

5 Diskussion

5.1 Überblick

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

Es konnte gezeigt werden, dass ein effizienter Gentransfer des anti-MHC I-Intrabody in primäre HUVEC mit einer adenoviralen Transduktion möglich ist. Weiterhin wurde durch die Transduktion von HUVEC mit dem Intrabody nahezu ein phänotypischer „knock-out“ der MHC I Oberflächenexpression erzielt, wobei die Expression anderer Oberflächenmoleküle im Wesentlichen unbeeinflusst blieb.

Im Rahmen eines funktionellen Abstossungsmodells waren anti-MHC I Intrabody transduzierte HUVEC vor einer Zellyse durch allospezifische zytotoxische T-Lymphozyten geschützt.

Damit kann die Arbeitshypothese als bestätigt angesehen werden.

5.2 Hintergrund

Die Umgehung arteriosklerotisch veränderter arterieller Koronargefäßabschnitte durch Implantation von isolierten arteriellen oder venösen Gefäßen ist der derzeitige Goldstandard in der kardiovaskulären Bypasschirurgie. Bei Zweitoperationen und ausgeprägter Arteriosklerose verhindert der Mangel an qualitativ ausreichendem autologem Gefäßmaterial eine erfolgreiche Bypassoperation [2]. Die Verwendung kleinkalibriger Kunststoffprothesen aus ePTFE (Teflon®, Gore Tex®) analog zur Bypasschirurgie der „großen“ arteriellen Gefäße ist durch hohe Spontanverschlussraten aufgrund der geringen Biokompatibilität der luminalen Gefäßoberflächen gekennzeichnet [8] [22].

Im Rahmen des „tissue-engineering“ generierte alloplastische Gefäßprothesen werden inzwischen erfolgreich mit Endothelzellen besiedelt, um eine verbesserte Biokompatibilität und verringerte Thrombogenität zu gewährleisten [25] [18]. Die Implantation von autolog endothelialisierten Gefäßprothesen ist klinische Realität und zeigt ermutigende Langzeitergebnisse [21, 27]. Als Problem stellt sich dabei zunehmend die Gewinnung und Kultivierung von autologen

Endothelzellen dar. Eine Alternative zu autologen Endothelzelltransplantaten stellen allogene humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) dar. Die Isolation von Nabelschnurendothelzellen hat sich als einfache und effektive Methode erwiesen, ausreichende Mengen an Endothelzellen in hoher Reinheit und mit guter proliferativer Potenz zu gewinnen [28].

Die Kryokonservierung und Kultur dieser Zellen ist gut etabliert und die verwendeten Medien gut definiert. Die Verwendung serumfreier Medien im Rahmen des GMP ist möglich.

Bei der Verwendung allogenen Zellmaterials im Rahmen des „Tissue engineering“ ergibt sich jedoch das Problem der Transplantatabstoßung [29] [31].

Die Hauptursache der immunologischen Erkennung und Abstoßung allogener Transplantate ist die Expression von Haupthistokompatibilitätsantigenen in Spendergeweben und die Erkennung dieser durch Empfängerlymphozyten [107] [101] [37] [45].

Innerhalb dieser Mechanismen nimmt die Erkennung und Zerstörung Fremd MHC I exprimierender Spenderzellen durch allospezifische zytotoxische T-Lymphozyten eine Hauptrolle ein.

Ein möglicher Ansatz zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung ist die Modulation oder Verminderung der MHC I Oberflächenexpression auf den Spenderzellen, um diese vor einer allospezifischen Lyse durch Empfänger T-Lymphozyten zu schützen [54].

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unseren Untersuchungen testeten wir ein künstlich generiertes und im ER-Kompartiment der Zelle zurückgehaltenes Antikörperfragment, das ein nicht polymorphes Epitop des MHC I-Moleküls bindet und so seine Oberflächenexpression verhindert [94].

Dieser „Intrabody“ wurde durch adenoviralen Gentransfer in primäre humane Endothelzellkulturen transduziert. Der Effekt auf die MHC I-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch ermittelt und funktionelle Konsequenzen dieser veränderten MHC I-Dichte im Rahmen eines Zytotoxizitätstests untersucht [103].

