

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische und zellbiologische Eigenschaften der HUVEC

Sowohl die vorhandenen gepoolten HUVEC mehrerer Spender als auch die selbst gewonnenen Einzelspender-Isolate zeigten morphologisch als auch immunologisch identische Endothelzeleigenschaften.

Endothelzellen zeigen ein typisches, in der Literatur beschriebenes Zellwachstum *in vitro* als Monolayer mit polygonalen Zellen, die bei zunehmender Konfluenz im Auflichtmikroskop ein „Pflastersteinrelief“ auf dem Boden des Kulturgefäßes ausbilden [28]. Die Kontaktinhibition der benachbarten Zellen verhindert ein weiteres Wachstum nach Erreichen der Konfluenz und sichert eine einschichtige Histoarchitektur.

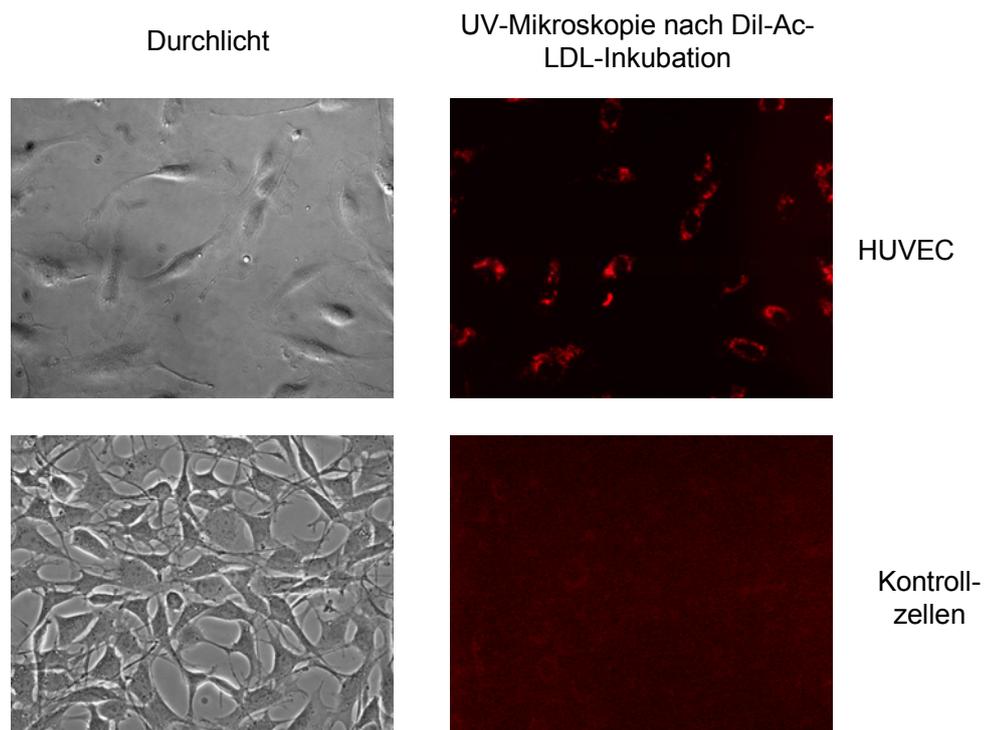


Abb. 5: Selektive Aufnahme von acetylierten Dil-LDL durch HVEC

Im Vergleich zu Fibroblasten-Kontrollzellen zeigen HUVEC nach Inkubation mit Dil-Ac-LDL eine zytoplasmatische Rotfluoreszenz in der UV-Mikroskopie.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Endothelzellen ist die selektive

zytoplasmatische Aufnahme von farbstoffmarkierten acetylierten LDL-Molekülen. Diese Eigenschaft wird sonst nur noch bei monozytären Zellen beobachtet, die jedoch nach längerer Kultur nicht mehr als Kontamination in Betracht kommen. Bei allen Isolaten aus Nabelschnurvenen zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine starke intrazelluläre Anreicherung des Farbstoffes in Form punktförmiger Aggregate (Abb. 5). Die durchflusszytometrische Analyse von suspendierten HUVEC im FACS zeigt eine einheitliche vitale Zellpopulation im Streulichtbild an (Abb. 6).

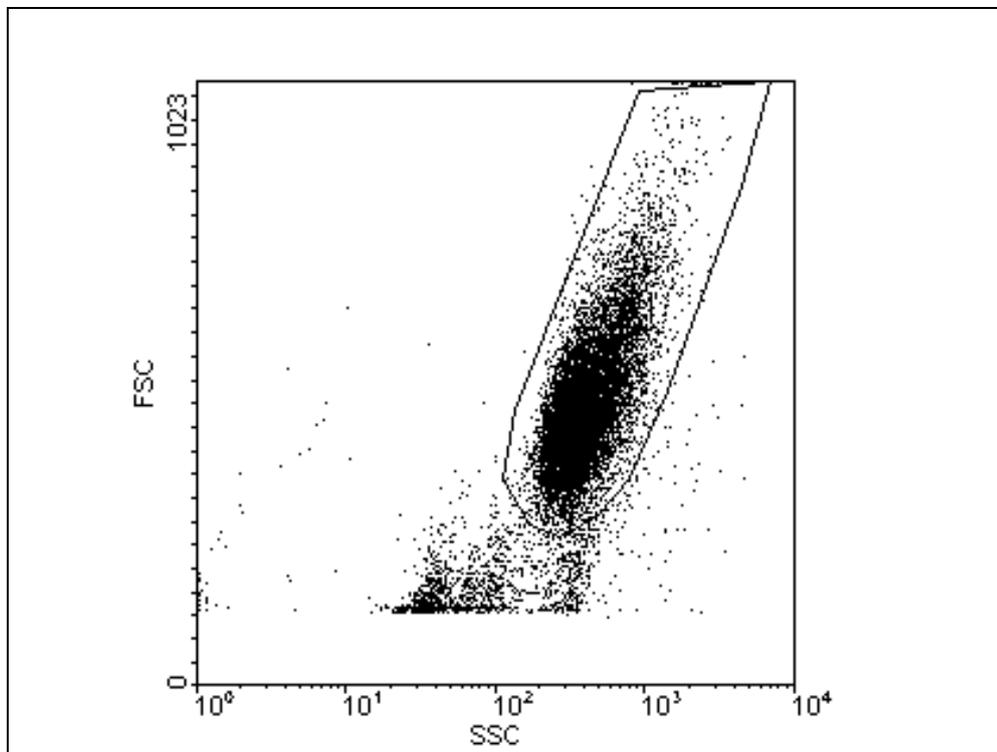


Abb. 6: Durchflusszytometrische Darstellung von HUVEC im Streulichtbild (Scatter).

Der auf der Abszisse dargestellte „Forward Scatter“ (FSC) entspricht der Zellgröße, der auf der Ordinate dargestellte „Sideward Scatter“ (SSC) der Granularität der Zellen. Die Population der vitalen Zellen ist durch ein Polygon eingeraht und wird den nachfolgenden Fluoreszenzdarstellungen zugrundegelegt.

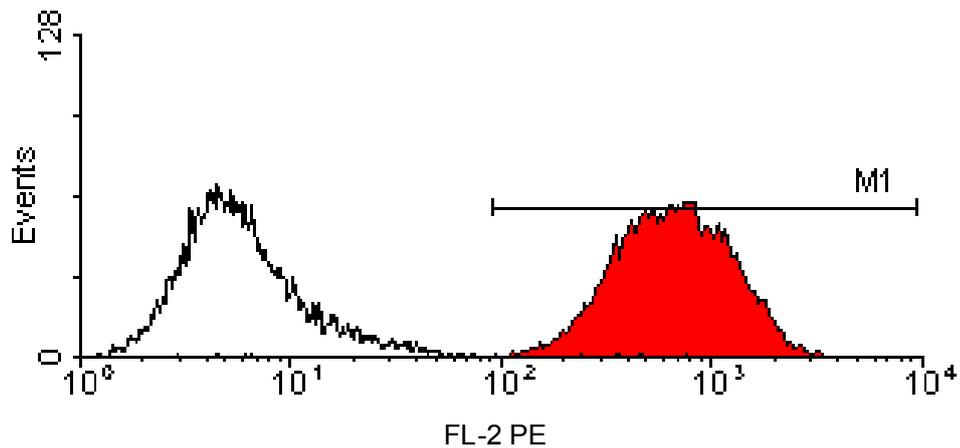
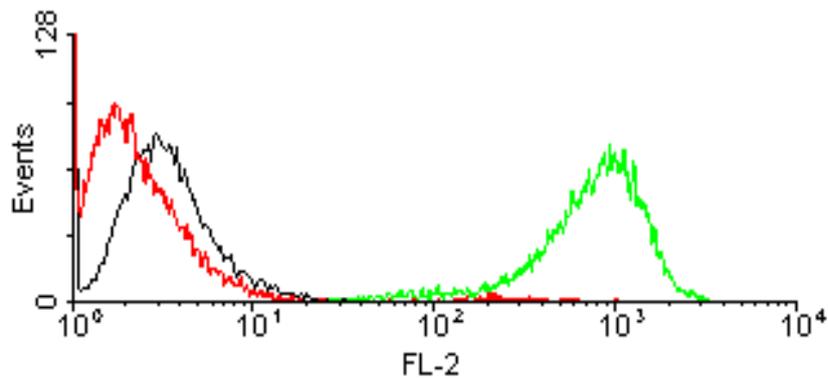


Abb. 7: Nachweis der CD 31-Expression auf HUVEC.

FACS-Histogramm der Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC mit anti-CD 31-PE Antikörpern (rote Fläche) und Isotyp-Kontroll-Antikörpern (schwarze Linie). Der Marker M1 beschreibt die Grenzen positiv zu wertender Fluoreszenz. Alle HUVEC zeigen eine positives Signal nach CD 31 PE Färbung.

Fluoreszenzmarkierungen mit dem endothelspezifischen Antikörper anti-CD 31 (platelet endothelial adhesion molecule - PECAM) erbrachten bei allen vitalen HUVEC ein positives Signal mit jeweils geringen Streubreiten der Intensität (Abb. 7).

Die Inkorporation des Dil-LDL-Farbstoffes in HUVEC liess sich durch die Rotfluoreszenz der aufgenommenen Moleküle auch durchflusszytometrisch im Kanal 2 darstellen (Abb. 8).



A

bb. 8: Nachweis der Inkorporation von Dil-Ac-LDL in HUVEC

FACS-Histogramm der Fluoreszenzintensität im Kanal 2 (FL-2 /rot) ungefärbter HUVEC (rote Kurve), Isotyp-PE-markierter HUVEC (schwarze Linie) und Dil-Ac-LDL-markierter HUVEC (grüne Kurve). Die Verteilungskurven sind vollständig getrennt. Alle HUVEC haben Dil-AC-LDL aufgenommen und zeigen damit eine charakteristische Eigenschaft von Endothelzellen.

Eine indirekte intrazelluläre Färbung mit einem anti-vWF-Primärantikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ergab durchflusszytometrisch nur ein schwaches Signal, das von der entsprechenden Isotypkontrolle nur schwer abzugrenzen war (Abb. 9).

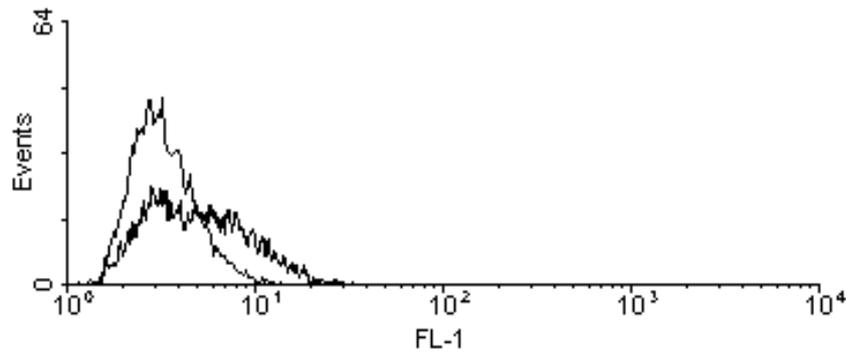


Abb. 9: Nachweis einer sehr geringen intrazellulären vWF-Expression in HUVEC mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung.

Darstellung des FACS-Histogramms der Fluoreszenzintensität im Kanal 1 (FL-1/grün).

Dargestellt sind HUVEC, die mit einem Kaninchen-anti vWF-AK (dicke Linie) oder einem Kaninchen-Kontroll-AK (dünne Linie) behandelt und anschließend mit einem FITC-markierten Schaf-anti Kaninchen AK inkubiert wurden.

Eine ausreichende Trennung der Populationen konnte nicht erreicht werden.

4.2 Konstitutive Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf HUVEC

Die Oberflächenexpression des MHC I-Moleküls auf HUVEC war der wesentliche durchflusszytometrisch am FACS zu bestimmende Parameter für unsere Untersuchungen. Die Expression ließ sich unter normalen Kulturbedingungen mit einem ca. 10fach stärkeren Signal deutlich von den Isotypkontrollen abgrenzen und reagierte auf die Stimulation mit Zytokinen sehr empfindlich (Abb. 10).

Insgesamt war die Schwankungsbreite der konstitutiven MHC I-Expression zwischen unterschiedlichen HUVEC-Allotypen gering und durch die Zahl der

Passagen der Zellkultur wenig beeinflusst.

