

Aus dem  
Charité Centrum für Dermatologie und Innere Medizin  
Institut für Medizinische Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Volk

## **Habilitationsschrift**

### **Neue Strategien zur Modulation adaptiver Immunantworten gegenüber primären epithelialen und endothelialen Zellen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Immunologie

vorgelegt dem Medizinischen Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Martina Seifert**

geb. am 16.03.1962 in Hohen Neuendorf

Eingereicht: Juni 2008

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Heike Mertsching
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwitzer

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<i>Zusammenfassung</i>	4
<i>Abkürzungen</i>	5
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Mechanismen der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort gegenüber allogenen Zell- und Gewebetransplantaten</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Der besondere Status der MHC-Moleküle im allogenen Rejektionsprozess</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Modulation der adaptiven Immunantwort durch das Zytokin IL-10</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Hemmung der adaptiven Immunantwort durch Modifizierung der MHC I-Expression</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Tissue Engineering und Immunmodulation von Keratinozyten für die Erzeugung von artifiziellm Hautersatz</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Kombination von Tissue Engineering und Intrabody-Strategie für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen</b>	<b>14</b>
<b>1.7. Übersicht der bearbeiteten Fragestellungen</b>	<b>16</b>
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Modulation der Immunantwort durch Anwendung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 - Effekte auf Immunzellen und Keratinozyten</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Gentherapeutische Modulation von MHC I-Molekülen auf primären Zellen zur Anwendung im Tissue Engineering</b>	<b>28</b>
<i>2.2.1. Etablierung von anti-MHC I-Intrabodies und Testung an epithelialen Zelllinien und primären Keratinozyten</i>	28
<i>2.2.2. Modulation der MHC I-Expression auf humanen und Ratten-Endothelzellen durch anti-MHC I-Intrabody-Expression</i>	53
<b>2.3. Modulation der Immunantwort durch Anwendung der Intrabody-Strategie gegenüber vaskulären Transplantaten im Rattenmodell</b>	<b>72</b>

<b>3. Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>3.1. Primäre Keratinozyten als Zielzellen einer Immunmodulation durch Zytokine</b>	<b>82</b>
<b>3.2. Immunmodulation durch Hemmung der MHC I-Expression auf primären epithelialen und endothelialen Zellen</b>	<b>83</b>
<b>3.3. Anwendungen MHC I-defizienter primärer Zellen in der Entwicklung von Gewebeersatz mittels Tissue Engineering</b>	<b>87</b>
<b>3.4. Probleme bei der Applikation MHC I-defizienter Gewebe und Ausblick</b>	<b>89</b>
<b>4. Referenzen</b>	<b>92</b>
<b>5. Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>6. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>104</b>

## Zusammenfassung

Transplantationen primärer körperfremder (allogener) Zellen und Gewebe stehen im Focus des sich rasch entwickelnden Gebietes der Regenerativen Medizin. Auch wenn in einem gewissen Umfang auf die Nutzung körpereigener (autologer) Zell-Ressourcen durch eine Gewinnung und anschließende *ex vivo*-Vermehrung zurückgegriffen werden kann, ergibt sich zunehmend die Notwendigkeit, über die Applikation allogener Zellen nachzudenken. Damit verbunden ist jedoch das Problem einer Induktion von Prozessen der adaptiven Immunantwort mit einem Spektrum von zellulären und humoralen Komponenten. Auch Zytokine, als Modulatoren und Amplifikatoren dieser Prozesse, spielen dabei eine ganz entscheidende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit werden am Beispiel von Epithel- und Endothelzellen experimentelle Ansätze vorgestellt, die adaptive Immunantwort gegenüber allogenen primären Zellen zu modulieren. Durch die intrazelluläre Expression von Fragmenten eines anti-MHC Klasse I-Antikörpers (Intrabody) unter Anwendung verschiedener Gentransferverfahren kann die Oberflächenexpression dieser wichtigen allogenen Erkennungsstruktur modifiziert werden. Phänotypische Charakterisierungen sowie zelluläre und humorale Testsysteme an Keratinozyten und Endothelzellen der Ratte und des Menschen belegen eindrucksvoll die immunmodulierende Kapazität dieses Intrabody-Prinzips. Ursprünglich allogene primäre Zellen sind somit signifikant weniger empfindlich gegenüber einer Attacke zytotoxischer T-Zellen und ihrer Zytokine als auch gegenüber Allo-Antikörper/Komplement-vermittelten lytischen Prozessen.

In einem ersten *in vivo*-Carotis-Transplantationsmodell der Ratte kann das protektive Prinzip der Intrabody-vermittelten Strategie durch eine Reduktion typischer Rejektionsmerkmale, wie der zellulären Infiltration und einer Intimahyperplasie, nachgewiesen werden. Limitationen des Systems zeigen sich jedoch in Form eines teilweise revertierten MHC Klasse I-Expressionsniveaus unter pro-inflammatorischen Bedingungen.

Das immunmodulierende Prinzip mittels anti-MHC Klasse I-spezifischer Antikörperfragmente eröffnet für die künftige therapeutische Anwendung allogener Zellen ein tragfähiges Konzept insbesondere im Bereich des Tissue Engineering von Gewebeersatzstrukturen.

## Abkürzungen

Ad	Adenovirus
AAT	alpha-anti-Trypsin
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
CD	Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation)
CMV	Cytomegalovirus
CTL	zytotoxische T-Zelle (Cytotoxic T Lymphocyte)
CTLA-4	ko-stimulatorisches Molekül auf T-Zellen (CD152)
EBV	Epstein-Barr Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
EC	Endothelzellen
FACS	fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
gp	Glykoprotein
GvH	Graft versus Host Disease
hu	human
HLA	Human Leucocyte Antigen
hrGFP	humanized Renilla Green Fluorescence Protein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IB	Intrabody
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICOS	induzierbarer Ko-Stimulator
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IRES	Intra Ribosomal Entry Site
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LFA	Leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-1 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-L1	Programmed death ligand-1
PE	R-Phycoerythrin
ra	Ratten
RNA	Ribonukleinsäure
scFv	Single-chain variable fragment
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
siRNA	small interfering RNA
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAP	Transporter assoziiert mit Antigen-Präsentation
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TCR	T-Zell-Rezeptor
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase

## 1. Einleitung

Innerhalb der Transplantationsforschung nimmt die Übertragung von allogenen primären Zellen bzw. von zusammengesetzten Geweben eine Sonderstellung ein. Obwohl die gleichen Prinzipien der angeborenen und adaptiven Immunantwort auch für diesen speziellen Typ einer Transplantation zutreffen, zeichnet er sich durch einige Besonderheiten aus. Durch die völlige Abwesenheit bzw. einen stark reduzierten Gehalt an antigenpräsentierenden Zellen (APC) treten die Mechanismen der direkten Antigenpräsentation in den Hintergrund, während die Prozesse der Induktion einer Abstoßungsreaktion, initiiert durch indirekte Mechanismen einer Antigenpräsentation, nach wie vor wirksam werden können. Die Verwendung von primären Zellen oder Gewebeverbänden bietet andererseits auch die einmalige Chance einer *ex vivo*-Modifikation von potentiell immunogen wirksamen Eigenschaften der Zellen zur Verhinderung oder Abschwächung des Rejektionsprozesses nach einer allogenen Transplantation. Möglichkeiten für eine derartige Modifikation oder Beeinflussung der adaptiven Immunantwort ergeben sich zum einen durch eine Behandlung der Zellen mit ausgewählten Zytokinen als auch durch eine gentherapeutische Modifikation von Schlüsselmolekülen des Rejektionsgeschehens, den MHC Klasse I (MHC I)-Molekülen.

In der vorliegenden Habilitationsschrift werden beide Ansätze am Beispiel von primären epithelialen Zellen (humane und Ratten-Keratinozyten) sowie den endothelialen Zellen (Humane Nabelschnur-Venen-Endothelzellen (HUVEC) und Ratten-Aortenendothelzellen) verfolgt und mit experimentellen Daten untermauert. Beide untersuchten Zelltypen zählen zudem zu den so genannten nicht-professionellen APC und exprimieren konstitutiv nur MHC I-, nicht aber MHC Klasse II (MHC II)-Moleküle. Zunächst werden die Effekte einer Behandlung von humanen Keratinozyten mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 einer näheren Betrachtung unterzogen. Hierbei werden insbesondere auch Zusammenhänge mit der Immunpathogenese des dermatologischen Erkrankungsbildes der Psoriasis aufgedeckt. In einem zweiten Themenkomplex wird dann ein von uns entwickeltes neues therapeutisches Prinzip zur Hemmung der MHC I-Oberflächenexpression mittels eines so genannten „Intrabodies“ vorgestellt und sowohl die Effekte an Keratinozyten als auch Endothelzellen *in vitro* demonstriert. Letztlich wird in einer ersten *in vivo*-Studie im Ratten-Modell die Wirksamkeit dieses

neu entwickelten therapeutischen Ansatzes auf der Basis von intrazellulär exprimierten Antikörpern (Intrabodies) gegen MHC I-Antigene belegt.

### **1.1. Mechanismen der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort gegenüber alloenen Zell- und Gewebetransplantaten**

Die Erkennung von Antigenen erfolgt im Verlaufe der adaptiven Immunantwort sowohl durch die Immunglobulinrezeptoren auf B-Zellen als auch durch die antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen. Beide Rezeptorgruppen zeichnen sich durch eine hohe Variabilität ihrer Strukturen aus, die eine Erkennung der vielfältigen Antigenstrukturen und damit den Schutz des Organismus gewährleistet.

Während eine Stimulation der B-Zellen direkt über den Immunglobulinrezeptor in Verbindung mit ko-stimulatorischen Signalen erfolgt, kann es beim T-Zell-Rezeptor nur zu einer Erkennung von fremden Antigenstrukturen in Form von prozessierten Peptiden im Kontext mit Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (auch als MHC-Komplex bezeichnet), den MHC I- und MHC II-Molekülen kommen [Hernandez-Fuentes *et al.* 1999; Rogers und Lechler 2001]. Die präsentierten Peptide werden durch den Vorgang der Antigenprozessierung generiert und anschließend zusammen mit den MHC-Molekülen auf der Oberfläche der APC exprimiert. Eine wichtige Rolle beim zytosolischen Proteinabbau spielt hierbei der multikatalytische Proteasekomplex, das Proteasom, welcher Peptide für einen Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) erzeugen kann. Auch Peptide, die von sezernierten Proteinen oder Membranproteinen stammen, werden während ihrer Synthese in das Lumen des ER transportiert.

Neue MHC I-Moleküle binden im ER zunächst an das Chaperon-Protein Calnexin, wodurch der partiell gefaltete Zustand des MHC I-Moleküls erhalten bleibt. Nach erfolgter Bindung des assoziierten  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Moleküls kommt es zu einer Dissoziation des MHC I- $\alpha$ -Ketten-Calnexin-Komplexes und zu einer Anlagerung an einen weiteren Proteinkomplex, insbesondere an dessen integralen Bestandteil Calreticulin, sowie auch an Tapasin. Wird nun ein passendes Peptid durch zytosolischen Abbau generiert und durch den TAP-Transporter in das ER transportiert, kommt es zu einer Beladung der MHC I-Moleküle mit dem Peptid und zu einer Ausschleusung über den Golgi-Apparat bis an die Zelloberfläche.

Im Gegensatz zur Transplantation von soliden Organen, werden bei einer Übertragung von primären Zellen oder Geweben, wie beispielsweise bei Keratinozyten oder Endothelzellen, keine oder nur sehr wenige APC transferiert. Während man früher eine nur schwache Abstoßung dieser Transplantate annahm, konnte später am Beispiel der Transplantation von Keratinozyten-Sheets deutlich gezeigt werden, dass es zu einer Abstoßung, vermittelt durch das Einwandern von APC des Empfängers, kommt [Aubock *et al.* 1988; Rouabhia *et al.* 1993]. Die Erkennung dieser Zellen erfolgt somit im Falle einer allogenen Transplantation ausschließlich auf indirektem Weg. Hierbei werden allogene MHC-Moleküle durch eine zytosolische Zerlegung in Peptide auf den APC des Transplantatempfängers exprimiert [Game und Lechler 2002; Heeger 2003]. Die erzeugte Immunantwort ist demzufolge zeitlich etwas verzögert, deren Wirksamkeit in Bezug auf die Zerstörung der transplantierten Zellen und Gewebe wird aber nicht reduziert. Insbesondere sind in diese Abstoßungsreaktionen CD4(+)-T-Zellen, die Fremd-Peptide im Kontext mit MHC II-Molekülen erkennen, involviert. Aber auch CD8(+)-T-Zellen, sowie Makrophagen und B-Zellen können im Verlauf einer solchen verzögerten Rejektion wirksam werden.

