

## **3 Methoden**

### **3.1 Überblick über die Abfolge angewandter Methoden**

- Endothelzellkultur und –charakterisierung
- Transduktion humaner Endothelzellen mit Adenoviren
- FACS-Analytik transduzierter Endothelzellen
- Gewinnung humaner Nabelschnurendothelzellen und Nabelschnurblutleukozyten
- EBV-Transformation der Nabelschnurblutleukozyten und Generierung von BLC
- Lymphozytenkokultur zur Generierung allospezifischer CTL
- Zytotoxizitätstests

### **3.2 Endothelzellkultur**

#### **3.2.1 Isolierung humaner Nabelschnurendothelzellen**

Die Nabelschnüre wurden nach Absprache mit der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin der Charite, Campus Mitte von freiwilligen Spenderinnen aus dem Kreissaal zur Verfügung gestellt. Dort erfolgte auch die Entnahme von Nabelschnurblut zur Gewinnung von autologen PBMC. Die Nabelschnüre waren auf einem Abschnitt von mindestens 20 cm Länge nicht traumatisiert und wiesen keine Punktionsstellen auf. Die Nabelschnüre wurden in Transportflaschen mit sterilem HEPES Puffer überführt, bei 4°C gelagert und innerhalb von 8 Stunden aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte analog dem Protokoll der Firma Promocell. Im Labor wurden das Nabelschnurmaterial unter sterilen Bedingungen dem Transportgefäß entnommen, die Enden neu angeschnitten und anschließend die Nabelschnurvene mit abgestumpften Butterfly-Kanülen und Gefäßklemmen an beiden Seiten angeschlossen. Mit einer 50 ml Spritze wurde die Vene vorsichtig mit HEPES-Puffer gespült, um Blutreste zu entfernen und Lecks auszuschließen. Anschließend wurde bei verschlossener Abflusskanüle die 0,2 % Collagenase II / HBSS-Puffer eingebracht, bis die Vene ausreichend gefüllt war und der Zufluss abgeklemmt. Die Nabelschnur wurde nun 15 min in einer verschlossenen sterilen Schale bei

Raumtemperatur inkubiert, wobei sie zweimal entnommen und leicht beklopft wurde. Anschließend wurden die Endothelzellen mit der Collagenaselösung und 2-maligem Spülen mit HEPES Puffer in ein Sammelgefäß ausgespült, zentrifugiert, gezählt und in EBM-2-Medium in eine T25-Flasche ausgesät. Bei den nachfolgenden Passagen wurden die HUVEC-Isolate mit Amphotericin B und antibiotikahaltigem PBS mehrfach gewaschen um bakterielle und mykotische Infektionen zu vermeiden. Die Passagen 1-5 wurden dazu benutzt, eine ausreichende Anzahl von Sicherheitseinfrierungen anzulegen. Alle Experimente wurden mit HUVEC der Passagen 5-10 durchgeführt.

### 3.2.2 Kultur der HUVEC

HUVEC wurden in EBM-2 Medium in 24-Loch-Platten und in liegenden T25- oder T75-Flaschen im Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre kultiviert. Eine mikroskopische Kontrolle auf Infektion und Zelldichte erfolgte täglich. Das Medium wurde bei Farbumschlag des Indikators, spätestens jedoch nach 3 Tagen gewechselt. Bei Mediumwechsel wurden die adhärennten Zellen vorsichtig mit PBS gespült. Das Volumen des zugegebenen EGM-2-Mediums betrug 1 ml / Loch für 24-Loch-Platten, 5 ml / T25-Flasche und 20 ml / T75-Flasche.

Zur Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wurde IFN- $\gamma$  mit 500 pg/ml und TNF- $\alpha$  mit 5 ng/ml dem EBM-2-Kulturmedium für 48 h zugesetzt.