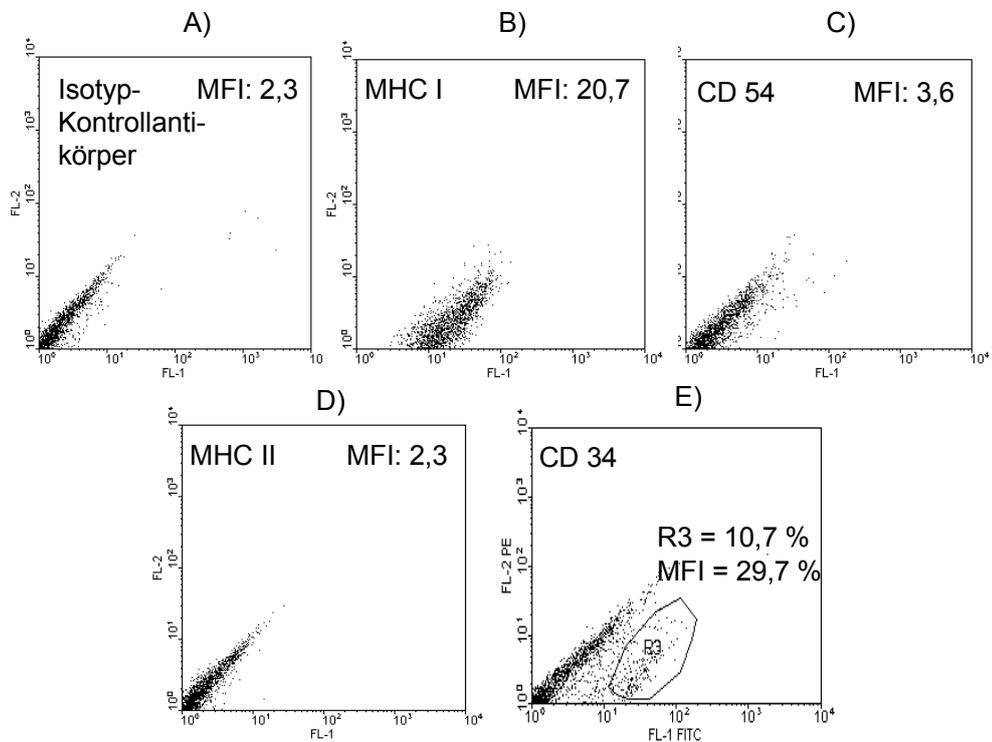


Abb. 10: Überblick über konstitutiv exprimierte Oberflächenmarker auf HUVEC, die durchflusszytometrisch mit FITC-markierten Antikörpern ermittelt wurden.

Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme von:

A): Isotyp AK gefärbter Kontrolle. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 2,3 im Kanal 1 (FL-1) gibt einen Vergleichswert an, ab dem ein positives Fluoreszenzsignal im Sinne einer konstitutiven Oberflächenexpression gegeben ist.

B): Deutliche konstitutive **MHC I**-Oberflächenexpression der HUVEC mit einer MFI von 20,7 und etwa 10-facher Intensität gegenüber der Isotyp-Kontrolle

C): Die basale Expression des Aktivierungsmarkers **CD 54** (ICAM1) ist mit einer MFI von 3,6 sehr schwach.

D): MHC II wird nicht konstitutiv auf HUVEC exprimiert

E): eine konstitutive **CD 34**-Expression konnte nur bei einer Subpopulation von etwa 11 % (R3) der HUVEC nachgewiesen werden (dabei eine MFI von 29,7)

Ein weiterer, durchflusszytometrisch bestimmter Oberflächenmarker auf HUVEC war CD 54 (ICAM1) aus der Gruppe der Integrine. Dieser ist ein Indikator der Zellaktivierung im Rahmen entzündlicher Reaktionen. Das Adhäsionsmolekül wird unter normalen Kulturbedingungen nur sehr gering expri-

miert. Die Antikörperfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD 54-Antikörper führt nur zu einem etwa 1,6fach stärkeren Signal als die Färbung mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper.

Als typischer Marker für antigenpräsentierende Zellen wurde die MHC II-Expression analysiert. Unter Kulturbedingungen ohne proinflammatorische Stimuli, wurde dieser Marker nicht konstitutiv auf HUVEC exprimiert. Die in der Literatur beschriebene CD 34-Expression konnte nur auf einer kleinen Subpopulation (~11 %) nachgewiesen werden (Abb. 10).

4.3 Expression von Oberflächenmolekülen auf HUVEC unter proinflammatorischen Kulturbedingungen

Um eine Antwort der Endothelzellen auf proinflammatorische Stimuli zu untersuchen wurden HUVEC über 48 Stunden mit steigenden Konzentrationen an Interferon- γ bzw. TNF- α im Kulturzellmedium inkubiert. Zytologisch ergab sich für IFN- γ -stimulierte Kulturen eine dosisabhängige Hemmung im Zellwachstum. Die Stimulation mit TNF- α führte mit zunehmender Dosis zu einer Zunahme der Granularität und zum Absterben von Zellen bei hohen TNF-Konzentrationen. Nach der Stimulation wurden die HUVEC durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht. Um für spätere Experimente geeignete Konzentration von IFN- γ bzw. TNF- α zu ermitteln, wurden unterschiedliche Konzentrationen der beiden Zytokine dem Kulturmedium der HUVEC zugesetzt. Es wurde diejenige Konzentration ermittelt, die schon zu einem deutlichen Anstieg der Aktivierungsmarker führte, jedoch noch nicht deren maximale Expressionsstärke (Plateauwert) erreichte. Bei Interferon- γ entsprach dies einer Konzentration von 500 pg/ml im Kulturmedium. Bei der Stimulation mit TNF- α erwies sich eine Konzentration von 5 ng/ml im Kulturmedium als ausreichend.

Die Veränderungen der Expression der Oberflächenmoleküle in Abhängigkeit von der Dosis der jeweiligen Zytokine IFN- γ und TNF- α sind aus den Abbildungen ersichtlich. Eine für die Aktivierungsmarker typische Steigerung der Moleküldichte zeigte sich neben dem MHC I-Molekül auch bei CD 54.

Die MHC-II Expression veränderte sich abhängig vom verwendeten Zytokin in unterschiedlicher Weise. Bei der Stimulation mit IFN- γ wurde eine MHC II Expression induziert und ließ sich mit wachsender Konzentration steigern. Bei der Stimulation mit TNF- α dagegen ließ sich auch bei steigender TNF- α -Konzentration keine messbare MHC II-Expression induzieren (Abb. 11).

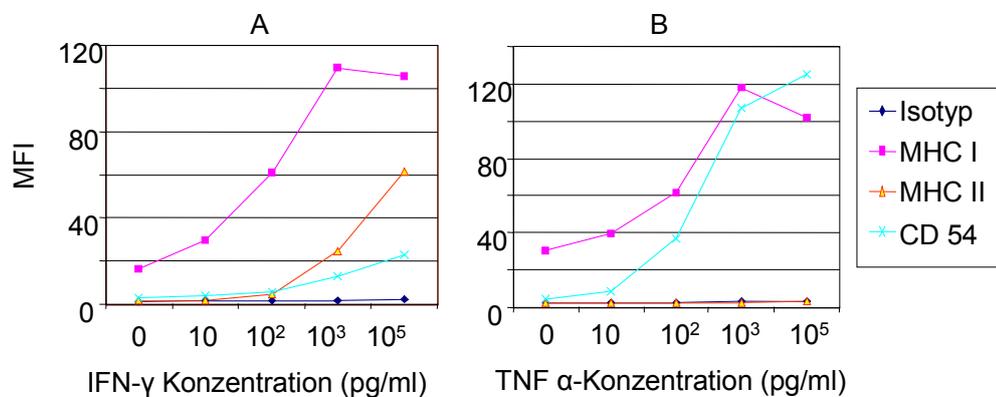


Abb 11: Einfluß einer 48 h Stimulation mit IFN- γ bzw. TNF- α auf die Expression von MHC I, MHC II und CD 54 auf HUVEC.

Dargestellt sind die MFI-Werte in Abhängigkeit von der verwendeten Zytokin-konzentration nach 48 h Stimulation. Als Kontrolle diente ein Isotyp identischer fluoreszenzmarkierter Antikörper (n=1 Experiment).

Die stark induzierbare Expression von MHC I erreicht ein Maximum bei einer Dosis von etwa 1ng/ml IFN- γ und TNF- α . TNF- α (B) induziert CD 54 sehr stark, nicht jedoch die Expression von MHC II. IFN- γ (A) induziert die Expression von MHC II stärker als die Expression von CD 54.

Die Expression des CD 31 Oberflächenmoleküls ließ sich durch eine Stimula-tion mit inflammatorischen Zytokinen nicht beeinflussen (Abb. 12).

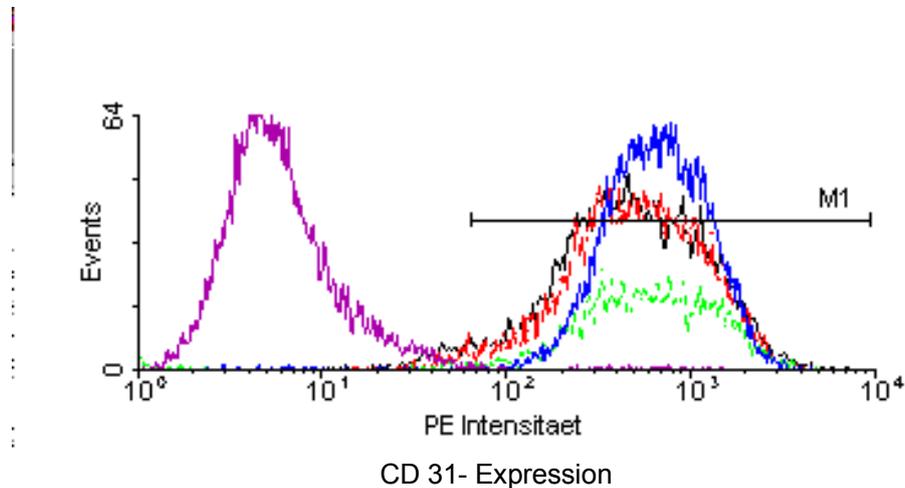


Abb. 12: stabile CD 31-Expression auf HUVEC unter IFN- γ Stimulation

FACS-Histogramm des durchflusszytometrischen Nachweises von CD 31 auf HUVEC nach 48 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- γ im Kulturmedium (n=1 Experiment).

Dargestellt ist die konstitutive CD 31 Expression ohne IFN- γ Stimulation (schwarze Kurve), sowie die CD 31 Expression nach Stimulation mit 100 pg/ml IFN- γ (rote Kurve), 500 pg/ml IFN- γ (blaue Kurve) und 1 ng/ml IFN- γ (grüne Kurve).

Als Negativ-Kontrolle diente ein ein PE markierter Isotyp identischer Kontroll-AK (lila Kurve). Der Marker M1 grenzt die als CD 31 positiv zu wertenden Zellpopulationen ab.

Die Histogrammkurven der mit anti-CD 31-PE-Antikörpern markierten HUVEC liegen übereinander. Die CD 31-Expression auf HUVEC lässt sich durch Stimulation mit IFN- γ nicht induzieren.

4.4 Effizienz der adenoviralen Transduktion von HUVEC

Die Effizienz adenoviraler Transduktionen wurde mit Hilfe des adenoviralen EGFP Vektors (AdEGFP) überprüft. Parallel zu den adenoviralen Transduktionen mit dem β -Gal-Kontrollvektor (Ad β Gal) und dem Intrabody (AdsFv) wurden die HUVEC mit dem EGFP-Reportergen transduziert. Eine starke Fluoreszenz nahezu aller Zellen zeigte sich bereits bei optischer Kontrolle unter

dem Fluoreszenzmikroskop. Durchflusszytometrisch lag der Anteil grün fluoreszierender Zellen in 5 unterschiedlichen Transduktionsansätzen bei einem Median von 92,05 % (Abb. 13).

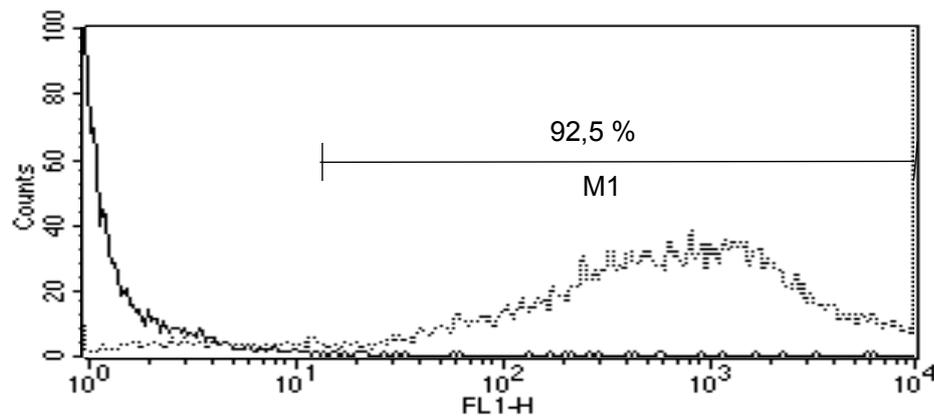


Abb. 13: Durchflusszytometrische Ermittlung der Transduktionseffizienz des adenoviralen Gentransfers

Dargestellt ist 1 von n=5 Experimenten.

FACS-Histogramm der EGFP-Fluoreszenz (FL-1) von HUVEC 48 h nach Transduktion mit Ad-EGFP (gestrichelte Linie) bzw. mit dem adenoviralen Kontrollvektor Ad-β-Gal (durchgezogene Linie).

Der Anteil der EGFP positiven und damit erfolgreich transduzierten Zellen beträgt 92,5 %.

Einen weiteren indirekten Hinweis auf die Transduktionseffizienz ergab die Auswertung der MHC I-Expression AdsFv transduzierter Zellen. Die Population Endothelzellen, die offensichtlich nicht erfolgreich transduziert wurde, zeigte sowohl unter normalen Bedingungen, als auch nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen eine den adenoviralen Kontrollen vergleichbare MHC I-Oberflächenexpression. Der Anteil dieser Population an der unstimulierten vitalen Gesamtpopulation betrug ca. 8 % (Abb. 14).