Primäre Zellen, wie Keratinozyten und Endothelzellen, weisen jedoch eine wichtige Besonderheit auf. Sie können als so genannte „nicht-professionelle“ APC fungieren und somit ebenso den Rejektionsprozess vorantreiben. Beide Zelltypen exprimieren konstitutiv nur MHC I, jedoch nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  auch MHC II. Über nicht-klassische ko-stimulatorische Moleküle, wie beispielsweise ICOS-L und PD-L1 auf Endothelzellen, könnten spezifische Effektor-T-Zellen generiert werden, die auf die allospezifische Immunantwort Einfluß nehmen [Marelli-Berg und Jarmin 2004]. Für Maus-Endothelzellen wurde gezeigt, dass es zu einer direkten Aktivierung von CD8(+)-T-Zellen kommt, die sowohl proliferieren, als auch zu Effektorzellen differenzieren können [Kreisel *et al.* 2002].

Durch die fehlende Übertragung von APC des Spenders selbst kann eine Immunantwort relativ gut über eine Modifikation der Expression von MHC I-Molekülen auf der Oberfläche der transplantierten Zellen oder Gewebe beeinflusst werden. Diese Modulation eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten im Bereich des „Tissue Engineering“ durch die Verwendung von allogenen Zellen als integralem Bestandteil eines Zell- oder Gewebetransplantates, wie beispielsweise artifiziellem Haut- oder Blutgefäßersatz.



## **1.2. Der besondere Status der MHC-Moleküle im allogenen Rejektionsprozess**

Die hochgradig polymorphen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes sind von ganz entscheidender Bedeutung für die Immunantwort des Empfängers gegenüber einem nicht-MHC-identischen (allogenen) Transplantat [Sherman und Chattopadhyay 1993]. Die Stärke, die Dauer und die klinische Bedeutung der T-Zell-Reaktionen gegenüber MHC-Molekülen der Klasse I und II ist bei Organ- und Knochenmarks-Transplantationen annähernd gleich [Csencsits und Bishop 2003] und muß ebenso bei der Übertragung von allogenen Zellen oder Geweben berücksichtigt werden. Es ist hinlänglich bekannt, dass die Frequenz der allospezifischen T-Zellen um das 1000-Fache höher ist als die normale Frequenz der T-Zellen gegenüber anderen Antigenen. Dieser Umstand bewirkt eine extrem starke primäre Immunantwort gegenüber dem allogenen Transplantat [Suchin *et al.* 2001]. Zahlreiche Untersuchungen haben sich in der Vergangenheit mit der Frage beschäftigt, welchen Einfluss die Bindung endogener Peptide an MHC I- oder MHC II-Moleküle auf die alloreaktive T-Zell-Antwort hat [Heath *et al.* 1991; Weber *et al.* 1995; Sayegh *et al.* 2003]. Aktuell wird die starke alloreaktive T-Zell-Antwort weniger mit einer Peptid-spezifischen als mit einer Peptid-MHC-Gesamtkomplex-spezifischen Antwort erklärt [Wang und Reinherz 2000; Housset und Malissen 2003]. Dieser Grad an so genannter „Degeneration“ oder „Promiscuität“ in der Interaktion von T-Zell-Rezeptor (TCR) und Peptid-MHC-Komplex wird jedoch weiterhin in der Fachliteratur diskutiert [Nikolich-Zugich 2007]. Neuere Untersuchungen im murinen System belegen einen hohen Grad an „Polyspezifität“ der alloreaktiven T-Zellen [Felix *et al.* 2007].

## **1.3. Modulation der adaptiven Immunantwort durch das Zytokin IL-10**

Zytokine sind neben der Interaktion von T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-Peptid-Komplex wesentliche Mediatoren, Amplifikatoren bzw. Ko-Stimulatoren der adaptiven Immunantwort. Das Spektrum produzierter Zytokine durch T-Zellen bestimmt die Ausübung ihrer Effektorfunktionen. Die Regulation des Zytokinnetzwerkes ist ganz entscheidend für die Homeostase des Organismus und eine Dysregulation der Zytokinproduktion kann zur Entstehung pathologischer Effekte beitragen. Zytokine

bestimmen ganz wesentlich die Balance des Th1/Th2-Verhältnisses in Bezug auf deren Entwicklung und Funktion im immunologischen Geschehen.

Das Zytokin IL-10 spielt im Netzwerk der Zytokine eine ganz zentrale Rolle und wird von verschiedenen Immunzellen, wie beispielsweise Monozyten, B-Zellen und T-Zellen produziert. Ursprünglich 1989 entdeckt, sind seine biologischen Funktionen gut charakterisiert [Moore *et al.* 2001]. Seither wurden einige strukturell verwandte Zytokine der IL-10-Familie beschrieben, wie beispielsweise IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26 [Boniface *et al.* 2005]. IL-10 vermittelt seine biologischen Effekte über den IL-10-Rezeptor1(R1)/IL-10-Rezeptor2(R2) [Kotenko *et al.* 1997]. Die IL-10R2-Kette ist auch Bestandteil des IL-22-Rezeptors, zusammen mit der IL-22R1-Kette [Kotenko *et al.* 2001], sowie Komponente des IL-26-Rezeptors, assoziiert mit der IL-20R1-Kette [Sheikh *et al.* 2004]. Die IL-10R2-Kette ist auf vielen Zelltypen des Organismus exprimiert. Das Spektrum der biologischen Reaktionen von Zellen wird demnach maßgeblich durch das Expressionsmuster von IL-10R1, IL-22R1 und IL-20R1 bestimmt. Die IL-10R1 Untereinheit wird hauptsächlich in lymphoiden Geweben und auf Immunzellen exprimiert, aber auch schwach in der Haut, im Pankreas und in der Leber [Wolk *et al.* 2002].

Die multifunktionellen Effekte von IL-10 zeigen sich in einer Hemmung der Antigenpräsentation durch Makrophagen und dendritische Zellen [Macatonia *et al.* 1993; Enk *et al.* 1993; Peguet-Navarro *et al.* 1994] als auch der Proliferation von CD4(+)-T-Zellen [De Waal Malefit *et al.* 1991]. IL-10 führt außerdem zu einer Inhibition der Zytokinsynthese durch T-Zellen [De Waal Malefit *et al.* 1993] als auch von pro-inflammatorischen Zytokinen der Monozyten/Makrophagen [De Waal Malefit *et al.* 1991; Fiorentino *et al.* 1991]. IL-10 ist ebenfalls in der Lage, in Monozyten die Expression von anti-inflammatorisch wirksamen Molekülen, wie IL-1-Rezeptor-Antagonist und löslichem TNF-Rezeptor, zu erhöhen [Moore *et al.* 2001]. Auf der anderen Seite kann IL-10 die Differenzierung von Th2-Zellen durch die Hemmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion aktivierter T-Zellen unterstützen [D'Andrea *et al.* 1993]. Ganz im Gegensatz zu den anti-inflammatorischen Effekten von IL-10 werden für die anderen Mitglieder der IL-10-Familie eher pro-inflammatorische Wirkungen beschrieben [Boniface *et al.* 2005].

Die Beteiligung von IL-10 an physiologischen oder pathologischen Prozessen der Haut wird in der Literatur zahlreich diskutiert. So wurde beschrieben, dass die IL-10-Expression in Hautproben von Patienten mit einer Th2-Pathologie, wie atopischer

Dermatitis, Melanomen und Lymphomen, stark erhöht ist [Kruger-Krasagakes *et al.* 1994; Ohmen *et al.* 1995; Asadullah *et al.* 1996]. Dagegen finden sich Hinweise auf eine IL-10-Defizienz in Th1-Typ-Erkrankungen, wie der Psoriasis [Asadullah *et al.* 1998].

#### **1.4. Hemmung der adaptiven Immunantwort durch Modifizierung der MHC-Expression**

In der Natur existieren verschiedene Mechanismen, die sich eine Hemmung der MHC I-Expression auf Zellen zu Nutze machen. Insbesondere Viren haben verschiedene Mechanismen entwickelt, sich so der adaptiven Immunantwort des Menschen zu entziehen. Beschrieben wurde beispielsweise die Retention von MHC I im ER durch das adenovirale Glykoprotein gp19 [Signas *et al.* 1982; Andersson *et al.* 1985; von Herrath *et al.* 1997; Lichtenstein *et al.* 2004], die proteolytische Spaltung der MHC I-Moleküle durch die Proteine US2 und US11 des humanen Cytomegalievirus (CMV) [Ahn *et al.* 1996; Chevalier und Johnson 2003; Lilley und Ploegh 2004] sowie auch eine Hemmung des TAP-vermittelten Peptidtransportes in das ER. Letzteres Prinzip wurde in verschiedenen Publikationen für das US6-Protein von humanem CMV [Ahn *et al.* 1997], für das Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Protein ICP47 [York *et al.* 1994], sowie für das MK3-Protein des murinen  $\gamma$ -Herpesvirus-68 [Stevenson *et al.* 2000; Boname *et al.* 2004], welches neben einer Degradation von MHC I auch zum Abbau des TAP-Transporters führt, beschrieben.

In Anlehnung an diese genannten viralen Mechanismen wurde die Strategie der Unterdrückung der MHC I-Oberflächenexpression durch einen intrazellulär exprimierten und gegen eine nicht-polymorphe Determinante des MHC I-Moleküls gerichteten Antikörper entwickelt. Intrazellulär exprimierte Antikörper, so genannte „Intrabodies“, sind bereits seit einigen Jahren als effektive Werkzeuge zur Hemmung der Expression von Oberflächenmolekülen beschrieben [Werge *et al.* 1990; Biocca *et al.* 1990; Chen *et al.* 1994; Lobato und Rabbitts 2003; Lo *et al.* 2008]. Die Expression der Antikörper bzw. Antikörperfragmente führt zu einer Retention und zum Abbau des von ihnen spezifisch gebundenen Proteins. Als Intrabodies werden überwiegend Fab oder scFv-Fragmente verwendet, welche von der nativen Antikörperstruktur abgeleitet sind. Das klassische scFv-Fragment besteht aus den variablen Teilen von schwerer und leichter Kette, die über einen Peptidlinker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> oder

Disulfidbrücken verbunden sind [Whitlow *et al.* 1993; Reiter *et al.* 1996]. Angefügte spezifische Signal-Polypeptide führen zu einem gerichteten Transport in ein definiertes Zellkompartiment [Biocca und Cattaneo 1995; Richardson und Marasco 1995], beispielsweise die Sequenz KDEL zu einer Retention im ER. Das Intrabody-Konzept wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für die Inhibition HIV-1 assoziierter Proteine [Marasco *et al.* 1993; Beerli *et al.* 1994; Aires da Silva *et al.* 2004], zur Beeinflussung der Expression von Onkogenen [Deshane *et al.* 1997; Cochet *et al.* 1998; Alvarez *et al.* 2000;] aber auch zur Hemmung der Expression des VEGF-Rezeptors [Wheeler *et al.* 2003], des EGF-Rezeptors [Hyland *et al.* 2003] und der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette [Richardson *et al.* 1998] beschrieben.

Gegenstand unserer eigenen Forschungsarbeiten ist die Hemmung der MHC I-Oberflächenexpression durch Einschleusung eines anti-MHC I-spezifischen Intrabodies in die gewünschten Zielzellen, wie Keratinozyten und Endothelzellen. Das Zurückhalten des scFv-Intrabody im ER der Zellen wird durch das Anfügen der Retentionssequenz KDEL erreicht. Der Intrabody ist somit im gleichen Kompartiment, wie auch die  $\alpha$ -Ketten des MHC I-Moleküls lokalisiert und kann durch direkte Bindung im ER den Transport an die Zelloberfläche verhindern.

Die Expression des anti-MHC I-spezifischen Intrabodies erfolgte mittels Transfektion oder durch viralen Gentransfer (adenoviral, lentiviral). Wir entwickelten sowohl einen anti-MHC I-spezifischen scFv-Intrabody für das Ratten-MHC I unter Verwendung des Antikörpers OX18 als auch einen anti-human-MHC I-spezifischen Antikörper, abgeleitet vom Antikörper BB7.7. Die resultierenden Intrabodies wurden von uns als **IB-OX18scFv** (Ratten-spezifisch) und **IB-8KscFv** (Human-spezifisch) bezeichnet. Primäre Zellen lassen sich *ex vivo* vor einer Transplantation in Bezug auf ihre MHC I-Expression modifizieren und induzieren so eine verminderte adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort als auch verminderte Erkennung durch alloreaktive Antikörper der Empfänger.

### **1.5. Tissue Engineering und Immunmodulation von Keratinozyten für die Erzeugung von artifiziellm Hautersatz**

Bei der Behandlung von akuten (z.B. Verbrennungen schwersten Grades) oder chronischen Hautwunden (z. B. Diabetischer Fuß-Ulcer) müssen zunächst die stark

geschädigten Hautareale möglichst schnell abgedeckt werden, um das Eindringen von Infektionserregern zu verhindern. Das Ziel jeder Behandlung von Patienten mit Hautersatz ist es, sowohl die anatomischen als auch die physiologischen Eigenschaften der normalen unverletzten Haut wiederherzustellen und damit die Morbidität und Mortalität von Patienten zu reduzieren. Die Herstellung von Hautersatzmaterialien durch das Tissue Engineering eröffnet einige neue Möglichkeiten für die Behandlung von akuten und chronischen Hautwunden [Balasubramani *et al.* 2001; Boyce *et al.* 2001; Kearney *et al.* 2001; Metcalf und Ferguson 2007].

