

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Reaktivität von Natürlichen Killerzellen
gegenüber allogenen MHC I modulierten Endothelzell-
Transplantaten – in vitro und in vivo

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bernhard Fleischer

aus Berlin

Gutachter/in: 1. PD Dr. rer nat M.Seifert
 2. Prof. Dr. med. U. Stock
 3. PD Dr. med. N. Khaladj

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Abstoßungsreaktionen	2
1.1.1	Hyperakute Transplantatabstoßung	2
1.1.2	Akute Abstoßungsreaktionen	3
1.1.3	Chronische Abstoßungsreaktion	3
1.2	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	4
1.3	Arterienaufbau	5
1.3.1	Intima.....	5
1.3.2	Media.....	6
1.3.3	Adventitia.....	7
1.4	Gefäßersatzmaterialien.....	8
1.4.1	Synthetische Bypässe	10
1.4.2	Gefäßersatz durch Tissue Engineering	11
2	Zielstellung.....	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Verwendete Materialien	17
3.1.1	Geräte	17
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.3	Chemikalien.....	19
3.1.4	Puffer und Medien für die Zellkultur.....	20
3.1.5	Antikörper	20
3.1.6	Sonstige Puffer und Medien	21
3.1.7	Verwendete Zellen.....	23
3.1.8	Operationsmaterial	24
3.1.9	Versuchstiere	25
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	NK-Zell-Isolation aus Rattenmilz	26
3.2.2	Zellkultur der RAEC (Ratten-Aorten-Endothelzellen).....	30
3.2.3	Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	30
3.2.4	FACS-Analyse.....	31
3.2.5	Zytotoxizitäts-Test (CTX).....	32

3.2.6	Azellularisierung und Besiedlung von nativen Rattenaorten mit RAEC	33
3.2.7	Transplantation von Rattenaorten	34
3.2.8	Kryofixierung von Gewebeproben und Herstellung von Gewebeschnitten ...	39
3.2.9	Hämatoxylin-Eosin Färbung	40
3.2.10	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	40
3.2.11	PCR-Analyse	42
3.2.12	Bildmorphometrie der immunhistochemischen Präparate	44
3.2.13	Statistik	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Reaktivität von NKRP1-(+) Zellen gegenüber RAEC in vitro	46
4.1.1	Isolation und Charakterisierung NKRP1(+) Zellen aus Rattenmilzen	46
4.2	Transplantation von Gefäßersatzstücken aus azellulärer Matrix und RAEC	63
4.2.1	Quantitative Betrachtung der Transplantationsversuche	63
4.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen der Gefäßersatzstücke	64
4.2.3	Nachweis von Inflammations- und Abstoßungsmarkern auf mRNA- Expressionsebene	78
5	Diskussion	81
5.1	Isolation und Charakterisierung von NK-Zellen	81
5.2	Immunogenität MHC-I-armer RAEC in vitro	82
5.3	Immunogenität MHC-I-armer RAEC in vivo	84
6	Ausblick	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Bildverzeichnis	96
9	Danksagung	97
10	Eigenständigkeitserklärung	98
11	Lebenslauf	99

Abkürzungsverzeichnis

a-	- anti
AK	– Antikörper
Allo	- allogene
APC	– antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	– destilliertes Wasser (latein: Aqua destillata)
bzw.	– beziehungsweise
CD	– engl.: cluster of differentiation
CO ₂	– Kohlenstoffdioxid
d. h.	– das heißt
dest.	- destilliert
engl.	– englisch
ePTFE	– expanded Polytetrafluorethylen
EZM	– extrazelluläre Matrix
FACS	- fluorescence activated cell sorting (deutsch: Durchflusszytometrie)
FITC	– Fluoresceinisothiocyanat
FSC	– engl.: Forwardscatter (deutsch: Vorwärtsstreulicht)
GFP	- grünes Fluoreszenz-Protein
HE	– Hämatoxilin / Eosin
IFN γ	- Interferon gamma
ITAM	-engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs deutsch: tyrosin-basierte Immunrezeptor Aktivierungseinheit
ITIM	-engl.: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, deutsch: tyrosin-basierte Immunrezeptor Inhibierungseinheit
KLR	-Lektin-ähnliche Killerzell-Rezeptoren, engl.: killer-cell lectin-like receptors
KIR	-Immunglobulin-ähnliche Killerzell-Rezeptoren, engl.: killer-cell immunoglobulin-like receptors
MACS	- Magnetic Cell Separation (deutsch: magnetassoziierte Zelltrennung)
MAPC	–multipotente adulte Progenitorzelle (engl.: multipotent adult progenitor cell)
MHC I	- Hauptgewebeverträglichkeitskomplex der Klasse I, bei Ratten RT1a

	(englisch : major histocompatibility complex class I)
MHC II	- Hauptgewebeverträglichkeitskomplex der Klasse II, bei Ratten RT1b (englisch : major histocompatibility complex, class II)
µl	– Mikroliter
min	– Minute(n)
ml	– Milliliter
mm	– Millimeter
MR	– Maximalrelease, maximale Freisetzung
nach Sep.	– nach Separation
NK-Zelle(n)	– Natürliche Killerzelle(n)
NO	– Stickstoffmonoxid
OX18	- anti-RT1A Intrabody
PE	- Phycoerythrin
RAEC	–Ratten-Aorten-Endothelzellen
RFU	–Relative Fluoreszenzeinheiten
sog.	– sogenannt
SR	–Spontanrelease, spontane Freisetzung
SSC	– engl.: Sidewardsscatter (deutsch: Seitwärtsstreulicht)
StAbw	- Standardabweichung
syn	– syngen
TCR	–T-Zell-Rezeptor
u.	–und
u.a.	–unter anderem
vs.	–versus (lat.: gegen, gegenüber)
(vs)	–vor Separation
vWF	–von Willebrand-Faktor
WT	-Wildtyp
z.B.	–zum Beispiel
z.T.	–zum Teil

1 Einleitung

Die in der kardiovaskulären Chirurgie häufig verwendeten Gefäßersatzmaterialien, wie z. B. autologes, d.h., patienteneigenes Gefäßersatzmaterial oder künstliche Gefäßersatzstücke unterliegen aufgrund ihrer Verfügbarkeit bzw. ihrer Materialeigenschaften bestimmten Anwendungsbeschränkungen. Im Falle der autologen Gefäße sind arteriosklerotische bzw. atherosklerotische Vorschädigungen nicht selten. Bei synthetischem Gefäßersatzmaterial stehen die Problematik der zwangsläufig erforderlichen, dauerhaften medikamentösen Thromboseprophylaxe und die mangelnde Anpassungsfähigkeit an physiologische Gefäßwandregulationen im Vordergrund. Aus diesem Grund werden verschiedene Gefäßersatzkonstrukte aus vollständig biologischen Komponenten entwickelt, die bezüglich ihrer Verwendbarkeit unter physiologischen Bedingungen erprobt werden müssen. Eine mögliche Alternative zu den herkömmlichen Materialien stellen mit Endothelzellen besiedelte bindegewebige Gefäßgrundgerüste dar. Um eine über MHC I (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex der Klasse I, englisch: major histocompatibility complex, class I) vermittelte Transplantat-abstoßung zu verhindern, kann die Expression dieses immunologischen Schlüsselmoleküls in allogenen Ratten-Aorten-Endothelzellen (RAEC) erfolgreich unterdrückt werden. Dies geschieht mit Hilfe der Expression eines intrazellulären Antikörperfragments, eines sog. Intrabodies, durch lentiviralen Gentransfer. Durch die Transduktion mit dem Intrabody-Gen und dessen Expression, werden intrazellulär die MHC-I-Moleküle (bei Ratten OX18 oder RT1A genannt) gebunden und somit die Oberflächenexpression des Moleküls stark verringert. Die Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression führt in der Folge zu einer signifikanten Hemmung zellulärer und humoraler Immunantworten [20]. Aufgrund der vielversprechenden Daten aus den *in vitro* Versuchen wurde eine Fortsetzung der Versuche *in vivo* möglich und erforderlich, da *in vitro* wahrscheinlich nicht alle immunologisch relevanten Wechselwirkungen simuliert werden können. Da eine verringerte MHC-I-Oberflächenexpression ein möglicher Stimulus zur Aktivierung von zytotoxischen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) darstellt, ist es von besonderem Interesse, zu analysieren, ob diese MHC-I-defizienten Endothelzellen ein bevorzugtes Angriffsziel von NK-Zellen darstellen. Diese Fragestellung ist Thema

der vorliegenden Arbeit und wurde im Rattenmodell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bearbeitet.

1.1 Abstoßungsreaktionen

Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen können nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens bzw. ihres Schweregrades in drei verschiedene Arten unterteilt werden - die hyperakuten, die akuten und die chronischen Abstoßungsreaktionen. Ihnen liegen verschiedene Immunmechanismen zugrunde, die auf zellulärer Ebene vor allem durch T-Zellen, auf humoraler Ebene vor allem durch Antikörper-Komplement-Reaktionen verursacht werden. Auf der Antigenseite sind, je nach Abstoßungstyp, MHC der Klassen I und II sowie Nebengewebeverträglichkeitskomplexe (englisch: minor histocompatibility complexes) und allogene Peptide beteiligt.

Je nach genetischer Herkunft der Gewebe unterscheidet man *xenogene* (d.h. Transplantation von Geweben aus Organismen unterschiedlicher Spezies), *allogene* (wenn es sich um Transplantationen zwischen genetisch unterschiedlichen Organismen der gleichen Spezies handelt, sog. Allo-Reaktionen) und *syngene* Transplantationen (wenn es sich um Transplantationen zwischen genetisch identischen Organismen der gleichen Spezies handelt).

1.1.1 Hyperakute Transplantatabstoßung

Die hyperakute Transplantatabstoßung ist geprägt durch Antikörper-vermittelte Reaktionen, z.B. gegen AB0-Blutgruppenantigene, die schon vor der Transplantation im Blut des Empfängers vorhanden sind. Durch die rasche Verfügbarkeit dieser Antikörper und deren Fähigkeit die Komplement- und Gerinnungskaskade auszulösen, ergibt sich eine Transplantatabstoßung, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation beginnt. Hierbei werden die transplantatversorgenden Gefäße verstopft und das Transplantat stirbt ab und zeigt dabei eine rasch eintretende violette Verfärbung. Das Risiko einer hyperakuten Abstoßungsreaktion kann durch Kompatibilitätstests, eine sog. „Kreuz-Probe“, erheblich verringert werden. Da bei xenogenen Transplantationen die gewebeschützenden Komplement-Regulator-Proteine, wie z.B. CD59, CD55 und

CD46, besonders schlecht funktionieren, ist bei diesen Transplantationen der Schutz des Transplantates am geringsten und die hyperakuten Abstoßungen am stärksten.

1.1.2 Akute Abstoßungsreaktionen

Sie werden hauptsächlich durch Wechselwirkungen zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen verursacht. Die APC können sowohl aus dem Spenderorgan stammen (direkte Antigenerkennung) als auch aus dem Empfänger (indirekte Antigenerkennung). Im Falle der direkten Aktivierung treffen die mit spendereigenen Peptiden beladenen APC in den sekundären lymphatischen Organen auf die passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) tragenden Empfänger-T-Zellen. Im Falle der indirekten Aktivierung werden Spenderpeptide (wie z. B. auch die MHC-Moleküle) durch APC des Empfängers aufgenommen und über MHC der Klasse II (bei Ratten RT1B genannt) an Empfänger-T-Zellen präsentiert. Eine zytotoxische Antwort, die das transplantierte Organ vernichten kann, ist die Folge. Sie tritt Tage bis Wochen nach Transplantation auf. Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclosporin A, ermöglichen eine Unterdrückung dieser T-Zell-Antworten. Allerdings ist das immer mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten und einer potentiellen Reaktivierung latenter Viren und z.T. nicht unerheblichen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva verbunden.

1.1.3 Chronische Abstoßungsreaktion

In der Regel weisen die transplantierten Organe aufgrund der vorangegangenen MHC-Kompatibilitäts-Tests eine hohe Übereinstimmung der MHC-Strukturen auf. Jedoch sind Unterschiede bei anderen Oberflächenproteinen (minor histocompatibility antigens) unvermeidbar. Da eine vollständige genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger nur bei eineiigen Zwillingen vorkommt, sorgen geringe Unterschiede der über MHC präsentierten Peptide immer für eine Immunantwort, vor allem von T-Zellen. In der Folge resultiert eine Schädigung des Endothels der transplantatversorgenden Blutgefäße. Diese Immunantwort ähnelt sehr einer Reaktion des Organismus auf virusbefallene Zellen.

Außerdem verhält sich die Schwere der chronischen Transplantatabstoßung proportional zum Ausmaß sog. Ischämie-Reperfusionsschäden (englisch: ischemia-reperfusion injury), d.h. Schäden, die ein Transplantat dadurch erleidet, dass es während der Transplantation vom Kreislaufsystem abgekoppelt ist. Histologisch zeigt sich die chronische Abstoßung von Blutgefäßstücken vor allem durch konzentrische Arteriosklerose (Intimafibrose). Insbesondere CD4+ Th1-Zellen durchdringen das Endothel und sorgen im Interstitium für die Sekretion von Chemokinen, wie z. B. CCL5. Die daraus resultierende Makrophagenaktivierung sorgt für eine Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF- α , CCL2 und IL-1. Dadurch kommt es zur Entzündung im Interstitium und in der Folge zur Sklerosierung und Vernarbung der transplantatversorgenden Blutgefäße, die eine ausreichende Blutversorgung zunehmend erschweren. Die chronische Abstoßung nach Transplantationen wird oft erst Monate bis Jahre später erkennbar. Sie ist nach wie vor medikamentös schlecht behandelbar. Auf lange Zeit macht sie durch fortschreitende Organzerstörung eine erneute Transplantation unumgänglich.