Der Gentransfer durch adenovirale Transduktion erwies sich mit über 90 %

transduzierten Zellen als sehr effektiv. Im Bezug auf das Zellwachstum und die Zellmorphologie wurden keine negativen Auswirkungen beobachtet (siehe Abschnitt 4.4)

Der Transfer von MHC I-bindenden Intrabodys in humane Endothelzellen führte zu einer dramatischen Reduktion der MHC I Oberflächenexpression, die einem phänotypischen „Knock-out“ nahe kommt (s. 4.5.1).

Die Stimulation solcherart veränderter HUVEC mit proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und TNF- α war nicht in der Lage, eine wesentliche Zunahme der MHC I-Oberflächendichte zu erzielen (s. 4.5.2).

Die mit einem adenoviralem Kontrollvektor transduzierten HUVEC verhielten sich im Wesentlichen wie nicht genetisch veränderte HUVEC. Die adenovirale Transduktion des Intrabodys hatte auf die Expression anderer Oberflächmoleküle keinen wesentlichen Einfluss (s. 4.6).

Im Rahmen der Untersuchung funktioneller Effekte der Transduktion mit dem Intrabody konnte festgestellt werden, dass allospezifische zytotoxische T-Zellen Intrabody transduzierte HUVEC in wesentlich geringerem Maße lysierten als Kontrollvektor transduzierte oder genetisch unveränderte HUVEC desselben Genotyps. Das Niveau der Zellyse Intrabody behandelter allogener HUVEC lag in etwa auf dem Niveau einer MHC I-verschiedenen HUVEC-Population (s. 4.7.5.3).

Die Reduktion der MHC I-abhängigen Abstoßung durch den Gentransfer von anti MHC I-Intrabodies könnte die Verwendung allogener Zellen in Zell- oder Gewebetransplantaten im Rahmen des „tissue-engineering“ ermöglichen. In unserem Falle betrifft dies die Besiedlung kleinkalibriger Kunststoffgefäßprothesen mit allogenen Endothelzellen im Rahmen der kardiovaskulären Bypasschirurgie.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Arbeitsschritte noch einmal betrachtet.

5.4 Die Isolation und Kultur humaner Nabelschnurendothelzellen

Die menschliche Plazenta, Nabelschnur und Nabelschnurblut sind Gewebe, die bei jeder Entbindung anfallen und aus vielerlei Hinsicht im Interesse der

Transplantationsmedizin stehen [108] [109].

Die ständige Verfügbarkeit, die ethische und rechtliche Unbedenklichkeit der Gewinnung, das geringe Alter der Zellen, deren hohe proliferative Potenz und ein z.T. erhaltenes weiteres Differenzierungspotential sind vielversprechend [110]. Weitere Aspekte, die für eine Speicherung dieser Gewebe in größerem Maßstab sprechen, sind die Möglichkeiten dem Spender selbst im Falle einer späteren Erkrankung körpereigene Gewebe zur Verfügung zu stellen, als auch die Schaffung einer genügend großen Gewebekbank für allogene Transplantationszwecke.

Die Gewinnung von primären Endothelzellen aus Nabelschnüren ist eine seit 30 Jahren etablierte Methode [28].

In der vorliegenden Arbeit konnten aus 6 verschiedenen Nabelschnüren sowohl HUVEC als auch BLC mit 5 verschiedenen HLA-Typen (bei einer eineiigen ZwillingsgGeburt) isoliert, kryokonserviert und über zahlreiche Zellpassagen kultiviert werden.

Ein Problem bei der Gewinnung von HUVEC für die klinische Anwendung ist sicherlich die Gefahr der Kontamination mit Keimen während der vaginalen Entbindung. In unserer Arbeit konnte die Problematik einer Übersiedlung mit Pilzen durch mehrfaches Waschen und Kultur in Antimykotika-haltigen Medien begegnet werden. Die Verwendung von Material aus Kaiserschnitten wäre alternativ denkbar.

Die Kultivierung von HUVEC über mehr als 12 Zellpassagen und die Lagerung in flüssigem Stickstoff stellten kein Problem dar.

5.5 *In vitro* Gentransfer in HUVEC

Die in unseren Versuchen verwendeten adenovirale Gentransfermethoden haben hinsichtlich der problematischen klinischen Anwendung in der Vergangenheit sicherlich Modellcharakter [111].