In der Vergangenheit wurde die Applikation von allogener Haut [Hackett 1975], von Schweinehaut [Bromberg *et al.* 1965], von Amnionmembranen [Unger *et al.* 1976] sowie eines „meshed graft“ aus autologem Gewebe [Tanner *et al.* 1964] für den Hautersatz beschrieben. Auch wurden dünne epidermale Haut-Sheets aus autologen Keratinozyten *in vitro* angezchtet und für die Abdeckung von Vollhaut-Defekten verwendet [Meyers *et al.* 1995]. Diese Sheets sind jedoch fragil sowie gegenüber mechanischem Stress empfindlich [Desai *et al.* 1991] und neben einem hohen Zeit- und Kostenfaktor ist die Anwachsrate der Transplantate insgesamt gering. Neuere Entwicklungen, die auf autologe epidermale Ersatzmethoden zurückgehen, sind Sprays mit Keratinozyten und einer Fibrinkomponente wie CellSpray® [Navarro *et al.* 2000]. In der Folgezeit konzentrierte man sich auf Hautersatzmaterialien mit einer epidermalen als auch einer dermalen Komponente. Der Ersatz des Dermisanteiles kann zum einen durch Collagen oder andere Formen von Matrixproteinen erfolgen [Yang *et al.* 2000]. Hierbei können Fibroblasten in die dermale Matrix eingebracht werden, um die Proliferation der Keratinozyten in der Epidermis zu fördern [Lamme *et al.* 1998; Svensjö *et al.* 2002]. Dies führte zur Entwicklung von kommerziellen Präparaten wie Apligraf™ mit zwei Hautkomponenten, wobei neonatale Fibroblasten (für die Dermis) und Keratinozyten (für die Epidermis) als zelluläre Bestandteile verwendet werden [Wilkins *et al.* 1994; Falanga *et al.* 1998]. Weitere experimentelle Arbeiten mündeten in der Entwicklung eines azellulären dermalen Ersatzmaterials (Integra®) [Metcalf und Ferguson 2007].

Eine interessante Alternative zur dermalen Matrix auf Collagenbasis ist die Verwendung einer azellulären Dermis, die *in vitro* mit kultivierten Keratinozyten besiedelt [Ben-Bassat *et al.* 1992; Demarchez *et al.* 1992; McKay *et al.* 1994] und zur

Abdeckung von tiefen Hautwunden verwendet wird [Pandya *et al.* 1998; Boyce *et al.* 1999].

Die *ex vivo*-Herstellung eines Dermis-Epidermis-Transplantates erlaubt die Manipulation der antigenen Eigenschaften der epidermalen Zellen mittels gentechnischer Methoden und somit die funktionelle Elimination von Genen, die für die Initiation oder Propagierung des Rejektionsprozesses verantwortlich sind. Im Mausmodell konnte experimentell gezeigt werden, dass die Immunogenität von allogenen Haut-Sheet-Transplantaten durch fehlende MHC-Expression drastisch reduziert wird [Hultman *et al.* 1998]. Es könnte deshalb künftig sinnvoll sein, epidermale Zellen ohne MHC I-Expression auf der Dermis *ex vivo* zu kultivieren und dann als Hautersatz zu transplantieren. Außerdem stellen Keratinozyten einen geeigneten Zelltyp dar, um durch gentherapeutisch induzierte Expression von Molekülen den Wundheilungsprozess und das Einwachsen eines Hautersatzgewebes deutlich zu verbessern. Beispielsweise lässt sich durch eine VEGF Freisetzung die schnellere Gefäßanbindung des Transplantates erreichen [Hojo *et al.* 2003].

### **1.6. Kombination von Tissue Engineering und Intrabody Strategie für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen**

Im Bereich der kardiovaskulären Bypass-Chirurgie besteht ein stetig wachsender Bedarf an geeignetem kleinlumigem Gefäßersatz zur Wiederherstellung einer optimalen Versorgung des Herzmuskels. Ebenso werden Gefäßersatzstrukturen für die Bereitstellung einer Gefäßüberbrückung bei Dialysepatienten (Dialyse-Shunts), sowie für Operationen im Bereich der pädiatrischen Chirurgie benötigt. Nach wie vor gilt die Transplantation von autologen Gefäßen, wie der Brustwandarterie (A. thoracica interna) oder der Beinvene (V. saphena magna), als der „Goldstandard“ eines Gefäßersatzes. Probleme entstehen jedoch, wenn, bedingt durch das hohe Alter der Patienten oder einen schlechten Zustand der Gefäße durch Grunderkrankungen, kein geeignetes Material zur Verfügung steht. Einige Arbeitsgruppen beschreiben die Verwendung von xenogenen Gefäßen oder von kryokonservierten allogenen Gefäßen [Teebken *et al.* 2000; Schmidt und Baier 2000]. Probleme bestehen hierbei jedoch bezüglich der geringen Offenheitsrate, der Gefahr von Aneurismenbildungen oder auch durch ein immunogenes Potential der

Gefäßstrukturbestandteile und verbleibender zellulärer Komponenten. Deshalb wurden Verfahren einer Dezellularisierung von nativen Gefäßstrukturen und einer Stabilisierung durch Glutaraldehydvernetzung getestet. Vorteilhaft ist bei der Methode der Dezellularisierung, dass die nativen Matrixstrukturen, inklusive der Lamina elastica interna, erhalten bleiben [Kasimir *et al.* 2003; Mertsching, *et al.* 2005; Gilbert *et al.* 2006].

Alternativen zu diesen genannten Verfahren bestehen in der Herstellung verschiedener Typen des Gefäßersatzes auf dem Wege des „Tissue Engineering“ [Tebken und Haverich 2002; Nugent und Edelmann 2003; Zhang *et al.* 2007]. In den vergangenen Jahren wurden insbesondere bei der Entwicklung von englumigem Gefäßersatz große Anstrengungen unternommen. Während synthetische Materialien für den arteriellen Ersatz in Bereichen mit hohem Blutfluss und geringem Strömungswiderstand bereits erfolgreich verwendet werden, müssen für englumige Gefäße andere Lösungsmöglichkeiten entwickelt werden. Da es im Menschen zu keiner spontanen Endothelialisierung der implantierten Gefäßmatrix kommt, muss zur Vermeidung einer Thrombosierung eine Besiedlung mit EC *ex vivo* vor einer Implantation durchgeführt werden [Bordenave *et al.* 2005]. Hierbei werden Matrices, die sowohl aus Kunststoffmaterialien, wie ePTFE oder auch natürlichen azellularisierten Materialien bestehen können, mit einer luminalen Endothelzellschicht versehen. Einige wenige Arbeitsgruppen haben die erfolgreiche Anwendung endothelialisierter ePTFE-Prothesen als femoropopliteale Bypässe beschrieben [Deutsch *et al.* 1997; Meinhard *et al.* 2001; Meinhard *et al.* 2005]. Laube und Mitarbeiter [2000] zeigten als eine der wenigen Gruppen auch Erfolge mit ePTFE-Gefäßersatz bei kardialen Bypassoperationen. Alternative experimentelle Ansätze zielen hingegen auf die komplette Generierung eines Gefäßes aus den einzelnen Zellschichten des Blutgefäßes, wie von L'Heureux und Mitarbeitern beschrieben [1998; 2006; 2007]. In der Regel wird man auch hier eine Besiedlung mit autologen Endothelzellen vornehmen, um möglichst keine oder geringe Immunantworten zu induzieren.

Alle beschriebenen Verfahren setzen jedoch die zeitaufwändige und kostenintensive Anzucht von autologen EC voraus und sind so für Akutsituationen völlig ungeeignet. An diesem Punkt setzt die Strategie zur Modulation der allogenen Eigenschaften von EC durch gezielte Unterdrückung der MHC I-Expression an, um eine universelle Spenderzelle zur luminalen Besiedlung von Gefäßersatzmaterialien bereitzustellen.

## 1.7. Übersicht der bearbeiteten Fragestellungen

Auf der Basis der in den Abschnitten 1.1. bis 1.6. dargelegten wissenschaftlichen Erkenntnisse und Hintergründe ergaben sich für meine Arbeit folgende zu bearbeitende Fragestellungen:

1. Können anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, direkten Einfluss auf primäre epitheliale Zellen ausüben und damit die Prozesse der adaptiven Immunantwort im Verlauf von dermatologischen Erkrankungen beeinflussen?
2. Kann die Immunogenität von primären endothelialen und epithelialen Zellen durch eine Hemmung ihrer MHC I-Oberflächenexpression herabgesetzt oder sogar verhindert werden?
3. Ist das Verfahren der anti-MHC I-Intrabody-Expression in primären Zellen eine effiziente Methode für eine gezielte Modifikation der MHC I-Molekülexpression?
4. Welche funktionellen Auswirkungen auf die Prozesse der zellulären und humoralen Immunantwort hat die auf epithelialen und endothelialen Zellen generierte MHC I-Defizienz?
5. Ist es möglich eine universelle Spenderzelle für die Anwendung bei der Transplantation von Zellen und zusammengesetzten Geweben zu erzeugen und welche Effekte können *in vitro* und *in vivo* erzielt werden?



## 2. Ergebnisse

### 2.1. Modulation der Immunantwort durch Anwendung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 - Effekte auf Immunzellen und Keratinozyten

(Publikation 1: Seifert *et al.* 2000a, siehe Seite 19-27)

Das Zytokin IL-10, eines der bekanntesten anti-inflammatorischen Zytokine, ist ein Schlüsselfaktor im Wechselspiel zwischen Immun- und Hautsystem im Prozess der Wundheilung und der kutanen inflammatorischen Reaktionen und stellt somit einen hoffnungsvollen Kandidaten für die Behandlung dermatologischer Erkrankungen dar. Es ist bekannt, dass IL-10 die Infiltration von neutrophilen Zellen und Makrophagen in das geschädigte Gewebe hemmt und auch zu einer Inhibition der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie von Chemokinen wie MCP-1 und MIP1- $\alpha$  führt [Sato *et al.* 1999]. Wirksame therapeutische Effekte bei der Anwendung von IL-10 in der Behandlung der Psoriasis mit klaren histomorphologischen Effekten in der Epidermis der psoriatischen Plaques [Asadullah *et al.* 1998] ließen die Frage nach den direkten Effekten dieses Zytokins auf den primären Zelltyp der Keratinozyten in den Focus der experimentellen Forschung rücken. Obwohl ursprüngliche Daten anderer Arbeitsgruppen einen direkten Einfluß von IL-10 auf die Keratinozyten vermuten ließen [Becherel *et al.* 1995; Michel *et al.* 1997], konnten wir dies mit unseren eigenen experimentellen Studien überzeugend widerlegen. So verwendeten wir in unseren *in vitro*-Untersuchungen an humanen primären Keratinozyten die identische IL-10-Formulierung, wie sie auch zur Behandlung psoriatischer Patienten eingesetzt wurde. Wir untersuchten hierbei zunächst den Einfluss von IL-10 auf die Proliferation der Keratinozyten, fanden jedoch keine hemmenden Effekte, im Gegensatz zu der als Positivkontrolle mitgeführten IFN- $\gamma$ -Behandlung der Zellen [Seifert *et al.* 2000a]. Im Weiteren wurde untersucht, ob IL-10 die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und des IL-1-Rezeptor-Antagonisten beeinflusst. Hierzu erfolgte eine Inkubation der Keratinozyten für 24 Stunden mit IL-10 alleine sowie zusätzlich nach einer Vorbehandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$  oder LPS zur Simulation von Entzündungsbedingungen. In keinem der genannten Ansätze konnte eine Modulation des Zytokinfreisetzungsmusters durch die IL-10-Behandlung nachgewiesen werden. Als Kontrolle mitgeführte PBMC-Kulturen zeigten hingegen eine deutliche Inhibition

der LPS-induzierten IL-8 Freisetzung mit steigender IL-10-Konzentration. In einer weiteren Experimentserie testeten wir den potentiellen Einfluss von IL-10 auf die Expression von wichtigen Oberflächenmarkern unter inflammatorischen Bedingungen, simuliert durch eine Inkubation mit IFN- $\gamma$ , LPS oder einer Kombination beider Faktoren. Doch auch hier konnte ausschließlich für die analysierten PBMC eine dosisabhängige Regulation der Expression von MHC II und CD86 gezeigt werden, jedoch wiederum keine Modulation bei den untersuchten primären Keratinozyten. Die Marker ICAM-1 und CD80 wurden weder bei PBMC noch bei Keratinozyten durch IL-10-Behandlung beeinflusst. Auf Grund dieser Daten zogen wir die Schlussfolgerung, dass die therapeutischen Wirkungen von IL-10 bei der Psoriasis eher über Effekte auf Immunzellen der Peripherie als über lokale Wirkungen auf die Keratinozyten selbst vermittelt werden. Unsere eigenen weiterführenden Untersuchungen belegten, dass sowohl humane primäre Keratinozyten, als auch die Zelllinie HaCaT, keine IL-10-Rezeptor- $\alpha$ -Kette exprimieren, jedoch die IL-10-Rezeptor- $\beta$ -Kette [Seifert *et al.* 2003]. Somit blieb auch die Induktion früher intrazellulärer Signalmoleküle wie SOCS 3 über IL-10 aus.