1.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Zu den Aufgaben von NK-Zellen gehört die Zerstörung virusbefallener Zellen, die Zerstörung von Tumorzellen, sowie die Zerstörung von Zellen mit fehlender MHC-I Oberflächenexpression. Auch im Zusammenhang mit Transplantatabstoßung finden sich in der Literatur Hinweise für eine Beteiligung von NK-Zellen, sowohl als Teil der Abstoßungsreaktion, aber auch als Vermittler von Toleranz gegenüber bestimmten Transplantaten [0, 27]. NK-Zellen exprimieren dafür viele verschiedene Oberflächenrezeptoren, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Zum einen die KLR (Lektin-ähnlichen Killerzell-Rezeptoren, engl.: killer-cell lectin-like receptors) und zum anderen die KIR (Immunglobulin-ähnlichen Killerzell-Rezeptoren, engl.: killer-cell immunoglobulin-like receptors). Diese Zuordnung erfolgt aufgrund biochemischer Eigenschaften der extrazellulären Rezeptordomäne. Beide Gruppen beinhalten sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren. Die Transmembrandomänen aktivierender Rezeptoren enthalten sog. ITAM (engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), die inhibierenden Rezeptoren dementsprechend ITIM (engl.:

immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs). Diese tyrosinabhängigen aktivierenden- (ITAM) bzw. inhibierenden (ITAM) Rezeptorbestandteile dienen der Signaltransduktion in das Zellinnere [1]. Ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder inaktiv bleibt, hängt davon ab, wie das Gleichgewicht zwischen Signalen der aktivierenden und der inaktivierenden Rezeptoren beschaffen ist. Nur wenn aktivierende Reize überwiegen kommt es zur Aktivierung der NK-Zelle und zu einem Angriff auf die Zielzelle, z.B. in Form von Zerstörung der Zellmembran durch Lyseprozesse [2]. Ein Rezeptortyp ist für die Erkennung von NK-Zellen besonders geeignet. Der NKRP1-Rezeptor, welcher wiederum in mehrere Subtypen unterteilt werden kann, diente, durch Antikörper-vermittelte Markierung, vielen Arbeitsgruppen als Molekül zur phänotypischen Charakterisierung von Ratten-NK-Zellen (NKRP1⁺CD3⁻). Der NKRP1-Rezeptor wird allerdings auch von einem Subtyp der CD3⁺ T-Zellen, den sog. NKT-Zellen, exprimiert und ist daher alleine genutzt ein unpräziser NK-Zell-Marker [3]. Nur durch eine Ko-Färbung mit CD3, kann ein Ausschluss der doppelt positiv markierten NKT-Subpopulation erfolgen.

1.3 Arterienaufbau

Arterienwände werden histologisch in drei Schichten unterteilt. Sie werden, von innen nach außen betrachtet, als Intima, Media und Adventitia bezeichnet und weisen unterschiedliche Zellkomponenten und Funktionen auf. Je nach Aufbau der Media werden zwei verschiedene Typen von Arterien unterschieden, elastische und muskuläre. Arterien vom elastischen Typ findet man im herznahen Bereich; Arterien vom muskulären Typ bilden die restlichen arteriellen Gefäßstrukturen und damit den Hauptanteil.

1.3.1 Intima

Der Intima werden eine Endothelzellschicht und die darunter liegende subendotheliale Schicht zugerechnet. Das Endothel ist eine einschichtige, lückenlose Auskleidung der Blutgefäße und trennt den Intravasalraum von tieferen Wandschichten. Die polygonalen Zellen sind parallel zum Blutstrom ausgerichtet und

sitzen auf einer Basallamina. Endothelzellen sind sowohl durch sog. gap junctions als auch durch tight junctions miteinander verbunden und kommunizieren darüber untereinander sowie mit Zellen der subendothelialen Schichten. Als Diffusionsbarriere verhindern sie das Austreten makromolekularer Blutbestandteile. Nach entsprechender Stimulation kommt es auf Endothelzelloberflächen zur Expression von Selektinen und anderen Zelladhäsions-molekülen, welche einen wichtigen Regulator zur Leukozytenemigration (Leukodiapedese) darstellen und somit entzündliche Reaktionen fördern. Das Endothel sezerniert diverse Proteine, Proteoglykane und Gerinnungsfaktoren, wie z.B. von-Willebrand-Faktor (vWF), die eine intravasale Gerinnung intakter Gefäße verhindern und die Thrombenbildung in defekten Gefäßen fördern. Über die Produktion und Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) tragen Endothelzellen zur Regulation der Gefäßweite und damit zur Blutdruckregulation bei. Die subendotheliale Schicht wird vor allem von Proteoglykanen, kollagenen und elastischen Fasern, sowie Mikrofibrillen gebildet. Produziert werden diese Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) in den ersten zwei Lebensdekaden überwiegend von Endothelzellen und später dann von aus der Media eingewanderten glatten Muskelzellen. Die Produktion dieser EZM in der Intima durch die glatten Muskelzellen steht hier gegenüber der Kontraktion im Vordergrund. Mit steigendem Alter nimmt die Dicke dieser Gefäßwandschicht zu und wird für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen verantwortlich gemacht.

1.3.2 Media

Die Media wird v.a. von glatten Muskelzellen und EZM (elastische und kollagene Fasern, sowie Proteoglykanen) gebildet. Die EZM wird ausschließlich von glatten Muskelzellen produziert; Fibroblasten kommen in der Media nicht vor. Die Media bildet die dickste Schicht der Gefäßwand. Je höher der Blutdruck in der Arterie ist, desto dicker ist die Media. Über die Muskelzellen der Media wird in Arterien vom muskulären Typ die Wandspannung reguliert und damit der Blutdruck beeinflusst. Die Muskelzellen sind spiralförmig angeordnet und funktionell durch gap junctions miteinander gekoppelt. In Arterien vom elastischen Typ wechseln sich die Schichten der Muskelzellen von innen nach außen mit Bindegewebsschichten ab. Die elastischen Fasern sammeln die kinetische Energie der stoßweise ausgeworfenen

Blutmenge und geben diese zeitversetzt zur Auswurfphase des Herzens an den Blutstrom zurück. Auf diese Weise wird der kontinuierliche Blutpuls in eine gleichmäßigere Strömung umgewandelt (Windkesselfunktion). Arterielle Gefäße mit nur 1-2 Muskelschichten sind definitionsgemäß Arteriolen. Die Grenzschicht zwischen Intima und Media bildet eine Schicht elastischer Fasern, die sog. Membrana elastica interna. Sie ist durchlässig für bestimmte Makromoleküle und Fortsätze von Endothelzellen, die mit glatten Muskelzellen der Media kommunizieren. In großen Arterien gibt es diese „Grenzmembran“ auch zwischen Media und Adventitia, die Membrana elastica externa.

1.3.3 Adventitia

Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß in seiner Umgebung verankert. Sie enthält Fibroblasten, Proteoglykane, längs orientierte elastische Fasern, sowie längs und zirkulär orientierte Kollagenfasern. Durch die Adventitia können gefäßversorgende Blutgefäße (vasa vasorum) die äußeren Schichten der Media erreichen, während die inneren Schichten durch Diffusion vom Lumen aus ernährt werden. Auch Nerven (v.a. vegetative Fasern zur Tonusregulation) und Lymphgefäße gelangen über die Adventitia zu den Gefäßwänden. Die Nervenfasern dienen der efferenten Tonusregulation und stammen hauptsächlich vom Sympathikus. Die Fasern bilden Geflechte, die den Gefäßwänden aufliegen und die äußeren Muskelzellen beeinflussen. Diese geben die Signale über Kanalproteine (sog. gap junctions) an die tiefer gelegenen Muskelzellschichten weiter.

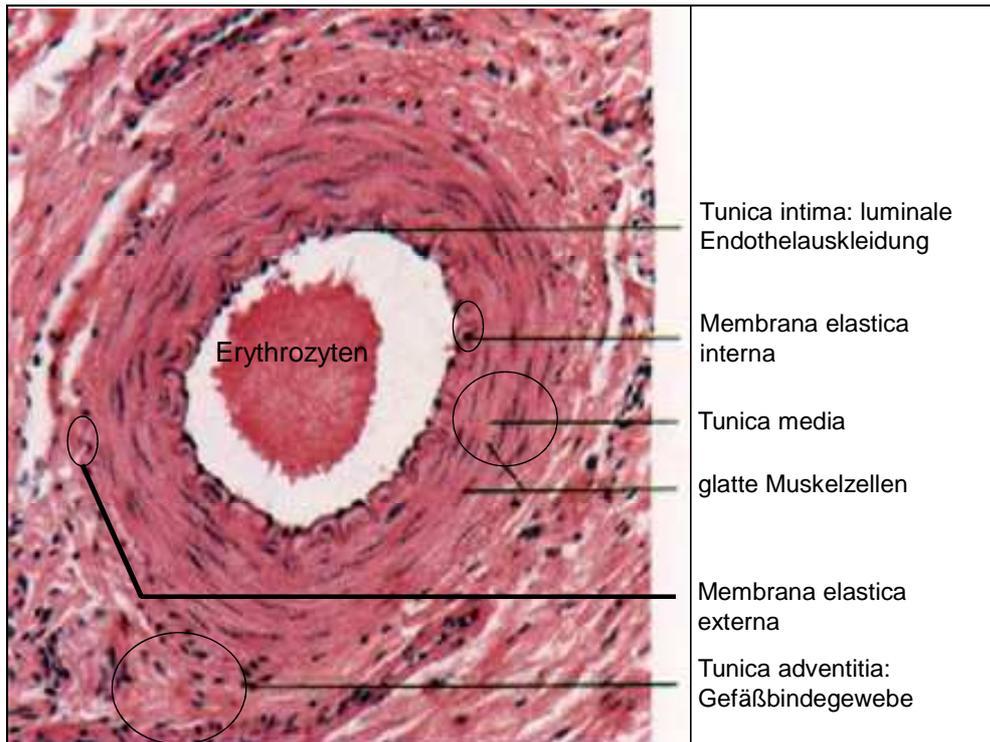


Abbildung 1: Querschnitt einer Arterie,

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

1.4 Gefäßersatzmaterialien

Arteriosklerose bzw. Atherosklerose sowie Erkrankungen der Herzkranzgefäße sind die häufigsten Todesursachen der westlichen Industriestaaten [4]. Die Erkrankungen und ihre Begleiterscheinungen erfordern oft eine operative Verbesserung der Durchblutungsverhältnisse in den erkrankten Körperregionen. Goldstandard ist dabei der Ersatz durch körpereigene Blutgefäßen, v.a. V. saphena, A. thoracica interna oder A. radialis. Oft sind jedoch die körpereigenen Gefäße ungeeignet oder nicht in ausreichendem Maß verfügbar, da die krankheitsbedingte Schädigung der Gefäße den gesamten Gefäßapparat eines Patienten in Mitleidenschaft zieht. Arteriell Gewebe ist venösem Gewebe vorzuziehen, wenn eine Arterie ersetzt werden soll, da die Vene als Anpassung an den gestiegenen Druck mit einer Intimahyperplasie reagiert, was Fibrosierung, Atherosklerose (Inzidenz 20-25% nach 8 bis 15 Jahren)

und Aneurismenbildung (Inzidenz 10-20% nach 8 bis 15 Jahren) zur Folge hat. Venen sind somit kein ideales Material zum Ersatz geschädigter Arterien und ebenfalls häufig nicht verfügbar [5].

Dann muss aus verschiedenen Alternativen zur Verbesserung der Durchblutungsverhältnisse gewählt werden. Das kann oft nur mit Durchführung von rekonstruktiven Gefäßplastiken unter Verwendung von synthetischem Gefäßersatzmaterial erreicht werden

Dabei stehen verschiedene Materialien zur Verfügung, die je nach Einsatzgebiet mehr oder weniger geeignet sind. Ein wesentliches Kriterium ist dabei der Durchmesser des zu ersetzenden Gefäßes. Großlumige Gefäße (Durchmesser > 6mm) können mit synthetischen Gefäßersatzmaterialien versorgt werden. Jedoch sind autologe arterielle und venöse Gefäße den synthetischen Ersatzstücken qualitativ überlegen. Bei kleinlumigen Gefäßen hat sich die Implantation synthetischer Bypässe als wenig nutzbringend herausgestellt [6].

Daher ist vor allem für kleinlumige Gefäßersatzpräparate die Suche nach geeigneten Materialien von besonderem wissenschaftlichem Interesse [7].

Es gibt viele verschiedene Ansätze zur Gewinnung solcher Materialien, wobei auf folgende Anforderungen besondere Rücksicht genommen werden muss. Die Materialien dürfen nicht gerinnungsfördernd (thrombogen) sein und müssen so lange, wie möglich durchgängig bleiben. Sie dürfen keine Entzündungsreaktionen hervorrufen und sollten im Akutfall sofort verfügbar sein. Des Weiteren müssten sie folgenden mechanischen Ansprüchen genügen. Die Gefäße sollten sich im Rahmen der Leistungsanpassung an Veränderungen des Blutdrucks durch Veränderung der Wandspannung anpassen können. Bei Verwendung im kindlichen Organismus sollten die Gefäße idealerweise mit dem Körper in physiologischem Ausmaß mitwachsen.

Das Einnähen durch den Chirurgen sollte außerdem leicht und stabil erfolgen können. Verschiedene Gefäßersatzkonstruktionen wurden bereits hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile in Studien untersucht.

1.4.1 Synthetische Bypässe

Sie dienen ausschließlich dem Ersatz großlumiger Gefäße (> 6mm Durchmesser), z.B. als Dialyse-Shunt, wenn kein patienteneigenes Arterien­gewebe verfügbar ist. Für die Herstellung synthetischer Bypässe haben sich vor allem ePTFE (expanded Polytetrafluorethylen, GoreTex) und Dacron (Polyester) durchgesetzt. Diese Materialien haben den Vorteil, dass sie auf Vorrat produziert werden können und sofort einsatzbereit sind. Die Haltbarkeit rein synthetischer Bypässe ist allerdings, verglichen mit anderen Materialien, gering [8]. Das liegt vor allem am Fehlen der vor Abstoßung schützenden Endothelzellschicht. Trotz ihrer zellfreien Oberfläche werden solche Bypässe als Fremdkörper erkannt und werden durch unspezifische Entzündungsreaktionen angegriffen. Die Bildung einer fibrinösen Pseudointima führt letztendlich zum vorzeitigen Verschluss des Transplantates. Dies ist der Schlüsselmechanismus eines thrombotischen Verschlusses [9]. Je kleiner der Durchmesser eines solchen Kunststoffschlauches ist, desto schneller ist die Durchlässigkeit des Implantates beendet.

Herring et al. postulierten, dass der thrombotische Verschluss durch Besiedlung der Innenoberfläche der Kunststoffschläuche mit Endothelzellen signifikant verzögert werden kann [10]. Fischlein et al. konnten die Verlängerung der Durchgängigkeitsdauer synthetischer Bypässe durch *in vitro*-Bedeckung der inneren Oberfläche mit Zellen bestätigen. Seitdem werden viele verschiedene Zellarten, z.B. Endothelzellen, pluripotente Knochenmarkzellen u.v.m, hinsichtlich ihrer Eignung verglichen. Eine einmalige intraoperative Injektion solcher Zellen in das eingenähte Transplantat zeigte jedoch eher enttäuschende Resultate [11].

