -Kette mit dem β_2 -Mikroglobulin führt zu einer Instabilität des Moleküls. In einem murinen β_2 $^{-/-}$ -m – Knock-out Modell konnte eine MHC I-Oberflächenreduktion auf 10 % der konstitutiven Expressionsdichte erreicht werden (Abb. 3 A).

Die verbliebene MHC I-Expression lässt darauf schließen, dass auch die α -Kette alleine oder mit anderen Molekülen assoziiert an die Zelloberfläche transportiert wird.

Die Beladung mit Peptiden am TAP-Transporter ist ein weiterer Schritt zur endgültigen stabilen Konformation des MHC I Moleküls. Der „Knock-out“ von TAP-Transportergenen im Mausmodell erbrachte eine ähnliche MHC I-Reduktion wie die o.g. Versuche (Abb. 3 B).

Es musste also noch andere Wege der Peptidbeladung von MHC I-Molekülen im ER geben [58].

Transplantationsmodelle mit β_2 -Mikroglobulin- oder TAP-defizienten Mäusen zeigten eine unterschiedlich starke Verbesserung der Akzeptanz allogener Transplantate [59]. Die Ergebnisse sind insofern ermutigend, als dass ein kompletter MHC I-Knock-out auch ein Unterbleiben der alloreaktiven Zytotoxizität bedeuten könnte.

1.4.3.2 Virale Mechanismen zur Inhibition der MHC I Oberflächenexpression

Viele Viren haben im Laufe der Evolution parallel zur Entwicklung des spezifischen Immunsystems eukarioter Wirtsorganismen Strategien zur Verhinderung der MHC I abhängigen Antigenpräsentation viraler Peptide entwickelt [60] [61].

Einige virale Strategien zur Verhinderung der Präsentation viraler Antigene sollen im Folgenden beschrieben werden.

Adenovirales p19-Glykoprotein bindet im ER an das MHC I-Molekül und verhindert dessen Transports an die Zelloberfläche[62],[63]. Ein weiterer Mechanismus scheint die Assoziation von p19 an den TAP Transporter und die Einschränkung dessen Funktion zu sein (Abb. 3 D).

Die Proteine US3 und US11 des humanen Zytomegalievirus (CMV) sind in der

Lage, die in das ER hineinsynthetisierte α -Kette des MHC I Moleküls durch das Translokon wieder in das Zytosol hinauszuschleusen, wo es der Spaltung durch Proteasen unterliegt (Abb. 3 E) [60], [64]. Eine direkte Regulation der Proteasomenaktivität mit gesteigerter Degradation von MHC I und-II-Molekülen wurde für das US2- und US3-Protein nachgewiesen [65].

Das ICP-47 Protein des Humanen Herpes Simplex Virus (HSV) bindet sich an die extrazelluläre Domäne des TAP-Transporters und verhindert so den Peptidtransport in das ER. Die Bindung erfolgt mit hoher Affinität an der zytosolischen Peptidbindungsstelle (Abb. 3 F) [66]. Analog dazu blockiert das US6 Molekül des humanen Zytomegalievirus den Peptidtransport durch den TAP Kanal auf der ER-Seite (o. Abb.) [67] [68] [69] [70]. Eine direkte Degradation des TAP-Moleküls wurde durch das murine Herpes-Virus-Protein MK3 beschrieben [71] [72].

1.4.3.3 Intrabodies

Die Expression von Antikörperfragmenten mit einer terminalen KDEL-Sequenz erzeugt Moleküle, die im ER der Zelle festgehalten werden und dort je nach Antikörperspezifität Bindungen mit einem spezifischen Antigen eingehen können. So gebundene Moleküle verbleiben ebenfalls im ER und können nicht an die Zelloberfläche transportiert werden [73].