## 2.2. Gentherapeutische Modulation von MHC I-Molekülen auf primären Zellen zur Anwendung im Tissue Engineering

### 2.2.1. Etablierung von anti- MHC I-Intrabodies und Testung an epithelialen Zelllinien und primären Keratinozyten

(Publikation 2: Mhashilkar, Doebis et al. 2002, siehe Seite 30-42 ; Publikation 3: Busch et al. 2004, siehe Seite 43-52)

Unsere ersten Untersuchungen mit anti-MHC I-spezifischen Intrabodies gehen auf eine mehrjährige Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Wayne A. Marasco am Dana-Farber-Institute in Boston zurück. In dieser Arbeitsgruppe wurde der anti-**human**-MHC I-spezifische Intrabody **IB-8KscFv** entwickelt. In gemeinsamen Untersuchungen [Mhashilkar, Doebis et al. 2002] konnte durch Transfektion des Intrabodies in COS-Zellen die Ko-Immunopräzipitation der MHC I- $\alpha$ -Kette sowie von  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen werden. Außerdem wurde nach Transfektion der humanen T-Zelllinie Jurkat ein kompletter phänotypischer MHC I-Knock-Out erzeugt. Die parallele Analyse anderer Oberflächenmarker auf den hergestellten Jurkat-Knock-Out-Klonen belegte, dass es, bedingt durch die Intrabody-Expression, ausschließlich zu einer MHC I-Defizienz kommt und die anderen Oberflächenmarker nicht modifiziert werden. In unserem Labor wurden diese Untersuchungen durch die Erzeugung eines Adenovirus (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Thomas Ritter) mit dem humanen IB-8KscFv (Ad-8KscFv) und die Transduktion primärer Keratinozyten und der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT komplettiert. Wir konnten eindeutig nachweisen, dass die Transduktion der Keratinozyten mit Ad-8KscFv zu einer starken Herunterregulation der MHC I-Oberflächenexpression führt und dies sogar nach Stimulation der Zellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$ .

Ganz entscheidend für die Anwendung der Intrabody-Strategie in einem experimentellen Tiermodell der Ratte war die Entwicklung eines anti-**Ratten**-MHC I(RT1A)-spezifischen Intrabodies [Busch et al. 2004]. Der in unserer Arbeitsgruppe generierte Intrabody **IB-OX18scFv** wurde in verschiedenen Konstruktformen getestet, zum einen als Fusionsprotein mit GFP sowie auch als Bicistronisches Konstrukt mit einer IRES und nachgeschaltetem GFP-Gen. Beide Konstruktvarianten wurden mittels klassischer liposomaler Transfektion in primären Keratinozyten exprimiert. Als Kontrollkonstrukte wurden von uns analoge Vektorvarianten mit dem humanen IB-8KscFv verwendet. Jedoch zeigte sich

ausschließlich bei Verwendung des Konstruktes mit dem Fusionsprotein aus Intrabody und GFP eine deutliche Herunterregulation der MHC I-Expression bei der FACS-Analyse. Durch eine kombinierte Anfärbung von intra- und extrazellulären MHC I-Molekülen gelang es uns, die Akkumulation von MHC I im Zytoplasma bei gleichzeitiger Reduktion des oberflächengebundenen MHC I nachzuweisen. Wir konnten zudem zeigen, dass die Wirkung des intrazellulär exprimierten anti-MHC I-Antikörperfragmentes IB-OX18scFv ausschließlich die MHC I-Oberflächenexpression hemmte, jedoch keinen Einfluss auf die Expression anderer charakteristischer Oberflächenmarker der Keratinozyten, wie beispielsweise ICAM-1, hatte. Mittels GFP-Ko-Expression als Reportermolekül konnten wir Intrabody-GFP-positive Klone der primären Keratinozyten etablieren und in funktionellen Experimenten einsetzen. Die Analyse der MHC I-defizienten Keratinozyten in einem Zytotoxizitätstest unter Verwendung von vorsensibilisierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) zeigte eine deutlich verminderte spezifische Lyse dieser Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Keratinozyten oder auch den Zellen eines dritten unabhängigen MHC-Typs („3rd party“). Diese signifikante Hemmung der CTL-vermittelten Lyse prädestiniert diese Zellen für eine Verwendung als universelle Spenderzelle bei der Transplantation von Hautersatzgewebe in einem entsprechenden Transplantationsmodell. Generell kann dieses Prinzip auch auf humane Keratinozyten übertragen werden, wie bereits in den ersten eigenen Untersuchungen [Mhashilkar, Doebis *et al.* 2002] gezeigt werden konnte.

### 2.2.2. Modulation der MHC I-Expression auf humanen und Ratten-Endothelzellen durch anti-MHC I-Intrabody-Expression

(Publikation 4: Beyer et al. 2004 , siehe Seite 56-63; Publikation 5: Doebis et al. 2006, siehe Seite 64-71)

Für die Generierung von artifiziellm Gefäßersatz durch die luminale Besiedlung von Gefäßmatrices mit Endothelzellen sollte das Prinzip der Erzeugung universeller Spenderzellen durch MHC I-Modulation mittels eines Intrabodies auch auf diesen primären Zelltyp angewandt werden. Endothelzellen sind durch liposomale Gentransfermethoden relativ schlecht zu transfizieren. So wurde der von uns generierte Intrabody-Adenovirus (Ad-8KscFv) für die gezielte Modifikation von humanen Nabelschnur-Venen-Endothelzellen (HUVEC) verwendet [Beyer et al. 2004]. Unter Verwendung eines GFP-Adenovirus (Ad-GFP) konnte in Voruntersuchungen eine Transduktionseffizienz von >95% erzielt werden. Die umfangreichen Experimente unter Verwendung des Ad-8KscFv zeigten eine signifikante Hemmung der MHC I-Oberflächenexpression auf HUVEC 48 Stunden nach Transduktion im Vergleich zum Expressionsniveau auf untransduzierten oder mit Kontrollvektor (Ad- $\alpha$ -Antitrypsin (AAT)) transduzierten Zellen. Es konnte in weiterführenden Experimenten nach Stimulation der transduzierten Zellen mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zweifelsfrei belegt werden, dass die Hemmung der MHC I-Expression auch unter pro-inflammatorischen Bedingungen erhalten bleibt. Von Interesse war aus diesem Grund die Analyse der Zellen in einem Zytotoxizitätstest mit CTL. Die Generierung der geeigneten CTL erforderte eine HLA-Typisierung der verwendeten HUVEC und die Vorstimulation von T-Zellen durch eine EBV-transformierte B-Zelllinie (LCL) des identischen HLA-Typs. Somit wurde die B-Zelllinie eines Normalspenders mit einem bezüglich der verwendeten HUVEC identischen HLA-Typ durch EBV-Transformation hergestellt und T-Zellen durch eine Vorkultur unter Zusatz von IL-2 über mehrere Tage auf die Erkennung dieses HLA-Typs sensibilisiert. Die Zytotoxizitätsanalyse erfolgte mittels eines von uns dafür etablierten Calcein-Freisetzungstests. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass HUVEC mit reduzierter MHC I-Expression auf Grund der Ad-8KscFv-Transduktion weniger stark von den vorsensibilisierten CTL lysiert werden als untransduzierte oder Kontrollvektor-transduzierte Zellen. Einschränkend für dieses System ist lediglich das schnelle Abklingen des Intrabody-vermittelten Effektes, bedingt durch das gewählte adenovirale Gentransfersystem, bei dem es zu keiner stabilen Integration des anti-

MHC I-Intrabody-Gens in das Genom kommt. Schon nach 7 Tagen ist kein Effekt der Transduktion mehr messbar.

Aus diesem Grunde wurde für die Transduktion der Endothelzellen im Rattenmodell ein lentivirales Gentransfersystem, welches von unserem Kooperationspartner Jakob Reiser an der Louisiana State University in New Orleans entwickelt wurde, angewandt [Doebis *et al.* 2006]. Mit diesem Transduktionssystem gelang eine stabile Integration des Intrabody-Gens in das Genom der Aorten-Endothelzellen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass auch nach weit über 70 Tagen stabile Effekte der Transduktion mit dem Intrabody IB-OX18scFv nachweisbar waren. Durch Ko-Expression des Reportermoleküls hrGFP (humanized renilla Green Fluorescence Protein) sowie durch effiziente Transduktion und nachfolgendes Sortieren am FACS gelang uns die Generierung von stabilen MHC I-defizienten Ratten-Aorten-Endothelzellen. Die Methode zur Isolation der Ratten-Aorten-Endothelzellen wurde aus dem Labor von Roberto Nicosia in Seattle (Division of Pathology and Laboratory Medicine, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System) übernommen und in unserem Labor etabliert. So konnten in der Folgezeit primäre Aorten-Endothelzellen von verschiedenen Ratten-Stämmen generiert werden.

Die stabile Intrabody-Expression in Ratten-Aorten-Endothelzellen führte zur Erzeugung eines MHC I-Knock-Out-Phänotyps. In Analogie zu den Untersuchungen an Ratten-Keratinocyten konnte auch hier eine deutliche Akkumulation von MHC I in der Zelle bei gleichzeitiger Reduktion der MHC I-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Die Reduktion von MHC I war über lange Untersuchungszeiträume stabil, konnte jedoch partiell durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  aufgehoben werden.

Endothelzellen als luminaler Besatz der Gefäßinnenwand spielen insbesondere eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Rejektionsprozessen über allospezifische Antikörper. Unsere Hypothese, dass die fehlende MHC I-Expression nach Transduktion mit dem Intrabody auch zu einer Hemmung von Allo-Antikörper (AK)/Komplement-vermittelter Lyse führt, konnte in unseren Experimenten belegt werden. Die Allo-AK/Komplement-vermittelte Lyse wurde hierbei durch FACS-Analyse der 7AAD-positiven Zellfraktion nach Inkubation mit einem starken Allo-AK und Kaninchen-Complement ermittelt. Es zeigte sich eine hochsignifiante Reduktion des Anteils 7AAD-positiver Zellen in den Intrabody-exprimierenden Endothelzellen im Vergleich zu den Wildtypzellen bzw. den Kontroll-transduzierten Zellen. Diese Daten

belegen die Resistenz der MHC I-Knock-Out-Endothelzellen für Angriffe des humoralen Immunsystems.

Auch die Annahme, dass die MHC I-Defizienz der Endothelzellen zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber CTL-vermittelter Lyse führt, konnten wir in den durchgeführten Zytotoxizitätstestungen bestätigen. Die spezifische Lyse der Endothelzellen, ermittelt über einen Calcein-Freisetzungstest, wurde nahezu auf das Niveau der Lyse von syngenen Kontrollzellen reduziert. Die Intrabody-modifizierten Zellen stellen somit aus unserer Sicht einen geeigneten universellen Spenderzelltyp für die Anwendung in der Transplantation von Gefäßersatz dar. Sie können für die Besiedlung englumiger Gefäßmatrices verwendet und dann in einem Ratten-Transplantationsmodell getestet werden. Ein solches Aorten-Transplantationsmodell wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert und erste Daten mit der Transplantation von MHC I-defizienten Endothelzellen auf einer azellularisierten Gefäßmatrix liegen inzwischen vor [Seifert *et al.* in Vorbereitung].