Dabei wurde ein Kunststoffschlauch mit Zellen, z. B. Endothelzellen, besiedelt, die dem späteren Empfänger entnommen wurden. Das Überwachsen der inneren Oberfläche mit einer dichten Zellschicht ist *in vitro* erfolgreich umsetzbar, dauert allerdings Wochen bis Monate und ist sehr aufwändig. Spezielle Aufbereitungen der Kunststoffoberflächen, wie z.B. ein Fibronectin- oder ein Aminosäureüberzug mit sog. RGD-Peptiden zur Verbesserung der Haftung der Zellen wurden bereits erprobt und zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Aus der langen Vorbereitungszeit ergibt sich allerdings der Nachteil, dass solche Konstrukte in Notfallsituationen nicht schnell genug zur Verfügung gestellt werden können [12].

Des Weiteren bieten solche künstlichen Materialien Angriffsfläche für Bakterien, was zu einer Kolonialisierung mit Keimen und daraus folgenden gefährlichen Entzündungen führen kann. Nicht selten sind Amputationen und sogar tödliche Verläufe die Folge.

Obwohl es im klinischen Alltag großen Bedarf an sofort verfügbaren, kleinlumigen Gefäßersatzpräparaten gibt, ist derzeit kein geeignetes synthetisches Material verfügbar. Die durchschnittliche Durchlässigkeitsdauer synthetischer Bypässe ist kleiner als die von autologen biologischen Bypässen [13].

1.4.2 Gefäßersatz durch Tissue Engineering

Aufgrund der problematischen Heilungs- und Thrombosierungseigenschaften synthetischer Materialien im mikrovaskulären Bereich, wurde versucht mit Hilfe des „Tissue Engineering“ geeignete Materialien zu entwickeln bzw. gewonnene Einzelkomponenten zu verwendbaren Gefäßersatzpräparaten zu formen. Schon 1986 gelang es ein vollständig ex-vivo generiertes biologisches Gefäßersatzkonstrukt herzustellen [14]. Seitdem sind immer mehr Komponenten und Geräte zur Herstellung solcher künstlichen Gefäße entwickelt worden. Die Ansätze sind dabei sehr verschieden. Die Arbeitsgruppe um Nicolas L'Heureux et al. hat durch Überschichten einzelner Lagen von Geweben auf einer Schablone die natürlichen Gefäßwandschichten rekonstruiert und dem Konstrukt auf diesem Wege sehr naturnahe physiologische Eigenschaften einer Arterie verliehen. Dies ist verglichen mit anderen Gefäßersatzkonstrukten ein sehr erfolgreicher, aber auch technisch aufwändiger Weg, der zudem eine lange Herstellungszeit erfordert [15].

Andere Arbeitsgruppen nutzen vom Körper gebildete Grundstrukturen und kombinieren diese mit künstlichen Komponenten [16]. Das ist vor folgendem Hintergrund besonders interessant.

Die von Zellen befreiten bindegewebigen Stützstrukturen von Gefäßwänden wurden hinsichtlich ihrer Immunogenität untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass von diesen sog. azellulären Matrices kaum Reize zur Auslösung einer Immunantwort ausgehen. Gleichzeitig besitzen sie als natürlich gewachsene Struktur gute physiologische Anpassungseigenschaften und erfüllen daher als Grundgerüst eines

künstlichen Gefäßes wesentliche physiologische Qualitätskriterien, die von keinem bisher verwendeten Material so einfach erreicht werden [17]. Allerdings konnten Walles et al. nachweisen, dass die zellfreien Matrizes nach Implantation einem degenerativen Prozess unterliegen, der mit einer Kalkeinlagerung rund um die elastischen Fasern einhergeht. Diese Degenerationsvorgänge können auch bei biologischen Herzklappen beobachtet werden [18]. Daher scheint eine luminale Besiedlung mit einer Zellschicht sinnvoll und notwendig.

Eine innere Auskleidung mit Zellen, wie z.B. Endothelzellen; ist auch bei diesen Matrizes *in vitro* erfolgreich durchführbar und sinnvoll, da es die physiologischen Eigenschaften verbessern kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass einige Zeit nach Implantation solcher azellulärer Matrizes empfangereigene Glattmuskelzellen (SMC) in die bindegewebige Grundstruktur einwachsen. Für einige Zellarten, die als luminale Auskleidung verwendet werden können, ist bekannt, dass diese Transmitter, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen können. Dieser Transmitter wirkt auf SMCs und ist für die Regulation der Gefäßweite und somit für die Druckanpassung wichtig. Durch die Verwendung der mit Zellen ausgekleideten Matrizes und dem anschließenden Einwachsen von SMCs nach der Implantation kann dem Gefäßersatzstück die Fähigkeit eines physiologischen Regulationsmechanismus der Blutdruckverhältnisse verliehen werden, was durch die Verwendung synthetischer Materialien nicht erreicht wird.

1.4.2.1 RAEC mit verminderter MHC-I Oberflächenexpression

Die Immunogenität hängt vor allem von den zellulären Komponenten der Bypässe aus biologischem Material ab. Mit der Absicht humorale und zelluläre Abstoßung allogener Endothelzellen im Rattenmodell zu unterdrücken und eine universelle Transplantierbarkeit zwischen Ratten verschiedener Stämme zu ermöglichen, wurden Endothelzellen entwickelt, die mit Hilfe eines sog. Intrabodies die Oberflächenexpression des RT1A-Komplexes, einem immunologischen Schlüsselmolekül für die Antigenerkennung, vermindern. Intrabodies sind intrazelluläre Antikörper, die aufgrund einer angefügten KDEL-Retentions-Sequenz im Endoplasmatischen Retikulum einer Zelle verbleiben und je nach antikörperspezifischer Bindungsdomäne verschiedenste Moleküle binden können.

Auf diese Weise werden die jeweiligen Zielmoleküle über den Intrabody innerhalb der Zelle gebunden und so an ihrer Oberflächenexpression gehindert. Beschrieben wurden intrazelluläre Antikörper erstmals durch die Gruppe um Cattaneo et al. [19].

Die verwendeten primären Ratten-Aorten-Endothel-Zellen (RAEC) wurden durch lentiviralen Gentransfer transduziert. Die Ratten-Aorten-Endothel-Zellen mit der Bezeichnung DA-LE OX18 IRES hrGFP RAEC (nachfolgend OX18-RAEC genannt) sind in ihrer Fähigkeit RT1A- Moleküle zu exprimieren eingeschränkt, da sie einen Genkomplex enthalten, der für die Expression eines α -RT1A-Intrabodys codiert. Der Intrabody bindet die RT1A-Moleküle intrazellulär und verhindert deren Oberflächenexpression. Um die verfrühte Dissoziation des Ribosoms von der DNA zu verhindern sind die Zellen zusätzlich mit einer IRES-Sequenz ausgestattet, welche die ribosomale Bindungsfähigkeit verstärkt. Mit Hilfe des letzten Teils der eingebrachten Gensequenz für ein humanes rekombinantes grünes Fluoreszenzprotein (hrGFP) wurden die erfolgreich transduzierten Zellen markiert.

RAEC mit der Bezeichnung DA LE IRES hrGFP (nachfolgend GFP-RAEC genannt) dienen als Kontrollzellen zur Ermittlung evtl. unspezifischen Effekte der Transduktion mit der IRES- und der hrGFP-Sequenz.

Die parallel zu den transduzierten Zellen verwendeten Wildtypzellen (nachfolgend WT-RAEC genannt) dienen als Kontrollzellen zur Ermittlung evtl. unspezifischer Effekte des FACS-Sortierungs-Prozesses (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting). Die Zellen sind nicht transduziert, waren aber im gleichen Umfang, wie die transduzierten Zellen, den mechanischen Belastungen der FACS-Sortierung ausgesetzt.

Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass im Rattensystem durch einen anti-OX18-Intrabody die Oberflächenexpression von RT1A-Molekülen erfolgreich unterdrückt werden kann. Sowohl humorale als auch zelluläre Abstoßungsreaktionen werden dadurch signifikant verringert und bis auf ein basales Niveau herabreguliert [20].

Die Verwendbarkeit der OX18-defizienten RAEC als zellulärer Komponente des biologischen Gefäßersatzes ist Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit und von besonderem Interesse, weil das Fehlen von MHC I Oberflächenexpression, z.B. bei Virusinfektionen, im humanen Organismus ein potenter Auslöser von NK-Zell-Reaktivität ist [21].

Die Frage, in welchem Umfang das Fehlen vergleichbarer Moleküle bei gentechnisch veränderten RAEC Auslöser einer NK-Zell-Aktivierung ist, sollen die nachfolgend beschriebenen Versuche beantworten.

2 Zielstellung

Aufgrund der zahlreichen ungünstigen Nebenwirkungen synthetischer Materialien, wie z.B. die Notwendigkeit dauerhafter Antikoagulation, mangelnder Anpassungsfähigkeit an physiologische Parameter wie z.B. Blutdruck, wird nach alternativen Materialien biologischen Ursprungs gesucht, die dem Gefäßersatzstück möglichst viele der oben genannten physiologischen Eigenschaften verleihen.

Durch die Verwendung biologischer Materialien erlangt das Problem der immunologischen Verträglichkeit besondere Bedeutung. Um eine dauerhafte Haltbarkeit und Funktion des Gefäßersatzstückes zu gewährleisten darf der Empfängerorganismus das nicht-körpereigene Material nicht als bedrohliches Fremdmaterial erkennen. Daher werden neue experimentelle Ansätze verfolgt, die verwendeten Materialien der immunologischen Erkennung zu entziehen.

Um die immunologische Verträglichkeit der Materialien zu prüfen, müssen die Reaktionen immunkompetenter Zellen auf diese Materialien charakterisiert werden. Dabei müssen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden, die Aussagen über Quantität und Qualität von Abstoßungsreaktionen im Transplantationsmodell ermöglichen.

Mit dem Konzept der Besiedlung azellularisierter Gefäßgrundgerüste (bestehend aus Bindegewebe, die sog. Bindegewebsmatrix) mit MHC-Klasse-I-defizienten Endothelzellen erhofft man sich die Beibehaltung vieler physiologischer Eigenschaften, die ein körpereigenes Blutgefäß aufweist, bei gleichzeitiger Vermeidung von Abstoßungsreaktionen. Durch die MHC-I-Defizienz der Endothelzellen könnten jedoch Abstoßungsprozesse durch NK-Zellen initiiert werden.

Demnach ergeben sich folgende Zielstellungen:

- Entwicklung eines Protokolls zur Isolation von NK-Zellen mit hoher Reinheit und Ausbeute
- Charakterisierung der isolierten NK-Zellen hinsichtlich spezifischer Oberflächenexpressionsmuster
- Analyse der Sensitivität MHC-I-defizienter Endothelzellen gegenüber einer zellvermittelten Lyse im Vergleich zu Wildtyp-Endothelzellen
- Transplantation azellularisierter Gefäßmatrices nach Besiedlung mit MHC-I-defizienten Endothelzellen im Ratten-Aorten-Transplantationsmodell
- Charakterisierung von Inflammations- und Rejektionsprozesse in Gefäßersatzstücken mit MHC-I-defizienten Endothelzellen unter besonderer Berücksichtigung einer NK-Zell-Beteiligung

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Gössner, Hamburg G
Dako-Pen	Dako, Glostrup Dänemark
Durchflusszytometer FACSDIVA®	Becton Dickinson
Einfrierbox (NALGENE™)	Nunc, Roskilde Dänemark
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand Italien
Flowzytometer (FACS Calibur®)	Becton Dickinson
Fotoausrüstung (AxioCam + Axio Vision 3.0)	Zeiss, Jena
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart
Glaswaren	Schott, Mainz
Kühlschränke	Liebherr, Oberhausen
Kryostat	SLEE, Mainz
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Tokio
Lichtmikroskop	Leica, Braunschweig
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Operationsmikroskop	Leica, Braunschweig
Pipettierhilfe	Hirschmann, Stuttgart
Schüttler (Vortex MS2 Minishaker)	IKA-Werke, Staufen
Spektrofluorimeter	Tecan, Männedorf, Schweiz
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank, Heracell 240	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Centrifuge 5410 Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

Tabelle 1: Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller / Ort
Einmalkanülen pink	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalkanülen blau	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze 10 ml zweiteilig	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze 20 ml zweiteilig	Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hanau
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Falconröhrchen 15 ml (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Falconröhrchen 50 ml (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen Nunc	Nunc, Roskilde Dänemark
Microtest Plate 24-Well	Nunc, Roskilde Dänemark
Microtest Plate 96-Well	Nunc Roskilde Dänemark
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Magnet	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Magnethalter	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Spritzenverschlusskappe	Gerresheimer, Düsseldorf
Microtest Plate 96-Well schwarz	Nunc, Roskilde Dänemark
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischale verschiedene Größen	Becton Dickinson
Pipettenspitzen farblos 0,1-10 µl (Typ Eppendorf)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen gelb 10-100 µl (Typ Eppendorf)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen blau 100-1000 µl (Typ Eppendorf)	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman, USA
Einmalskalpell (steril)	Feather, Osaka, Japan
Stripetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Inc., USA
Zellkulturflasche Easy Flask 25 cm ² / 75 cm ² / 175 cm ² mit Filterkappen (steril)	Nunc, Roskilde Dänemark
Zellsieb 40 µm (Falcon®-Cellstrainer)	Becton Dickinson
Separationswolle	Polysciences Inc., USA

Table 2: Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Fraktion V, bovine	Sigma Aldrich, USA
Aceton	J.T. Baker, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
Calcein-AM	MoBiTec, Göttingen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma Aldrich, USA
Einfriermedium	Jung / Leica, Nussloch
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol	JT Baker, USA
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA, Pasching, Österreich
Formalin	Sigma Aldrich, USA
Gelatine Typ A: aus Schweinehaut	Sigma Aldrich, USA
Gentamicin	Sigma Aldrich, USA
Glutamin	Sigma Aldrich, USA
HEPES	Sigma Aldrich, USA
Härris-Hämatoxylinlösung (Papanicolaou)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma Aldrich, USA
phosphatgepufferte Salzlösung, (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd 1%	SigmaAldrich, USA
Penicillin	Life Technologies, USA
Pferdeserum	Sigma Aldrich, USA
Salzsäure (HCl)	Herbeta, Berlin
Streptomycin	Life Technologies, USA
Streptavidin/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Tissue Tech	Sakura Finetek, USA
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-X	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, USA
Trypsin/EDTA	Life Technologies, USA
Tween-20 [®]	Serva, Heidelberg

Tabelle 3: Chemikalien

3.1.4 Puffer und Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Endothel Basal Medium (EBM)	PAA Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Pasching, Österreich