Beschrieben wurden intrazelluläre Antikörper in eukaryoten Zellen erstmals 1990 durch die Gruppe Cattaneo et al. [74]. Der Begriff "Intrabody" wurde 1994 von der Gruppe Marrasco et al. geprägt [75]. Intrabodies werden meist als Fab-Einkettenfragmente oder „single chain variable fragments“ (sFv) eingesetzt, je nachdem welche Konformation die stabilere ist. Das kleinere sFv-Molekül ist aus den über einen Peptidlinker verbundenen variablen (v_L und v_H) Regionen des zugrundeliegenden Antikörpers zusammengesetzt. Der Peptidlinker besteht aus einem Peptid der Sequenz $(Gly_4Ser)_3$ [76](Abb. 4). Die Kopplung mit der KDEL-Sequenz am Ende des Proteins sorgt für eine Insertion des Intrabody in die Membran des ER [75] [77] (Abb. 4).

Die Möglichkeit, auf spezifische Art und Weise intrazelluläre Proteine mit Intrabodies zu binden und deren Funktion zu beeinflussen, führt mit Hilfe von

genetischen Screeningmethoden im Rahmen der funktionellen Genomik zur Erstellung großer Intrabody-Bibliotheken mit einer Vielzahl von potentiellen Zielmolekülen [78, 79].

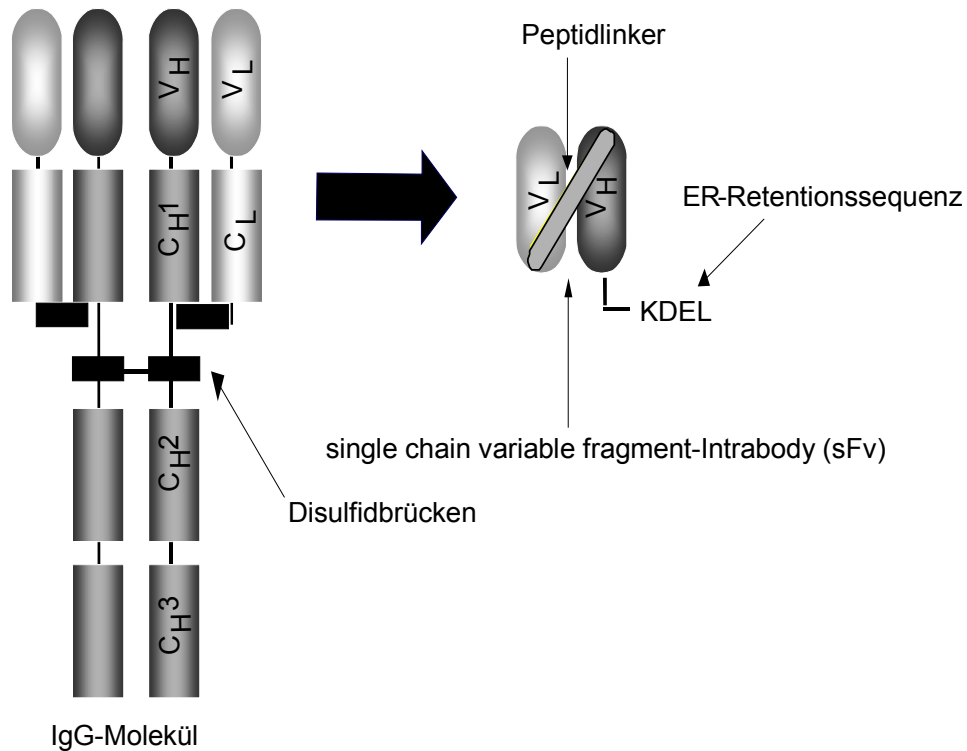


Abb. 4: Aufbau des Intrabody-Moleküls

Schematische Darstellung eines vollständigen Antikörperheterotetramers mit zwei schweren (C_{H1-3}, V_H) und leichten Ketten (C_L, V_L) Ketten und den verbindenden Disulfidbrücken. Die konstanten (C) Regionen sind für die Grundkonformation des Moleküls verantwortlich, die variablen (V) Regionen für die Antispezifität.