### 3.2.3 Passage der HUVEC

Ein Umsetzen der Zellen wurde ab einem Konfluenzgrad von 90 % vorgenommen. Dabei wurden die mit PBS gespülten adhärennten HUVEC in 2 ml /25-Kulturflasche bzw. 5 ml/ T75-Kulturflasche Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle und unter leichtem Klopfen von der Oberfläche ablösen. Die Zellsuspension wurde in 10 ml 10 % FKS haltigem PBS aufgenommen, welches das Trypsin inaktiviert und dann abzentrifugiert. Nach 2-maligem Waschen in PBS wurden die Zellen in EBM-2 Lösung aufgenommen auf neue Kulturgefäße verteilt. Die Zellzahl bei Aussaat betrug bei 24 well Platten ca.  $2\text{-}5 \times 10^4$  HUVEC/well, bei T25 Flaschen ca.  $3\text{-}5 \times 10^5$  und bei T75 Flaschen etwa  $1 \times 10^6$

HUVEC/Flasche

#### 3.2.4 Kryokonservierung der HUVEC

Die Kryokonservierung der HUVEC erfolgte in Aliquots zu je  $3-5 \times 10^5$  Zellen in 1,8 ml vorgekühltem FKS mit 10 % DMSO in Kryokonservierungsröhrchen. Aus einer konfluent bewachsenen T25 Flasche konnten so etwa 3 Aliquots konserviert werden. Die abgelösten, in PBS gewaschenen und gezählten HUVEC wurden in kühles Einfriermedium aufgenommen, schnell auf die Röhrchen verteilt und diese in Isolationsverpackungen zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach drei Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff mit  $-196^\circ\text{C}$  überführt. Zum Auftauen der HUVEC wurden die Kryokonservierungsröhrchen dem Stickstoff entnommen, schnell im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und sofort in kühles EBM-2 Medium aufgenommen, abzentrifugiert und nach 2-maligem Waschen mit Medium in eine T25 Flasche übernommen und anfangs mit 2 ml und nach einem Tag mit 5 ml Medium versorgt.

#### 3.2.5 Identifikation der HUVEC als endotheliale Zellen

In vitro kultivierte HUVEC zeigen ein Wachstum als einschichtige, kontakthihibitede Monolayer [28]. Immunologische Identifikationsmarker sind die Expression von CD 31-Molekülen an der Zelloberfläche sowie die intrazelluläre Expression des von von-Willebrand-Faktor. Als spezifische metabolische Eigenschaft wurde die selektive Aufnahme von Dil-Ac-LDL herangezogen [97].

Hierbei wird einer Endothelzellkultur farbmarkiertes acetyliertes LDL mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  dem Medium zugesetzt und 4 Stunden inkubiert. Nach anschließendem Waschen sieht man im Fluoreszenzmikroskop intrazellulär eine rote Fluoreszenz der Zellen in Form kleiner Granula.

### 3.3 Lymphozytenkulturen

Um eine Protektion von Intrabody-transduzierten HUVEC vor zellulärer Abstoßung nachzuweisen war die Etablierung eines *in vitro*-Abstoßungsmodells nötig. Zur Generierung alloreaktiver Lymphozyten wird vor allem die gemischte Lymphozytenkultur angewandt. Bei nicht lymphozytären Stimulatorzellen ist deren Fähigkeit, Spenderantigene in Kombination mit Kostimulatori-

schen Signalen zu präsentieren, elementar. Humane Endothelzellen als nicht professionelle APZ mit einer unter inflammatorischen Bedingungen geringen MHC II-Expression induzieren nur sehr schwache allospezifische T-Zell-Antworten. Außerdem haben die so generierten T-Zellen nicht die üblichen Eigenschaften zytotoxischer T-Zellen [98]. So waren HUVEC als alleinige Stimulatorzellen zur Erzeugung allospezifischer CTL ungeeignet [99]. Die Generierung alloreaktiver CTL zur Verwendung in den Zytotoxizitätsassays wurde in Anlehnung an die Protokolle von T. Dengler, JS. Pober, B. Biedermann und L. Zheng et al. durchgeführt [97] [100] [101] [102]. Als Stimulatorzellen dienten BCL, die aus dem Nabelschnurblut der zur HUVEC-Isolation verwendeten Nabelschnüre gewonnen und mit Hilfe einer EBV-Transformation immortalisiert werden konnten [101, 103] [104]. Auf diese Art und Weise erhielten wir einen ständig verfügbaren Vorrat autologer Stimulatorzellen mit APZ Eigenschaften für die Kokulturen mit allogenen T-Lymphozyten. Als Responderzellen wurden aus HLA diskordanten Spender-PBMC isolierte CD8+ T-Lymphozyten verwendet, da wir bei der Verwendung normaler PBMC als Responderzellen keine ausreichenden Mengen an CTL kultivieren konnten.