Tabelle 4: Puffer und Medien für die Zellkultur

3.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Stammlösung	Arbeitslösung
NKRP1A (CD161a) FITC	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
NKRP1A	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
CD11b	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
mouse-anti-Rat CD31	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
mouse IgG ₁ isotype control (MOPC)	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
mouse-anti-rat RT1A (Ox 18)	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
mouse-anti-rat RT1B (Ox 6)	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
CD 45 RA	AbD Serotec, Düsseldorf	0,5mg/ml	5µg/ml
IgG1 FITC Isotyp-Kontrolle	Beckman, USA	0,5mg/ml	5µg/ml
IgG1 PE Isotyp-Kontrolle	Beckman, USA	0,5mg/ml	5µg/ml
CD 3 Biotin	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
CD3 FITC	Becton Dickinson	0,5mg/ml	5µg/ml
CD4	AbD Serotec, Düsseldorf		
CD8	AbD Serotec, Düsseldorf		
TCR PE	Becton Dickinson	0,2mg/ml	10µg/ml
anti-mouse-IgG F(ab') ₂ -PE	Jackson ImmunoResearch, GB	0,5mg/ml	5µg/ml
ED1 (CD68)	AbD Serotec, Düsseldorf	1mg/ml	10µg/ml
anti-Maus IgG (H+L)-Biotin	Vector, USA		

Tabelle 5: Antikörper

3.1.6 Sonstige Puffer und Medien

FACS-Puffer:	PBS 1 % FCS 0,5 g/l Natriumazid
MACS-Puffer:	PBS 2mM EDTA +0,5% BSA
Einfríermedium:	10 % DMSO 90% FCS
Azellularisierungslösung:	0,25 % Na-Desoxycholat 0,25% Triton-X 99,5% PBS
Beschichtungslösung:	Gelatine 0,2 %, in PBS
Kulturmedium für RAEC:	EBM 2mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamicin 10 % FKS
MLC-Medium:	RPMI1640 ca. 87% 10% FKS ca. 10% 2mM Glutamin ca. 1% 100 U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin 5mM HEPES ca. 0,5% 50µM β-Mercaptoe-Ethanol(1M) Ratten IL-2 (NatuTec) 250U / ml
Medium für YAC-1-Zellen:	RPMI 1640 10% FKS 2mM Glutamin

100U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin

Dichtezentrifugationsmedium

Rat Pancoll (PANBiotech, Aidenbach)

Immunhistochemie:

Stammlösung 1 aus:

0,5M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6

60,55 g/l Tris

90 % H₂O dest

6% HCl 25%

4% H₂O dest.

Stammlösung 2 aus:

1,5M NaCl

87,66 g NaCl /l H₂O dest.

TBS: 0,05M Tris-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,6,
aus:

Stammlösung 1 10%

Stammlösung 2 10%

H₂O dest. 80%

TBS-Tween: 0,05M TBS, pH 7,6 mit 0,1% Tween 20

ABC-Komplex (DAKO, Dänemark) gelöst in:

5ml TBS

50µl Reagenz A

50µl Reagenz B

30 min vor Verwendung ansetzen

H₂O₂-Blocklösung (DAKO, Dänemark)

Streptavidin/HRP (DAKO, Dänemark) 1:500 in TBS

AEC-Fertiglösung (DAKO, Dänemark)

Aquatex (Merck, Darmstadt)

3.1.7 Verwendete Zellen

3.1.7.1 Primäre Endothelzellen

Bezeichnung	Herkunft
Lewis (Lew)-RAEC	Isolation durch AG M. Seifert, Inst. f. Med. Immunologie, Charité Berlin
Dark Agouti (DA)-RAEC	Isolation durch AG M. Seifert, Inst. f. Med. Immunologie, Charité Berlin

Tabelle 6: primäre Endothelzellen

3.1.7.2 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
DA* ¹ LE OX18 IRES hrGFP	Isolation und Transduktion durch AG M. Seifert, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin
DA* ² LE IRES hrGFP	Isolation und Transduktion durch AG M. Seifert, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin
DA* ³ WT	Isolation und Transduktion durch AG M. Seifert, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin
YAC-1	DSMZ, Braunschweig, D

Tabelle 7: Primärzellen und Zelllinien

3.1.8 Operationsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Einmalrasierer	Wilkinson, Solingen
Klebeband	NeoLab, Heidelberg
Sterile Kompressen 10x10cm	Fuhrmann, Much
Spritze 1ml / 0,01ml	Becton Dickinson
Mikrochirurgische Pinzette, gerade, Gr. 1	WPI, USA
Mikrochirurgische Pinzette, gerade, Gr. 2	WPI, USA
Mikrochirurgische Schere	VeriMed, Bad Oyenhausen
Mikrochirurgischer Nadelhalter	VeriMed, Bad Oyenhausen
Spritze 10 ml / 0,1 ml	Becton Dickinson
Sterile Wattetupfer	Hartmann, Heidenheim
Chirurgischer Nadelhalter	VeriMed, Bad Oyenhausen
Chirurgische Schere	VeriMed, Bad Oyenhausen
Venöse Verweilkanüle	Braun Melsungen AG
Gelita Tampon	Braun Melsungen AG
Isotone Kochsalzlösung, steril	Fresenius, Bad Homburg
Nahtmaterial Ethilon 8-0	Johnson & Johnson, Norderstedt
Nahtmaterial Vicryl 3-0	Johnson & Johnson, Norderstedt
Ketavet (Ketaminhydrochlorid 10%)	Pfizer, Berlin
Rompun (Xylazinhydrochlorid 2%)	Bayer, Leverkusen
Heparin	Rotexmedica, Trittau
Kanüle 27 G	Becton Dickinson
Kanüle 18 G	Becton Dickinson
Desinfektionsmittel Descosept	Dr. Schuhmacher, Melsungen
Operationsmikroskop M651	Leica, Braunschweig
Latexhandschuhe	Emerson & Co., Genua, Italien
Wattestäbchen, steril	Rauscher, Neuwied

Tabelle 8: Operationsmaterial

3.1.9 Versuchstiere

Alle Tierversuche zur sterilen Entnahme der Gewebe und zur Gefäßtransplantation wurden nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes BGB 1. IS. 01484 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (Projektnummer G0023/06). Auf die Einhaltung der Empfehlung des National Institut of Health (USA) zum Umgang mit Versuchstieren wurde geachtet („guide for the care and use of laboratory animals“, 1996). Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte freundlicherweise durch die Angestellten der Abteilung für Versuchstierhaltung der Charité, Campus Mitte, Tucholskystraße, 10117 Berlin. Die Tiere, bis zu sechs pro Käfig, wurden in vollklimatisierten Räumen mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser bei zirkadianem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Futter und Wasseraufnahme wurden regelmäßig kontrolliert. Das Anfangsgewicht der Tiere betrug 150-180g.

Dark Agouti (DA), Haplotyp: RT-1^{av1}

Harlan Winkelmann, Borchon

Lewis (Lew), Haplotyp: RT-1^l

Harlan Winkelmann, Borchon

3.2 Methoden

3.2.1 NK-Zell-Isolation aus Rattenmilz

Rattenmilzen sind eine ergiebige Quelle für die Gewinnung von Natürlichen-Killerzellen. Da keine NK-Zell-Isolations-Kits für das Rattenmodell kommerziell erhältlich sind, musste eine Isolationsmethode etabliert werden. Die folgenden vier Arbeitsschritte haben sich als ein erfolgreiches und reproduzierbares Protokoll zur Isolation aus Ratten bewährt.

3.2.1.1 Dichtegradient

Zunächst wurden pro Isolation 2 Ratten (LEW) getötet, die Milzen entnommen und in kaltem PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Milzen mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels und eines 100µm Siebes. Das so entstandene Zell-Homogenisat wurde in kaltem PBS aufgenommen und nochmals durch ein 40µm Sieb in ein 50ml Falcon filtriert. Die Zellsuspension wurde auf ein Dichtezentrifugations-Medium (Ratten Pancoll) aufgeschichtet und bei 400g für 40 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Leukozytenschicht wurde mit Hilfe einer Transfer-pipette in ein leeres 50er Falcon überführt. Das Waschen der Zellen durch zentrifugieren (bei 300g für 10 min. bei 4°C) erfolgte in einem bis zur 50ml Marke mit kaltem PBS gefüllten Falcon.

3.2.1.2 Separation mit Nylonwolle

Am Tag vor der NK-Zell Isolation wurden sterile Spritzenzylinder mit 0,7g Nylonwolle gefüllt und die Wolle mit PBS durchtränkt. Eine Spritzenkappe wurde aufgeschraubt, so dass die eingefüllte Flüssigkeit nicht herausfließen konnte. Anschließend erfolgte die Autoklavierung der so befüllten Säulen für 45 Min. bei 37°C und 5% CO₂.

Am Separationstag wurden die Säulen mit YAC-1-Medium gewaschen, um die PBS-Lösung zu entfernen, dann bis zur Oberkante der Wattefüllung mit YAC-1 Medium

gefüllt und mit den Spritzenkappen verschlossen. Eine sterile Pipettenspitze diente zur Entfernung von Luftblasen. Die mit YAC-1-Medium befüllten Säulen inkubierten anschließend für 40 Minuten bei 37°C und 5% CO₂.

Während der Inkubationsphase wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation separierten Zellen in YAC-1-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 x 10⁸ Zellen pro ml Medium eingestellt.

Nach der Inkubationsphase mit Medium wurden die Säulen mit je 1ml Zellsuspension befüllt. Anschließend wurde 1ml YAC-1 Medium dazugegeben und die Flüssigkeit durch lösen der Spritzenkappe einsickern gelassen. Nach Einfüllen von weiteren 3-4ml

YAC-1-Medium bei verschlossener Spritzenkappe wurden die gefüllten Spritzenzylinder mit desinfizierter (Ethanol 70%) Aluminiumfolie verschlossen und aufrecht im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für 45-60 min. gelagert. In dieser Zeit sollen die in der Zellsuspension enthaltenen adhärenen (B-Zellen, Monozyten) Zellen an die Nylonwolle binden und auf diese Weise abgetrennt werden. Die nicht-adhärenen Zellen konnten mit 20 ml YAC-1-Medium aus dem Spritzenzylinder herausgespült und anschließend 3 mal bei 300g für 5 min. zentrifugiert und in kaltem PBS gewaschen werden.

3.2.1.3 Magnetic Cell Separation (MACS)

Die Magnetic Cell Separation (MACS) ist eine von der Firma Miltenyi Biotec entwickelte Zelltrennungstechnik, die auf der Markierung von Zellen mit antikörpergekoppelten Magnetpartikeln basiert. Die aus der Nylonwolle herausgespülten und in PBS gewaschenen Zellen wurden gezählt und jeweils 1 x 10⁸ in ein 50er Falcon überführt. Es folgten zwei Waschungen in MACS-Puffer, die Aufnahme des Zellpellet in 700µl MACS-Puffer und die Zugabe von 70µl der Stammlösung des α-NKRP1-Antikörpers hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen inkubierte die Zellsuspension für 20 Minuten auf Eis und musste einige Male leicht geschüttelt werden um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal in 1-2 ml MACS-Puffer / 10⁷ Zellen, d.h., maximal 10 ml MACS-Puffer, gewaschen (Zentrifugieren bei 300g, 4°C, 10 min).

Das Zellpellet wurde in 80µl MACS-Puffer / 1×10^7 Zellen resuspendiert, d.h., maximal 800µl, und 30µl- rat anti-mouse IgG1 Micro-Beads hinzugefügt. Nach kurzem vortexen inkubierte die Suspension für 15 min. bei 4°C. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift und das Zellpellet wurde in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Während des Waschens wurden die MACS-Säulen vorbereitet, d.h., in den Magnethalter eingespannt und mit 500µl MACS-Puffer angefeuchtet.

Die 500µl Zellsuspension wurden anschließend auf die MACS-Säule aufgetragen und einsickern gelassen. Anschließend erfolgte eine dreimalige Spülung mit je 500µl pro Säule. Die durchsickernde Flüssigkeit wurde in einem 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen und enthält Zellen, an die keine magnetassoziierten a-NKRP1-Antikörper (a-NKRP1-AK) gebunden haben und somit nicht vom Magnetfeld gebunden werden konnten. Die auf diese Weise abgetrennte Zellfraktion wird im weiteren Verlauf NKRP1(-)-Fraktion genannt, da sie größtenteils nur NKRP1(-) Zellen enthielt.

Nachdem die NKRP1(-)-Fraktion vollständig ausgewaschen worden war, wurde die MACS-Säule aus dem Magneten entfernt, 1ml MACS-Puffer aufgetragen und sofort mit Hilfe des Stempels die Flüssigkeit durch die MACS-Säule gepresst und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Diese Fraktion enthielt überwiegend die NKRP1(+) Zellen und wurde daher im weiteren Verlauf NKRP1(+)-Fraktion genannt.

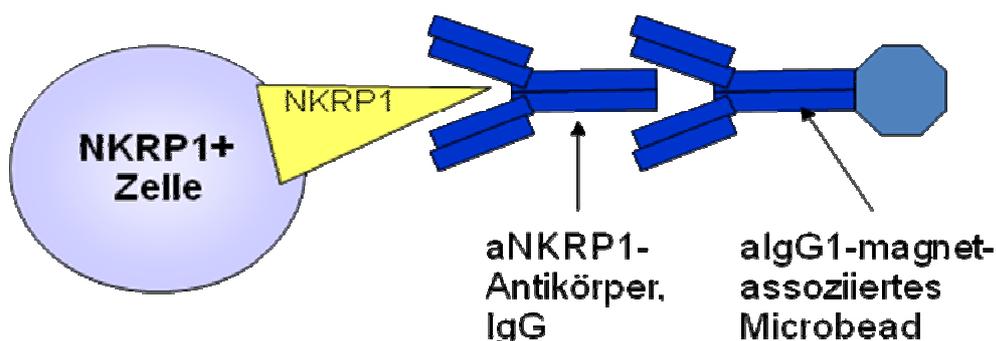


Abbildung 2: Prinzip der Isolation NKRP1(+)-Zellen mittels MACS-Separation

3.2.1.4 NK-Zell-Kultur

Die NKRP1(+)-Fraktion der MACS-Separation wurde zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden dann für ca. 12 h mit $1-2 \times 10^6$ Zellen pro ml in MLC-Medium mit 250Units/ μ l Ratten-IL-2 bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, je nach Ausbeute in 12 well oder 24 well Zellkulturplatten. Die NKRP1(-)-Fraktion wurde für ca. 16 h bei 4°C bis zur Reinheitsanalyse aufbewahrt.

Beide Zellfraktionen konnten erst am Tag nach der Isolation per FACS-Analyse phänotypisch charakterisiert werden. Am selben Tag ist eine FACS-Färbung nicht möglich, da die Oberfläche der Zellen noch mit NKRP1-Antikörper-Bead-Komplexen besetzt ist und somit eine vollständige Markierung der Epitope unmöglich ist.