### 2.3. Modulation der Immunantwort durch Anwendung der Intrabody-Strategie gegenüber vaskulären Transplantaten im Rattenmodell

(Publikation 6: Zdoroveac et al. 2008, siehe Seite 73-81 )

Nachdem es uns *in vitro* durch die Expression des anti-MHC I-spezifischen Intrabodies gelungen war, die MHC I-Oberflächenexpression in arteriellen Ratten-Endothelzellen zu inhibieren und auch eine Hemmung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort zu demonstrieren, sollte dieses Prinzip nun im *in vivo*-Transplantationsmodell getestet werden. Hierbei kam als Gentransfersystem die adenovirale Expression des Ratten-Intrabodies zur Anwendung. Zunächst wurde durch Applikation eines  $\beta$ -Galaktosidase-haltigen Kontrollvektors (Ad- $\beta$ -Gal) die Effizienz der Transduktion von Ratten-Endothelzellen *ex vivo* in einem Carotis-Transplantat überprüft [Zdoroveac et al. 2008]. Mittels X-Gal konnte ein hoher Prozentsatz der luminalen Endothelzellen spezifisch angefärbt werden. In den Carotis-Transplantationsexperimenten wurden folgende Versuchsgruppen miteinander verglichen: (i) mit Intrabody-Transduktion (ii) mit Kontrollvektor-Transduktion und (iii) ohne Transduktion. In umfassenden histologischen Untersuchungen am Tag 7 und Tag 28 nach der Transplantation konnten deutliche Effekte der Behandlung mit dem anti-MHC I-Intrabody nachgewiesen werden. Es zeigte sich insbesondere eine verringerte Infiltration von T-Zellen (sowohl CD4(+) als auch CD8(+)) und von CD68(+)-Gewebsmakrophagen. Diese verminderte zelluläre Infiltration sowohl zu einem frühen (Tag 7) als auch zu einem späten (Tag 28) Zeitpunkt nach der Transplantation war mit einer signifikant verringerten Intimaverdickung assoziiert. Durch Analysen der mRNA Expression verschiedener zellulärer Marker als auch von pro-inflammatorischen Zytokinen konnten die Ergebnisse der histologischen Studien untermauert werden. Insbesondere war die Expression von IFN- $\gamma$  in den mit Intrabody-transduzierten Transplantaten erniedrigt. Die Analyse der Allo-AK-Antwort durch eine spezifische FACS-Analyse der Seren aller transplantierten Ratten zeigte nur in der Tendenz einen erniedrigten Shift in der mittleren Fluoreszenzintensität bei der Intrabody-Versuchsgruppe gegenüber beiden Kontrollgruppen. Auf Grund der geringen Größe der Carotis-Transplantate war die Allo-AK-Antwort insgesamt extrem gering und die Sensitivität der Methode ließ keine gute Differenzierung zwischen den Versuchsgruppen zu. Dennoch gelang es, durch dieses Transplantationsmodell erstmalig einen deutlichen protektiven Effekt der Anwendung der Intrabody-Strategie *in vivo* zu demonstrieren.



### **3. Diskussion**

#### **3.1. Primäre Keratinozyten als Zielzellen einer Immunmodulation durch Zytokine**

Für eine Reihe von dermatologischen Erkrankungen stehen die Keratinozyten als eine der zellulären Hauptkomponenten der Epidermis im Focus der Untersuchungen. Permanent befindet sich die epidermale Schicht im homeostatischen Umbau und durchlaufen die Keratinozyten eine Entwicklung von der Basalzellschicht bis hin zum hoch differenzierten Stratum corneum [Candi *et al.* 2005]. Die Biologie dieses Zelltyps ist komplex und ihre Rolle in vielen pathologischen Veränderungen der Haut noch nicht vollständig geklärt. Beispielsweise kommt es bei der Psoriasis zur Entwicklung einer Hyperkeratosis durch eine scheinbar ungehemmte Proliferation der Keratinozyten. Da durch Asadullah und Mitarbeiter [1998] in ersten klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von Psoriatikern mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 zu einer signifikanten Verbesserung der Histomorphologie der Epidermis führte, waren direkte, möglicherweise anti-proliferative Effekte von IL-10 denkbar. Durch unsere umfangreichen Studien konnten wir jedoch eindeutig nachweisen, dass die Effekte dieses Zytokins eher auf indirektem Wege durch eine systemische Wirkung auf Immunzellen realisiert werden [Seifert *et al.* 2000a]. Weiterhin gelang es uns nachzuweisen, dass primäre humane Keratinozyten über keine IL-10R1-Kette verfügen und somit auch keine Signalmoleküle wie STAT oder SOCS aktiviert werden können [Seifert *et al.* 2003]. Unsere Daten relativierten somit die von anderen Arbeitsgruppen publizierten Effekte des Zytokins IL-10 auf Keratinozytenzelllinien und primäre Zellen [Becherel *et al.* 1995; Michel *et al.* 1997]. In den nachfolgenden Jahren wurden eine Reihe von IL-10 verwandten Zytokinen entdeckt, wie bereits ausführlich in der Einleitung dargelegt (siehe 1.3.). Die auf Keratinozyten exprimierte IL-10R2-Kette kann mit verschiedenen anderen Partnern (IL-20R1-, IL-20R2- und IL-22R1-Kette) assoziieren und macht diesen Zelltyp sensitiv für die Wirkung der Zytokine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26. Die genannten pro-inflammatorisch wirksamen Zytokine könnten mit einer Präsenz von autoreaktiven Th1-Zellen in psoriatischen Läsionen verknüpft sein. So findet sich IL-19 und IL-20 mRNA in Hautläsionen von Psoriatikern [Romer *et al.* 2003]. Auch für das von T-Zellen produzierte IL-22 fanden sich erhöhte mRNA-

Expressionen bei diesem Krankheitsbild [Wolk *et al.* 2002]. Offenbar dominieren verschiedene Mitglieder der IL-10-Familie bei der Psoriasis und eine verstärkte Expression der entsprechenden Rezeptoren auf den Keratinozyten spricht für ihre Rolle in der Entstehung der epidermalen Entzündung [Boniface *et al.* 2005]. Gegenwärtige Therapiestrategien konzentrieren sich auf die Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung und die Beeinflussung der Balance von Th1- und Th2-Zellen, beispielsweise durch das LFA-3/CD58-Fusionsprotein (Alefasept), CTLA4-Ig, die Neutralisation von TNF- $\alpha$  sowie die Begünstigung einer Th2-Immunantwort durch Applikation von IL-4, IL-10 und IL-11 [Boniface *et al.* 2005]. Auch IL-15 stellt im Kontext der Psoriasis-Therapie einen interessanten Ansatzpunkt dar. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Silvia Bulfone-Paus untersuchten wir den Effekt von IL-15 auf humane Keratinozyten und die HaCaT-Zelllinie und konnten eine signifikante Hemmung von anti-Fas- und Methylzellulose-induzierter Apoptose nachweisen [Rückert *et al.* 2000]. Durch histologische Untersuchungen an Hautschnitten von Psoriatikern im Vergleich zu nichtläsionalen Hautbereichen der gleichen Patientengruppe und zu Normalspendern konnte gezeigt werden, dass die IL-15-Proteinexpression in den Gewebeproben der psoriatischen Läsionen deutlich erhöht war. Diese Beobachtung legte die Hypothese nahe, dass die IL-15-Expression in den psoriatischen Läsionen über eine Vermittlung anti-apoptotischer Mechanismen die Hyperproliferation der Keratinozyten in den oberen Epidermisbereichen begünstigt. In seither veröffentlichten Studien werden therapeutische Verfahren zur Neutralisation von IL-15 sowohl für Psoriasis als auch für Diabetes beschrieben [McInnes und Gracie 2004].

### **3.2. Immunmodulation durch Hemmung der MHC I-Expression auf primären epithelialen und endothelialen Zellen**

Ansätze zur Modulation der Immunantwort beinhalten die Modifikation von wichtigen Oberflächenstrukturen auf transplantierten Zellen und Geweben. Maßgebliche Erkennungsstrukturen sind dabei die MHC-Moleküle der Klassen I und II. Bei unseren eigenen Untersuchungen konzentrierten wir uns auf die Hemmung der MHC I-Expression, da die verwendeten primären Zelltypen, Keratinozyten und Endothelzellen, konstitutiv ausschließlich MHC I-Moleküle exprimieren. Nach einer inflammatorischen Stimulation der Zellen kann es auch zu einer Induktion von

MHC II-Molekülen kommen, jedoch soll letztendlich die Generierung von MHC I-defizienten Zellen die Initiierung einer Inflammation und damit auch die weitere MHC II-Induktion verhindern helfen.

Zur MHC I-Modifikation bedienten wir uns in unseren experimentellen Studien einer sehr spezifischen und effizienten Methode, der intrazellulären Expression eines gegen das MHC I-Molekül gerichteten Antikörperfragmentes (so genannter „Intrabody“). Durch die Spezifität des antigenbindenden Strukturteiles Fv mit dem entsprechenden nicht-polymorphen Epitop des MHC-Moleküls zeichnet sich das Verfahren ebenfalls durch eine hohe Spezifität und Effizienz aus. Dies ist auch ein Vorteil gegenüber dem in jüngster Zeit beschriebenen Verfahren der RNA-Interferenz (siRNA-Technologie) [Lobato *et al.* 2003; Boldicke *et al.* 2007]. Ein weiterer Vorteil der Intrabody-basierten Hemmung von Proteinexpressionen besteht im Ausbleiben einer Induktion von IFN- $\gamma$ , welches beim Verfahren der siRNA-basierten Hemmung eine nicht unerhebliche Rolle spielt [Sledz und Williams 2004; Lo *et al.* 2008]. Dennoch haben sich andere Arbeitsgruppen mit einer Hemmung der MHC I- sowie der  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Expression auf humanen EBV-transformierten B-Zellen durch spezifische siRNA befasst [Figueridero *et al.* 2006]. Die Autoren zeigten in ihren Arbeiten, dass durch den lentiviralen Gentransfer von siRNA für  $\beta$ 2-Mikroglobulin und HLA-A eine dauerhafte Reduktion der Oberflächenexpression dieser Moleküle erfolgt und eine verminderte Proliferation von CD8(+)-Zelllinien als auch eine verminderte Zelllyse erzielt werden kann.

Wir gehen jedoch auf Grund des hohen Grades an Polymorphismus der MHC-Moleküle und der hoch-spezifischen Bindung des anti-MHC I-Intrabodies von einem Vorteil unserer Technik gegenüber siRNA basierten Prinzipien aus. Hierbei müssten spezifische siRNA Moleküle mit Klassen-, Gen- und Gruppen-Spezifität generiert werden, was einen hohen Grad an individueller patientenspezifischer Anpassung erfordert.

Wichtig ist auch die Stabilität des erreichten MHC I-defizienten Zustandes. Erfolgt der Transfer des Intrabody-kodierenden Gens nur transient, so ist auch der Effekt der MHC I-Defizienz ein nur kurzzeitiger. Gelingt jedoch die stabile Integration des Intrabody-kodierenden Gens in die Zellen, so ist der MHC I-defiziente Phänotyp anhaltend. Wir haben in unseren eigenen Untersuchungen auf verschiedene Methoden des Gentransfers zurückgegriffen, sowohl den liposomalen Gentransfer

als auch den viralen (adenoviral, retroviral) Gentransfer. Das setzte zum Teil Optimierungsarbeiten für einen effizienten Gentransfer in die primären Zellen voraus. So wurden in umfangreichen methodischen Untersuchungen an Epithelzelllinien und primären humanen sowie Ratten-Keratinozyten optimale Transduktionsbedingungen mit einem  $\beta$ -Gal-exprimierenden Adenovirus durchgeführt [Doebis *et al.* 2002]. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Transduktionseffizienz durch den Zusatz von Polybrene. Die Transduktionen des therapeutischen Adenovirus mit dem Intrabody wurden dann entsprechend dieser Methodenoptimierung durchgeführt.

Weiterhin gab es zahlreiche Vorarbeiten durch Herstellung von geeigneten Konstrukten zur liposomalen Transfektion und Ko-Expression eines GFP-Reporterproteins, welches eine Sortierung und damit Selektion der Intrabody-exprimierenden Zellen ermöglichte [Busch *et al.* 2004; Doebis *et al.* 2006]. Die Expression eines anti-MHC I-spezifischen Intrabodies in Keratinozyten der Ratte und des Menschen durch adenoviralen oder liposomalen Gentransfer führte zu einer deutlichen Reduktion bzw. zum kompletten Verlust der MHC I-Oberflächenexpression auf diesen Zellen [Mhashilkar, Doebis *et al.* 2002; Busch *et al.* 2004]. Sowohl im Ratten- als auch im humanen System war das exprimierte Antikörperfragment gegen eine nicht-polymorphe Struktur auf dem MHC I-Molekül gerichtet und mit einem Retentionssignal für das ER versehen. Im ER findet die Bindung an die schweren Ketten des MHC-Moleküls statt, die den Transport dieses Zellrezeptors an die Zelloberfläche inhibiert. Der Verbleib des Komplexes aus Antigen und Intrabody konnte durch uns nicht vollständig geklärt werden. Die experimentellen Daten zeigen jedoch, sowohl für Keratinozyten als auch für Endothelzellen, dass eine Akkumulation von MHC I-Molekülen in den Zellen stattfindet. Inwiefern es im Verlaufe einer anhaltenden Expression des Intrabodies zu einem Abbau des Komplexes kommt, ist noch unklar. Wir konnten jedoch keine toxischen Effekte oder gar morphologischen Veränderungen feststellen, selbst bei stabiler Expression in den Zellen. Unterschiede in Bezug auf die Stabilität und Löslichkeit des intrazellulär exprimierten scFv-Fragmentes je nach Kompartimentlokalisierung wurden bereits beschrieben [Cardinale *et al.* 2004] und sind beispielsweise auf eine unterschiedliche Faltung des Fragmentes zurückzuführen. Wir konnten in den Experimenten mit Ratten-Keratinozyten feststellen, dass die Expression des Fusionsproteins von Intrabody mit GFP zu einer stabileren Expression und zu einem effizienten MHC I-Knock-Out führte, während die

Transfektion mit Intrabody und GFP in einer zweiten Expressionskassette nach einer IRES-Sequenz nur eine schwächere MHC I-Modulation bewirkte. Wir vermuten deshalb eine mögliche Stabilisierung des IB-OX18scFv durch seine direkte Kopplung an das GFP.