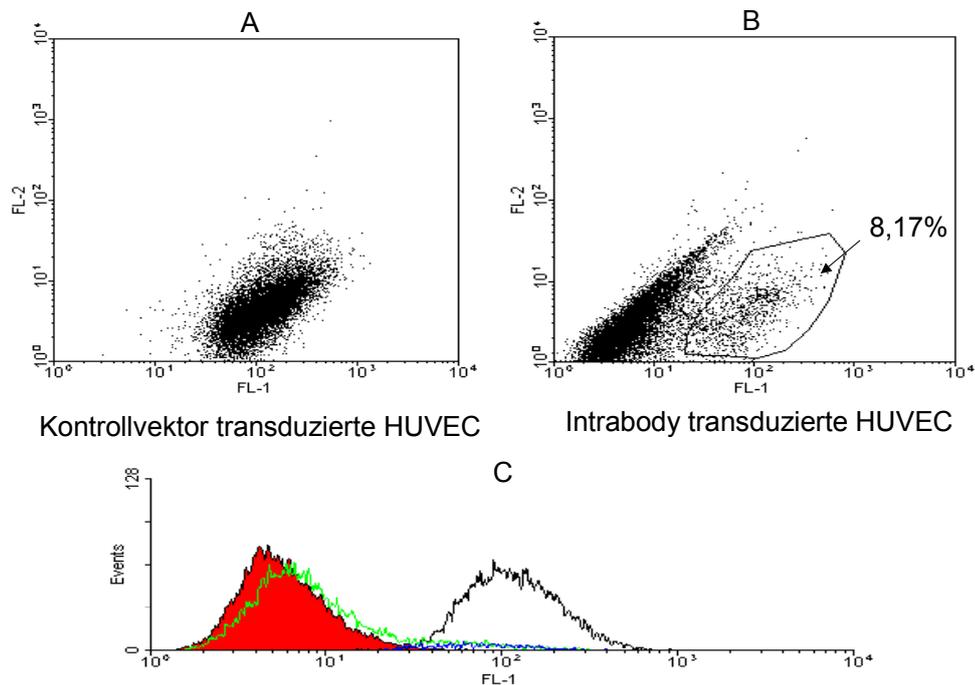


Abb 14: Vergleich der MHC I Expression von Kontrollvektor (A)- und Intrabody transduzierten HUVEC (B).

Die Analyse erfolgte 48 h nach der Transduktion im FACS. Im Dot Plot B erkennt man neben der MHC I reduzierten Zellpopulation Intrabody transduzierter Zellen eine Gruppe von 8,17%, die eine mit der Kontrolle vergleichbare MHC I-Dichte aufweist. Im dazugehörigen Histogramm (C) ist diese Population blau dargestellt. Überlagert sind in Abbildung C die Histogramme für die Isotyp Kontrolle (rot unterlegt), die Intrabody transduzierten HUVEC (grün) und die Kontrollvektor transduzierten Zellen (schwarz) dargestellt. Die blau dargestellte Subpopulation der HUVEC, die trotz Intrabody Transduktion eine normale MHC I-Expression aufweist, wurde nicht erfolgreich transduziert.

Noch deutlicher wurde die Unterscheidung effizient transduzierter und nicht transduzierter Zellen nach IFN γ -Stimulation. Der Anteil der MHC I-exprimierenden Zellen betrug dann etwa 14 % (Abb. 15).

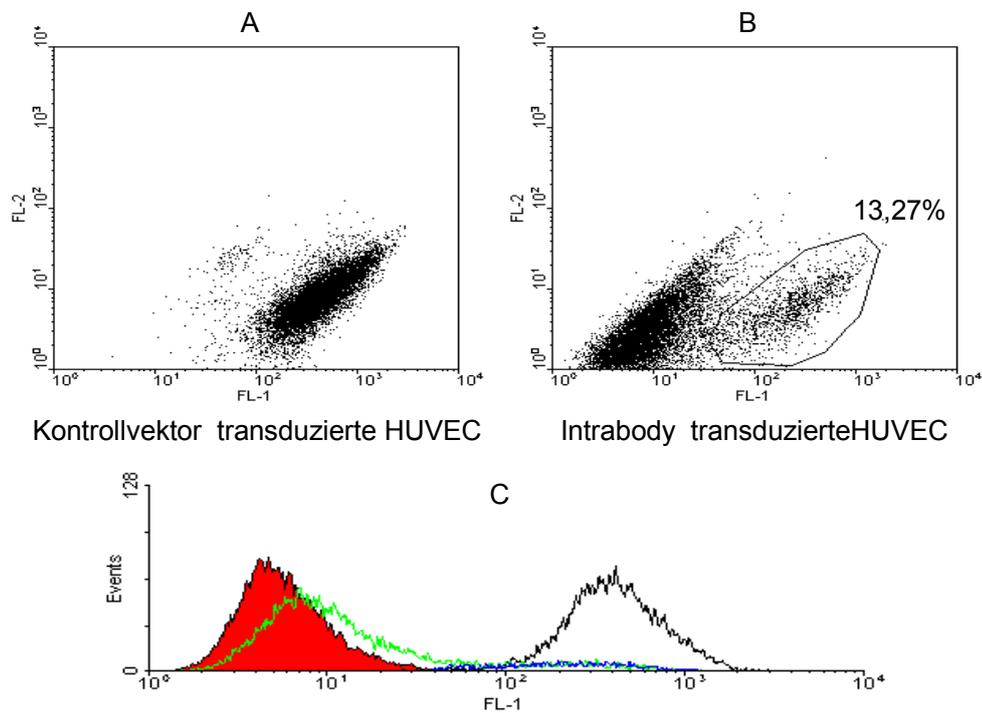


Abb. 15: Vergleich der MHC I Expression von Kontrollvektor (A)- und Intrabody transduzierter HUVEC (B) nach Stimulation mit IFN- γ .

Die Analyse der MHC I Expression erfolgte nach der Transduktion und anschließender Stimulation mit 1 ng / ml IFN- γ über 48 h.

Durch die vergleichbare Induktion von MHC I sowohl in der markierten untransduzierten Subpopulation der Intrabody transduzierten HUVEC (jetzt 13,27 % der Gesamtpopulation) als auch der Kontrollvektor transduzierten HUVEC wird die Abgrenzung zu den erfolgreich mit Intrabody transduzierten Zellen deutlicher (Kurvenbezeichnungen im Histogramm (C) analog zur Abb. 14).

4.5 MHC I Oberflächenexpression untransduzierter und adenoviral transduzierter HUVEC

Die MHC I-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe fluoreszenzmarkierter anti-MHC I-Antikörper bestimmt und als Differenz von ermittelten MFI-Werten der anti-MHC I-Färbung und mit der entsprechenden Isotypkontrolle dargestellt. Insgesamt wurden n=5 Versuche mit jeweils drei Ansätzen durchgeführt. Verglichen wurde die MHC I-Expression von unbehandelten, mit Kontrollvektor transduzierten (AdaAT) und Intrabody (AdsFv) transduzierten HUVEC.

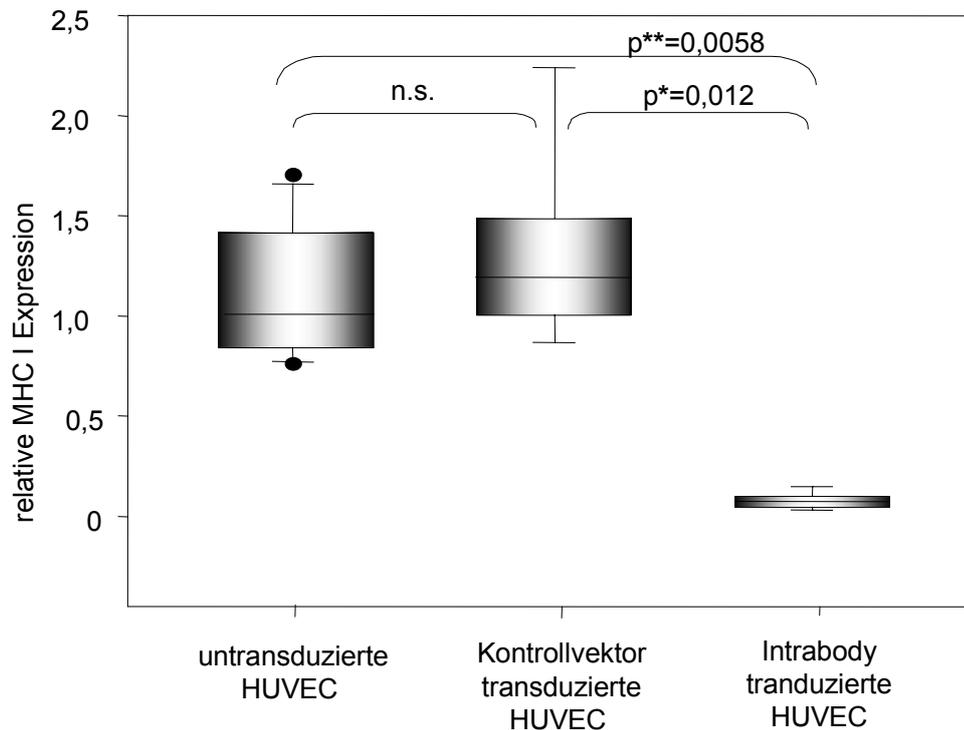


Abb 16: Reduktion der MHC I-Oberflächenexpression durch Transduktion der HUVEC mit dem Intrabody.

Insgesamt wurden $n=5$ Experimente mit jeweils Dreifach-Ansätzen gewertet. Der Box Plot stellt jeweils den Median der MHC I-Expression als Linie in den Boxen dar. Für die untransduzierten HUVEC wurde der Wert auf 1 gesetzt.

Die Boxen stellen den Wertebereich zwischen 25% und 75 % dar, die Säulen jenseits der Boxen den Wertebereich zwischen 5% und 95% aller Werte. Punkte jenseits der Säulen markieren Ausreißer-Werte.

Der Median der relativen MHC I Oberflächenexpression betrug für Kontrollvektor transduzierte HUVEC 1,19 und für Intrabody transduzierte HUVEC 0,08.

Die Differenz der MHC I Expression Intrabody transduzierter Zellen und Kontrollvektor transduzierter Zellen war mit $p^*=0,012$ signifikant. Die Differenz zwischen Intrabody transduzierten und untransduzierten Zellen war mit $p^{**}=0,0058$ hoch signifikant. Die Differenz der MHC I Expression untransduzierter und Kontrollvektor transduzierter HUVEC war nicht signifikant ($p=0,745$).

Die 3 Werte jeweils eines Experiments wurden gemittelt und flossen dann in die statistische Auswertung ein. Zuerst wurde eine Varianzanalyse in Form einer one-way Anova durchgeführt, die für alle drei unterschiedlich behandelten Zellpopulationen eine Signifikanz ergab. Anschließend wurden die jeweils 5 Ergebnisse der drei unterschiedlich behandelten HUVEC-Zellpopulationen jeweils paarweise mit Hilfe eines Wilcoxon-ranked-Tests verglichen, um

Differenzen in der MHC I-Expression unterschiedlich behandelter HUVEC und deren Signifikanz zu erkennen. Zur grafischen Darstellung wurden Box Plots erstellt, die sowohl den Medianwert zeigen, als auch Aussagen über die Verteilungen in verschiedenen Wertebereichen erlauben.

Der konstitutive Wert der MHC I-Expression auf untransduzierten HUVEC wurde durchflusszytometrisch ermittelt und dem Median der erhaltenen Werte der relative Wert 1 zugeordnet.

Der Median der MHC I-Expression Kontrollvektor (AdAAT) transduzierter HUVEC entsprach dem Wert 1,19. Die Differenz zu untransduzierten HUVEC war im Wilcoxon ranked test mit $p = 0,745$ jedoch nicht signifikant. Intrabody (AdsFv) transduzierte HUVEC zeigten eine deutlich reduzierte MHC I-Oberflächenexpression, deren Median dem relativen Wert 0,08 entspricht. Dieser Unterschied war sowohl gegenüber untransduzierten ($p^{**} = 0,0058$) hoch signifikant. Die Differenz der MHC I Expression Intrabody und Kontrollvektor (AdAAT) transduzierter HUVEC war mit $p^* = 0,012$ signifikant. Die Reduktion der Oberflächenexpression auf Intrabody transduzierten HUVEC kommt einem phänotypischen Knock-out nahe (Abb. 16).

4.6 Vergleich der MHC I-Oberflächenexpression Zytokin stimulierter untransduzierter und adenoviral transduzierter HUVEC

Durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ließ sich die MHC I-Oberflächenexpression auf HUVEC um ein Vielfaches des konstitutiven Wertes erhöhen. Der Effekt des Intrabody zur Hemmung der MHC I-Oberflächenreduktion sollte nun auch unter inflammatorischen Bedingungen überprüft werden.

Untransduzierte, Kontrollvektor (AdAAT) transduzierte und Intrabody (AdsFv) transduzierte HUVEC wurden nach dem Gentransfer für 48 Stunden in einer Stimulationslösung mit 500 pg/ml IFN- γ bzw. 5 ng/ml TNF- α inkubiert. Auch hier wurde das Experiment mit 3-fachen Ansätzen je 5-mal wiederholt. In der IFN- γ -behandelten Gruppe zeigten die untransduzierten bzw. Kontrollvektor transduzierten HUVEC eine Zunahme der relativen MHC I-Expression auf das 7,04fache bzw. 7,22fache des konstitutiven Vergleichswertes. Die MHC I-Expression der mit dem Intrabody behandelten HUVEC stieg auf das 0,45fache

des konstitutiven Vergleichswertes.

Bei der mit IFN- γ behandelten Gruppe waren die Differenzen zwischen Intrabody transduzierten HUVEC einerseits und Kontrollvektor transduzierten HUVEC ($p=0,012$) bzw. unbehandelten HUVEC ($p=0,012$) andererseits signifikant. Zwischen nativen und Kontrollvektor transduzierten HUVEC bestanden zum Teil erhebliche Unterschiede in der MHC I-Expression nach Zytokinstimulation, die mit $p = 0,24$ jedoch keine Signifikanz erreichten (Abb. 17).