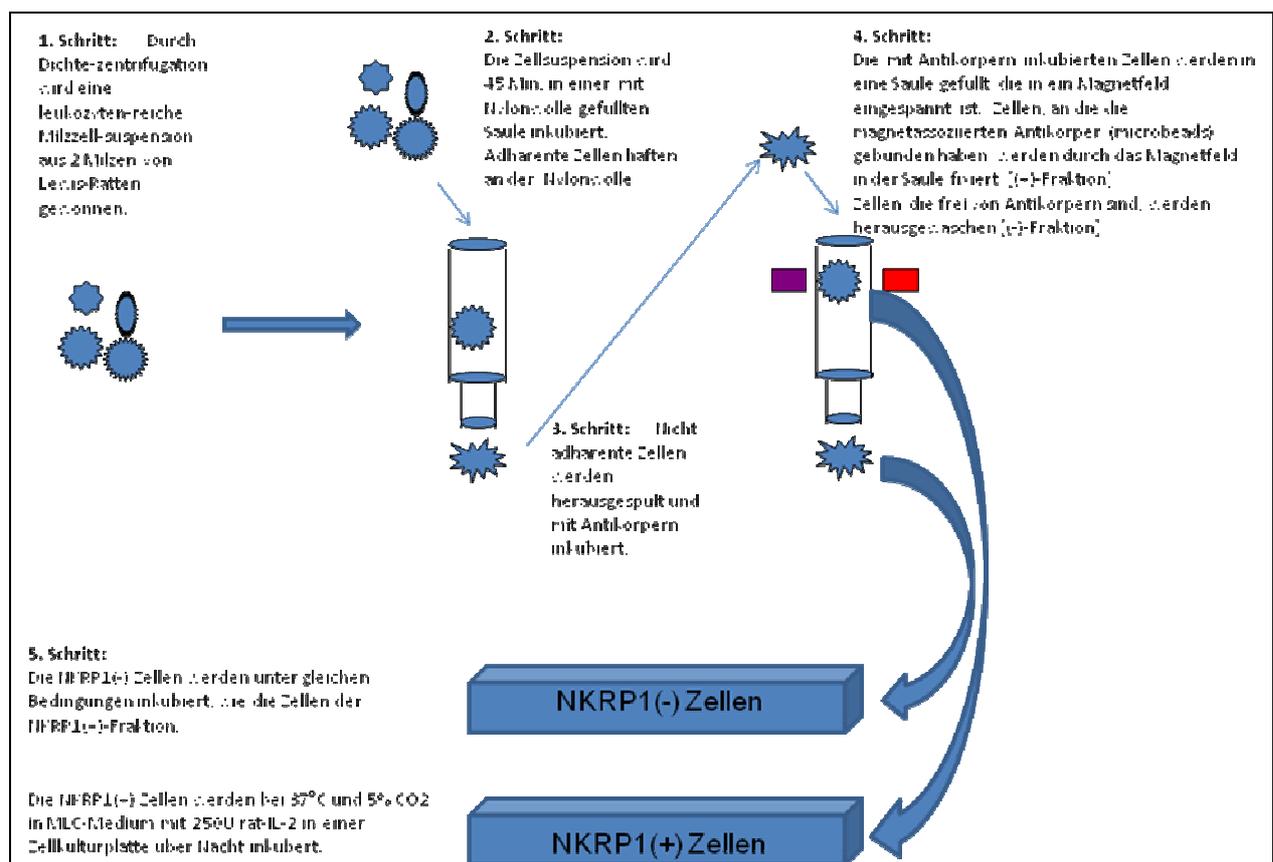


Abbildung 3: Isolationsschritte für die Gewinnung von NKRP1 (+) und NKRP1(-) Zellen und ihre weitere Kultivierung *in vitro*

3.2.2 Zellkultur der RAEC (Ratten-Aorten-Endothelzellen)

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt um Kontaminationen zu verhindern.

Zur Erhaltung der Zelllinien war ein regelmäßiges Umsetzen in neue Kulturgefäße erforderlich, in der Regel alle 2-3 Tage. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium aus der Kulturflasche abgezogen und der Zellrasen zweimal mit PBS + P/S gewaschen. Dann wurde mit auf 37°C erwärmtem Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt und die Suspension bei 300g zentrifugiert. Vom entstandenen Zellpellet wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet selbst in frischem Kulturmedium im Verhältnis 1:5 resuspendiert und in eine neue Kulturflasche dünn ausgesät. Die Zeit von der Aussaat bis zum erneuten Splitten wird als Passage (P) bezeichnet.

Um eine optimale Zelladhäsion und stabile Haftung der Endothelzellen auf den Kulturflaschen zu gewährleisten, wurden diese vor ihrer Verwendung beschichtet. Dazu wurden je 25 cm² Kulturflasche 2 ml einer 0,2 % igen Gelatinelösung verwendet. Nach mindestens 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Gelatinelösung wieder abgesaugt und die Flaschen mit PBS gespült.

3.2.3 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Der Anteil erfolgreich transduzierter Ratten-Aorten-Endothel-Zellen wurde in regelmäßigen Abständen mittels FACS-Analyse bestimmt. Für den Fall, dass der Anteil der untransduzierten Zellen zu groß wurde, erfolgte die Entfernung von nicht transduzierten Zellen mittels Flowzytometrie, dem sog. Fluorescence activated cell sorting (FACS). Experimentelle Verwendung fanden nur Zellfraktionen, deren Anteil hrGFP (human recombinant Green Fluorescence Protein) exprimierender Zellen maximiert wurde, d.h., einen Anteil von mindestens 50% aufwiesen. Dazu wurde die gesamte Population aus der Kulturflasche gelöst, in 300µl Medium aufgenommen und durch ein 40µm Zellsieb in ein steriles, verschließbares FACS-Röhrchen

überführt. Der Sort-Prozess wurde am Deutschen Rheumaforschungszentrum in der entsprechenden Serviceabteilung durchgeführt.

3.2.4 FACS-Analyse

Um die Zellen phänotypisch charakterisieren zu können, wurden per FACS-Analyse spezifische Oberflächenmarker nachgewiesen. Alle aus den Rattenmilzen gewonnenen Zellen wurden hinsichtlich des Vergleichs der verschiedenen Subpopulationen vor und nach Separation mit zellspezifischen Antikörpern (AK) markiert (siehe Tab. 5) und analysiert. Vorrangig dienten die Messungen dazu, den Anteil vorhandener NK-Zellen im gesamten Milzhomogenisat sowohl vor, als auch nach der Separation zu bestimmen, um die Effektivität der Anreicherung zu kontrollieren. Um fehlerhafte Messungen zu verhindern, erfolgte die Antikörper-Markierung am Tag nach der Isolation (siehe NK-Zellkultur).

Bei der phänotypischen Charakterisierung der RAEC ging es darum zu kontrollieren, wie hoch der Anteil der erfolgreich transduzierten Zellen war, um entscheiden zu können, ob eine Sortierung im FACS erforderlich ist. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

3.2.4.1 Probenaufarbeitung für FACS-Analyse

Die Zellen wurden aus ihren Kulturschalen geerntet, bei RAEC mit Hilfe von Trypsin, und pro FACS-Röhrchen auf $2 \cdot 10^5$ Zellen eingestellt. Nach Auffüllen mit 1000 μ l kaltem FACS-Puffer wurden die Zellen für 5 min bei 300g gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 40 μ l kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 2 μ l Primärantikörper (100 μ g/ml) (siehe Tabelle 5) und eine anschließende Inkubation von 30 min bei 4°C. Wiederholt wurde mit 1000 μ l kaltem FACS-Puffer für 5 min bei 300g gewaschen und der Überstand abgesaugt. Danach wurden ggf. Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6) dazugegeben, inkubiert (30 min bei 4°C), gewaschen, der Überstand abgenommen und für sofortige Messungen erfolgte die Aufnahme des Pellets in 200 μ l FACS-Puffer. Für Fixierung der Proben wurden die Pellets in 200 μ l 1%igen Paraformaldehyd aufgenommen. Die Messungen

erfolgten alle unter Verwendung eines Gerätes vom Typ FACSCalibur mit der Software Cell-Quest.

3.2.5 Zytotoxizitäts-Test (CTX)

Dieser Test dient dazu, die Reaktivität der isolierten Ratten-NK-Zellen gegenüber unveränderten und veränderten RAEC zu bestimmen und zu vergleichen. Der auf Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein basierende Test musste zunächst für die Anwendbarkeit auf RAEC und YAC-1 Zellen getestet werden. Optimale Parameter für Calceinkonzentration und Anzahl der Zielzellen wurden ermittelt. Als Positivkontrolle dienten YAC-1-Zellen, eine leukämische murine Tumorzelllinie. Die CTX wurden nach folgendem Protokoll am zweiten Tag nach der NK-Zell-Isolation durchgeführt:

Zunächst wurden die Zielzellen geerntet, zwei Mal in PBS gewaschen und anschließend mit einer Zelldichte von 1×10^6 / ml in serumfreiem RPMI aufgenommen. Durch Zugabe von 20µl/ml Calcein und einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ werden die Zielzellen gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zielzellen drei Mal in komplettem (serumhaltigen) MLC Medium gewaschen. Nach erneuter Zellzählung wurde die Zelldichte auf 1×10^5 / ml MLC-Medium eingestellt.

Während der Inkubation der Zielzellen mit Calcein erfolgte die Ernte der Effektorzellen (NKRP1(+)/TCR(-)Zellen) und deren Überführung in ein 50ml Falcon. Nach dem Waschen in komplettem MLC-Medium und dem einstellen auf 1×10^6 NK-Zellen / ml MLC-Medium wurde eine Verdünnungsreihe (Faktor 1:2) hergestellt.

1×10^6 Zellen/ml (Ausgangslösung)	10:1*
5×10^5 Zellen/ml	5:1*
$2,5 \times 10^5$ Zellen/ml	2,5:1*
$1,25 \times 10^5$ Zellen/ml	1,25:1*

*entspr. nach Befüllen der wells einer Effektor:Zielzell-Ratio von

Von der Zielzellsuspension wurden 100µl pro well in 96 well Flachbodenplatten (NUNC) vorgelegt und 100µl der Effektorzellsuspension hinzugegeben. Für jede Verdünnungs-stufe wurden mehrere wells (3-5) befüllt, um später eine mittlere spezifische Lyse berechnen zu können. Zusätzlich wurden pro Zielzelltyp mehrere wells anstatt mit Effektorsuspension mit 100µl MLC-Medium sowie einige wells mit 100µl Triton-X (1,8%ig) befüllt. Die Zugabe von MLC-Medium diene der Ermittlung der Spontan-freisetzung, der von Zellyse unabhängigen Calcein-Freisetzung durch die Zielzellen. Die Zugabe von Triton-X diene der Ermittlung der maximalen Calcein-Freisetzung.

Nach dem vollständigen Befüllen der Platten wurden diese kurz (30 sek., 300g) zentrifugiert und für vier Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Danach werden die Platten erneut zentrifugiert und 100µl der Überstände jedes Wells vorsichtig in eine schwarze 96well Flachbodenplatte überführt.

Calcein fluoresziert bei Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 495nm. Nun wurde die Fluoreszenz in den abgenommenen Überständen mit dem TECAN-Fluorimeter gemessen. Für jeden Zielzelltyp wurden Mittelwerte der experimentell erzielten Calceinfreisetzung und anschließend mit Hilfe der folgenden Formel die spezifische Zellyse berechnet:

$$\text{spezifischeZellyse} = \frac{\text{exp erim.Freisetzung} - \text{Spontan freisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontan freisetzung}} \times 100$$

3.2.6 Azellularisierung und Besiedlung von nativen Rattenaorten mit RAEC

Nach Entnahme des Gefäßes am narkotisierten Tier, mehrfachem Spülen mit PBS und Lagerung in PBS auf Eis erfolgte die Überführung in Azellularisierungs-Lösung, wobei das Gefäß auch gründlich mit der Lösung gespült wurde). Es folgte die Inkubation bei 37°C in 10ml Azellularisierungslösung (in 100ml Glaskolben, Schüttler für 48 h bzw. ca. 64h). Nach dem Überführen in PBS mit 0,1 % Na-Azid, kurzem Durchspülen mit einer Spritze und 24 h bei 37°C Inkubation auf einem Schüttler wurde das Gefäß in reinem PBS mit einer Spritze gespült. Danach erfolgte eine 24

stündige Inkubation bei 4°C auf einem Schüttler (T2 5er Flasche ohne Filterdeckel verwenden) in ca. 7 ml PBS. Anschließend wurde das PBS durch serumfreies EBM ersetzt und weitere 24 h inkubiert. Danach erfolgte eine Besiedlung mit Endothelzellen. Dazu wurden 1 x 10⁶ Zellen /ml von einer Seite in komplettem EBM injiziert. Nach anschließender Inkubation für ca. 3-4 h wurde das Gefäß gedreht und eine gleich große Portion Zellen von der anderen Seite in das Lumen geben. Das Gefäßstück inkubierte danach bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.7 Transplantation von Rattenaorten

Ein Teil der abdominalen Aorta, caudal der Abgänge der Arteria renalis und cranial der Aufzweigung in die Aa. Illiacae wurde aus Spendertieren vom Stamm Lewis entnommen, welche zuvor durch CO₂-Inhalation getötet wurden. Die Aorten wurden von ihren physiologischen Zellschichten befreit, so dass nur das bindegewebige Grundgerüst übrig blieb, (siehe 1.2.9.). Diese sog. azelluläre Matrix wurde entweder zellfrei implantiert oder zuvor mit den zuvor beschriebenen Endothelzellen aus unserer Zellkultur besiedelt (siehe 3.2.10.1) und in die Aorta abdominalis von Empfängertieren implantiert.

Die Empfängertiere waren alle vom Stamm LEWIS und am Zeitpunkt der Transplantation zwischen 200g und 300g schwer. Die gesamte Transplantation wurde unter einem Operationsmikroskop bei 16- bis 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

Die Empfängertiere wurden 2 bzw. 4 Wochen nach Transplantation getötet, die Aorten entnommen und nach fest definierten Regeln untersucht. Die Transplantate und der Naht-nahe Bereich der tiereigenen Aorta wurden vollständig entnommen und in drei Teile geteilt. Das mittlere Stück, nur aus Transplantat bestehend, wurde zur PCR-Messung benutzt, das herznahe Stück für immunhistochemische Färbungen und das herzferne Stück in Formalin eingelegt um Paraffinschnitte anfertigen zu lassen. Zusätzlich wurde den Tieren Blut zur Serumgewinnung sowie die Milzen zur Herstellung von Milzzellsuspensionen entnommen.