### 3.3.1 Allgemeine Abfolge der Lymphozytenkulturen

Die Gewinnung und EBV-Transformation der Nabelschnurleukozyten stand am Anfang. Es folgte die Auswahl eines entsprechenden HLA diskordanten Spenders und die Gewinnung und Isolierung der CD8+ Responderzellen. Dann schloss sich die lymphozytäre Kokultur zur Generierung allospezifischer CTL an, die im Weiteren für die Durchführung der Zytotoxizitätstests verwendet wurden. Parallel wurden FACS Kontrollen zur Charakterisierung der erhaltenen CTL durchgeführt.

### 3.3.2 Gewinnung humaner Nabelschnurleukozyten

Die Gewinnung von 10 bis 20 ml Nabelschnurvenenblut erfolgte noch im Kreissaal. Es wurde in Zitratmonovetten zusammen mit den Nabelschnüren in unsere Labore gebracht und dort aufgearbeitet. Die Präparation erfolgt analog zur Gewinnung von PBMC (s.u.).

### 3.3.3 Generierung humaner B-lymphoblastoider Zellen

Die Transformation der gewonnenen Nabelschnurleukozyten mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde anschließend durchgeführt [101, 103] [104].

Die Inkubation von PBMC mit dem EBV-haltigen Überstand der Zelllinie B 95/8 führt zur EBV-Infektion der naiven B-Zellen und zur Immortalisierung analog zur Pathogenese des Burkitt-Lymphoms. Im weiteren Verlauf der Kultur überwuchern die autonom proliferierenden BLC die anderen Zellpopulationen der PBMC. Anschließend wurden die BLC HLA-typisiert, kryokonserviert und in aufrecht stehenden T25 Flaschen kultiviert.

Protokoll:

- $2 \times 10^7$  Nabelschnurblutleukozyten in 2 ml RPMI 1640 aufnehmen
- Zugabe von 2 ml Zellkulturüberstand der Zelllinie B 95.8
- Inkubation im Brutschrank über Nacht in 6-Loch Platten
- Ansätze absaugen, 1 x Waschen in RPMI 1640
- Aussaat in stehenden T-25 Flaschen mit 5 ml RPMI 1640 / 10 % FKS

### 3.3.4 Kultur der BLC

Die *in vitro* Kultivierung erfolgte mit 20 ml RPMI 1640 / 10 % FKS in stehenden T25 Flaschen. Der Wechsel des Mediums wurde bei Farbumschlag des Indikators nach gelb oder spätestens nach 3 Tagen vorgenommen.

### 3.3.5 Kryokonservierung und Auftauen der BLC

Die Kryokonservierung der BLC erfolgte in Aliquots zu je  $3-5 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml vorgekühltem FKS mit 10 % DMSO in Kryokonservierungsröhrchen. Die in PBS gewaschenen und gezählten BLC wurden in kühlem Einfriermedium aufgenommen, schnell auf die Röhrchen verteilt und diese in Isolationsverpackungen zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach drei Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  überführt.

Zum Auftauen der BLC wurden die Kryokonservierungsröhrchen dem Stickstoff entnommen, schnell im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und sofort in kühles voll supplementiertes RPMI 1640 / 10 % FKS aufgenommen, abzentrifugiert und nach 2-maligem Waschen in Medium in eine T25-Flasche

überführt und anfangs mit 5 ml und später mit 20 ml Medium versorgt.