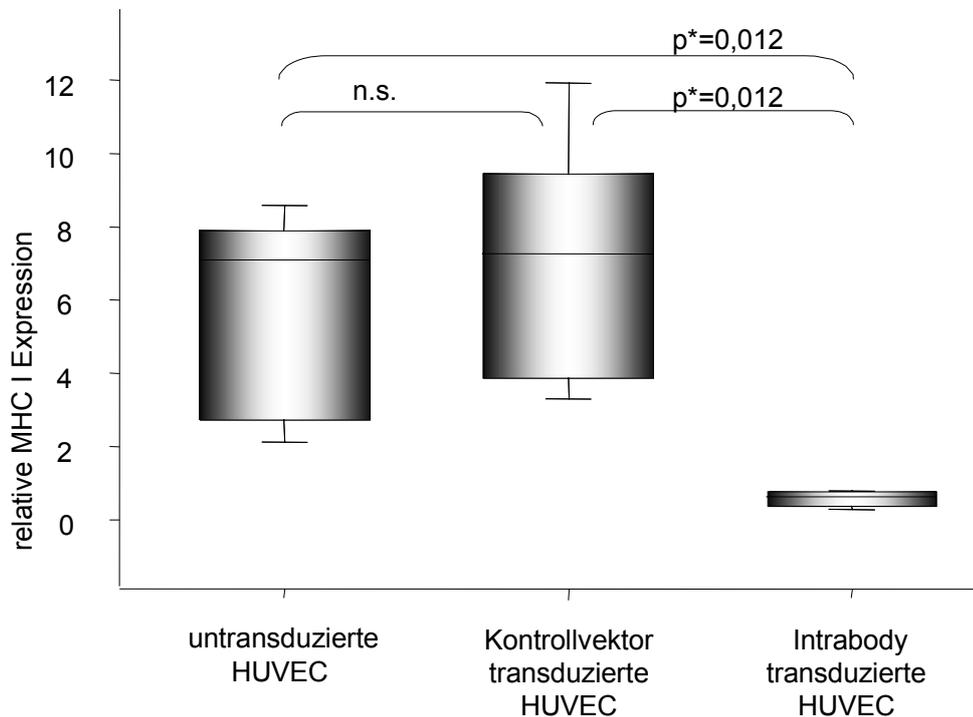


Abb. 17: Intrabody transduzierte HUVEC zeigen eine stabil niedrige relative MHC I-Expression im Vergleich mit untransduzierten oder Kontrollvektor transduzierten HUVEC nach Stimulation mit 500 pg / ml IFN- γ .

Die Darstellung in Box Plots und die statistische Auswertung erfolgte analog zu Abb. 15. Es wurden $n = 5$ Experimente mit Dreifach-Ansätzen gewertet. Der Median der nativen und auch der adenoviralen Kontrolle lag beim 7,02- bzw. 7,22-fachen Wert der relativen konstitutiven MHC I Expression untransduzierter HUVEC.

Der Mittelwert der MHC I Expression Intrabody transduzierter Zellen stieg auf das 0,45-fache des relativen Vergleichswertes. Die Differenz der MHC I-Expression Intrabody transduzierter Zellen war im Vergleich zu den Kontrollvektor transduzierten bzw. untransduzierten HUVEC mit einem jeweiligen $p^*=0,012$ signifikant.

Ähnlich deutlich reagierte die mit TNF- α behandelte Gruppe. Die Intrabody transduzierten HUVEC zeigten relative MHC I-Expressionswerte von 0,52, wogegen die Expression in der untransduzierten Gruppe um den Faktor 4,82 und in der Kontrollvektor transduzierten Gruppe sogar auf 9,28 anstieg.

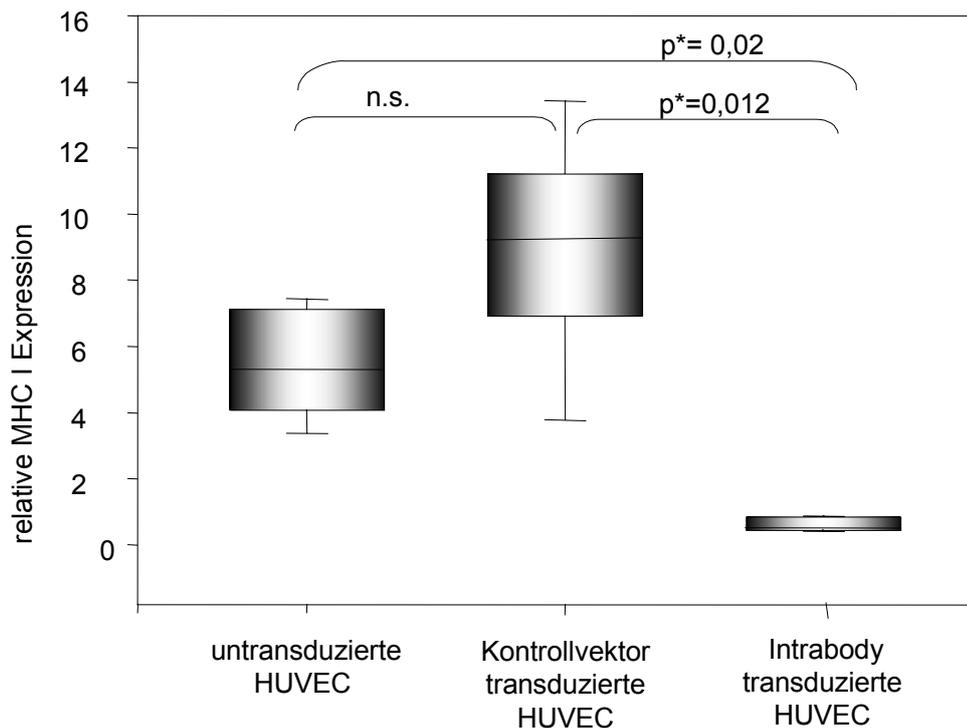


Abb. 18:: Intrabody transduzierte HUVEC mit niedriger relativer MHC I-Expression im Vergleich zu untransduzierten oder Kontrollvektor transduzierten HUVEC nach Stimulation mit 5 ng / ml TNF- α .

Die Darstellung in Box Plots und die statistische Auswertung erfolgte analog zu Abb. 15. Es wurden n = 5 Experimente mit je Dreifach-Ansätzen gewertet. Der Median der untransduzierten HUVEC und auch der adenoviralen Kontrolle betrug das 4,82- bzw. 9,82-fache der konstitutiven MHC I-Expression nativer HUVEC. Die mittlere MHC I-Expression Intrabody transduzierter Zellen stieg auf 0,52 – fache des konstitutiven Vergleichswertes.

Die Differenz der MHC I Expression Intrabody transduzierter Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektor transduzierten bzw. untransduzierten waren mit $p = 0,012$ bzw. $0,02$ signifikant. Die Differenz der MHC I-Expression zwischen den Kontrollen war mit $p = 0,113$ nicht signifikant.

Bei der mit TNF- α behandelten Gruppe waren die Differenzen zwischen Intrabody transduzierten HUVEC und Kontrollvektor transduzierten HUVEC

($p=0,012$) bzw. unbehandelten HUVEC ($p=0,02$) ebenfalls signifikant. Zwischen nativen und Kontrollvektor transduzierten HUVEC bestanden zum Teil erhebliche Unterschiede in der MHC I-Expression nach TNF- α Stimulation, die aber mit $p = 0,113$ keine Signifikanz aufzeigten (Abb. 18).

4.6.1 MHC I Expression auf HUVEC unter Stimulation mit hohen IFN γ Dosen

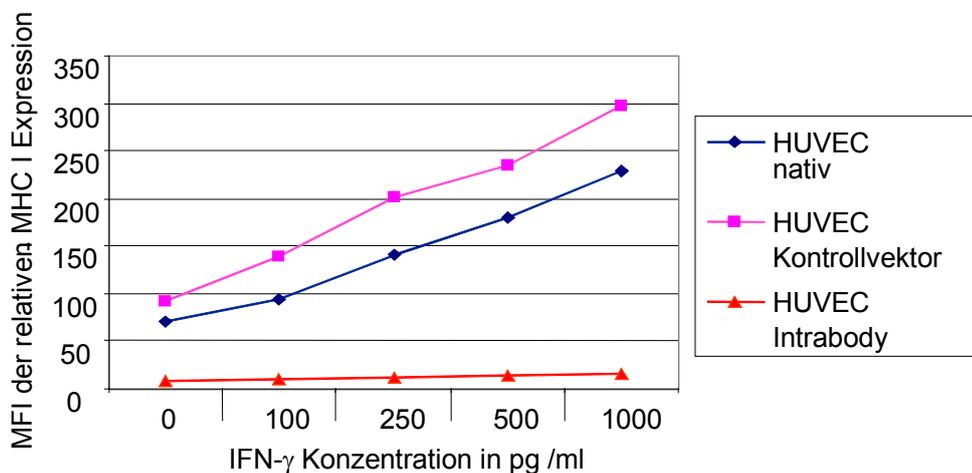


Abb. 19: Anhaltend niedrige MHC I Expression Intrabody transduzierter HUVEC nach Stimulation mit steigenden IFN- γ Dosen.

Dargestellt sind die MFI der MHC I-Expression untransduzierter und Intrabody- bzw. Kontrollvektor transduzierter HUVEC nach 48 h Stimulation mit IFN- γ Konzentrationen zwischen 0 und 1000 pg/ml (siehe auch Abb.13 und 14). Die Zytokinstimulation kann den Intrabody-Effekt über den gesamten Konzentrationsbereich nicht aufheben ($n=1$ Experiment).

In einem weiteren Experiment wurden untransduzierte, Kontrollvektor (Ad β -Gal) und Intrabody (AdsFv) transduzierte HUVEC für 48 Stunden unterschiedlich hohen Konzentrationen IFN- γ (100 pg/ml bis 1 ng/ml) im Kulturmedium ausgesetzt. Die durchflusszytometrisch ermittelte MHC I Expression der Intra-

body transduzierten Zellen stieg dabei nur geringfügig an. Untransduzierte und Ad β Gal-transduzierte HUVEC exprimierten in diesem Experiment bei Stimulation mit der höchsten Dosis an IFN- γ (1ng/ml) jeweils etwa die 3-fache relative Dichte an MHC I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 19). Dagegen war eine maximale Zytokinstimulation mit IFN- γ nicht in der Lage, den MHC I reduzierenden Effekt des AdsFv-Intrabody aufzuheben.

4.7 Einfluss der Intrabody Transduktion auf die Expression anderer Oberflächenmarker

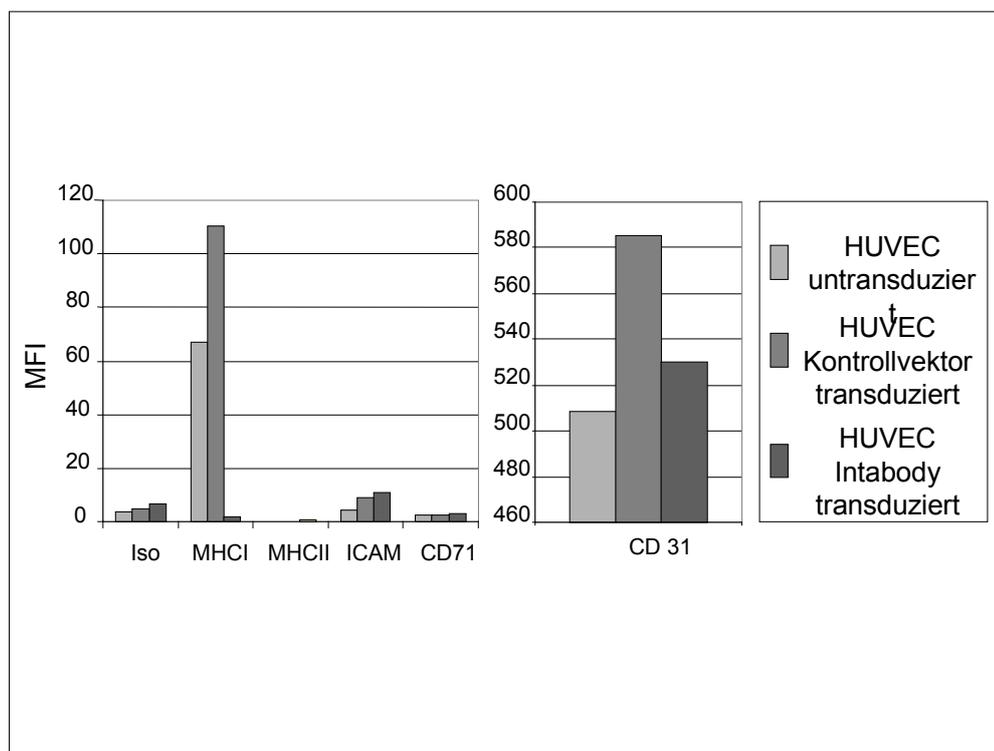


Abb. 20: Vergleich des Expressionsmusters charakteristischer Oberflächenmarker auf transduzierten und nativen Zellen.

Dargestellt ist 1 von n=2 unabhängigen Experimenten.

Die FACS-Analyse der HUVEC erfolgte 48 Stunden nach adenoviraler Transduktion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen MHC I, MHC II, CD 54, CD 71, CD 31 und einem Isotyp identischen Kontrollantikörper. Der Intrabody (sFv) beeinflusst nur die MHC I-Oberflächendichte auf HUVEC. Bei allen anderen Markern ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede.

Untransduzierte, Ad β Gal-Kontrollvektor transduzierte und AdsFv-Intrabody transduzierte HUVEC wurden auf die durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker MHC I, MHC II, CD 54, CD 71 untersucht (n=2 Experimente). Die jeweilige Höhe der Expression eines Parameters wird durch die MFI angegeben (Abb. 20). Wie bereits in Abschnitt 4.5 dargestellt, zeigen AdsFv-transduzierte HUVEC eine starke Reduktion der MHC I-Expression, wohingegen untransduzierte und Ad β Gal-transduzierte HUVEC ein vergleichbares Expressionsniveau aufweisen. Eine konstitutive Expression von MHC II ist bei allen unterschiedlich behandelten HUVEC nicht nachweisbar.

Das Expressionsniveau von CD 54 und CD 71 und CD 31 ist bei untransduzierten, Ad β Gal- und AdsFv transduzierten HUVEC vergleichbar. Der Effekt des Intrabody ist somit spezifisch für eine MHC I-Oberflächenreduktion und betrifft nicht die Expression anderer Oberflächenmarker.

In einem weiteren Experiment wurden untransduzierte, Ad β Gal-Kontrollvektor transduzierte und AdsFv Intrabody transduzierte HUVEC über 48 Stunden mit verschiedenen Dosen an IFN γ stimuliert (Abb. 21).

Die Expression von MHC I entsprach den bereits in Abschnitt 4.5 gezeigten Daten. Die Expression von MHC II ließ sich bei allen drei HUVEC Populationen durch IFN γ auf vergleichbare MFI-Werte steigern.

CD 54 war durch eine Inkubation der HUVEC mit IFN- γ induzierbar. Adenoviral transduzierte HUVEC zeigten eine höhere CD 54 Expression als untransduzierte HUVEC.

CD 31 ließ sich nicht durch Zytokinstimulation induzieren. Alle drei unterschiedlich behandelten Zellpopulationen zeigten eine etwa gleichbleibende CD 31 Oberflächenexpression.