In Ratten-Endothelzellen gelang uns eine stabile Expression des Intrabody durch einen lentiviralen Gentransfer und eine FACS-basierte Anreicherung der Intrabody-exprimierenden Zellen durch Ko-Expression des Reporterproteins hrGFP. Die Wahl fiel auf dieses Reportermolekül auf Grund seiner beschriebenen geringeren Zytotoxizität bei langanhaltender Expression in eukaryontischen Zellen [Hanazono *et al.* 1997]

Während wir durch einen adenoviralen Gentransfer in humanen Keratinozyten sowie humanen Endothelzellen (HUVEC) nur einen transienten, wenn auch deutlichen Effekt auf die Herunterregulation der MHC I-Expression erreichen konnten, ermöglichte uns der lentivirale Transfer die Untersuchung stabiler Endothelzellklone für weiterführende funktionelle Studien.

Übereinstimmend ergab sich in Zytotoxizitätstestungen mit beiden genannten primären Zelltypen, dass die MHC I-defizienten Zellen auf Grund ihrer Intrabody-Expression eine erhöhte Resistenz gegenüber der Attacke von vorsensibilisierten CTL besitzen [Busch *et al.* 2004; Beyer *et al.* 2004; Doebis *et al.* 2006]. Diese Resultate sind beachtlich, wenn doch bekannt ist, dass für die Auslösung von zerstörenden Prozessen über den Granzyme/Perforin-Weg nur wenige MHC I-Moleküle auf den Zielzellen ausreichen [Valitutti S *et al.* 1996; Kummer *et al.* 2005], um eine Lyse zu induzieren.

Für die Intrabody-Strategie muß jedoch einschränkend angemerkt werden, dass unter starker inflammatorischer Stimulation mit IFN- $\gamma$  ein Anstieg der MHC I-Expression erfolgt, was auch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber T-Zell-vermittelten Angriffen nach sich zieht. Ob jedoch die von uns eingesetzten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen *in vivo* tatsächlich lokal erreicht werden können, bleibt strittig.

In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass im Gegensatz zu den Rattenzellen, die MHC I-Defizienz auf humanen EC (HUVEC) offenbar nicht durch eine IFN- $\gamma$ -Stimulation mit vergleichbaren Dosen aufgehoben werden kann [Beyer *et al.* 2004]. Andere Arbeitsgruppen haben bezüglich des Einflusses inflammatorischer Zytokine auf die MHC I-Modulation andere Moleküle untersucht, wie beispielsweise das MK3 des  $\gamma$ -Herpesvirus [Boname *et al.* 2004]. Das MK3 Molekül verhindert die

Assemblierung der MHC I-Moleküle, indem es sowohl die MHC I-Moleküle als auch Proteine des TAP Transporters ubiquitinyliert.

Für EC spielen bei einer Abstoßungsreaktion neben den T-Zell-vermittelten Lyseprozessen auch Angriffe über gebildete Allo-AK in einer Ko-Wirkung mit Komplement eine wichtige Rolle [Derhaag *et al.* 2000; Baldwin *et al.* 2003; Wehner *et al.* 2007]. Diese Untersuchungen haben wir ausschließlich an Ratten-EC durchgeführt und entsprechende Daten generiert. So sind die mit dem Intrabody IB-OX18scFv transduzierten EC nahezu komplett vor einer solchen humoralen Zellyse geschützt. Die durch Intrabody-Expression erzielte verminderte Dichte der MHC I-Moleküle auf der EC-Oberfläche führt somit zu einer stark verminderten Dichte der gebundenen Allo-AK, die dann nicht mehr ausreicht, um die Komplementkaskade zu aktivieren. Insbesondere für den späteren Einsatz der EC als universelle Spenderzellen zur Besiedlung von Gefäßersatzstrukturen ist dieser Aspekt bedeutsam.

### **3.3. Anwendungen MHC I-defizienter primärer Zellen in der Entwicklung von Gewebeersatz mittels Tissue Engineering**

Mit der Entwicklung von epithelialen und endothelialen Zellen mit defizienter MHC I-Expression verfolgten wir primär das Ziel einer direkten Anwendung als universelle Spenderzellen in Transplantationsmodellen der Ratte. Die parallelen Untersuchungen an den entsprechenden humanen Zellen sollte die Translatierbarkeit der Prinzipien für spätere klinische Applikationen demonstrieren.

Obwohl wir stabile Ratten-Keratinocytenklone mit Expression des IB-OX18scFv generieren konnten, gestaltete sich die Entwicklung eines Haut-Sheet-Transplantationsmodells in der Ratte als schwierig und führte nicht zu den gewünschten Ergebnissen [Doebis *et al.* 1999; Seifert *et al.* 2000b]. Dennoch bieten die entwickelten MHC I-Knock-Out-Systeme gute Voraussetzungen für künftige Wege in diese Richtung. Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich nach wie vor mit der Generierung von Keratinocyten zur Expression potentieller therapeutischer Gene [Del Rio *et al.* 2002].

Im Bereich der Entwicklung von universell transplantierbaren Gefäßstrukturen gelang uns die Anwendung der Intrabody-Strategie in einem Gefäß-Transplantationsmodell der Ratte [Zdoroveac *et al.* 2008]. Wir konnten durch adenoviralen *ex vivo*-

Gentransfer des IB-OX18scFv in Ratten-Carotiden die Zeichen einer chronischen Rejektion und die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen deutlich reduzieren. Diese Modulation durch die Expression des Intrabodies zeigte sich zum einen in einer verminderten zellulären Infiltration in die Transplantate, einer verminderten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  als auch in der Hemmung der charakteristischerweise auftretenden Intimaverdickung der Gefäßwände. Mit unserer Behandlung können wir die primäre Entwicklung der Inflammation im transplantierten Organ inhibieren und somit auch eine verzögerte chronische Rejektion bewirken. Andere Autoren beschrieben in Analogie dazu, dass im Maus-Modell die initialen antigenabhängigen Prozesse sehr entscheidend für das Schicksal des Gefäßtransplantates sind. Allerdings gibt es einen Zeitpunkt, ab dem sich die Prozesse antigenunabhängig fortsetzen und in typischen Anzeichen einer chronischen Rejektion mit starker Zellinfiltration und Verdickung der Lamina Intima münden [Ensminger *et al.* 2002]. Durch die verminderte MHC I-Expression auf den EC wandern deutlich weniger T-Zellen sowie auch Monozyten/Makrophagen in das Gefäßtransplantat ein. Folglich wird auch die Sekretion von Zytokinen z.B. von IFN- $\gamma$  minimiert, wodurch sowohl die Bindung von zirkulierenden Immunzellen an luminale EC als auch die Proliferation und Migration von in der Lamina Media der Carotiswand befindlichen glatten Muskelzellen reduziert wird. Neutralisationsexperimente mit anti-IFN- $\gamma$  Antikörpern zeigten den direkten Einfluß von IFN- $\gamma$  auf arteriosklerotische Prozesse [Nagano *et al.* 1997]. Bei der Transplantation allogener Gefäße erfolgt durch eben diese Prozesse eine immer stärker werdende Proliferation der Glattmuskelzellen und deren Einwanderung auf die luminale Seite, bis es zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes kommt. Andere Autoren zeigten durch eine andere Modifikation der EC auf der luminalen Gefäßseite, einer Überexpression von Fas-Ligand, dass eine signifikante Beeinflussung T-Zell-vermittelter Rejektionsprozesse und eine Hemmung der Intimahyperplasie stattfindet [Sata *et al.* 2001].

Ob auch humorale Faktoren durch die Intrabody-Expression in den luminalen EC der Carotiden beeinflusst werden, konnten wir nicht belegen. Die Bildung von Allo-AK war auf Grund der geringen Größe des Transplantates insgesamt sehr gering und so konnten wir lediglich in der Tendenz eine verringerte Bildung von Allo-AK in der Intrabody-Gruppe detektieren. Allo-AK können bei der Aktivierung und Proliferation von EC eine wichtige Rolle spielen [Jin *et al.* 2005; Naji *et al.* 2005] und einen Beitrag

zum chronischen Rejektionsverlauf liefern [Wu *et al.* 2002]. In unserem Modell haben wir, bedingt durch den adenoviralen Gentransfer, nur eine kurzzeitige Expression des Transgens von bis zu 2 Wochen erreichen können, wobei möglicherweise eine unspezifische Inflammation durch den Adenovirus selbst stattfindet. Somit wären in Zukunft weitere Studien mit einer stabilen Intrabody-Expression im Transplantat sinnvoll.

Während es sich bei der Carotis-Transplantation um einen *ex vivo*-Gentransfer in ein komplettes allogenes Gefäß handelt, gehen weitere Experimente in die Richtung eines *ex vivo*-Gentransfers in die EC selbst. Dabei erfolgt die Herstellung eines Gefäßtransplantates durch Tissue Engineering unter Verwendung dieser Zellen. Wie bereits ausführlich unter 1.5. erläutert, können dabei unterschiedliche Trägermatrices als Grundlage für die luminale Besiedlung mit EC Anwendung finden. Eigene Erfahrungen mit ePFTE-Prothesen und einer luminalen Besiedlung mit Ratten-EC zeigten, dass dieses synthetische Material aufgrund einer außerordentlich schlechten Adhärenz der EC und einer zusätzlichen starken inflammatorischen Komponente für den englumigen Gefäßersatz nicht geeignet ist [Seifert *et al.* 2004; Seifert *et al.* 2006]. Wir haben uns deshalb in den gegenwärtigen experimentellen Studien auf die Herstellung azellulärer Gefäßmatrices aus Ratten-Aorten und deren Besiedlung mit EC konzentriert. Für eine optimale Besiedlung der extrem englumigen Gefäße (Innendurchmesser <1,5 mm) entwickelten wir ein Gefäß-Reaktormodell für die Besiedlung unter pulsatilen Fluss-Bedingungen, die den physiologischen Parametern sehr nahe kommen [Trommer *et al.* 2007; Seifert *et al.* Gebrauchsmuster Nr. 20 2007 014 630.2]. Die besiedelten Gefäße werden dann in den Bereich der abdominalen Aorta in die Empfänger-Ratten transplantiert. Unsere bisherigen Daten belegen eine geringe inflammatorische Komponente durch die azellularisierte Matrix selbst und keine Zeichen von Abstoßung bei Besiedlung mit autologen EC. An diesem Modell durchgeführte Studien mit MHC I-defizienten EC zeigen eine deutlich verminderte Infiltration von T-Zellen und APC in die Lamina Intima der Transplantate [Seifert *et al.* in Vorbereitung]. Die Fortführung dieser Strategie ist demnach Erfolg versprechend.

### **3.4. Probleme bei der Applikation MHC I-defizienter Gewebe und Ausblick**

Trotz der überzeugenden Effekte der Erzeugung von MHC I-Defizienzen in epithelialen und endothelialen Zellen wurden einige Limitationen dieser Strategie



bereits deutlich. Zum einen konnten wir zeigen, dass in der Regel eine starke Herunterregulation der MHC I-Oberflächenexpression stattfindet, jedoch kein kompletter phänotischer Knock-Out erreicht werden kann. Somit könnten die verbleibenden MHC I-Moleküle immer noch zu einer T-Zell-vermittelten Rejektion führen, wahrscheinlich initiiert über Prozesse der indirekten Antigenpräsentation [Ljunggren *et al.* 1995; Lee *et al.* 1997].

Eine weitere Limitation der von uns favorisierten Intrabody-Strategie liegt in einer möglichen Reversibilität der MHC I-Defizienz durch einen Cocktail von inflammatorischen Zytokinen, wie er beispielsweise nach einer Transplantation vorliegt. In den eigenen Arbeiten mit Ratten-EC beleuchten wir diesen Punkt als kritisch, da wir eine Abschwächung des Intrabody-vermittelten Effektes feststellen mussten. Dennoch bleibt unklar, wie unsere *in vitro*-Kulturbedingungen den tatsächlichen Verhältnissen *in vivo* entsprechen und inwieweit die relevanten lokalen Konzentrationen der Zytokine wirklich erreicht werden.

Ein weiterer kritischer Punkt liegt in der potentiellen Erkennung der MHC I-defizienten Zellen durch NK-Zellen. Entsprechend der „Missing Self“ Hypothese erkennen NK Zellen MHC I-defiziente Zellen und führen zu deren Elimination [Lyunggren *et al.* 1990]. NK-Zellen verfügen über einen ganzen Satz von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren (KIR-Rezeptoren) [Brumbaugh *et al.* 1998]. Einige dieser inhibierenden Rezeptoren erkennen eine Reihe klassischer MHC I-Moleküle als Liganden, was zu einer Verminderung der Aktivität führt.