### 3.3.6 Gewinnung humaner peripherer Blutlymphozyten

Nach Auswahl eines HLA diskordanten Spenders wurden zu jeder Kokultur 100 ml Blut entnommen und die enthaltenen PBMC sofort durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

Protokoll:

- Blutentnahme 100 ml
- Mischen des Blutes 1:1 mit PBS bei Raumtemperatur
- Füllen der 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Ficoll Paque
- Vorsichtiges Überschichten mit 25 ml Blut/PBS Gemisch
- Dichtegradientenzentrifugation über 40 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur
- vorsichtiges Absaugen des Lymphozytenringes mit einer Pasteurpipette
- 2-maliges Waschen in PBS / 10 % ABS und Zählen

### 3.3.7 HLA-Typisierung der Zellen

Die gesamte HLA-Typisierung mittels PCR wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Marion Nagy, Institut für Gerichtsmedizin, Charite Campus Mitte, Berlin durchgeführt. Zur Typisierung wurden jeweils ca.  $2 \times 10^6$  BLC, PBMC oder  $1 \times 10^6$  HUVEC in 2 ml Eppendorfgefäßen in dem jeweiligen Kulturmedium verschickt.

### 3.3.8 CD8+-Zellisolation aus PBMC

CD8+ T-Lymphozyten wurden aus PBMC mit dem CD8-Isolation-Kit (Dynal, Hamburg) nach den Vorschriften des Herstellers isoliert. Dabei werden mit anti CD8-IgG beladene Eisenkugeln („beads“) unter ständigem Rollen mit den PBMC inkubiert. Die an die Kugeln gebundenen CD8+ T-Lymphozyten wurden dann mit einem Magneten heraussortiert und gewaschen. Anschließend wurden die Komplexe mit Antikörpern inkubiert (Detach a bead-Lösung, Dynal, Hamburg), die eine höhere Affinität zu den beadgebundenen Antikörpern haben als die CD8-Oberflächenmoleküle der gesorteten T-Zellen. Auf diese Weise erhält man nach magnetischem Abtrennen der Eisenkugeln und dem Sammeln des Überstandes die unveränderten CD8+ T-Lymphozyten in

hoher Reinheit.

Protokoll:

- Blutentnahme 100 ml und Präparation der PBMC
- 2-mal in PBS waschen, zählen und mit  $1 \times 10^7$ /ml in kaltes PBS / 2 % FKS aufnehmen, auf Eis lagern
- In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pro zu sortierenden  $1 \times 10^7$  PBMC je 72  $\mu$ l „Dynabeads CD8“ entnehmen und mit 1 ml kaltem PBS/2 % FKS waschen, mit dem Magneten sortieren und anschließend mit kaltem PBS/ 2 % FKS das ursprüngliche Ausgangsvolumen wiederherstellen
- Beads und PBMC zusammen im 15 ml Zentrifugenröhrchen rollend bei 4°C 20 Minuten inkubieren
- Beadgebundene Zellen mit dem Magneten POSITIV sortieren
- 4-5 mal in kaltem PBS / 2 % FKS waschen
- Aufnahme in je 100  $\mu$ l RPMI 1640 / 1 % AB-Serum pro  $10^7$  PBMC
- Zugabe von 10  $\mu$ l Dynabead „Detach a bead CD8“ AK-Lösung
- Inkubation 45-60 min im Roller bei Raumtemperatur
- CD8+-Zellen befinden sich jetzt im Überstand - daher NEGATIV sortieren
- Beads noch 3-mal in 0,5 ml RPMI 1640 / 1 % AB-Serum waschen und negativ sortieren
- Zellsuspension auf 10 ml mit RPMI 1640 / 1 % AB-Serum auffüllen, zählen ( $1-1,5 \times 10^7$ ) und abzentrifugieren
- CD8+-Zellen zu  $1 \times 10^6$ /ml mit RPMI 10 % AB Serum einstellen
- FACS Kontrolle zur Reinheit der Isolate und FACS Kontrolle der Restzellpopulation zum Einschätzen der Ausbeute