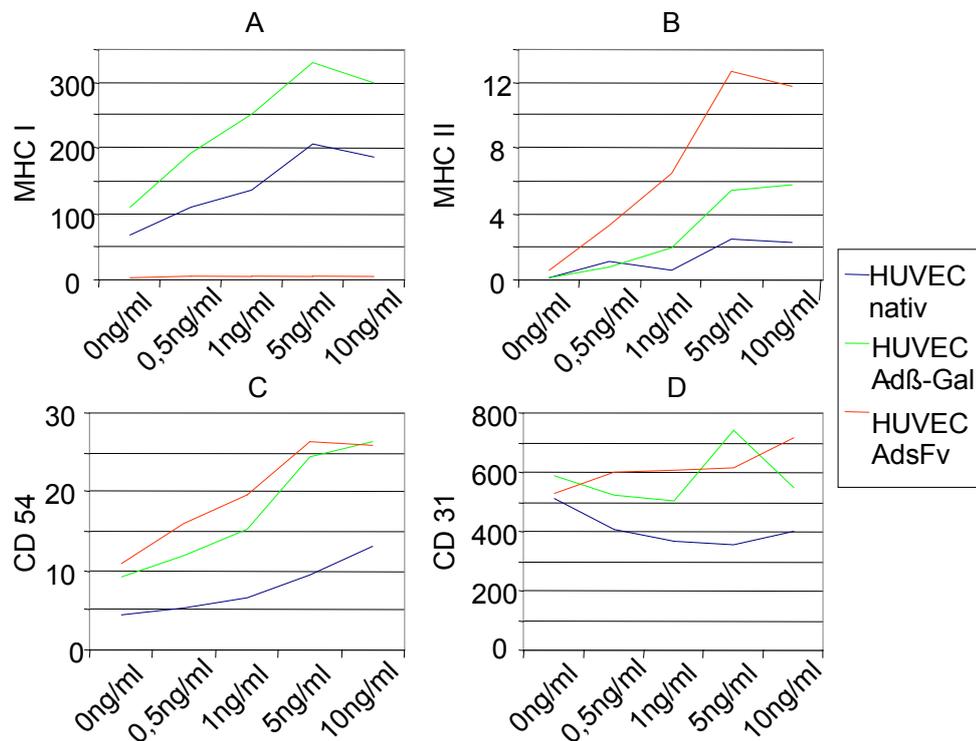


Abb. 21: Vergleich der MFI-Werte der Expression der Marker MHC I, MHC II, CD 54 und CD 31 auf untransduzierten (nativen), Kontrollvektor transduzierten (Ad β -Gal) und Intrabody transduzierten (AdsFv) HUVEC nach Stimulation mit steigenden Dosen IFN- γ .

Die FACS-Analyse erfolgte 48 h nach Transduktion und Stimulation mit IFN- γ (Y-Achse). Dargestellt ist n=1 Experiment.

A: Die MHC I Expression steigt unter IFN- γ Stimulation bei untransduzierten und Kontrollvektor transduzierten HUVEC an, nicht jedoch bei Intrabody transduzierten Zellen.

B: Die MHC II Expression steigt bei Intrabody und Kontrollvektor transduzierten HUVEC stärker als bei untransduzierten Zellen.

C: Die CD 54 Expression steigt bei Intrabody und Kontrollvektor transduzierten HUVEC stärker als bei untransduzierten Zellen.

D: Die CD 31-Expression lässt sich durch steigende IFN- γ Konzentrationen weder bei untransduzierten noch bei Kontrollvektor oder Intrabody transduzierten HUVEC beeinflussen.

Abgesehen vom Oberflächenmarker MHC I zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der Intrabody transduzierten HUVEC im Vergleich mit den anderen Zellpopulationen.

Der anti MHC I Intrabody beeinflusst also nur die MHC I Oberflächenexpression der Zelle und nimmt auf die Oberflächenexpression anderer Marker auch unter Stimulationsbedingungen mit proinflammatorischen Zytokinen keinen Einfluss.

4.8 Funktionelle Effekte der MHC I-Downregulation durch adenoviralen Transfer des Intrabody

In den weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die Suppression der MHC I-Oberflächenexpression auf HUVEC in der Lage ist, diese Zellen wirklich vor einer T-Zell-vermittelte Zytotoxizität zu schützen. Im Rahmen eines bei uns etablierten Zytotoxizitätsassays werden allospezifische, aktivierte CD 8+ T-Zellen mit verschiedenen Calcein-markierten Populationen an Zielzellen inkubiert und die erfolgte Zellyse anhand der freigesetzten Menge an Calcein quantifiziert.

In unserem Falle wurden die CD 8+ -Effektorzellen aus PBMC isoliert und über 11 Tage mit BLC-Stimulatorzellen in IL-2 haltigem Kulturmedium inkubiert. Als Zielzellpopulationen dienten zum einen BLC vom Stimulatorgenotyp und eine HLA-divergente Kontrolle, zum anderen HUVEC vom Stimulatorgenotyp (allogen), HLA-divergente Kontrollzellen („3rd party“) und mit dem Intrabody bzw. einem Kontrollvektor transduzierte allogene HUVEC.

4.8.1 HLA-Phänotypisierung der verwendeten Zellen

Zum Generierung allospezifischer CD8+ Effektor-T-Zellen musste einerseits eine HLA Divergenz zwischen dem Genotyp der allogenen Stimulator- und späteren Zielzellen und den Effektorzellen vorhanden sein. Zum anderen musste, um die MHC I-Spezifität der generierten Effektorzellen zu kontrollieren, eine zum Stimulatorzellgenotyp HLA-verschiedene Kontrollzellpopulation (nachfolgend als „3rd party“ bezeichnet), ausgewählt werden.

So wurden zunächst sämtliche HUVEC bzw. BLC, die aus Nabelschnüren gewonnen, einer HLA-Typisierung mittels PCR unterzogen (Tab. 3). Diese Typisierung wurde im Institut für Gerichtsmedizin der Charité von Frau Dr. M. Nagy durchgeführt.

ISOLAT	HLA A	HLA B	HLA C	HLA DR	HLA DQ
Anton	03 / 23	08 / 44	07	03 / 11	02 / 03
Bert	01	08 / 65	07 / 08	01 / 03	0201 / 05011
Caesar	03 /23	08 / 44	7	03 / 11	02 / 03
A	01	08 / 18	07	03 / 15	0201 / 0602
B	01	51 / 40	02 / 03	04 / 11	0301 / 0302

Tabelle 3: Ergebnisse der HLA-Typisierung der unterschiedlichen Nabelschnurzellisolate.

Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist waren zwei Nabelschnurisolat aus einer Zwillingengeburt HLA-identisch („Anton“ und „Caesar“).

Als allogene Stimulator- bzw. Zielzellen wählten wir den Genotyp „Caesar“ HLA-A 3 and 23 und HLA-B 8 and 44. Als 3rd party-Kontrolle wählten wir den Genotyp „B“ HLA-A 1 und HLA-B 51 und 40. Aus einer Gruppe freiwilliger, gesunder, HLA-typisierter Spender wählten wir einen mit dem Genotyp HLA-A 1 und 29 und HLA-B 8 und 44 um aus seinen PBMC die CD 8+-Effektorzellen zu generieren.

4.8.2 Gewinnung von autologen BLC-Stimulatorzellen

Endothelzellen, als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen sind allein nicht in der Lage zytotoxische T-Zell-Antworten zu stimulieren [98]. Um professionelle antigenpräsentierende Zellen desselben Genotyps zu generieren wurden Nabelschnurblutleukozyten mit Epstein-Barr-Viren transformiert und so immortalisiert. Die generierten BLC wurden durchflusszytometrisch auf die Expression der typischen B-Zellmarker CD 19 und 21 hin untersucht. Alle generierten BLC zeigten eine konstitutive Expression von CD 19 und CD 21 (Abb.: 22).

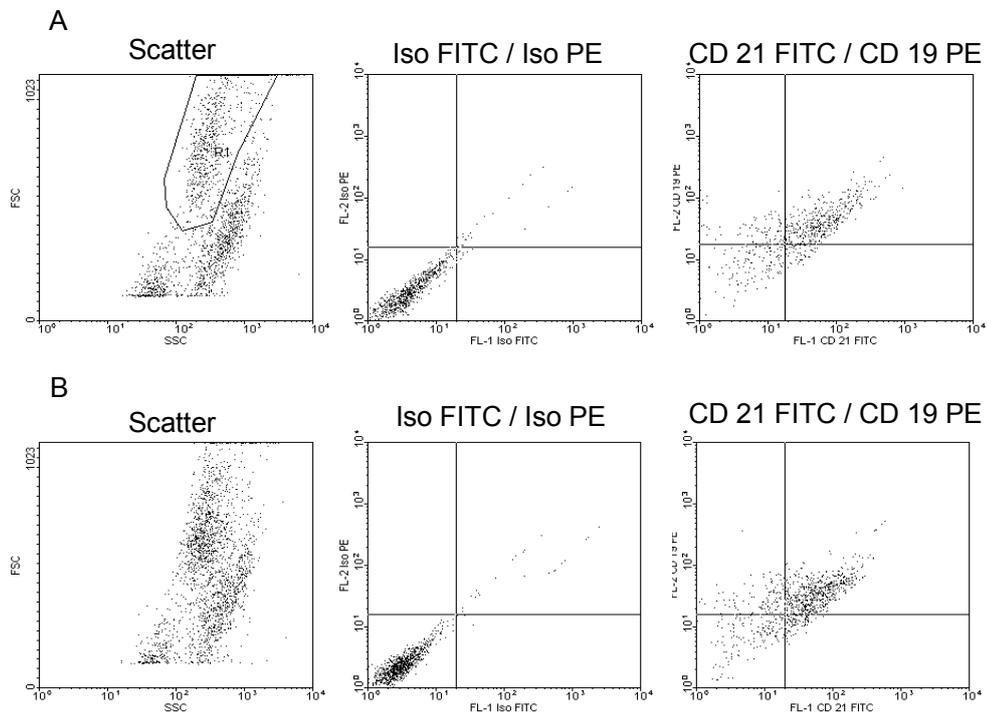
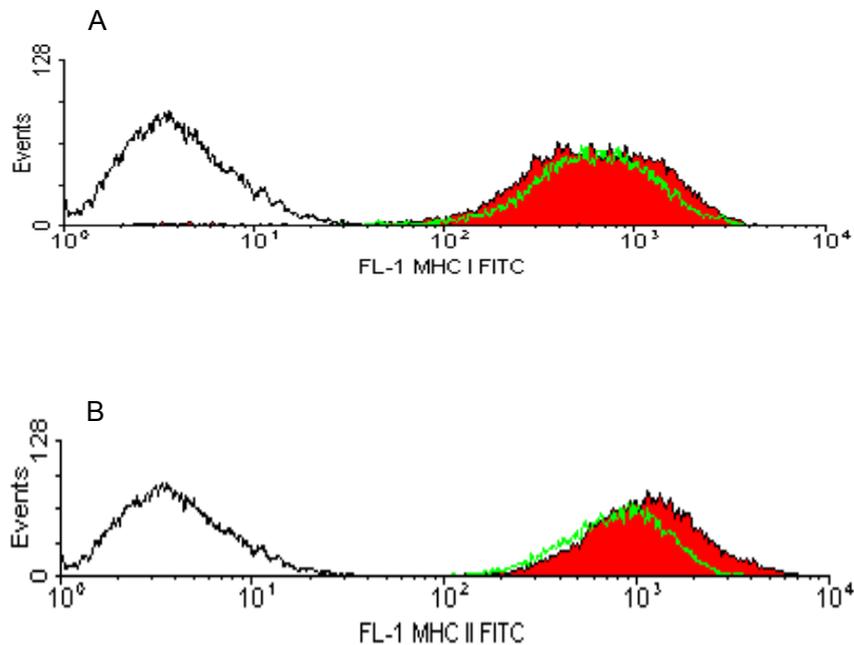


Abb. 22: Die Bestrahlung der BLC mit 100 Gy führt zu keiner Veränderung ihrer durchflusszytometrischen Charakteristika

Durchflusszytometrische Darstellung von mit 100 Gy bestrahlten (A) und unbestrahlten BLC (B) anhand ihrer Scatterbilder (links, Die Region R1 beschreibt die vitale BLC-Population), der Färbungen mit Isotyp-spezifischen Kontrollantikörpern (Mitte) und mit den B-Zell Markern CD 19 und CD 21 (rechts y- bzw. x-Achse). Es sind keine wesentlichen Unterschiede erkennbar.

Weiterhin war auf den BLC eine konstitutive Expression von MHC II dem obligaten Oberflächenmolekül zur Präsentation von Fremdanigenen an T-Lymphozyten durchflusszytometrisch nachweisbar (Abb. 23).

Da für eine Lymphozytenkokultur die Stimulatorzellen einer Bestrahlung unterzogen werden, um eine weitere Proliferation dieser Zellen zu verhindern wurden die BLC außerdem auf die Expression der Marker MHC I, MHC II, CD 19 und CD 21 48 h nach einer Bestrahlung mit 100 Gy untersucht und mit unbestrahlten BLC verglichen. Diese waren mit der Expression auf unbestrahlten BLC vergleichbar, was auf einen Erhalt der B-Zell- und APZ-Eigenschaften auch nach einer Bestrahlung schließen lässt (Abb. 22 und 23).



A

bb. 23: Die MHC I und MHC II Oberflächenexpression der BLC wird durch die Bestrahlung nicht beeinflusst

Durchflusszytometrischer Vergleich mit 100 Gy bestrahlter und unbestrahlter BLC anhand ihrer MHC I und II Expression (n=1).

Dargestellt sind FACS-Histogramme der Oberflächenexpression von MHC I (A) und MHC II (B) unbestrahlter (grüne Linie) und mit 100 Gy bestrahlter BLC (rote Fläche). Zum Vergleich ist eine Kontrolle mit Isotyp-identischen Kontrollantikörpern (schwarze Linie) dargestellt.

Sowohl bestrahlte als auch unbestrahlte BLC zeigen eine von der Isotyp-Kontrolle deutlich abgrenzbare MHC I bzw. – II Oberflächenexpression, wobei die Histogramme des Expressionsmusters von MHC I und MHC II übereinander liegen.