Der „Intrabody“ besteht aus den „ V_H “ und „ V_L “ Regionen eines Antikörpermoleküls die über einen künstlichen Peptidlinker miteinander verbunden sind (single chain variable Fragment – sFv) und an ein konserviertes Epitop des MHC I-Moleküls binden.

Für die Retention des „Intrabody“ im ER ist eine angehängte KDEL-Retentionssequenz verantwortlich.

An praktischen Anwendungen der Intrabody-Technologie sind beispielsweise die Oberflächenreduktion von CD 2 auf T-Zellen, der α -Kette des IL-2 Rezeptors auf T-Zelllinien, des EGF-Rezeptors und des VLA-4-Antigens [80] [81] [82].

Der Einsatz von Intrabodies gegen Onkogenprodukte und zur Inhibition der HIV-Replikation sind weitere aktuelle Anwendungen dieses Prinzips [83] [84] [85, 86] [87] [88] [89].

Die Entwicklung von mehrvalenten Intrabodies mit der Eigenschaft verschiedene intrazelluläre Antigene zu binden eröffnet weitere Möglichkeiten [90]. Weitere neue Ansätze in der Intrabody-Technologie sind die Entwicklung von Intrabody Fragmenten mit lediglich der V_H-Domäne des ursprünglichen Antikörper-Moleküls [91].

Bisher noch unzureichend geklärt sind die Faktoren, die die Löslichkeit und Stabilität von Intrabodies und Intrabody-Peptid-Komplexen in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten beeinflussen [92] [93].

1.4.3.4 Anti-MHC I-Intrabodies

Der gegen ein nicht-polymorphes MHC I-Epitop gerichtete Intrabody wurde in der Gruppe von W. A. Marasco entwickelt [94]. Er bindet das MHC I-Molekül im Lumen des ER und verhindert durch die KDEL-Retentionssequenz den Transport des Proteinkomplexes an die Zelloberfläche (Abb. 3 G). Eine Reduktion der MHC I-Oberflächenexpression, die einem phänotypischen „Knock-out“ nahekam konnte in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Immunologie der Charité auf humanen Zelllinien und an primären humanen Keratinozyten gezeigt werden [95].

Parallel dazu wurde im Rattensystem ein analoger anti MHC I-Intrabody (anti R1.A-Intrabody) entwickelt. Neben einer drastischen Reduktion der RT1.A Oberflächenexpression auf Rattenkeratinozyten waren erfolgreich anti-RT1.A-Intrabody transfizierte Zellen vor der Lyse durch alloreaktive Lymphozyten geschützt [94].

1.5 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, ob der adenovirale Gentransfer des anti MHC I Intrabody in primäre humane Endothelzellen deren Immunogenität verringern kann.

Dazu wurden folgende Teilaspekte untersucht:

- Isolation und Charakterisierung von primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC).
- Etablierung des adenoviralen Gentransfer des anti MHC I – Intrabody und entsprechenden Kontrollvektoren, Ermittlung der Transduktionseffizienz und die durchflusszytometrische Quantifizierung der MHC I Oberflächenexpression Intrabody transduzierter und Kontrollvektor transduzierter bzw. untransduzierter HUVEC
- Untersuchung möglicher Effekte der Intrabody Transduktion auf die Oberflächenexpression anderer charakteristischer Oberflächenmarker auf HUVEC
- funktionelle Untersuchung der transduzierten HUVEC hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber allospezifischen Abstoßungsprozessen in einem Zytotoxizitätstest

Die erfolgreiche Bearbeitung dieser Aufgaben stellt die Voraussetzung für die Untersuchung derartig modifizierter Zellen in einem geeigneten *in vivo* Modell (SCID-Maus) dar.

Durch die vorliegende Arbeit können wichtige Voraussetzungen für die Anwendung allogener Endothelzellen zur Besiedlung von künstlichen Gefäßprothesen geschaffen werden.