Die hohe Frequenz von spezifischer antiadenoviraler Immunität in der Bevölkerung, die nur vorübergehende transiente Expression von adenoviral eingebrachten Fremdgenen und die Gefahr toxischer Reaktionen stehen einer breiten klinischen Anwendung am Menschen derzeit im Wege [112]. Hinsicht-

lich Ihrer Zuverlässigkeit und der hohen Effizienz der Transduktion sind adenovirale Vektoren immer noch ein Standard bei der Gentherapie, an dem sich andere Verfahren orientieren müssen [113].

Die herkömmlichen Methoden der nichtviralen Gentherapie wie Ca-Phosphat Präzipitation, Transfektion mit liposomalen Transfektionssystemen etc. haben das Problem der geringen Effizienz des Gentransfers und sind für empfindliche humane Primärzellisolate schlecht geeignet. Die neueren Methoden der Nucleofection und Magnetofection als Weiterentwicklungen der Elektroporation sind für primäre humane Zellen geeignet und erreichen Effizienzen von ca. 40 % [52] [114]. Damit wären allerdings immer noch Selektionsschritte nötig, um nicht veränderte Zellen herauszusortieren. Weiterentwicklungen des adenoviralen Gentransfers sind die Verwendung weniger immunogener „gutless“ Vehikel [115] [102] [116] und die Entwicklung zellspezifisch transduzierender Vektoren [117].

Eine Alternative beim viralen Gentransfer ist die Verwendung von retroviralen Vektoren. Diese haben den Vorteil der festen Integration des Fremdgens in das Zellgenom, die stabile Expression und Weitergabe im Rahmen der Zellteilung.

Kritisch ist auch hier der Sicherheitsaspekt einer klinischen Anwendung am Menschen zu sehen.

5.6 MHC I-Oberflächenreduktion durch den Intrabody

Die Transduktion von HUVEC mit dem Intrabody führte zu einer durchflusszytometrisch ermittelten Reduktion der MHC I-Oberflächenexpression auf 8 % des Vergleichswertes. Die Transduktion der Endothelzellen mit adenoviralen Kontrollvektoren ergab eher eine – allerdings nicht signifikante –Steigerung der MHC I-Expression auf 119 % der unveränderten Zellen.

Diese anti MHC I Intrabody vermittelte Reduktion kommt einem MHC I-„Knock-out“-Phänotyp nahe.

Unter der Wirkung proinflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ und TNF- α stieg die MHC I-Expression der Intrabody-transduzierten HUVEC nur geringfügig an. Dieser geringfügige Anstieg ist wahrscheinlich auf die nicht erfolg-

reich transduzierte Zellpopulation zurückzuführen.

Ziel weiterer Untersuchungen wäre es, das Schicksal der intrazellulär retinierten MHC I / Intrabody-Komplexe weiterzuverfolgen. Kombinierte extra- und intrazelluläre anti MHC I-Färbungen erbrachten keinen Hinweis auf eine erhöhte intrazelluläre MHC I-Konzentration. Dieser Effekt war allerdings auf analog behandelten Rattenkeratinozyten und humanen 293-Zellen zu beobachten. Der weitere proteolytische Abbau des Proteinensembles bleibt bislang unklar. Wahrscheinlich erfolgt ein proteosomaler Abbau im Zytosol [118]. Ein Einfluss der adenoviralen Transduktion auf den Zellzyklus und die Morphologie transduzierter HUVEC in der *in vitro*-Kultivierung wurde in unseren Experimenten nicht beobachtet. Allerdings erfolgte in unseren Versuchen keine dauerhafte Kultivierung adenoviral transduzierter Zellen (max. 1 Passage entsprechend etwa 3 Teilungszyklen).

5.7 Auswirkungen des Gentransfers auf die Oberflächenexpression anderer Moleküle

Die adenovirale Transduktion von HUVEC führte zu einer Steigerung der Oberflächenexpression aller durchflusszytometrisch ermittelten Oberflächenmoleküle, gleich welches Konstrukt genau verwendet wurde. Es wird eine allgemeine Zellaktivierung aufgrund der viralen Infektion vermutet [119] [115] [107]. [120] *In-vivo* Studien zeigen am arteriellen Transplantationsmodell nach adenoviralen Transduktionen Endothelzellaktivierung, inflammatorische Reaktionen im umliegenden Gefäßbindegewebe und nachfolgend auch Einflüsse auf die Transgenexpression [121]. Aus transplantationsmedizinischer Sicht ist eine solche Aktivierung des Spendergewebes noch vor einer Transplantation unbedingt zu vermeiden, um eine Abstoßung zu verhindern. Auf die MHC I Expression bezogen bedeutet dies, dass sich bei Verwendung einer anderen Gentherapiemethode ohne allgemeine Zellaktivierung und bei noch besserer Transfereffizienz die MHC I-Dichte auf der Zelloberfläche noch weiter verringern ließe.