### 3.3.9 Kokultur zur Generierung allospezifischer CTL

Zur Generierung allospezifischer CTL wurden bestrahlte Stimulator BLC des Haplotyps HLA-A 3 und -23 und HLA-B 4 und 44 mit Responder-CD8+-Lymphozyten des Haplotyps HLA -A 1 und -29 und HLA-B 8 und -44 kokultiviert. Die Diskordanz im HLA-A Locus erwies sich zur Stimulation als ausreichend da vielmehr im Hinblick auf den später stattfindenden Zytotoxtest ein kompletter HLA-mismatch der 3rd party Kontrolle sowohl zu den Stimulator- als auch Responderzellen erforderlich war. Das Verhältnis von Stimulator BLC zu Responder CD8+ Lymphozyten betrug bei Aussaat 1:5.

Die Stimulatorzellen wurden mit 100 Gy bestrahlt um eine weitere Proliferation der BLC in der Kokultur zu verhindern [105] [102].

Die gesamte Kokultur wurde in voll supplementiertem RPMI 1640 unter Zusatz

von 10 % humanem AB Serum durchgeführt um eine unspezifische Aktivierung der Spender CD8+-Lymphozyten durch Kälberserumbestandteile zu verhindern. Die Kokultur wird an den Tagen 3, 7 und 11 mit rekombinantem humanen IL-2 stimuliert, um auch BLC-unabhängig die CTL zur weiteren Proliferation anzuregen, vor einer aktivierungsinduzierten Apoptose zu schützen und die zytotoxische Differenzierung zu fördern. Die Kokultur wird am 7. Tag erneut mit frischem Medium, IL-2 und BLC-Stimulatorzellen restimuliert. Bei sehr starker Proliferation und stoffwechselbedingter Azidose im Medium war an den Tagen 5 und 9 oder 10 eine Zugabe von Kokulturmedium erforderlich.

Protokoll:

Tag 0 – Präparation der Responder CD8+-Zellen und Ansatz der Kokultur mit BLC:

- BLC-Stimulatorzellen mit 100 Gy bestrahlen und zählen
- BLC in RPMI 1640 waschen und auf  $2 \times 10^5$ /ml mit RPMI 1640 / 10 % AB Serum einstellen
- je 100  $\mu$ l CD8+-(s.o.) und Stimulatorzellen / well (entspricht  $1 \times 10^5$  CD8 pro  $2 \times 10^4$  BLC / Ansatz) in eine 96 Loch Rundbodenplatte geben, ca. 4 Kontrollansätze ohne Zusatz von Stimulatorzellen anlegen

Tag 3 – 1. Stimulation mit IL-2:

- Herstellung einer 20 $\mu$ g/ml Arbeitsverdünnung aus einer rekombinanten humanen IL-2 Stocklösung (1 mg/ml) mit RPMI 1640 ohne Serumzusatz
- Gesamtvolumen des Kokulturansatzes ermitteln (19,2 ml / 96-Loch Platte; 200 $\mu$ l/ Loch)
- Herstellen der Stimulationslösung mit 1:600 verdünnter IL-2-Arbeitsverdünnung in RPMI 1640 / 10 % AB Serum
- 34,5  $\mu$ l Stimulationslösung / Loch (Endkonzentration 5 ng/ml)
- evtl. Kontrollansätze ohne IL-2 Zusatz belassen

Tag 7 – Umsetzen der Kokultur:

- Ernte der Kokultur, Zellzahlbestimmung, Aufnahme mit  $1 \times 10^6$  /ml in RPMI 1640 / 10 % AB Serum
- Neu geerntete BLC-Stimulatorzellen mit 100 Gy bestrahlen und auf  $2 \times 10^5$ /ml in RPMI 1640 / 10 % AB Serum einstellen
- CD8+- und Stimulatorzellen zusammengeben und Zugabe von 2,5 $\mu$ l IL-2 Arbeitsverdünnung / ml Zellsuspension (Endkonzentration 5 ng/ml)
- Ausplattieren von je 200 $\mu$ l/well in 96 Rundbodenplatten
- FACS-Färbung der Zellen aus der Kokultur und den Kontrollansätzen