3.2.7.1 Ablauf der Transplantation

3.2.7.1.1 Narkose

Für eine Empfängerratte vom Stamm LEWIS wurde ein Narkosegemisch aus 0,6ml Ketavet 10% (Ketaminhydrochlorid) und 0,12 ml Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid) angesetzt. Je nach Gewicht, wurden den Tieren zwischen 200g und 250g Körpergewicht initial 0,25ml und für Tiere zwischen 250g und 300g Körpergewicht initial 0,3 ml Narkosegemisch intraperitoneal ins caudale Bauchdrittel verabreicht. Während der OP muss bei zunehmendem Erwachen des Tieres, erkennbar an erhöhter Atemfrequenz und Zucken der Schnurrhaare, 0,05 bis 0,1 ml Narkosegemisch intramuskulär nachdosiert werden.

3.2.7.1.2 Freipräparieren der Aorta

Dem narkotisierten Tier wurde mit einem Einmalrasierer das Fell im Bauchbereich entfernt. Anschließend wurde das Tier mit Klebeband an allen vier Extremitäten fixiert. Der rasierte Bereich wurde mit einer Ethanolösung desinfiziert. Dadurch war gleichzeitig erkennbar, ob die Narkosetiefe ausreichend ist. War das der Fall, wurde mit einer Schere und einer chirurgischen Pinzette das Abdomen vom Beckenring bis zum Sternum per Medianlaparatomie eröffnet. Der mobilisierbare Teil des Darms wurde mit Hilfe von Wattestäbchen aus der Abdominalhöhle herausgeholt und in eine 10 x 10 cm große sterile Kompresse eingehüllt, ohne die Blutversorgung des Darms zu gefährden. Die Kompresse wurde mit physiologischer Kochsalzlösung getränkt und kontinuierlich feucht gehalten. Die Aorta wurde vom umliegenden Binde- und Fettgewebe mit Wattestäbchen stumpf frei präpariert. Die Abgänge caudal der A. renalis und cranial der Aa. Iliacae wurden mit doppelten Ligaturen versehen und dazwischen durchtrennt (siehe Tabelle 9, Bild 1). Das Bindegewebe, das Aorta und Vena cava inferior miteinander fest verbindet, musste mit feinen Pinzetten ebenfalls durchtrennt werden, so dass die Aorta im Operationsbereich frei beweglich war. Eine passende Gummimembran wurde als Schutz vor Verletzungen der Vena cava inf. zwischen die Vene und die Aorta gelegt (siehe Tabelle 9, Bild 3). Nun wurden am kranialen und am caudalen Ende des frei präparierten Aortenteils Gefäßklemmen angelegt, um den Blutstrom in der Aorta zu unterbinden (siehe Tabelle 9, Bild 4). Zwischen den Gefäßklemmen erfolgte die Durchtrennung der Aorta (siehe Tabelle 9, Bild 5) und die Gefäßstumpfe mussten mit Hilfe einer sterilen Kunststoffnadel,

entnommen aus einer venösen Verweilkanüle, durch Injektion von Heparinlösung (0,1%ig) von Blutresten befreit werden.

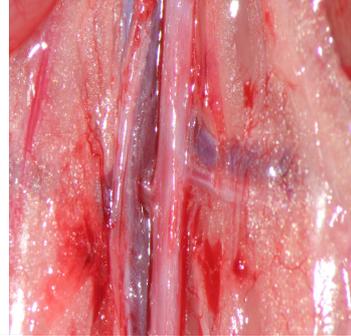
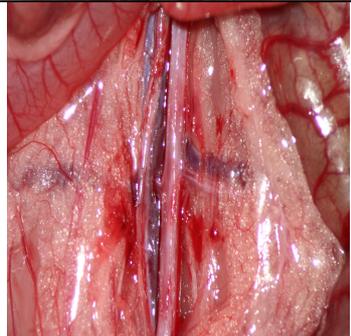
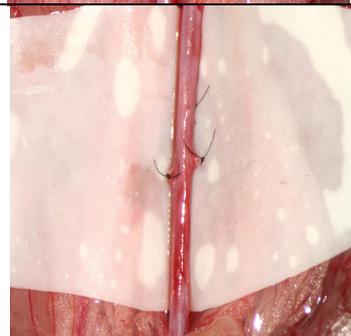
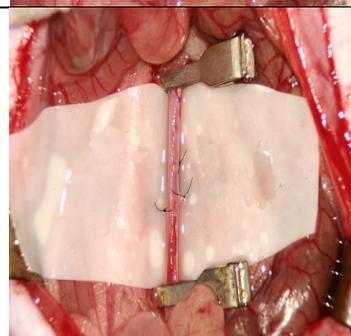
Bild 1:		<p>Die Aorta (mit Pfeil markiert) muss caudal der Aa. mesentericae bis zur Aufteilung in die Aa.iliacae vorsichtig aus dem Bindegewebe herauspräpariert werden. Dabei darf die daneben liegende Vena cava inferior nicht verletzt werden.</p>
Bild 2:		<p>Im Bereich der Markierung werden alle abgehenden Gefäße doppelt abgebunden und dazwischen durchtrennt um Blutaustritt zu verhindern. Kollateralgefäße verhindern eine Ischämie der unteren Extremitäten.</p>
Bild 3		<p>Nach dem völligen Heraustrennen der Aorta aus der bindegewebigen Umgebung und dem Abbinden der Abgänge wird eine Schutzmembran aus Gummi (Zuschnitt aus Gummihandschuh) hinter der Aorta positioniert, um eine Verletzung der Vene und umliegender Strukturen zu verhindern.</p>
Bild 4:		<p>Die Aorta wird im Präparationsbereich mit Hilfe der Gefäßclips vom Blutstrom abgetrennt.</p>
Bild 5:		<p>Aus dem blutstillen Teil der Aorta wird ein Stück native Aorta herausgetrennt und durch ein in der Länge angepasstes Transplantatstück ersetzt. Vom Transplantatstück wurde vor dem Einnähen ein Stück für immunhistochemische Färbungen abgetrennt</p>

Tabelle 9: OP-Ablauf – Freipräparieren der Aorta

3.2.7.1.3 Einnähen des Transplantats

Das bis wenige Minuten vor dem Einnähen im Brutschrank (bei 37°C, 5% CO₂) gelagerte Transplantat musste den Längenverhältnissen angepasst werden, so dass es durch die Dehnung im blutdurchströmten Zustand nicht zu einem gebogenen Verlauf kommen konnte, der die Entstehung von Stenosen und Thromben begünstigt hätte. Die abgeschnittenen Transplantatstücke wurden nach der OP zu immunhistochemischen Kontrollfärbungen genutzt, um festzustellen, ob das Lumen mit Endothelzellen bedeckt war. Dann wurde das Transplantat an jedem Ende mit zwei gegenüberliegenden Fixiernähten (mit Faden der Stärke 8.0, Ethilon, monofil, nicht-resorbierbar) befestigt und ohne den Fixierfaden abzutrennen mit einer fortlaufenden Naht bis zum gegenüberliegenden Fixierknoten End-zu-End anastomosiert, ca. 3-5 Stiche pro halben Gefäßumfang (siehe Tabelle 10, Bild 6 bzw. 7). Die Nahtstellen wurden mit blutungsstillendem Material umwickelt und die Gefäßklemmen geöffnet (siehe Tabelle 10, Bild 8), zuerst die caudale, dann die craniale, um einen Blutstau im Transplantatbereich zu vermeiden. Der Darm wurde unter Vermeidung von Verschlingungen wieder reponiert, etwas physiologische Kochsalzlösung in das Abdomen getropft und mit einer fortlaufenden Naht (mit Faden der Stärke 3.0, Vicryl, polyfil, nicht resorbierbar) die Bauchmuskulatur sowie im Anschluss mit einer Einzelknopfnahnt die Haut zugenäht. Gegebenenfalls wurde dem Tier 2-4 ml physiologische Kochsalzlösung subkutan in die Nackenfalte gespritzt, um intraoperative Volumenverluste auszugleichen.

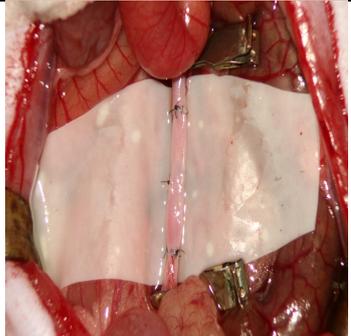
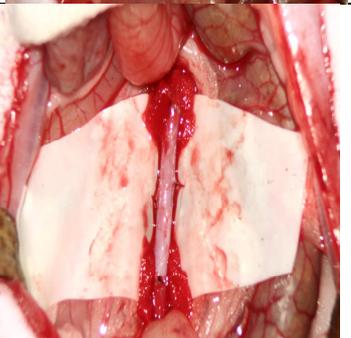
Bild 6:		Zwei halbkreisförmig verlaufende Wandnähte verbinden die gegenüberliegenden Aortenstümpfe nach Heparininjektion zu einer End-zu-End-Anastomose.
Bild 7:		Das Transplantat wurde der Länge nach eingepasst und faltenfrei cranial und caudal anastomosiert. Die Anpassung des Gefäßdurchmessers lässt sich durch Verwendung von ungefähr gleich alten Spender- und Empfängertieren regulieren.
Bild 8:		Leichte Undichtigkeiten der Anastomosen lassen sich durch blutungsstillende Materialien kompensieren. Sowohl im Transplantat als auch distal davon muss nach Entfernung der Gefäßclips ein Pulsieren des Blutes sichtbar sein, um nahtbedingte Stenosen auszuschließen.

Tabelle 10: OP-Ablauf – Einnähen des Transplantates

3.2.7.1.4 Nachuntersuchung

In der ersten Stunde nach der Operation wurde das Tier in regelmäßigen Abständen mehrmals untersucht. An den ersten auf die OP folgenden Tagen erfolgte mindestens eine Untersuchung. Es wurde z.B. die Atmung sowie die Hautfarbe an den Extremitäten auf eine evtl. Zyanose kontrolliert, auf Lähmungserscheinungen geachtet, versucht durch Kneifen in das Schwanzende bzw. zwischen den Zehen Schmerzreflexe auszulösen, wobei ein Fehlen bzw. eine Seitendifferenz auf eine evtl. Mangel durchblutung der unteren Extremitäten hinweisen sollte. Über mehrere Tage wurden Fressverhalten und Ausscheidung kontrolliert. Nur die Tiere, bei denen keine Zeichen auf Durchblutungsstörungen vorlagen, wurden für die weitere Auswertung der Versuche genutzt.

3.2.7.1.5 Organentnahme

Für die Organentnahme wurde das Tier in Narkose versetzt und das implantierte Gefäßersatzstück freipräpariert (zur Narkose siehe Kap. 3.2.12.1.1.). Der Narkosemittelbedarf war bei den meisten Explantationen sehr viel höher, als bei den Implantationen. Die Tiere waren altersbedingt schwerer und evtl. an das Narkosemittel „gewöhnnt“. Die individuell erforderlichen Mengen variierten stark. Transplantat-nahe Lymphknoten wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Gefäßtransplantat wurde mit Gefäß-Clips vom Blutkreislauf abgetrennt. Aus der Mitte des Gefäßersatzstückes wurde etwa ein Drittel herausgeschnitten, mit Kochsalzlösung gespült und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das herznahe Drittel, inklusive des Nahtbereiches und eines kleinen Stückes Eigengewebe, wurden in eine Petrischale mit isotoner Kochsalzlösung für immunhistochemische Färbungen überführt. Das herzferne Drittel, ebenfalls mit Nahtbereich und einem Stück angrenzendem Eigengewebe, wurden in Formalin in einer Petrischale gelagert.

Nach der Entfernung des Aortentransplantats wurde das Tier durch Herzpunktion und Entnahme der maximal aspirierbaren Blutmenge getötet, was durch einen Herzkammer-schnitt zusätzlich gesichert wurde. Das Blut wurde auf Eis gelagert und für Untersuchungen aufbewahrt. So schnell wie möglich, nach der tödlichen Blutentnahme, wurden ein Stück Thymus und ein Stück Milz entnommen und ebenfalls in Flüssigstickstoff eingefroren. Der verbliebene Kadaver wurde den Vorschriften entsprechend entsorgt.

3.2.8 Kryofixierung von Gewebeproben und Herstellung von Gewebeschnitten

Für die Beurteilung der EC-Besiedlung auf dem Lumen des Gefäßes wurde das Gewebe nach jedem Versuch mittig geteilt und durch Einbettung in Formalin oder N₂ fixiert. Die in Formalin gelagerten Proben wurden extern in Paraffin eingebettet, geschnitten und HE gefärbt. Die zweite Hälfte des Gefäßes wurde in Tissue Tec eingebettet. Dazu wurde es direkt nach der Entnahme aus dem Gefäßreaktor mit PBS gespült und für 25min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde das

Innere des Gefäßes mit Tissue Tech gefüllt, dann das komplette Gefäß in flüssiges Tissue Tech gelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Bis zur Herstellung der Gewebeschnitte wurde das so präparierte Gewebe bei -70°C aufbewahrt.

Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Kryostaten hergestellt. Die Schnitte wurden bei -13°C mit einer Dicke von 5µm angefertigt. Dazu wurde das gefrorene Gewebe mit Tissue Tech auf einem Objekthalter fixiert und in die Schneidevorrichtung eingespannt. Der entstandene Schnitt wurde direkt auf einen beschichteten, bei Raumtemperatur aufbewahrten Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungszeit von etwa 1h konnten die Schnitte für die immunhistochemische Färbung verwendet werden oder wurden bei -70°C gelagert.

3.2.9 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) lassen sich Zellkerne deutlich anfärben, da sie als einzige den Farbstoff Hämatoxylin (blau) aufnehmen. Durch die Gegenfärbung mit Eosin erscheint das Zytoplasma rot und bildet einen guten Kontrast zu den dunklen Zellkernen.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Nachdem die Schnitte 10 min in eiskaltem Aceton fixiert wurden, ließ man diese trocknen und färbte sie für 3-4 min mit Papanicolaou. Danach spülte man die Schnitte mit Aqua dest. und färbte anschließend für 3 min. mit Eosin gegen. Es folgten drei Spülschritte, der Erste mit Aqua dest., der Zweite für 5 min. mit 96% Alkohol und der Dritte für 5 min. mit 100% Alkohol. Die so präparierten Schnitte wurden mit Entellan, einem Eindeckmedium auf Alkoholbasis, eingebettet.