4.8.3 Generierung allospezifischer CTL

Um einen Schutz vor allospezifischer T-Zelllyse von Oberflächen MHC I defizienten HUVEC auch funktionell in einem Zytotoxizitätsmodell nachweisen zu können, war die Generierung alloreaktiver Effektor CD8⁺ T-Lymphozyten erforderlich. Dazu wurden CD8⁺ T-Lymphozyten aus PBMC mittels Magnetseparation isoliert und über 11 Tage mit allogenen BLC Stimulatorzellen und IL-2 zusammen kultiviert.

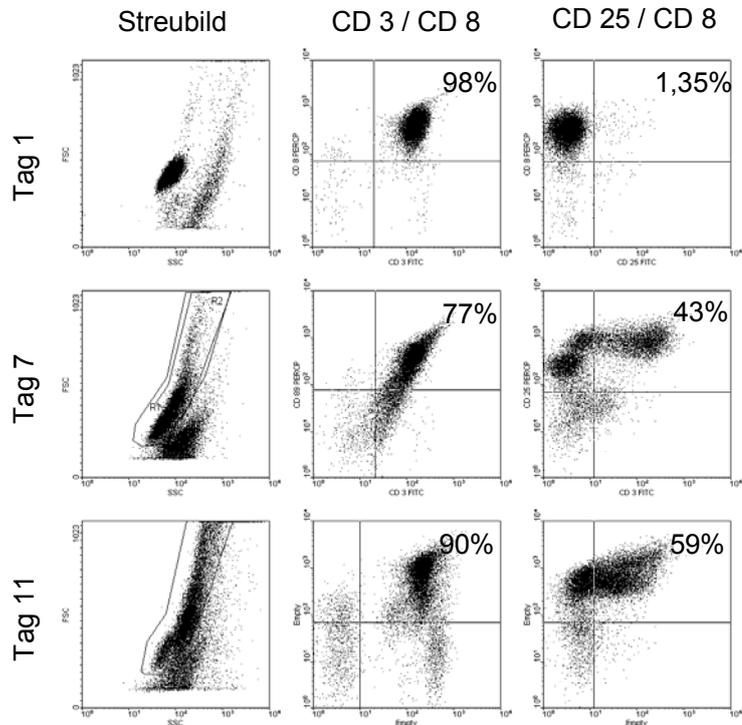


Abb. 24: Analyse der CTL zu verschiedenen Zeitpunkten einer Ko-Kultur. Zur Darstellung kommen Dot Plots der Streubilder (linke Spalte), der CD 3 / CD 8 Expression (X/Y-Achse der mittleren Spalte) und die CD 25/CD 8 – Expression (X/Y-Achse der rechten Spalte) nach 1 (oben), 7 (Mitte) und 11 d Kulturdauer (unten). Als Ergebnis der Magnetseparation zeigen 98% aller Zellen eine CD3 und CD 8 Expression (mittlere Spalte). Im zeitlichen Verlauf erkennt man die Zunahme der Blastenfraktion im Streubild (eingegrenzt durch das Polygon R2 im Plot Tag 7), und die Zunahme der aktivierten, CD 25 positiven CTL–Population in der rechten Spalte. Am Ende der Kokultur sind 90% aller Zellen CD 3 und 8 positiv und eine 59 % aller Zellen CD 25 positiv.

Bereits nach 7 Tagen war eine Proliferation makroskopisch sichtbar. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten im Vergleich zu Kontrollen ohne Stimulatorzellen bzw. ohne IL-2 Zusatz eine deutliche Blastenpopulation im Streubild und eine im Verlauf der Ko-Kultur zunehmende Expression von CD 25 als Zeichen der Zellaktivierung bei der überwiegend CD 3+/8+ Zellpopulation (Abb. 24, 25 und 26).

Aus etwa 1×10^7 CD8+ T-Lymphozyten, die aus 100 ml Blut isoliert wurden, erhielten wir nach 11 Tagen Kokultur etwa $1,5 \times 10^8$ zytotoxische Zellen für den anschließenden Zytotoxizitätstest.

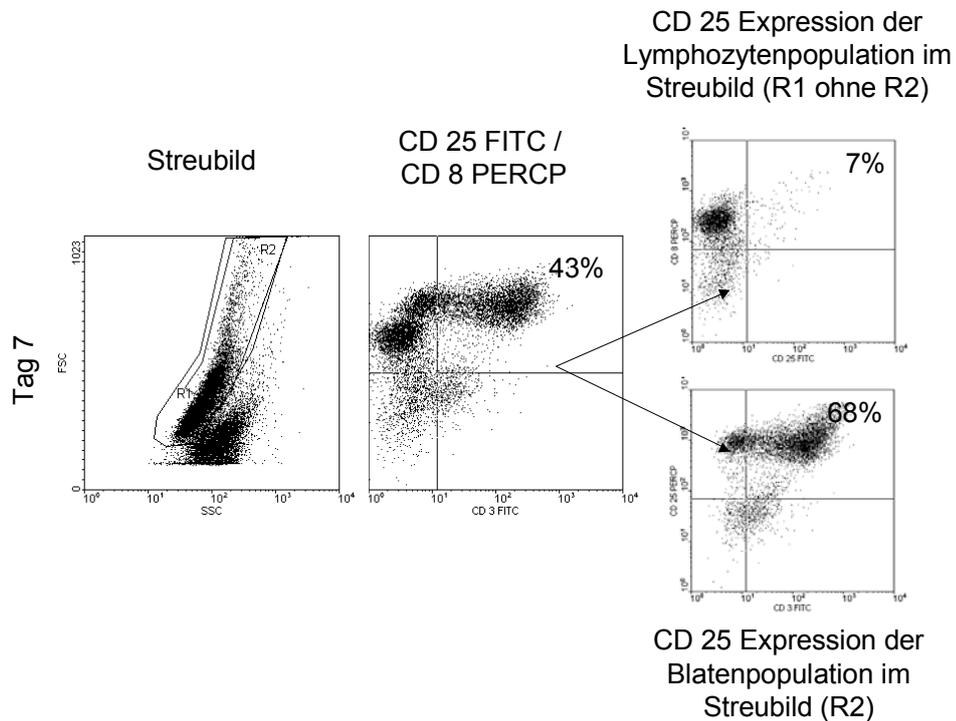


Abb. 25: Nur die proliferierende Lymphoblastenpopulation zeigt eine CD 25 Expression

Detaildarstellung Tag 7 der Ko-Kultur aus Abb. 24 A.

Hier wurde die CD 25 Expression verschiedener CTL-Subpopulationen aus dem Streubild differenziert betrachtet. Die Lymphozytenfraktion (Polygon R1 ohne R2) zeigt nur eine geringe CD 25 Expression (rechts oben), die Lymphoblastenfraktion (R2 des Streubildes) ist überwiegend CD 25 positiv. Die aktivierten, CD 25 positiven CTL sind vor allem in der proliferierenden Blastenfraktion (R2) zu finden.

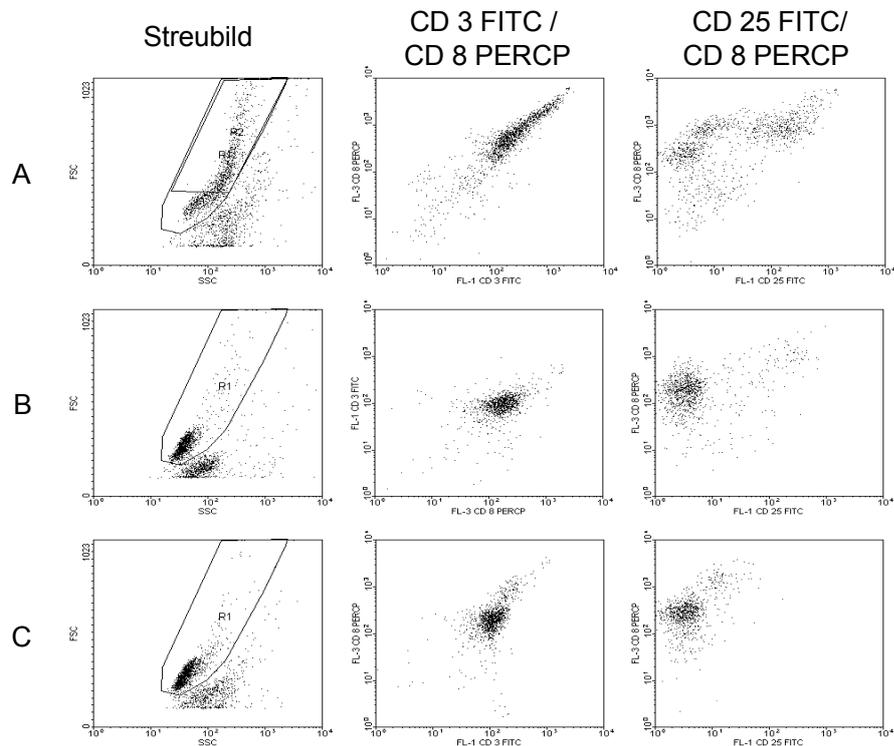


Abb. 26: Vergleich einer Lymphozyten-Kokultur mit Ansätzen ohne Stimulatorzellen bzw. ohne IL-2 Zusatz am Tag 7.

Durchflusszytometrische Darstellung des Streulichtbildes (links), der CD 3/ CD 8 Expression (Mitte) und der CD 25 / CD8 Expression (rechts) als Dot Plots (n=1 Experiment). In den Kontrollansätzen ohne BLC-Stimulatorzellen (B) und ohne IL-2-Zusatz (C) unterbleibt eine Lymphozytenaktivierung in Form einer CD 25 Induktion und die Ausbildung einer proliferierenden Blastenfraktion im Streubild wie bei der Ko-Kultur mit BLC-Stimulatorzellen und IL-2 Zusatz (A).

4.8.4 Markierungen der Zielzellen mit Calcein

In einem Markierungsversuch mit unterschiedlichen Calcein Konzentrationen erwies sich die in der Literatur empfohlene Konzentration von 5 μmol Calcein-AM zum Markieren der Zielzellen als ausreichend [102] [106]. Höhere Calcein Konzentrationen erbrachten keine erhöhte Fluoreszenzintensität in den Überständen lysierter Zielzellen (Abb. 27).

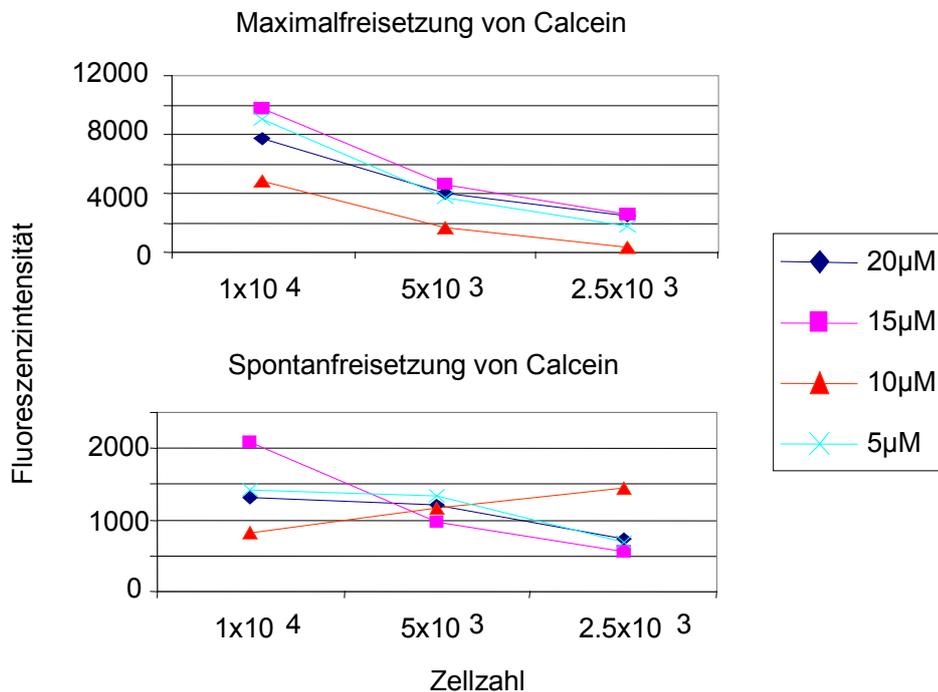


Abb. 27: Ermitteln der idealen Konzentration von Calcein-AM zum Markieren von Zielzellen im Zytotoxizitätstest.

In einem Experiment mit 3 Replikaten wurden HUVEC für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen Calcein-AM inkubiert und nach 3 h Inkubation bei 37 °C die maximale Calceinfreisetzung (oben) aus mit 0,9% Triton X lysierten Zellen bzw. die Spontanfreisetzung von Calcein während der Inkubation (unten) ermittelt. Die maximal bzw. spontan freigesetzte Menge an Calcein ist von der markierten Zellzahl, nicht jedoch von der Farbstoffkonzentration abhängig. Für die folgenden Experimente wurde eine Calcein-Konzentration von 5 µM verwendet.

Für HUVEC ergab erst die in der Literatur verwendete Zielzellzahl von 2x10⁴ / Ansatz ein ausreichendes Fluoreszenzsignal um Unterschiede in der Zellyse darzustellen. BLC nahmen aufgrund ihres kleineren Zellvolumens auch geringere Mengen Farbstoff auf, so dass hier eine Zielzellzahl von 4x10⁴/Ansatz ein ausreichendes Signal ergab (Abb. 28).

Allerdings wurden BLC und HUVEC mit der gleichen Zahl an Effektorzellen inkubiert, so dass bei den BLC die Effektor/Zielzell-Verhältnisse (E/T-Ratio) halbiert wurden.