Eine weitere hypothetische Möglichkeit beruht auf der Annahme einer nur transienten Aktivierung der Zellen durch eine adenovirale Transduktion. In

diesem Falle wäre von einem Rückgang der Aktivierungsparameter während einer verlängerten *in vitro*-Kulturphase nach adenoviraler Transduktion auszugehen.

Insgesamt ließ sich speziell ein Einfluss der Intrabody Transduktion auf die Expression anderer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch nicht nachweisen. Die Oberflächendichte der Marker MHC II, CD 54, CD 71 und CD 31 war in Kontrollvektor transduzierten und Intrabody transduzierten Zellen jeweils vergleichbar. Unter Stimulationsbedingungen mit proinflammatorischen Zytokinen ließ sich die Expression der Moleküle CD 54, MHC II und CD 71 gleichermaßen induzieren, während CD 31 davon nicht beeinflusst wurde.

5.8 Generierung von allospezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten für das Abstoßungsmodell

Zur effektiven Stimulation nativer HLA divergenter Lymphozyten war neben einer Präsentation des Antigens mit Hilfe kompetenter Antigen präsentierender Zellen auch eine zusätzliche IL-2 Gabe nötig. Der einfachste Weg wäre die Präsentation des Antigens über allogene APZ, die sowohl über eine ausreichende Dichte an Fremd MHC I-Molekülen und zur Präsentation notwendiger MHC II- und kostimulatorischer Moleküle verfügen. HUVEC als nicht professionelle APZ induzieren nur sehr begrenzte T-Zellantworten und die so generierten Effektorzellen unterscheiden sich von T-Lymphozyten, die z.B. im Rahmen einer „mixed lymphocyte culture“ (MLC) gewonnen wurden [98] [101]. In der Ko-Kultur verwendeten wir mit EBV immortalisierte Nabelschnur-B-Zellen (BLC) als Stimulatorzellen, die mit 100 Gy bestrahlt wurden. Die verwendete Strahlendosis verhinderte eine weitere BLC-Proliferation, ohne die Eigenschaften als professionelle APZ, insbesondere die MHC II-Expression zu beeinträchtigen [104].

Bei Verwendung von frisch isolierten PBMC als Responderzellen in der Ko-Kultur erzielten wir zwar eine gute Proliferationsantwort, ausreichende Mengen an CD 8+ und CD 4+ T-Zellen und auch eine T-Zellaktivierung mit einer CD 25-Induktion, jedoch funktionell keine allospezifische und durch TZR-Blockade aufhebbarer Zielzellyse.

Erst die Verwendung von aus PBMC isolierten CD8+ T-Zellen führte zur Generierung allospezifischer zytotoxischer Zellen, deren Lyseaktivität sich durch eine TZR-Blockade mit OKT 3 Antikörpern blockieren ließ. Allerdings war dies auch nicht in allen durchgeführten Ko-Kulturen der Fall. In 6 von 12 angefangenen Ko-Kulturen war die zytotoxische Potenz der Effektorzellen sehr schwach und eine allospezifische Aktivität nicht messbar. Dabei ließen sich bezüglich der Proliferationsaktivität in der Ko-Kultur oder der durchgeführten durchflusszytometrischen Kontrollen der Aktivierungsparameter keine Vorhersagen treffen.

Durch Verwendung gezielt nach allospezifischer Lyseeffizienz isolierter T-Zelllinien ließen sich verlässlichere und auch quantitativ besser auswertbare Resultate erzielen, allerdings wäre der Modellcharakter dieses Protokolls noch stärker ausgeprägt.