Es bleibt jedoch offen, ob die durch Intrabody-Expression defizienten EC *in vivo* wirklich einer NK-Zell-Attacke ausgesetzt sein würden. Klinische Daten einer Transplantation von T-Zell-depletierten und KIR-differenten Knochenmarkszellen zeigten ausschließlich eine Lyse von hämatopietischen, nicht aber von nicht-hämatopietischen Empfängerzellen, da eine GvH-Reaktion ausbleibt [Ruggeri *et al.* 2002; Gagne *et al.* 2002]. Unsere eigenen Untersuchungen im Carotis-Modell zur Transplantation von MHC I-defizienten EC auf azellularisierten Matrices zeigten keine Infiltration von NK-Zellen in das Transplantat. Der Nachweis der NK-Zellen erfolgte dabei über die Ratten-NK-Zell-spezifischen Marker NKR-P1 und NKp46 [Westgaard *et al.* 2003; Westgaard *et al.* 2004; Nylenna *et al.* 2005]. Zusätzlich konnten wir auch in Zyotoxizitätstests mit aufgereinigten Ratten-NK-Zellen keine verstärkte Lyse von MHC I-defizienten EC nachweisen [Seifert *et al.* in Vorbereitung].

Somit erscheint gegenwärtig eine Aktivierung der NK-Zellen als eher unwahrscheinlich.

Die von uns aufgezeigte Strategie einer MHC I-Modulation durch Expression des MHC I-spezifischen Antikörperfragmentes bietet künftig auch interessante Anwendungen in der Transplantation allogener Stammzellen. Auch hier konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass je nach Differenzierungsgrad der Zellen eine Expression von MHC I und nach einer Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen auch eine MHC II-Expression nachweisbar ist [Drukker *et al.* 2002; Drukker und Benvenisty 2004]. Sogar auf embryonalen Stammzellen nimmt mit zunehmendem Differenzierungsgrad die Expression von MHC I-Molekülen zu. Würden diese Zellen in der Zukunft für therapeutische Anwendungen genutzt werden, ist mit der Induktion von Immunantworten des adaptiven Immunsystems zu rechnen. Damit könnten auch diese Zelltypen in den Focus für Modulationen ihrer Oberflächenmoleküle rücken. Eine Reduktion der MHC I-Expression ist bei den Stammzellen jedoch nur eine von vielen Varianten zur Unterbindung der allospezifischen Immunantwort. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang einige Moleküle, die ähnlich wie beim semi-allogenen menschlichen Fetus, einen Schutz der Zellen und Gewebe bewirken. Ein sehr interessantes Molekül ist in diesem Zusammenhang das HLA-G-Molekül, welches unter anderem auch die Angriffe von NK-Zellen hemmen kann [LeMaoult *et al.* 2003; Le Rond *et al.* 2006; Carosella *et al.* 2008]. HLA-G wurde in der jüngsten Vergangenheit auch auf einer Gruppe von adulten Stammzellen, den mesenchymalen Stammzellen, gefunden. Diese Zellen sind möglicherweise aus diesem Grunde vor einer Rejektion im allogenen Empfänger geschützt [Creput *et al.* 2003; Bahri *et al.* 2006]. Weder HLA-G alleine noch eine MHC I-Defizienz werden jedoch zu einer kompletten Akzeptanz allogener Zellen führen und künftige Forschungen in der Regenerativen Medizin müssen weitere Einflussfaktoren und Schlüsselmoleküle aufspüren.

#### 4. Referenzen

- Ahn K, Angulo A, Ghazal P, et al. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 10990-10995.
- Ahn K, Gruhler A, Galocha B, et al. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*. 1997; 6: 613-621.
- Aires da Silva F, Santa-Marta M, Freitas-Vieira A, et al. Camelized rabbit-derived VH single-domain intrabodies against Vif strongly neutralize HIV-1 infectivity. *J Mol Biol*. 2004; 340: 525-542.
- Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, et al. A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 3081-3087.
- Andersson M, Paabo S, Nilsson T, et al. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell*. 1985; 43: 215-222.
- Asadullah K, Docke WD, Haeussler A, et al. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol*. 1996; 107: 833-837.
- Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, et al. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest*. 1998; 101: 783- 794.
- Aubock J, Irschick E, Romani N, et al. Rejection, after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. *Transplantation*. 1988; 45: 730-737.
- Bahri R, Hirsch F, Josse A, et al. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol*. 2006; 176: 1331-1339.
- Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. *Burns*. 2001; 27: 534-544.
- Baldwin WM, Ota H, Rodriguez ER. Complement in transplant rejection: diagnostic and mechanistic considerations. *Springer Semin Immunopathol*. 2003; 25: 181-197.
- Becherel PA, Le Goff L, Ktorza S, et al. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 2992-2295.
- Beerli RR, Wels W, Hynes NE. Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem*. 1994; 269: 23931-23936.
- Ben-Bassat H, Eldad A, Chaouat M et al. Structural and functional evaluation of modifications in the composite skin graft: cryopreserved dermis and cultured keratinocytes. *Plast Reconst Surg*. 1992; 89: 510-520.
- Beyer F, Doebis C, Busch A, Ritter T, Mhashilkar A, Marasco WA, Laube H, Volk HD, **Seifert M**. Decline of surface MHC I by adenoviral gene transfer of anti-MHC I intrabodies in human endothelial cells-new perspectives for the generation of universal donor cells for tissue transplantation. *J Gene Med*. 2004; 6: 616-623.

- Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *Embo J*. 1990; 9: 101-108.
- Biocca S, Cattaneo A. Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments. *Trends Cell Biol*. 1995; 5: 248-252.
- Böldicke T. Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER. *J Cell Mol Med*. 2007; 11: 54-70.
- Boyce ST, Kagan RJ, Meyer NA, et al. The clinical research award: Cultured skin substitutes combined with Integra Artificial Skin to replace native skin autograft and allograft for closure of full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil*. 1999; 20: 453-461.
- Bordenave L, Fernandez P, Remy-Zolghadri M, et al. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005; 33: 227-234.
- Boname JM, de Lima BD, Lehner PJ, et al. Viral degradation of the MHC class I peptide loading complex. *Immunity*. 2004; 20: 305-317.
- Boniface K, Lecron JC, Bernard FX, et al. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur Cytokine Netw*. 2005; 16: 309-319.
- Boyce ST. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns*. 2001; 27: 523-533.
- Bromberg EB, Song IC, Mohn MP. The use of pig skin as a temporary biological dressing. *J Plast Reconst Surg*. 1965; 36: 80-90.
- Brumbaugh KM, Binstadt BA, Leibson PJ. Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 230: 103-122.
- Busch A, Marasco WA, Doebis C, Volk HD, **Seifert M**. MHC class I manipulation on cell surfaces by gene transfer of anti-MHC class I intrabodies- a tool for decreased immunogenicity of allogeneic tissue and cell transplants. *Methods*. 2004; 34: 240-249.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 328-340.
- Cardinale A, Filesi I, Mattei S, et al. Intracellular targeting and functional analysis of single-chain Fv-fragments in mammalian cells. *Methods*. 2004; 34: 171-178.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol*. 2008; 29: 125-132.
- Chen SY, Bagley J, Marasco WA. Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 1994; 5: 595-601.
- Chevalier MS, Johnson DC. Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. *J Virol*. 2003; 77: 4731-4738.
- Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, et al. Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res*. 1998; 58: 1170-1176.

- Créput C, Durrbach A, Menier C, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol.* 2003; 39: 587-594.
- Csencsits KL, Bishop DK. Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: There's more to it than MHC restriction. *Am J Transpl.* 2003; 3: 107-115.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178: 1041-1048.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991; 174: 915-924.
- De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 1993; 150: 4754-4765.
- Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. A Preclinical model for the analysis of genetically modified skin *in vivo*. *Hum Gene Therapy.* 2002; 13: 959-968.
- Derhaag JG, Duijvestijn AM, Damoiseaux JG, et al. Effects of antibody reactivity to major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC alloantigens on graft endothelial cells in heart allograft rejection. *Transplantation.* 2000; 69: 1899-1906.
- Dermarchez M, Hartmann DJ, Regnier M, et al. The role of fibroblasts in the dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. *Transplantation.* 1992; 54: 317-26.
- Desai MH, Mlakar JM, McCauley RL, et al. Lack of long term durability of cultured keratinocyte burn wound coverage: a case report. *J Burn Care Rehabil.* 1991; 12: 540-545.
- Deshane J, Siegal GP, Wang M, et al. Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti-erbB-2 intracellular single-chain antibody for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol.* 1997; 64: 378-385.
- Deutsch M, Meinhart J, Vesely M, et al. In vitro endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: a clinical case report after 41 months of implantation. *J Vasc Surg.* 1997; 25: 757-763.
- Doebis C, Ritter T, Brandt C, Schönberger B, Volk HD, **Seifert M**. Efficient in vitro transduction of epithelial cells and keratinocytes with improved adenoviral gene transfer for the application in skin tissue engineering. *Transplant Immunology.* 2002; 9:323-329.
- Doebis C, Schu S, Ladhoff J, Busch A, Beyer F, Reiser J, Nicosia RF, Brösel S, Volk HD, **Seifert M**. An anti-Major Histocompatibility Complex I intrabody protects endothelial cells from an attack by immune mediators. *Cardiovascular Research.* 2006; 72: 331-338.
- Doebis C, Busch A, Ritter T, Brandt C, Marasco WA, Mhashikar AM, Volk HD, **Seifert M**. Modulation of MHC class I expression on epithelial cells by improved adenovirus-mediated gene transfer: New applications in skin sheet transplantation: *Immunobiology.* 1999; 200: 479.

- Drukker M, Katz G, Urbach A, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 9864-9869.
- Drukker M, Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol*. 2004; 22: 136-141.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, et al. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol*. 1993; 151: 2390-2398.
- Ensminger SM, Spriewald BM, Witzke O, et al. Kinetics of transplant arteriosclerosis in MHC-Class I mismatched and fully allogeneic mouse aortic allografts. *Transplantation*. 2002; 73:1068-1074.
- Falanga V, Margolis D, Alvarez O, et al. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. *Arch Dermatol*. 1998; 134: 293-300.
- Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, et al. Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat Immunol*. 2007; 8: 388-397.
- Figueiredo C, Seltsam A, Blasczyk R. Class-, gene-, and group- specific HLA silencing by lentiviral shRNA delivery. *J Mol Med*. 2006; 84: 425-437.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991; 146: 3444- 3451.
- Gagne K, Brizard G, Gueglio B, et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol*. 2002; 63: 271-280.
- Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol*. 2002; 10: 101-108
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-3683.
- Hackett MEJ. Preparation, storage and use of homograft. *Br J Hosp Med*. 1975; 62: 45.
- Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, et al. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Hum Gene Ther*. 1997; 8: 1313-1319.
- Heath WR, Kane KP, Mescher MF, et al. Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 5101-5105.
- Heeger PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant*. 2003; 3: 525-533.
- Hernandez-Fuentes MP, Baker RJ, Lechler RI. The alloresponse. *Rev Immunogenet*. 1999; 1: 282-296.
- Hojo M, Inoguchi S, Kidokoro M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 111: 1638-1645.
- Housset D, Malissen B. What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol*. 2003; 24: 429-437.

- Hultmann CS, Hunt JP, Yamamoto H, et al. Immunogenicity of cultured keratinocytes allografts deficient in Major Histocompatibility Complex Antigens. *The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care*. 1998; 45: 25-34.
- Hyland S, Beerli RR, Barbas CF, et al. Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor. *Oncogene*. 2003; 22: 1557-1567.
- Jin YP, Jindra PT, Gong KW, et al. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation*. 2005; 79:19-21.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*. 2003; 26: 421-427.
- Kearney JN. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns*. 2001; 27: 545-551.
- Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, et al. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J*. 1997; 16: 5894-5903.
- Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10R beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem*. 2001; 276: 2725-2732.
- Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, et al. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med*. 2002; 8: 233-239.
- Kruger-Krasagakes S, Krasagakakis K, Garbe C, et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*. 1994; 70: 1182-1185.
- Kummer M, Lev A, Reiter Y, et al. Vascular endothelial cells have impaired capacity to present immunodominant antigenic peptides : a mechanism of cell type-specific immune escape. *J Immunol*. 2005; 174: 1947-1953.
- Lamme EN, van Leeuwen RTJ, Jonker A, et al. Living skin substitutes: Survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitute in experimental wounds. *J Invest Dermatol*. 1998; 111: 989-995.
- Laube HR, Duwe J, Rutsch W, et al. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 120: 134-141.
- Le Maoult J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N, et al. Biology and function of human leucocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens*. 2003; 62: 273-284.
- Le Rond S, Azéma C, Krawice-Redanne I, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol*. 2006; 176: 3266-3276.
- Lee RS, Grusby MJ, Laufer TM, et al. CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly, cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation*. 1997; 63: 1123-1133.
- L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 1998; 12: 47-56.