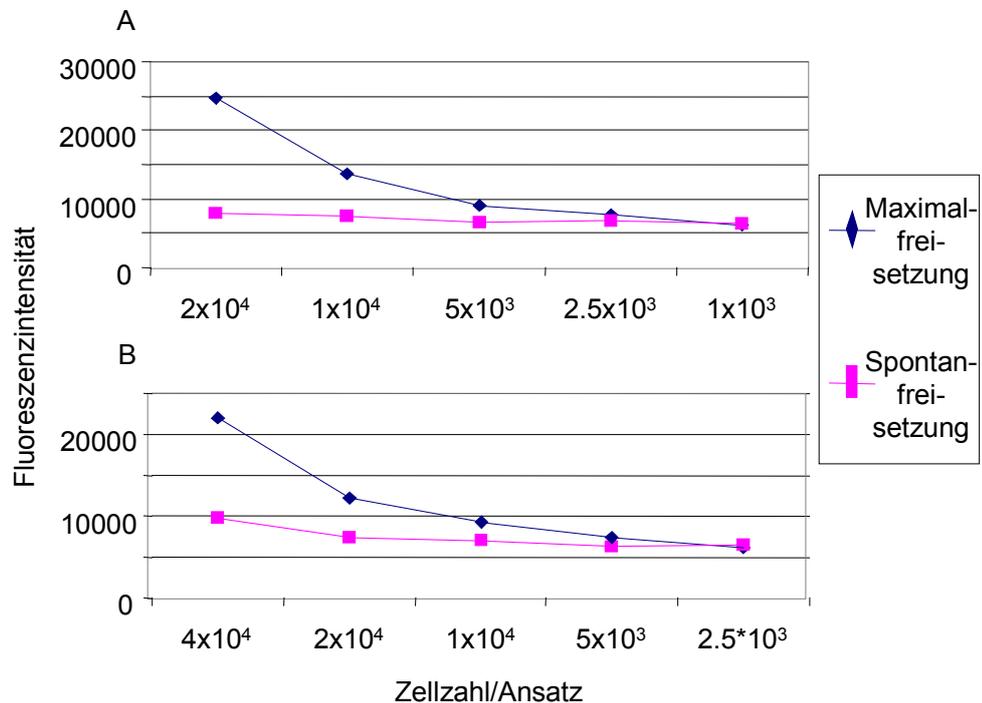


Abb. 28: Ermitteln der idealen Zielzellzahl pro Ansatz für eine ausreichende Sensitivität der Zellyse.

In einem Experiment mit jeweils drei Replikaten wurden unterschiedliche Zielzellzahlen von HUVEC (A) und BLC (B) 30 min mit $5 \mu\text{M}$ Calceinlösung inkubiert und nach 3 h Inkubation bei 37°C die durch Zellyse mit 0,9% Triton X (Maximalfreisetzung) bzw. spontan freigesetzte Calceinmenge (Spontanfreisetzung) fluorimetrisch bestimmt.

Jeweils 2×10^4 HUVEC und 4×10^4 BLC / Ansatz ergeben eine ausreichende Differenz der relativen Fluoreszenzintensität von Maximalfreisetzung und Spontanfreisetzung an Calcein, um eine quantitative Analyse des Anteils lysierter Zielzellen zu realisieren.

4.9 Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays

Am Ende jeder Kokultur zur Generierung allospezifischer, zytotoxischer T-Zellen wurden die Lyseraten dieser Zellen gegenüber: (1.) allogenen und 3rd party BLC, (2.) allogenen und 3rd party HUVEC und (3.) Kontrollvektor- und Intrabody transduzierten allogenen HUVEC ermittelt.

Die Konzentration an Effektorzellen wurde bei konstanter Zielzellzahl/Ansatz auf Verhältnisse (E/T-Ratios) von 40/1, 20/1, 10/1 und 5/1 für HUVEC als Zielzellen und 20/1, 10/1, 5/1 und 2,5/1 für BLC als Zielzellen eingestellt. So

konnte eine von der Effektorzellkonzentration abhängige Zellyse demonstriert werden.

Die Zellyserate wurde als „Zellyse in %“ nach der Formel:

Zellyse in % = (Experimentelle Lyse – Spontanlyse) x 100 / (Maximale Lyse - Spontanlyse)

quantifiziert.

Zur Ermittlung einer T-Zell-Rezeptor abhängigen Zellyse (TZR-spezifische Zellyse in %) wurden die T-Effektorzellen außerdem bei den 3 höheren E/T-Ratios mit T-Zell-Rezeptor blockierenden OKT 3 Antikörpern inkubiert und die verbleibende unspezifische Zellyserate von den korrespondierenden (s.o.) Ansätzen subtrahiert.

TZR-spezifische Zellyse in % = Zellyse in % - Zellyse nach OKT3 Vorinkubation in %

Die Versuche wurden in 3-fachen Ansätzen für die experimentellen Werte und in 4-fachen Ansätzen zur Ermittlung von Spontan- und Maximalfreisetzungswerten durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung in den Zellkulturüberständen wurde 3-mal wiederholt und die erhaltenen Werte gemittelt.

Um als gelungener Zytotoxizitätstest in die Wertung einzugehen, musste in der HUVEC und BLC Zielzellpopulation eine Differenz in den Lyseraten von allogenen und 3rd-party-Zellen nachweisbar sein. Von insgesamt 12 angesetzten Kokulturen wurden 6 gelungene Zytotoxizitätstests mit nachweisbarer allospezifischer Zellyse in die Wertungen mit einbezogen.

In einer statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Ranked Test wurden Unterschiede in den Lyseraten der jeweils verglichenen Zellpopulationen ermittelt und als Box-Plots dargestellt.

4.9.1 Analyse der Zellyseraten bei der Verwendung von BLC als Zielzellen

Wurden BLC des Stimulatorzelltyps als Zielzellen verwendet ergaben sich die höchsten Lyseraten (Abb. 29 und 30). Hierbei sind nicht nur die absoluten Prozentwerte der Zellyse, sondern auch die im Vergleich zu HUVEC halbierten Effektor-/Zielzell-Verhältnisse zu berücksichtigen. Die Differenzen zwischen allogenen und „3rd party“ Genotyp waren sowohl bei den Parametern „Zellyse in %“ und „TZR spezifische Lyse in %“ statistisch signifikant.

Die in den Kokulturen generierten zytotoxischen T-Zellen waren also in der Lage BLC-Stimulatorzellen allospezifisch zu lysieren.

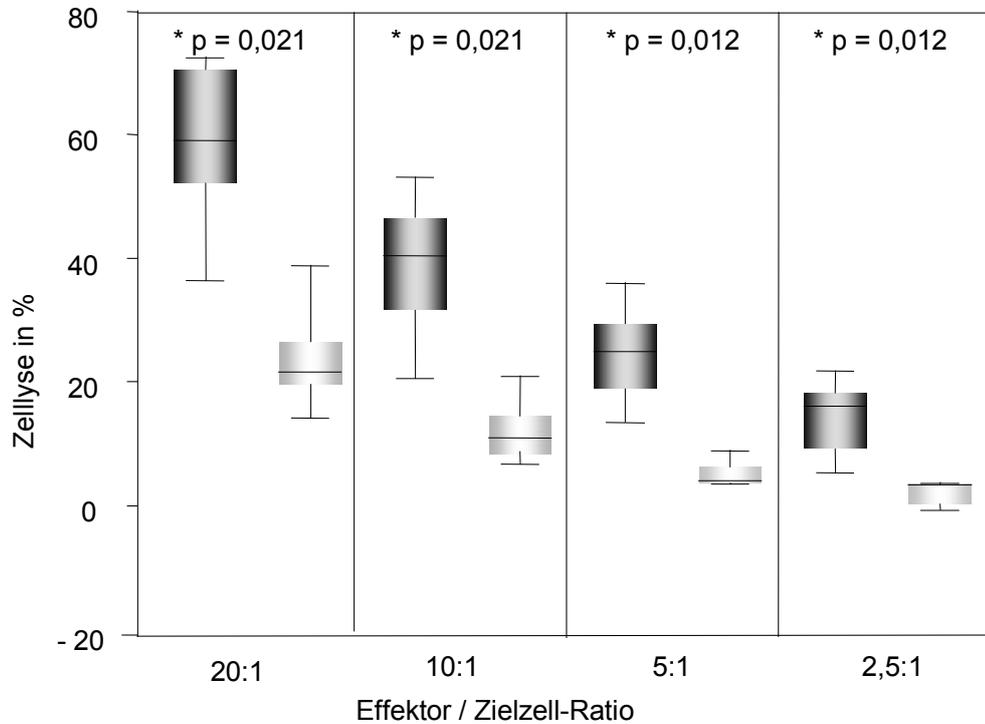


Abb. 29: Allospezifische Lyse von allogenen BLC-Zielzellen durch die in der Kokultur generierten CTL

Vergleich der Zellyse allogener (dunkle Boxen) und MHC I divergenter 3rd-party BLC (helle Boxen).

Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon Rank Test. In die Auswertung wurden n = 5 Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen.

Der Box plot stellt jeweils den Median der Zielzellyse als waagerechte Linie in den Boxen dar. Die Boxen stellen den Wertebereich zwischen 25% und 75% dar, die Säulen jenseits der Boxen den Wertebereich zwischen 5% und 95% aller Werte. Punkte jenseits der Säulen markieren Ausreißer-Werte.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden jeweils bei einer Effektor-/Zielzellratio verglichenen Werten sind als Stern (*) gekennzeichnet.

Allogene BLC werden in jeder Verdünnungsstufe der Effektorzellen mehr lysiert als 3rd-party BLC (Median der Zellyse bei 20/1 Verhältnis: 59% vs. 22%). Diese Unterschiede sind in allen Verdünnungsstufen signifikant. Die Lyse-raten nehmen mit den abnehmenden Effektorzellzahlen pro Ansatz ab. Es findet eine allospezifische, zellzahlabhängige Lyse der BLC-Zielzellen statt.

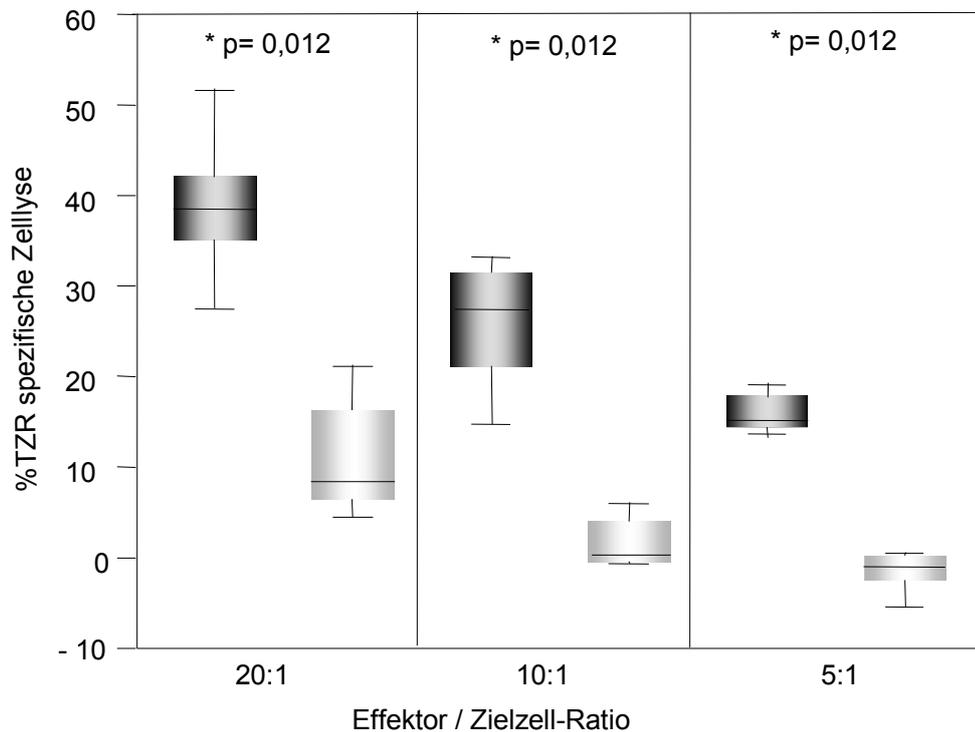


Abb. 30: T-Zellrezeptor abhängige Zellyse allogener BLC.

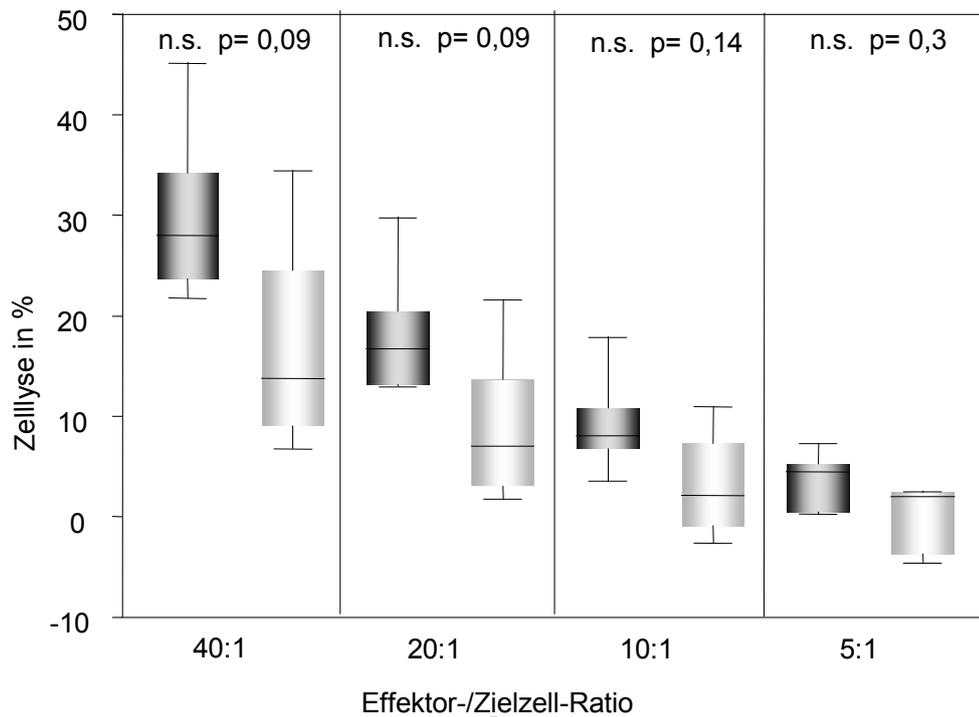
In die Auswertung wurden n = 5 Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen. Box Plots sind analog zur Abbildung 28 dargestellt.

In allen Verdünnungsstufen werden allogene BLC signifikant stärker lysiert als 3-rd party Zellen (*p jeweils 0,012). Median der Zellyse bei 20/1 Verhältnis: 38 % (allogene BLC, dunkle Boxen) vs. 8 % (3-rd party BLC, helle Boxen).