3.2.10 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Zur Beurteilung des Besiedlungsgrades der Gefäße wurden diese wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben eingebettet und 5µm dicke Schnitte hergestellt. Als spezifische Marker für Endothelzellen fanden CD31, als Lymphozyten- bzw. NK-Zellmarker TCR, CD45, CD68 (ED1) und NKRP1 und als Isotyp-Kontrollantikörper

MOPC-1 Verwendung. Es wurde eine ABC-Färbung durchgeführt. Diese basiert auf einer Immunezym Reaktion zur Lokalisierung von Antikörpern. Bei dieser Reaktion bindet ein Komplex aus Biotin, Peroxidase und Avidin an einen biotinylierten Sekundärantikörper. Der Komplex setzt das Substrat DAB (Diaminobenzidin), welches als Nachweissubstanz dient, durch Vernetzung zu Polymeren um, welche als dunkelvioletter bis brauner Niederschlag ausfallen. Der Vorteil der ABC-Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität, da Avidin und Biotin eine sehr hohe Bindungsaffinität aufweisen. Des Weiteren können auch sehr schwache Immunreaktionen nachgewiesen werden, da durch die verschiedenen Amplifikationsschritte während der Färbung (Bindung von Primär- und Sekundärantikörper, ABC-Komplexbildung, Komplexbildung am Sekundärantikörper) eine hohe Spezifität erreicht wird. Die bei -70°C gelagerten acetontfixierten Schnitte wurden aufgetaut und das Gewebe mit Hilfe eines Imedget-Stifts lückenlos umrandet, unter Vermeidung des Austrocknens. Es folgten zwei Waschgänge in TBS/Tween. Danach wurde das Präparat mit einem Gemisch aus TBS, Tween und 5%Pferdeserum blockiert (ca.50µl/Schnitt) und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiger Blockpuffer wurde mit Zellstofftüchern entfernt. Entsprechende Mengen von in Blockpuffer verdünnten Antikörperlösungen (Tabelle 5) wurden aufgetragen und über Nacht bei 4°C bzw. 1,5h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei wurde auch eine Negativkontrolle erstellt, welche anstatt der Antikörperlösung mit Blockpuffer inkubiert wurde. Im Anschluss wurden zwei Waschgänge mit TBS/Tween durchgeführt. Dann folgte eine einstündige Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG), sowie ein erster Waschschrift in TBS/Tween-Lösung und ein zweiter Waschschrift in TBS für jeweils 5 Minuten. Nach vorsichtigem Trockenwischen der Objektträger mit einem Zellstofftuch wurde ein Tropfen (ca. 50µl) H₂O₂-Blocklösung aufgetragen. Nach 20minütiger Inkubation wurde der Objektträger erneut mit einem Zellstofftuch von Flüssigkeitsresten befreit und für 2 mal 5 Minuten in TBS gewaschen. Nach dem Auftragen eines kurz zuvor angesetzten ABC-Peroxidase-Komplexes und 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde der Objektträger erneut von Flüssigkeit befreit und zwei Mal in TBS gewaschen. Anschließend wurde auf den getrockneten Objektträger AEC-Fertiglösung aufgebracht und bei Raumtemperatur für 6 Minuten belassen. Mit einer Pipette wurde die Färbelösung abgesaugt und der

Objektträger erneut zwei Mal gewaschen. Nach erneutem Trocknen folgte ein letzter Färbeschritt mit Hämatoxylin/Eosin über 2 Minuten und nach dem Absaugen der Flüssigkeit mit einer Pipette zwei Waschschriffe in TBS und ein letzter in Aqua dest für jeweils 5 Minuten. Die trockenen Objektträger wurden mit Aquatex eingedeckt.

3.2.11 PCR-Analyse

TaqMan-Real-time RT PCR

Die RNA-Extraktion, die cDNA-Synthese und TaqMan-Real-time RT PCR wurden nach der "Arbeitsanleitung zur molekularbiologischen Bestimmung der Genexpression" durchgeführt.¹

RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Aortensegment mittels TRIzol®-Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Das Aortensegment wurde in 1 ml TRIzol® homogenisiert (1 ml TRIzol® pro 50 mg Gewebe). Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 15 Sekunden geschüttelt und die Probe, nach kurzer Inkubation, für 15 Minuten bei 11200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der RNA enthaltene Überstand wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µg Glycogen wurde das Gemisch bei -80° über Nacht inkubiert. Ins Reaktionsgefäß mit der RNA-Lösung wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut für 15 min. bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene RNA-enthaltende Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend 5 Minuten bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Das Pellet wurde 5 Minuten luftgetrocknet, in 35 µl DEPC-Wasser resuspendiert und 10 Minuten bei 55°C inkubiert.²

¹ freundlicherweise durchgeführt von Sabine Brösel, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin

² Erstellt durch Katrin Vogt, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin

Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die Herstellung einer cDNA-Probe wurde 2 µg RNA eingesetzt. Nach Zugabe von 16 µl DEPC-H₂O und 2 µl odT-Primer wurde das Gemisch kurz abzentrifugiert und 10 Minuten bei 75° zur Lösung der Sekundärstrukturen inkubiert. Anschließend wurde ein Mixansatz vorbereitet:

8 µl first Strand Buffer (FSB)
4 µl Dithiothreitol (DTT/0,1M)
4 µl dNTP (2,5mM)
2 µl DNase (2U/µl)
0,5 µl RNase-Inhibitor (40U/µl)

18,5 µl Mix wurde pro Ansatz pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Proben zur DNase-Inaktivierung 5 Minuten auf 75°C erhitzt. Nach Zugabe von reverser Transkriptase und RNase-Inhibitor wurden die Proben in einem Thermozykler 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation durch Erhitzen auf 94°C für 5 Minuten gestoppt. Durch reverse Transkription aus extrahiertem RNA entstandene cDNA wurde mittels PCR amplifiziert.

Real-time RT PCR

In dieser Arbeit wurde die Expression von CD3, IFN γ , IP10, Tissue factor, eNOS und als Referenzgen (engl.: housekeeping gene) β -Aktin der Ratte quantitativ mittels real-time RT PCR durch GeneAmp®5700 Sequence Detection System (TaqMan, Perkin-Elmer Biosystems, Weiterstadt, Germany) ermittelt. Alle Primer wurden mit der Primer express®Software (Perkin-Elmer Biosystems) hergestellt. Die Expression von β -Aktin diente bei allen Analysen als Bezugspunkt für jede einzelne Probe. Für jede Probe wurde ein CT-Wert (threshold cycle) ermittelt. Als CT-Wert wird der Zeitpunkt bezeichnet, bei dem die exponentiell zunehmende Signalintensität einen Schwellenwert erreicht. Dieser Schwellenwert wird als erster Wendepunkt auf der Fluoreszenzkurve definiert.

Die Ausgangskonzentration (X) der Zielsequenz wird durch die Formel berechnet:

$$X = (1 + E) \cdot \Delta CT$$

Hierbei ist: $\Delta CT = CT$ (Zielsequenz) – CT (β -Aktin) und E=Effizienz der Reaktion.

3.2.12 Bildmorphometrie der immunhistochemischen Präparate

Teile der Gefäßtransplantate wurden wie unter 3.2.8 beschrieben für immunhistochemische Untersuchungen aufgearbeitet. Mittels Probeschnitten bekannter Infiltrationsstärken wurde die Morphometriesoftware kalibriert und für jeden Marker bestimmte Grundeinstellungen der Erkennungsempfindlichkeit, sog. Makros, definiert. Diese Makros dienten als Messgrundlage für alle Präparate eines Markers, so dass eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen verschiedenen Versuchsgruppen ermöglicht wurde*. Die Objektträger wurden unter einem computerunterstützten Mikroskop (Leica DMRDTM, Leica Bensheim, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung analysiert. Die Gefäßschnitte wurden dabei abschnittsweise fotografiert. Die zu analysierenden Gefäßschichten (Intima und Media) wurden markiert und die Infiltration in Form von Signalen pro Fläche computergestützt mit Hilfe der auf Microsoft Windows 98® basierten digitalen Morphometriesoftware Lucia G, (Version 3.52b, Imaging Laboratories, Prag, Tschechien) nach automatischer Optimierung von Schärfe und Kontrast ausgezählt. Zunächst wurde die Intima, anschließend die Media getrennt voneinander auf Infiltrationsstärke vermessen. Die Messwerte wurden computergestützt in das Format einer Microsoft Excel®-Datei konvertiert und dort in tabellarischer Form dargestellt. Aus den Werten der Infiltration von Intima und Media berechnete die Erkennungssoftware die durchschnittliche Gesamtinfiltration innerhalb der gesamten analysierten Fläche. Die tabellarisch aufgeführten Werte wurden nach Gruppen sortiert und mit Hilfe von Microsoft Excel® in Diagrammform dargestellt.

*Bereitstellung der Messinstrumente und Optimierung der Grundeinstellung erfolgte freundlicherweise durch Kerstin Puhl und Dirk Westermann aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

3.2.13 Statistik

Mann-Whitney U-Tests für ungepaarte Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms KyPlot 5.0 zur Signifikanzbestimmung durchgeführt, (* - signifikant, p-Wert $<0,05$; ** - hoch-signifikant, p-Wert $<0,01$)

4 Ergebnisse

4.1 Reaktivität von NKRP1-(+) Zellen gegenüber RAEC in vitro

4.1.1 Isolation und Charakterisierung NKRP1(+) Zellen aus Rattenmilzen

Die phänotypische Charakterisierung der NK-Zellfraktionen erfolgte per Durchflusszytometrie mit Hilfe eines monoklonalen FITC-markierten α -NKRP1-Antikörpers, sowie eines PE-markierten α -TCR-Antikörpers. Durch eine Doppelmarkierung konnten sowohl ausschließlich NKRP1(+) NK-Zellen als auch NKRP1(+) TCR(+) NKT-Zellen detektiert werden. Für die Isolation bzw. FACS-Färbung wurden Zellen verwendet, die zuvor als Interphase per Dichtezentrifugation aus dem Gesamtzellhomogenisat abgetrennt wurden. Das für die Isolation entwickelte Vier-Stufen-Protokoll führte zu einer effektiven Anreicherung der NKRP1(+)TCR(-) Zellen. Durch eine Kombination der verschiedenen Separationsmethoden konnte der Anteil der NKRP1(+)TCR(-) Zellen mit jedem Schritt des Protokolls erhöht werden bis eine deutliche Anreicherung gegenüber der Ausgangskonzentration erreicht wurde, (Abbildung 4). In den isolierten Zellen wurden hohe Anteile an NKRP1(+)TCR(-) Zellen nachgewiesen, welche Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entsprechen, (Abbildung 6). Für den Zytotoxizitätstest sollten nur Isolate mit einem willkürlich festgesetzten Anteil von mindestens 50% NKRP1(+)TCR(-) Zellen genutzt werden. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Anreicherung durch den Anteil NKRP1(+) Zellen vor und nach dem Anreicherungsprozess. Der prozentuale Anteil der NK-Zell-Population an der Gesamtzellpopulation aus allen für Zytotoxizitätstests genutzten Isolationen lag bei durchschnittlich $74\% \pm 9,6\%$. Die absolute Zellzahl der mit NK-Zellen angereicherten Isolate variierte zwischen $2,2 \times 10^6$ bis 10×10^6 mit einem Mittelwert von $5,1 \times 10^6$, \pm Standardabweichung (StAbw) $3,2 \times 10^6$, Anzahl der Versuche (n) = 6. Die für die Isolationen eingesetzten Ausgangszellzahlen lagen zwischen 1×10^8 und 3×10^8 . Vor der Isolation betrug der Anteil NKRP1(+)-TCR(-) Zellen durchschnittlich ca. 12%,

+/- 1,3%, n=3, (siehe Abbildung 4). In der (-)-Fraktion waren durchschnittlich noch 4,71% +/-2,73% NKRP1(+) Zellen enthalten, n=17.

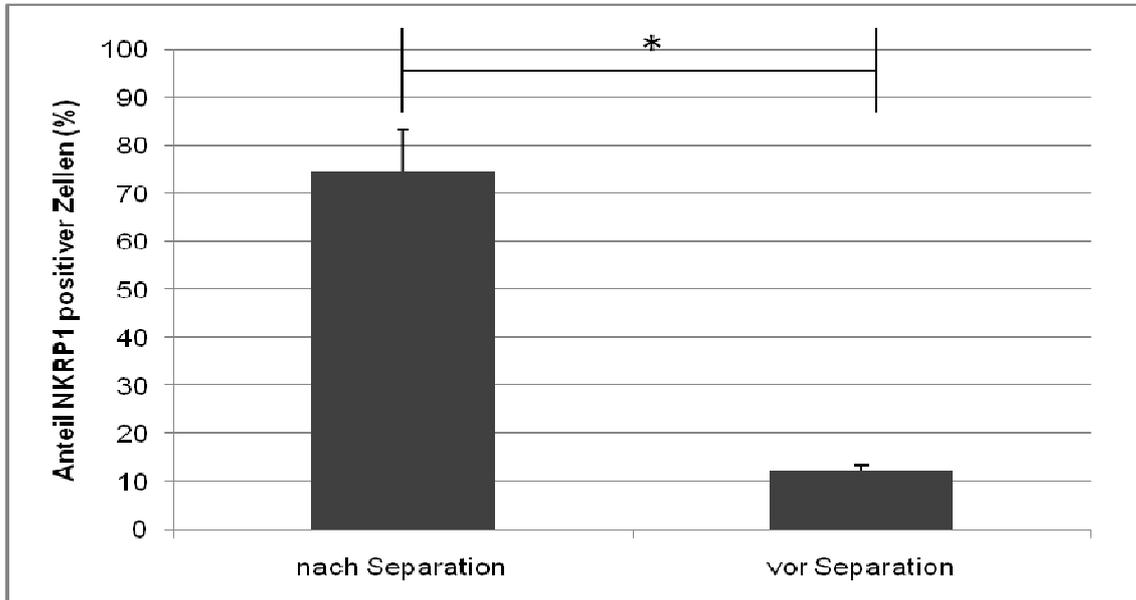


Abbildung 4: Effektive Anreicherung NKRP1(+)TCR(-) Zellen durch etablierte Protokolle:

Dargestellt ist der Vergleich des prozentualen Anteils der NKRP1(+)TCR(-) Zellen an der Gesamtzellmenge. „Vor Separation“ bedeutet, dass unmittelbar nach der Dichtezentrifugation der Anteil NKRP1(+)TCR(-) Zellen ermittelt wurde. „Nach Separation“ bedeutet nach MACS-Separation. Es sind die Mittelwerte +/- StAbw nach Separation (n=6) und vor Separation (n=3) dargestellt. Es konnte eine signifikante Anreicherung der NKRP1(+) Zellen erreicht werden ($p < 0,05^*$).