Mit unseren Ergebnissen lässt sich die Aussage treffen, dass Intrabody transduzierte HUVEC vor einer Zellyse durch allospezifische zytotoxische CD8+ Zellen geschützt sind. Das Niveau Ihrer Empfindlichkeit ist dem einer HLA verschiedenen 3rd party Kontrolle vergleichbar, während native oder Kontrollvektor transduzierte HUVEC in wesentlich stärkerem Maße allospezifisch abgetötet werden.

5.9 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Hinsichtlich der Bedeutung MHC I-defizienter Zellen innerhalb eines Transplantationsmodells ergeben sich weitere Fragen.

Die MHC I-Reduktion kann eine unspezifische Immunantwort im Rahmen der angeborenen Immunität nicht verhindern. Solche Spenderzellen sind also inflammatorischen Einflüssen in gleichermaßen ausgesetzt wie unveränderte Zellen. Weiterhin kann eine MHC I-Reduktion eine Antigenpräsentation durch empfängereigene APZ eine CD 4+ T-Lymphozytenaktivierung und eine nachfolgend ausgelöste humorale Immunantwort nicht beeinflussen.

Eine weitere Frage bezüglich der praktischen Bedeutung MHC I-defizienter Zellen ist die angeborene NK-Zell Immunität [122]. In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass MHC I defiziente Zellen vermehrt Angriffen durch NK-Zellen ausgesetzt waren.

NK-Zellen tragen neben dem T-Zell spezifischen CD 3-Rezeptor das CD 16 Antigen auf ihrer Zelloberfläche. Über KIR Rezeptoren auf NK-Zellen werden verschiedene MHC I Moleküle als Liganden erkannt. Der Funktionsmechanismus der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität funktioniert über das Prinzip des „Missing self“ („fehlendes Selbst“). Die Aktivität der NK-Zelle wird durch eine KIR-MHC I Interaktion reguliert und führt zu einer Inhibition der entsprechenden NK-Zelle mit einer ausbleibenden Zelllyse [123] [124]. Die Steigerung der MHC I Oberflächenexpression durch proinflammatorische Zytokine ist in der Lage, Endothelzellen vor einer NK-Zelllyse zu schützen [125].

Bei reduzierter MHC I-Oberflächenexpression, wie sie z.B. Im Rahmen eines Virusbefalls auftreten kann, fehlt eine suffiziente KIR-MHC I Interaktion und die NK-Zelle wird aktiviert. So wurde experimentell gezeigt, dass murine TAP-defiziente und MHC I reduzierte syngene Fibroblasten verstärkt durch NK-Zellen lysiert wurden [126].

Allerdings scheinen hierbei nicht alle MHC I-Klassen eine gleich starke Bedeutung zu besitzen. Die Überexpression des plazentaspezifischen MHC I-Klasse-G-Moleküls war in der Lage humane Zellen vor einer NK-Zelllyse zu schützen [127].

In Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings bei Intrabody transduzierten MHC I-reduzierten Rattenendothelzellen keine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen nachgewiesen werden. Eventuell reicht die verbliebene MHC I-Oberflächenexpression aus, eine NK-Zell vermittelte Zytotoxizität zu unterdrücken. Analog dazu wurde im murinen Hauttransplantationsmodell mit β 2-Mikroglobulin „Knock-out“ Mäusen keine vermehrte NK-Zell Aktivierung trotz verminderter MHC I-Oberflächenreduktion beobachtet.

Weitergehend wäre die Durchführung von NK-Zell-Zytotoxizitätsassays an Intrabody transduzierten HUVEC und die Etablierung eines murinen SCID-Transplantationsmodells die nächsten Schritte [128].

Parallel dazu sollten die Methoden des Gentransfers des anti-MHC I Intrabody optimiert werden. „Gutless adenoviral vectors“ oder retrovirale Vektoren bzw. alternative Methoden der Transfection sollten hinsichtlich Effizienz, Transgenexpression und potentielle Zytotoxizität geprüft werden.

Außerdem ist parallel zum bereits etablierten Rattenmodell die Besiedlung von kleinkalibrigen Kunststoffprothesen mit gentherapeutisch modifizierten humanen Endothelzellen etablieren.

Die klinische Anwendung gentherapeutisch modifizierter allogener Endothelzelltransplantate am Menschen ist, wie bereits in der Einleitung erläutert, obwohl technisch sicherlich realisierbar, vorerst noch grundsätzlich hinsichtlich ethischer Gesichtspunkte zu prüfen.