Die Zellyse erfolgt allospezifisch und ist von der Effektorzellzahl im Ansatz abhängig.

4.9.2 Analyse der Zellyseraten bei der Verwendung von HUVEC als Zielzellen

Wenn HUVEC vom allogenen bzw. 3rd party Typ verwendet wurden so sank die Lyserate ab (Abb. 31 und 32). Eine signifikante Differenz zwischen allogener und 3rd party Zellyse ergibt sich für die beiden höheren Effektor/Zielzell-Ratios des Parameters „TZR-spezifische Lyse in %“.



A

bb. 31: Vergleich der Zellyse allogener (dunkle Boxen) und HLA divergenter HUVEC (helle Boxen) durch die generierten CTL.

In die Auswertung wurden n = 5 Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen. Die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon Rank Test und die Darstellung im Box Plot erfolgt analog zu Abb. 28.

Die allogenen HUVEC werden in jeder Verdünnungsstufe stärker lysiert als die 3-rd party Kontrolle, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (Median der Zellyse bei 40/1 Verhältnis: 28 % allogene HUVEC vs. 14 % 3rd-party HUVEC).

Es besteht eine Abhängigkeit von der T-Effektorzellkonzentration im Ansatz und der resultierenden Zellyse.

Die mit BLC stimulierten Effektorzellen waren in der Lage, HUVEC desselben Genotyps allospezifisch zu lysieren, allerdings mit deutlich geringerer Effizienz als ihre BLC-Stimulatorzellen.

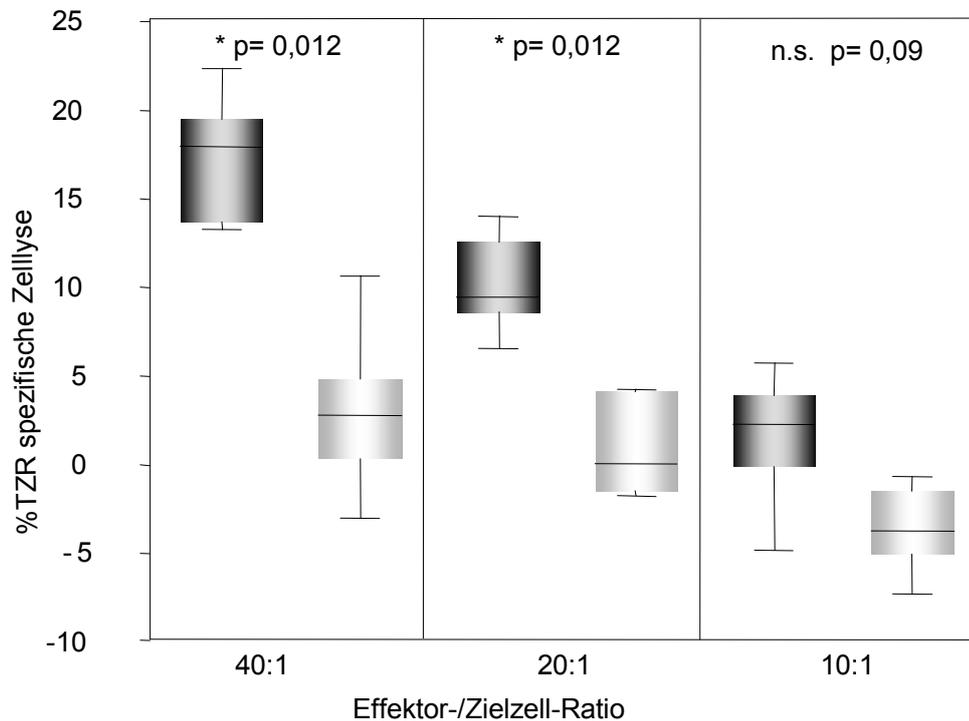


Abb. 32: Allospezifische TZR-abhängige Lyse allogener HUVEC durch die in der Kokultur generierten CTL

Darstellung der T-Zell-Rezeptor-abhängigen Lyse allogener HUVEC (dunkle Boxen) und 3rd party HUVEC (helle Boxen).

In die Auswertung wurden $n = 5$ Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen. Die statistische Auswertung im Wilcoxon Rank Test und die Darstellung im Box Plot erfolgt analog zu Abb. 28.

Die TZR spezifische Lyse der HUVEC erfolgt allospezifisch und ist abhängig von der Effektorzellkonzentration in den Ansätzen.

Die Unterschiede in der Zellyse sind für die beiden höheren Verdünnungsstufen signifikant (* $p = 0,012$). Der Median der Zellyse bei 40/1 Verhältnis beträgt: 18 % bei allogenen HUVEC vs. 3 % bei 3-rd party HUVEC.

4.9.3 Analyse der Zytotoxizität bei der Verwendung AdsFv-Intrabody- bzw. Kontrollvektor transduzierter HUVEC als Zielzellen

Im dritten Teil der jeweiligen Zytotoxizitätstests wurden adenoviral transduzierte HUVEC des allogenen Haplotyps auf ihre Empfindlichkeit gegenüber allospezifischen CTL hin untersucht. Verglichen wurden AdsFv-Intrabody transduzierte und Ad β Gal-Kontrollvektor transduzierte HUVEC.

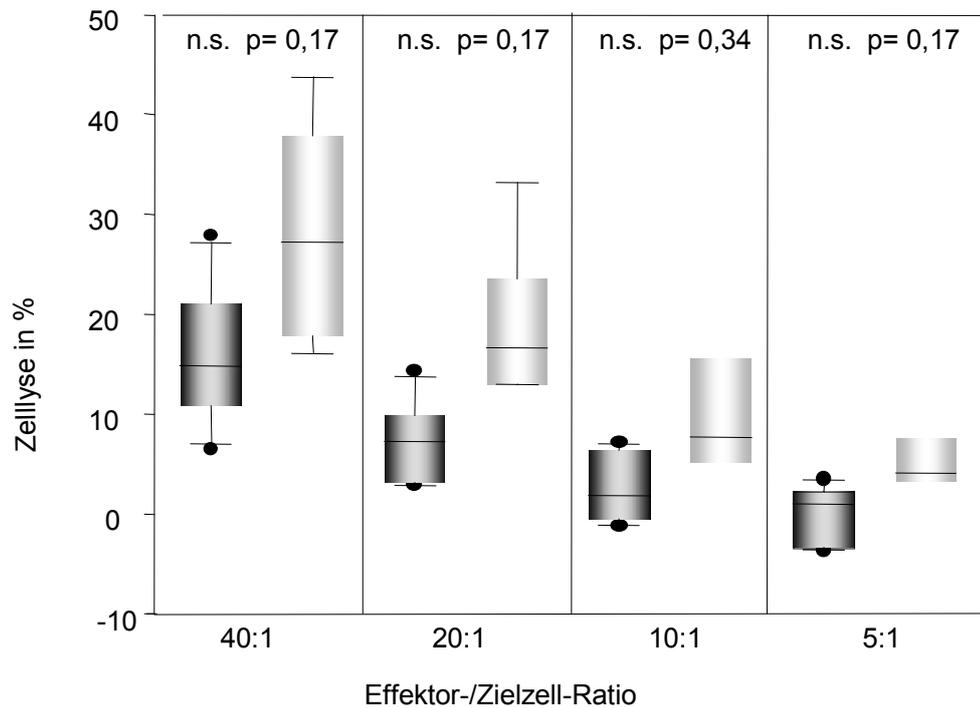


Abb. 33: Vergleich der Zellyse zwischen Intrabody- (dunkle Boxen) und Kontrollvektor transduzierten HUVEC (helle Boxen).

In die Auswertung wurden $n = 5$ Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen. Die statistische Auswertung im Wilcoxon Rank Test und die Darstellung im Box Plot erfolgt analog zu Abb. 28. Punkte jenseits der Säulen markieren Ausreißer-Werte.

Die Kontrollvektor transduzierten HUVEC werden stärker lysiert als die Intrabody transduzierten Zellen (Median der Zellyse bei 40/1 Verhältnis: 15 % Intrabody transduzierte HUVEC vs. 28 % Kontrollvektor transduzierte HUVEC). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Die Intrabody transduzierten Zellen waren vor einer Lyse durch die zytotoxischen T-Zellen geschützt (Abb. 33). Dieser Unterschied war jedoch erst beim Parameter „TZR-spezifische Lyse in %“ signifikant (Abb. 34).

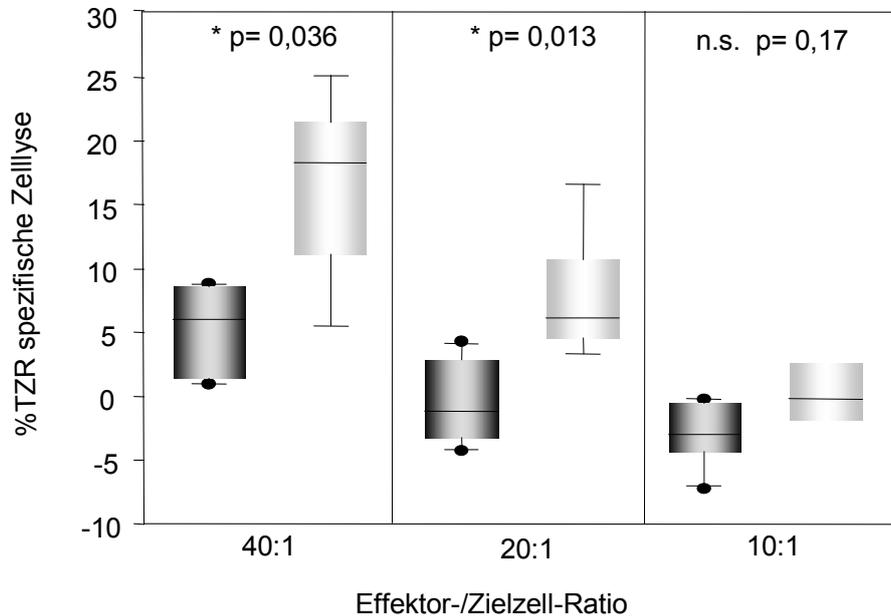


Abb. 34: Schutz der Intrabody transduzierten HUVEC vor einer Zellyse durch allospezifische CTL.

Darstellung der T-Zell-Rezeptor-abhängigen Lyse Intrabody transduzierter HUVEC (dunkle Boxen) und Kontrollvektor behandelte Zellen (helle Boxen). In die Auswertung wurden $n = 5$ Experimente mit je 3 Replikaten einbezogen. Die statistische Auswertung im Wilcoxon Rank Test und die Darstellung im Box Plot erfolgt analog zu Abb. 28. Punkte jenseits der Säulen markieren Ausreißer-Werte.

Die Intrabody transduzierten Zellen werden in viel geringerem Maße lysiert. Median der Zellyse bei 20/1 Verhältnis: 18 % (Kontrollvektor transduzierte HUVEC) vs. 6 % (Intrabody transduzierte HUVEC).

Die Unterschiede in der Zellyse sind für die beiden höheren Verdünnungsstufen signifikant.

Der Überblick über die Zytotoxizitätstests in Abb. 35 verdeutlicht noch einmal die Differenz der Zellyse gegenüber allogenen untransduzierten HUVEC und 3rd party HUVEC sowie allogenen adenoviral mit dem Intrabody bzw. Kontrollvektor transduzierten HUVEC.

Die Lyserate war bei den Kontrollvektor transduzierten allogenen HUVEC mit den untransduzierten Zellen vergleichbar.

Das Niveau der Zellyse der Intrabody transduzierten HUVEC lag etwa bei dem der „3rd party“ Kontrolle.

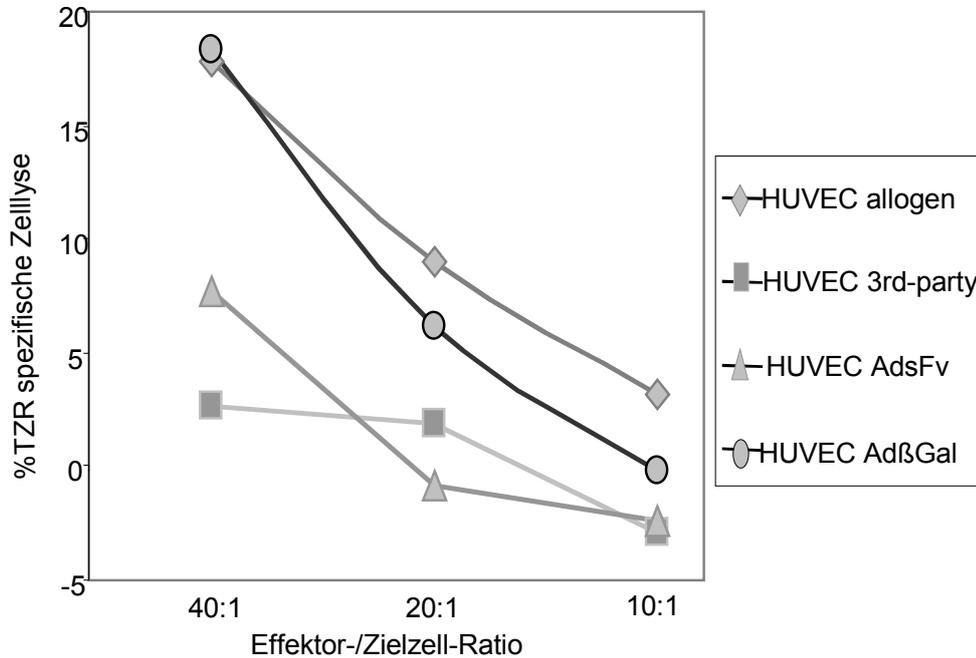


Abb. 35: Vergleichbare TZR abhängige Zellyse Intrabody transduzierter allogener HUVEC und HLA-divergenter HUVEC

Vergleich der Medianwerte der TZR spezifischen Lyseraten der in den Zytotoxtests eingesetzten untransduzierten (allo), Kontrollvektor- (Adβ-Gal) und Intrabody (AdsFv) transduzierten HUVEC und der 3rd-party-Kontrollzellen (n=5 Experimente).

Es ergeben sich jeweils vergleichbare Raten für die allogenen und Kontrollvektor (Adβ-Gal) transduzierten HUVEC einerseits und die 3-rd party und Intrabody (AdsFv) transduzierten HUVEC andererseits.