- Tag 10 Restimulation mit IL-2 (siehe Tag 3):
- Herstellen der Stimulationslösung mit 1:600 verdünnter IL-2-Arbeitsverdünnung in RPMI 1640 / 10 % AB Serum
- 34,5 µl Stimulationslösung/well (IL-2-Endkonzentration 5 ng/ml)

Tag 11 – Zytotoxizitätstest

### 3.4 Adenovirale Transduktionen

Die adenoviralen Transduktionen wurden mit einem E1-deletierten humanen rekombinanten Ad-5 Adenovirus Vektorsystem durchgeführt [96]. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Konstrukte verwendet. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte mit Hilfe des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) Reportergens im adenoviralen Vektorkonstrukt (AdEGFP, Gabe von A. Flügel, München). Vergleichende Kontrollen wurden mit dem E. Coli  $\beta$ -Galactosidase Gen ( $\beta$ Gal) und dem  $\alpha$ 1-Antitrypsin Gen (AAT, Gabe von M. Kay, Stanford, USA) durchgeführt. Das eigentliche therapeutische Gen war das adenovirale Vektorkonstrukt mit dem anti MHC I-single chain variable fragment intrabody (AdsFv, Ausgangsplasmidvektor von W. Marasco, Boston). Zur Verbesserung der Transduktionseffizienz wurde das Polykation Polybrene mit 8 µg / ml dem Transduktionsansatz zugefügt [95]

Protokoll:

- Zellen in EBM-2 waschen und zählen
- Transduktionslösung mit 200 Viren / Zelle (multiplicity of infection-MOI = 200) aus der viralen Stocklösung mit serumarmen EBM-2 hergestellen.
- Ansatzvolumen beträgt für 24-Loch Platten je 200 µl, für T-25 Flaschen je 2 ml und für T-75 Flaschen je 5 ml
- Zellen für 30 Minuten unter RT mit den Viren inkubieren
- Absaugen der Inkubationslösung, Zugabe von Kulturmedium je 1 ml für 24-Loch-Platten, 5 ml für T-25 Flaschen und 20 ml für T-75 Flaschen

### 3.5 Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrischen Messungen wurden am FACSort (Becton Dickinson) durchgeführt. Einmal eingestellte Messparameter (Verstärkung der einzelnen Kanäle, Streuwertkorrekturen, Messbereiche etc.) wurden im Ver-

lauf einer Messreihe nicht verändert.

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm „Cell Quest“ (Becton Dickinson) für Apple PC oder WinMDI 2.8 für Microsoft Windows ausgewertet und anschließend mit Microsoft Excel und Sigma blot weiterbearbeitet.

Protokoll:

- $0,5-3 \times 10^5$  Zellen in 1 ml kaltem FACS-Puffer suspendieren und in ein FACS-Röhrchen aufnehmen, waschen, 5 min abzentrifugieren bei 1200 rpm und 4°C Temperatur
- Überstand abgesaugen
- je Färbeansatz je 2µl der entsprechenden Antikörperlösung in 40µl Zellsuspension pipettieren
- 30 min Inkubation bei 4°C, vortexen nach 15 min
- waschen in je 1 ml kaltem FACS-Puffer
- Aufnahme der gefärbten Zellen in 100-200µl Fixierungslösung und Messen am FACSort innerhalb von 24 h

### **3.6 Ermittlung der Transduktionseffizienz**

Zur Ermittlung der Effizienz der adenoviralen Transduktion bei HUVEC wurden mit dem AdEGFP Reporter gen transduzierte HUVEC 48h nach der Transduktion im FACS gemessen. Die grüne Fluoreszenz des exprimierten EGFP nach erfolgreichem Gentransfer ergab ein positives Signal im FL-1 Kanal. Im Vergleich mit untransduzierten bzw. Kontrollvektor transduzierten HUVEC konnte eine negative Schwelle für das Signal im FL-1-Kanal festgelegt werden und der prozentuale Anteil der erfolgreich AdEGFP-transduzierten HUVEC ermittelt werden.