- L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*. 2006; 12: 361-365.
- L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1451-1453.
- Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, et al. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*. 2004; 23: 75-111.
- Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*. 2004; 429: 834-840.
- Ljunggren HG, Van Kaer L, Sabatine MS, et al. MHC class I expression and CD8+ T cell development in TAP1/beta 2-microglobulin double mutant mice. *Int Immunol*. 1995; 7: 975-984.
- Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and the NK recognition. *Immunology Today*. 1990; 14: 52-58.
- Lo AS-Y, Zhu Q, Marasco WA. Intracellular antibodies (Intrabodies) and their therapeutical potential. *Handb Exp Pharmacol*. 2008; 181: 343-73.
- Lobato MN, Rabbitts T. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends in Mol Med*. 2003; 9: 390-396.
- Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, et al. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol*. 1993; 150: 3755-3765.
- Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 7889-7893.
- Marelli-Berg FM, Jarmin SJ. Antigen presentation by the endothelium: a green light for antigen-specific T cell trafficking? *Immunol Lett*. 2004; 93: 109-113.
- McInnes IB, Gracie JA. Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004; 4: 392-397.
- McKay I, Woodward B, Wood K, et al. Reconstruction of human skin from glycerol preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns*. 1994; 20: 19-22.
- Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, et al. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71: 327-331.
- Meinhart JG, Schens J, Schima H et al. Enhanced endothelial cell retention on shear stresses synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 887-895
- Metcalfe AD, Ferguson WJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*. 2007; 28: 5100-5113.
- Mertsching H, Walles T, Hofmann M, et al. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*. 2005; 26: 6610-6617.
- Meyers S, Navsaria H, Sanders R, et al. Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. *The American Journal of Surgery*. 1995; 170: 75-83.
- Mhashilkar AM, Doebis C, **Seifert M**, Busch A, Zani C, Soo Hoo J, Nagy M, Ritter T, Volk HD, Marasco WA. Intrabody-mediated phenotypic knockout of major



- histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and primary human keratinocytes. *Gene Therapy*. 2002; 9: 307-319.
- Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, et al. 1,25- (OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. *Inflamm Res*. 1997; 46: 32-34.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765.
- Nagano H, Mitchell RN, Taylor MK, et al. Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest*. 1997; 100: 50-57.
- Naji A, Deschaseaux F, Racadot E, et al. Induction of tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by cell-specific HLA class I antibody: preliminary data. *Transplant Proc*. 2005; 37: 2892-2893.
- Navarro FA, Stoner ML, Park CS, et al. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil*. 2000; 21: 513-518.
- Nicolich-Zugich J. High specificity, not degeneracy, allows T cell alloresponses. *Nat Immunol*. 2007, 8: 335-337.
- Nugent HM, Edelman ER. Tissue Engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003; 92: 1068-1078.
- Nylenna O, Flornes LM, Westgaard IH, et al. Killer cell lectin-like receptors and the natural killer cell gene complex. *Adv Exp Med Biol*. 2005; 564: 23-24.
- Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, et al. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*. 1995; 154: 1956-1963.
- Pandya AN, Woodward B, Parkhouse N. The use of cultured autologous keratinocytes with Integra in the resurfacing of acute burns. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102: 825-830.
- Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, et al. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol*. 1994; 24: 884-891.
- Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, et al. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 1239-1245.
- Richardson JH, Marasco WA. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends Biotechnol*. 1995; 13: 306-310.
- Richardson JH, Hofmann W, Sodroski JG, et al. Intrabody-mediated knockout of the high-affinity IL-2 receptor in primary human T cells using a bicistronic lentivirus vector. *Gene Ther*. 1998; 5: 635-644.
- Rogers NJ and Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant*. 2001; 1: 97-102.
- Romer J, Hasselager E, Norby PL, et al. Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. *J Invest Dermatol*. 2003; 121: 1306-1311.

- Rouabhia M, Germain L, Belanger F, et al. Cultured epithelium allografts: Langerhans cell and Thy-1+ dendritic epidermal cell depletion effects on allograft rejection. *Transplantation*. 1993; 56: 259-264.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295:2097-2100.
- Rückert R, Asadullah K, **Seifert M**, et al. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol*. 2000; 165: 2240-2250.
- Sata M, Luo Z, Walsh K. Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and transplant-associated intimal hyperplasia. *J Immunol*. 2001; 166: 6964-6971.
- Sato Y, Oshima T, Kondo T. Regulatory role of endogeneous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 265: 194-199.
- Sayegh MH, Wu Z, Hancock WW, et al. Allograft rejection in a new allospecific CD4+ TCR transgenic mouse. *Am J Transplant*. 2003; 3: 381-389.
- Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissue: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000; 21: 2215-2231.
- Seifert M**, Sterry W, Effenberger E, et al. The antipsoriatic activity of IL-10 is rather caused by effects on peripheral blood cells than by a direct effect on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 2000a; 292: 164-172.
- Seifert M**, Doebis C, Ritter T, et al. MHC class I deficient human epithelial cell lines and primary human keratinocytes by intrabody expression- universal donor cells for skin transplantation? *Arch Dermatol Res*. 2000b; 292: 214.
- Seifert M**, Gruenberg BH, Sabat R, et al. Keratinocyte unresponsiveness towards interleukin-10: lack of specific binding due to deficient IL-10 receptor 1 expression. *Exp Dermatol*. 2003; 12: 137-144.
- Seifert M**, Doebis C, Beyer F, Schu S, Brösel S, Ritter T, Laube H, Marasco WA, Reiser J, Volk HD. Protection of allogeneic vascular endothelial cells by gene transfer of anti-MHC class I intrabodies. *Cytotherapy*. 2004; 6: 259.
- Seifert M**, Ladhoff J, Doebis C, Brösel S, Zdoroveac A, Laube H, Schmitt-Knosalla I, Volk HD. Vascular grafts seeded with endothelial cells and their immunogenicity in a rat transplantation model. *Cytotherapy*. 2006; 8: 12.
- Seifert M**, Giese C, Ammer R, Demmler C. Perfusionsvorrichtung für Blutgefäße, *Deutsches Patent- und Markenamt*, 2007, Gebrauchsmuster Nr. 20 2007 014 630.2; Inhaber: Charité- Universitätsmedizin Berlin und ProBioGen AG Berlin,
- Seifert M**, Fleischer B, Ladhoff J, et al. Application of acellularized vascular matrices seeded with MHC class I deficient endothelial cells in a rat aortic transplantation model, in Vorbereitung.
- Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11: 385-402.
- Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, et al. Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol*. 2004; 172: 2006-2010.

- Signas C, Katze MG, Persson H, et al. An adenovirus glycoprotein binds heavy chains of class I transplantation antigens from man and mouse. *Nature*. 1982; 299: 175-178.
- Sledz CA, Williams BR. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32: 952-956.
- Stevenson PG, Efstathiou S, Doherty PC, et al. Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 8455-8460.
- Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, et al. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001; 166: 973-981.
- Svensjö T, Yao F, Pomahac B, et al. Cultured autologous fibroblasts augment epidermal repair. *Transplantation*. 2002; 7: 1033-1041.
- Tanner JC, Vandeput J, Olley JF. The mesh skin autograft. *Plast Reconstr Surg*. 1964; 34: 287-92.
- Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, et al. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularized porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000; 19: 381-386.
- Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002; 23: 475-485.
- Trommer J, Schmitt-Knosalla I, Biens K, Effenberger E, Ladhoff J, Fleischer B, Hansmann J, Giese C, Ammer R, Volk HD, **Seifert M**. Construction of small diameter vascular grafts based on decellularized matrices seeded with aortic endothelial cells in a pulsatile flow bioreactor. *Regenerative Medicine*. 2007; 2: 578.
- Unger MG, Roberts M. Lyophilised amniotic membranes as a temporary biological dressing. *Surg Gynecol Obstet*. 1973; 136: 904-906.
- Valitutti S, Muller S, Dessing M et al. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med*. 1996; 183: 1917-1921.
- Von Herrath MG, Efrat S, Oldstone MB, et al. Expression of adenoviral E3 transgenes in beta cells prevents autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 9808-9813.
- Wang J, Reinherz EL. Structural basis of cell-cell interactions in the immune system. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10: 656-661.
- Weber DA, Terrell NK, Zhang Y, et al. Requirement for peptide in alloreactive CD4+ T cell recognition of class II MHC molecules. *J Immunol*. 1995; 154: 5153-5164.
- Wehner J, Morrell CN, Reynolds T, et al. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res*. 2007; 100: 191-203.
- Werge TM, Biocca S, Cattaneo A. Intracellular immunization. Cloning and intracellular expression of a monoclonal antibody to the p21ras protein. *FEBS Lett*. 1990; 274:193-198.
- Westgaard IH, Dissen E, Torgersen KM, et al. The lectin-like receptor KLRE1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2003; 197: 1551-1561.

- Westgaard IH, Berg SF, Vaage JT, et al. Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 1200-1206.
- Whitlow M, Bell BA, Feng SL, et al. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.* 1993; 6: 989-995.
- Wheeler YY, Kute TE, Willingham MC, et al. Intrabody-based strategies for inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2: effects on apoptosis, cell growth, and angiogenesis. *Faseb J.* 2003; 17: 1733-1735.
- Wilkin LM, Watson SR, Prosky SJ. Development of bilayered living skin construct for clinical application. *Biotechnol Bioeng.* 1994; 43: 747-756.
- Wolk K, Kunz S, Asadullah K, et al. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol.* 2002; 168: 5397- 5402.
- Wu GD, Jin YS, Salazar R, et al. Vascular endothelial cell apoptosis induced by anti-donor non-MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2002; 21: 1174-1187.
- Yang EK, Seo YK, Youn HH, et al. Tissue engineered artificial skin composed of dermis and epidermis. *Artif Organs.* 2000; 24: 7-17.
- York IA, Roop C, Andrews D, et al. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell.* 1994; 77: 525-535.
- Zhang WJ, Liu W, Cui L, et al. Tissue engineering of blood vessels. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 945-957.
- Zdoroveac A, Doebis C, Laube H, Brösel S, Schmitt-Knosalla I, Volk HD, **Seifert M.** Modulation of graft arteriosclerosis in a rat carotid transplantation model. *Journal of Surgical Research.* 2008; 145: 161-169.

## 5. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst all denjenigen Menschen, die mich auf meinem wissenschaftlichen Werdegang bisher begleitet haben und die mich nachhaltig für die Immunologie begeistern konnten. Besonders herzlich bedanke ich mich bei Prof. Rüdiger von Baehr für die Forschungszeit am Institut für Medizinische Immunologie unter seiner Leitung und für seine stetige freundliche Unterstützung und Förderung.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Hans-Dieter Volk, der mich in meinem wissenschaftlichen Werdegang am Institut für Medizinische Immunologie bestärkt und der durch viele gute und konstruktive Gespräche die Bearbeitung und den Fortschritt der eigenen wissenschaftlichen Projekte beflügelt hat. Danke auch für ein vertrauensvolles und freundschaftliches Miteinander in der gesamten gemeinsamen Institutszeit.

Meiner Arbeitsgruppe, ohne die alle experimentellen Vorhaben niemals umgesetzt werden könnten, danke ich ganz besonders herzlich. Dabei geht ein ganz besonderes Dankeschön an meine langjährige technische Assistentin Elke Effenberger für die vielen gemeinsam bewältigten Projekte und experimentellen Herausforderungen und eine vertrauensvolle Zusammenarbeit. Ebenso bedanke ich mich bei den technischen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie Sabine Brösel, Heinz Tanzmann und Christa Liebenthal für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Viele Doktoranden und Diplomanden haben zu einem nicht unerheblichen Teil dazu beigetragen, dass die Forschungsprojekte erfolgreich waren. Ich bedanke mich deshalb an dieser Stelle ganz besonders bei Cornelia Doebis, Annette Busch, Florian Beyer, Andrei Zdoroveac, Juliane Ladhoff, Bernhard Fleischer, Mareen Matz, Katja Biens, Anke Stein, Andrea Kießling, Jeanne Trommer, Maria Dams, Sabine Schu und allen anderen Studenten und Praktikanten, die in meiner Arbeitsgruppe für eine Zeit tätig waren und sind.

Mein Dank richtet sich auch an alle ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen des Institutes für Medizinische Immunologie für ihre Unterstützung und kooperative Zusammenarbeit, sowie an alle Kooperationspartner für den wissenschaftlichen Austausch und die vielfältige Unterstützung. Hier sind unter vielen Anderen zu nennen: Dr. Ralf Glaser, Dr. Sigbert Jahn, Dr. Uwe Marx, Dr. Volker Sandig, Dr. Dirk Roggenbuck, Dr. Gabriele Küttner, Dr. Khusru Asadullah, Dr. Robert Sabat, Dr. Isabela Schmitt-Knosalla, Dr. Gerald Grütz, Dr. Horst Laube, Dr. Silvia Bulfone-Paus, Dr. René Rückert, Dr. Ralf Arnold, Dr. Markus Friedrich, Dr. Thomas Ritter, Prof.

Wolfgang Höhne, Prof. Roberto Nicosia, Prof. Wayne Marasco, Prof. Jakob Reiser, Dr. Ulrich Stock und Prof. Heike Mertsching.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung zu jeder Zeit und dafür, dass sie mir stets aufs Neue die Kraft gibt, alle Arbeitsvorhaben zu bewältigen.

---

## 6. Eidesstattliche Erklärung

§4 Abs 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 11.06.2008

Martina Seifert