### **3.7 Ermittlung der MHC I-Oberflächenexpression**

Zur Ermittlung der MHC I Oberflächenexpression wurden HUVEC mit FITC markierten anti HLA -A, B, C Antikörpern gefärbt. Die Negativschwelle wurde mit einer parallelen Färbung mit FITC markiertem Maus IgG Isotyp Kontroll-Antikörper festgelegt. Die unterschiedliche Quantität der MHC I Expression auf unterschiedlich behandelten HUVEC konnte durch den gemittelten Intensitätswert (MFI = mean fluorescence intensity) im FL-1 Kanal ermittelt werden, solange die Messparameter nicht verändert wurden.

### **3.8 Expression anderer Oberflächenmarker auf Endothelzellen**

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurde die Expression anderer Oberflächenmarker auf HUVEC verschiedener Passagen und teilweise nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren oder nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen gemessen. Der Expressionsgrad wurde wiederum durch den Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit denen der Isotypkontrollen ermittelt. Folgende Oberflächenmarker wurden untersucht:

Das Adhäsionsmolekül CD 31 als charakteristischer Marker auf Endothelzellen, als Aktivierungsmarker der Transferrinrezeptor CD 71, das Adhäsionsmolekül CD 54 (ICAM I), das MHC II-Molekül, sowie der Stammzellmarker CD 34.

### **3.9 Oberflächenmarker der BLC**

B-lymphoblastoide Zellen (BLC) wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer MHC I- und -II-Expression untersucht. Weiterhin wurden die B-Zellmarker CD 19 und 21 bestimmt.

### **3.10 Oberflächenmarker der T-Lymphozytenkulturen**

Die Zellen der Lymphozytenkulturen wurden am Tag 3, 7, und 11 auf ihre Reinheit mit den Markern CD3 und CD8 sowie ihren Aktivierungsgrad mit dem Marker CD 25 überprüft. Außerdem ließ sich bereits in den Scatter-Plots der Messungen die proliferierende Blasten-Subpopulation der Zellen abgrenzen und deren Anteil bestimmen.

### **3.11 Zytotoxizitätsassays**

In einem Zytotoxizitätstest wurden in drei parallel ablaufenden Teilversuchen die Lyseraten der generierten CTL gegenüber den Stimulatorzellen (BLC) und den HUVEC verglichen.

1.: Bei der Verwendung der BLC als Zielzellen wurden sowohl die Stimulatorzellen als auch eine HLA-verschiedene Kontrolle (3<sup>rd</sup> party) verwendet. So ließ sich eine Allospezifität der erzeugten CTL nachweisen.

2.: Parallel dazu wurden HUVEC des Stimulator- und des „3<sup>rd</sup> party“-HLA-Typs als Zielzellen eingesetzt. Aus diesen Ergebnissen ließen sich die allospezifischen Lyseraten gegen HUVEC ermitteln.

3.: Es wurden die Lyseraten von Intrabody transduzierten und Kontrollvektor transduzierten HUVEC des Stimulatorzellgenotyps verglichen. Daraus konnten die Effekte der Intrabody-Transduktion abgeleitet werden.

Der Zytotoxizitätstest basiert auf einem Fluoreszenz-Freisetzungstest [106] [98] [102]. Calcein-AM, ein Farbstoff-Ester (Calcein-AM) wird von den Zielzellen aufgenommen, intrazellulär durch Esterasen hydrolysiert und erst dadurch fluoreszierend. Ein weiterer Effekt der Esterspaltung ist, dass Calcein nicht mehr durch die Zellmembran hindurch in den Kulturüberstand diffundieren kann. Die so markierten Zielzellen werden dann in unterschiedlichen Effektor-/Zielzellkonzentrationen (effector/target ratios E/T-ratios) mit CTL inkubiert und anschließend wird die Fluoreszenz des aus lysierten Zellen freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffes im Zellkulturüberstand quantitativ ermittelt. Mit Hilfe der parallel ermittelten Fluoreszenzintensitäten bei Maximalfreisetzung (Fluoreszenzintensität im Überstand Triton X-lysierten Zellen) und Spontanfreisetzung (Fluoreszenzintensität im Überstand markierter Kontroll-HUVEC) von Calcein aus HUVEC lässt sich so ein prozentualer Anteil lysierter Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen E/T-ratio ermitteln.

Formel:

$$\text{Zelllyse \%} = \frac{(\text{Experimentelle Calceinfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}) \times 100}{(\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})}$$

Zusätzlich werden bei einem Teil der Ansätze (jeweils die 3 höchsten E/T-ratios) die TZR abhängige Lyse durch eine Vorinkubation der CTL mit 10 µg/ml eines TZR-blockierenden Antikörpers (OKT3) inhibiert. So kann anschließend durch Subtraktion von den Gesamtlyseraten die von der MHC I-TZR Interaktion abhängige Zelllyse ermittelt werden.

Formel:

$$\text{TZR spezifische Zelllyse in \%} = \text{Zelllyse} - \text{Zelllyse unter TZR-Blockade}$$

Für die einzelnen Zielzellpopulationen werden 3 Replikate / Ansatz pipettiert, Maximal-, Spontanfreisetzung und Leerwert wurden aus 4fach-Replikaten ermittelt. Jede Platte wird am Fluoreszenzmessgerät 3fach durchgemessen und die Werte gemittelt.

### 3.11.1 Labeln mit Calcein-AM

Protokoll:

- Zielzellen ernten, 2 mal in PBS waschen, zählen
- Zellen auf  $1-2 \times 10^6$ /ml in serumfreiem Medium einstellen
- Calcein Stocklösung 1:200 dazugeben ( $5 \mu\text{l}$  ad  $1 \text{ ml} = 5 \mu\text{M}$ )
- Inkubation 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad
- 3 x waschen in serumhaltigem Medium.
- auf gewünschte Zellzahl (HUVEC  $2 \times 10^5$ /ml, BLC  $4 \times 10^5$ /ml) einstellen und je  $100 \mu\text{l}$  in jedes well einer 96-Rundbodenplatte pipettieren (je  $2 \times 10^4$  HUVEC und  $4 \times 10^4$  BLC / Well)
- für die Maximalfreisetzung die Zellen in 0,9 % Triton X lysieren
- Lagerung der Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  bis die Effektorzellen dazu pipettiert werden

### 3.11.2 Aussaat der Effektorzellen

Protokoll:

- CTL ernten und in Medium 1 mal waschen, Zellzahl bestimmen
- auf maximal benötigte Konzentration einstellen (z.B.: bei  $2 \times 10^4$  targets/well und 20:1 E/T ratio auf  $4 \times 10^5$ /100  $\mu\text{L}$ )
- durch 1:2 Verdünnungen abnehmende Effektorzellkonzentrationen herstellen (E/T-Ratio 1:40, 1:20, 1:10, 1:5 und 1:2,5)
- bei den Ansätzen mit OKT 3 jeweils Zugabe von  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  des Antikörpers zu jeder Effektorzellverdünnung und 30 min. Vorinkubation bei RT
- Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  Effektorzelllösung in den Inkubationsansatz
- Zur Ermittlung der Spontanfreisetzung Zugabe von Medium statt Effektorzellen
- 96-Rundbodenplatte mit den Zellen kurz anzentrifugieren (1000 rpm ca. 1 min)
- 4h im Brutschrank inkubieren ( $37^\circ\text{C}$ ; 5 %  $\text{CO}_2$ )
- nach 3 h  $100 \mu\text{l}$  Überstand nach kurzem Anzentrifugieren in eine 96-Flachbodenplatte überführen

### 3.11.3 Messen der Calcein Fluoreszenzintensität im Kulturüberstandes

Protokoll:

- Messen mit plate reader „TECAN Spectrafluor“
- Einstellungen: Excitation: 485 nm; Emission: 535 nm; Integrationszeit: 0; Integrationsstart: 20; Blitzanzahl 3; gain: manuell – die Maximalfreisetzungswerte auf ca. 20000 einstellen um im idealen Messbereich der Fluoreszenzintensität zu liegen (ca. 80-90); Plattentyp: C-O 96 KT
- jede Platte 3 mal messen