Die verschiedenen Zellpopulationen wurden zum Zeitpunkt vor und nach der Anreicherung mittels Magnetseparation durch die spezifische Anfärbung mit NK- und T-Zell-Markern charakterisiert. Dabei erfolgte zunächst im FACS die Eingrenzung vitaler Zellen mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärts-Scatter, wie in Abbildung 5a und 6a dargestellt. Die Doppelfärbung der Zellen vor der Magnetseparation ergab einen deutlichen Anteil ausschließlich NKRP1(+) Zellen. In der als repräsentativem Beispiel dienenden Dot-Plot-Darstellung (Abbildung 5b) zeigte sich ein Anteil von 13,49% ausschließlich NKRP1(+)-Zellen und ein entsprechend hoher Anteil an TCR(+) T-Zellen von 40,09%. Der Anteil von doppeltmarkierten NKRP1(+)TCR(+) NKT-Zellen in der analysierten Population ist mit 3,58% vernachlässigbar klein.

Im Gegensatz dazu konnte durch FACS-Analyse die deutliche Anreicherung NKRP1(+) Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 6b zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Doppelfärbung mit einem Anteil von 78,3 % NKRP1(+) Zellen, einem T-Zell-Anteil von nur noch 4,5% und einem Anteil doppelt markierter NKRP1(+)TCR(+) NKT-Zellen von 10,59%.

Der NK-Zell-Anteil im Isolat sollte definitionsgemäß über 50% liegen, um eine ausreichend reine Population im Zytotoxizitätstest einsetzen zu können. Zellen, die das NK-Zell-reiche Isolat verunreinigen könnten, fanden sich in den Zellen der NK-Zell-armen (-)-Fraktion nach der MACS-Separation (siehe Abbildung 3). Dementsprechend galt es die Verunreinigung mit anderen Zellen zu quantifizieren um eine Optimierung des Isolationsprotokolls zu ermöglichen, sowie evtl. Störeinflüsse auf die Testergebnisse beurteilen zu können. Daher wurden auch Zellen der (-)-Fraktion mit Hilfe der Marker NKRP1 und TCR untersucht. Die in Abbildung 9a untersuchte Population im Bereich R1 stellt vitale und homogene Zellen dar. Die Abnahme des relativen Anteils von NK-Zellen von 13,49% vor der Separation (Abbildung 5b) auf 5,23% in der (-)-Fraktion, (Abbildung 7b), deutete auf eine erfolgreiche Anreicherung der NK-Zellen in der NK-Zell-reichen (+)-Fraktion durch die MACS-Separation hin. Mit 83,3% stellen T-Zellen den größten Anteil der (-)-Fraktion dar. Doppelt positive NKT-Zellen sind mit einem Anteil von 3,36% vernachlässigbar.

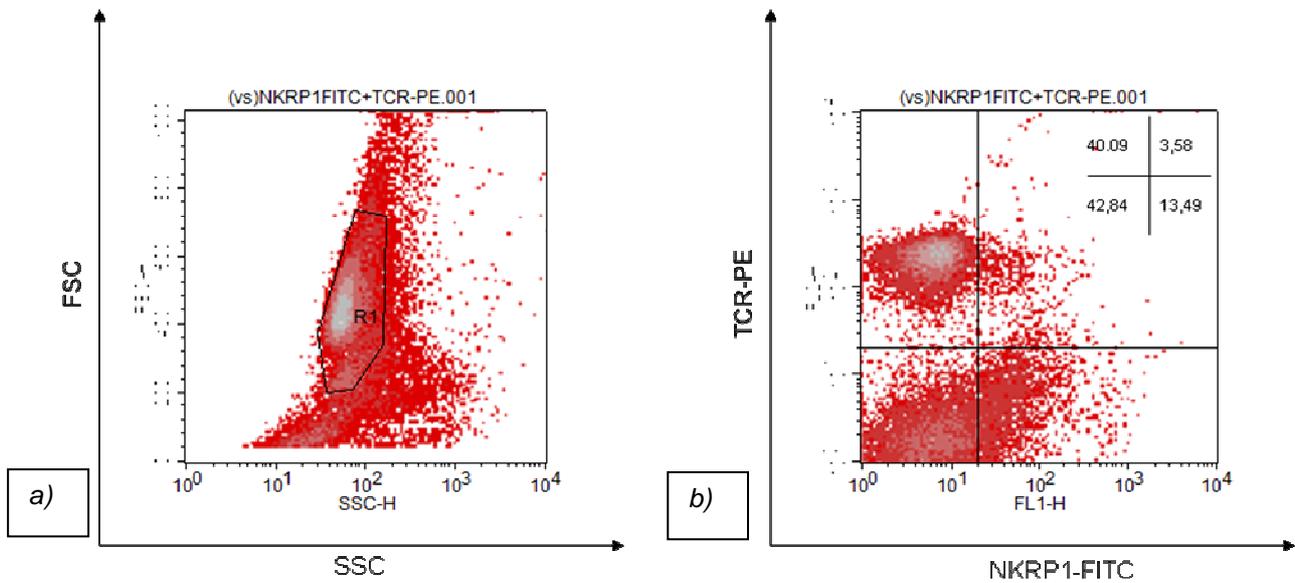


Abbildung 5: Phänotypische Charakterisierung der Milzzellisolate vor MACS-Separation

a) Die in R1 dargestellte Zellpopulation zeigte eine hinsichtlich der Größe (FSC) und Granularität (SSC) ähnliche Beschaffenheit und wurde als Population vitaler Zellen definiert.

b) Vor dem Isolationsprozess stellen T-Zellen mit 40% den größten Anteil dar. Im rechten unteren Quadranten zeigt sich ein Anteil von 13,49% potentiell isolierbarer NK-Zellen. Die im rechten oberen Quadranten dargestellten NKT-Zellen spielen vor der Separation mit einem Anteil von 3,58% in Bezug auf ihre Menge eine untergeordnete Rolle.

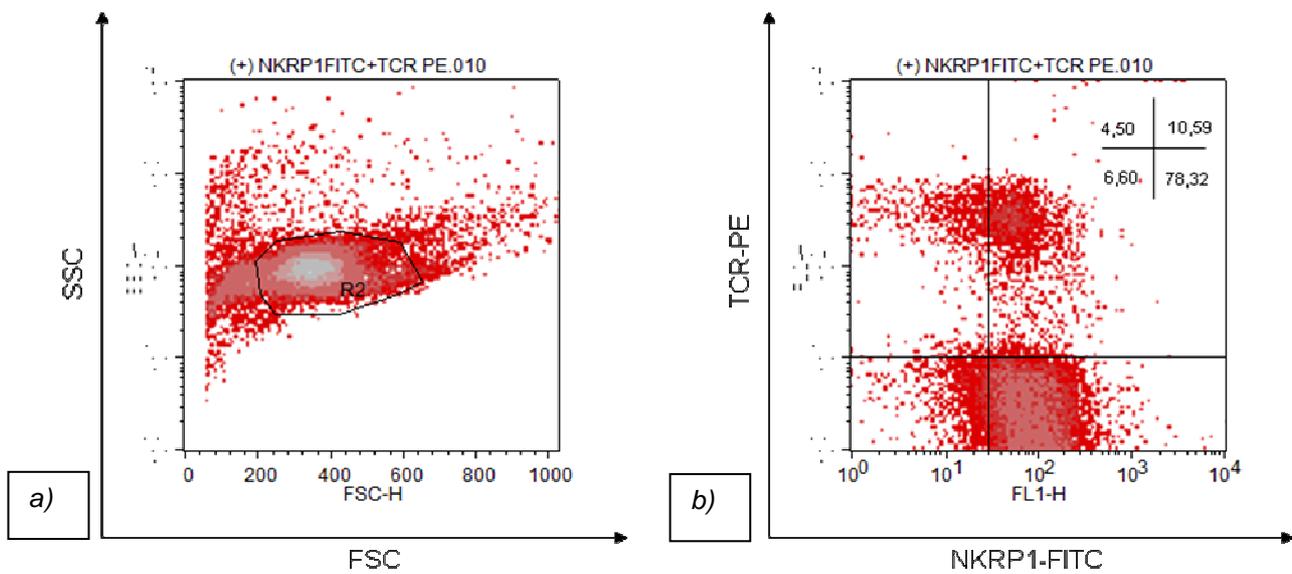


Abbildung 6: Anteil NKRP1(+)*TCR*(-) Zellen im (+)-Isolat nach MACS-Separation

a) Nach der Isolation ist der Anteil der enthaltenen, vitalen Zellen homogener geworden. Die in R2 dargestellten Zellen stellen den Großteil der isolierten Zellen dar. In dieser Population wurde ein hoher Anteil an NKRP1(+) Zellen vermutet. Da die Reinheit der NK-Zellen über 50% lag, konnte solch ein Isolat definitionsgemäß für die Durchführung eines Zytotoxizitätstests genutzt werden.

b) NK-Zellen stellen nach der Isolation mit 78,32% die größte Subpopulation dar. Der Anteil der doppelt positiven NKT-Zellen ist auf 10,59% angestiegen. Eine Verunreinigung mit T-Zellen von 4,5% kann vernachlässigt werden.

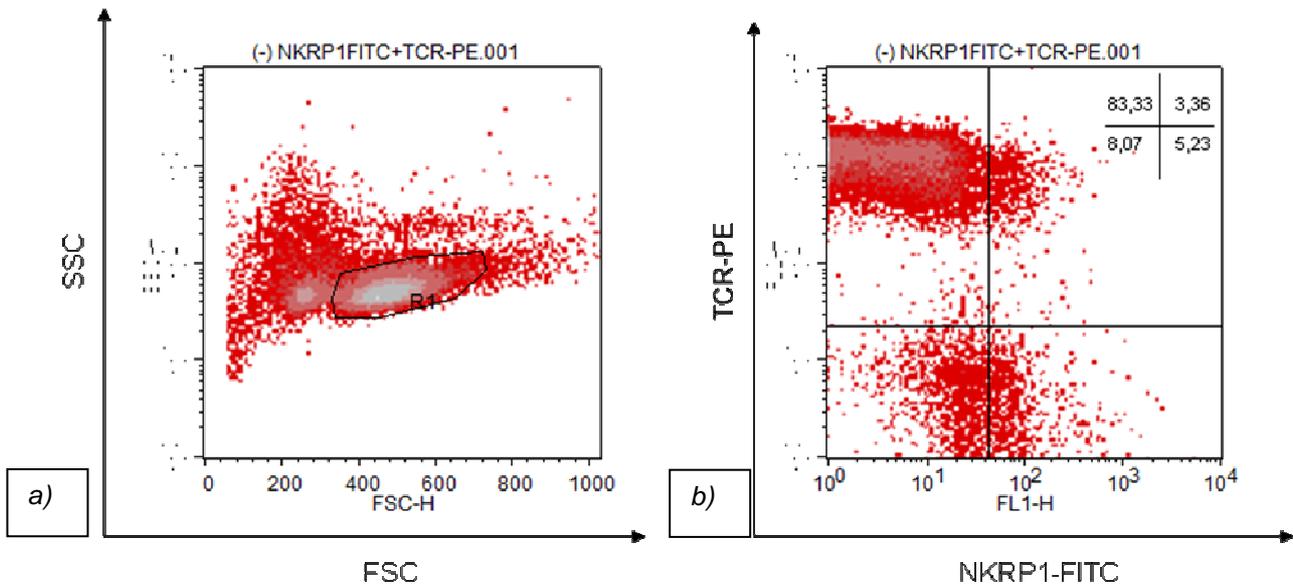


Abbildung 7: Anteil NKRP1(+)TCR(-) Zellen im (-)-Isolat nach MACS-Separation

a) Die im Bereich R1 liegende Population vitaler Zellen stellte einen Großteil der (-)-Fraktion dar und war in Bezug auf Größe und Granularität von ähnlicher Beschaffenheit.

b) Es zeigte sich, dass es sich bei 83,3% der Zellen aus R1 um T-Zellen und bei 3,36% der Zellen um NKT-Zellen handelte. Ein Anteil von 5,23% NK-Zellen zeigt, dass die (-)-Fraktion nach der MACS-Separation, gegenüber dem Gehalt vor Separation von 13,49%, NK-Zell-arm ist.

4.1.1.1 Reaktivität von Ratten-NK-Zellen gegenüber RAEC in Zytotoxizitätstests

Im Hinblick auf die Verwendung von MHC-I defizienten RAEC als zellulärer Komponente von Gefäßtransplantaten ist von besonderem Interesse, die Reaktivität Natürlicher Killerzellen auf die verminderte MHC-I-Oberflächenexpression zu charakterisieren und mit der Reaktivität gegenüber nativen RAEC zu vergleichen. Eine evtl. zytotoxische Reaktion kann mit Hilfe des Zytotoxizitätstest *in vitro* ausgelöst und analysiert werden. Das Ausmaß einer solchen Reaktion kann mit diesem Test quantifiziert werden und soll somit wertvolle Hinweise geben, ob *in vivo* mit einer Immunreaktion und daraus resultierender Transplantatschädigung zu rechnen ist.

Zunächst stand die Bestimmung optimaler Bedingungen eines Zytotoxizitätstests mit NKRP1(+) Zellen als Effektorzellen und RAEC als Zielzellen im Vordergrund. Neben der Ermittlung der optimalen Zell- und Calcein-Konzentration musste untersucht werden, ob YAC-1 Zellen als Kontrollzellen im Rattenmodell verwendet werden können, da es sich um Zellen murinen Ursprungs handelt. YAC-1-Zellen sollten im Folgenden in den Zytotoxizitätstests als Positivkontrolle benutzt werden, da diese auf Grund ihrer fehlenden MHC-Klasse I Expression nur durch NK-Zellen lysiert werden. Das sollte, zusätzlich zur FACS-Messung, den Erfolg der NK-Zell-Anreicherung bestätigen. Die FACS-Analysen mussten zusätzlich durchgeführt werden, da eine phänotypische Charakterisierung der isolierten Zellen **vor** Beginn des Zytotoxizitäts-Tests gewährleistet sein musste, um vorab Auskunft über die Verwendbarkeit der Zellisolate Auskunft geben zu können. Der Anteil NKRP1(+)TCR(-) Zellen sollte, per definitionem, nicht unter 50% liegen.

4.1.1.2 Etablierung des Zytotoxizitätstests

Zunächst wurden optimale Testbedingungen für den Zytotoxizitätstest unter Verwendung angereicherter NK-Zellen ermittelt. Zunächst wurden die optimale Zellzahl sowie die optimale Calcein-Konzentration zur Markierung der Zielzellen bestimmt. Ziel war, die bestmögliche Diskriminierung zwischen der maximalen Zellyse (MR, engl.: Maximal Release) und einer spontan vorhandenen Lyse in Kulturen mit Zellkulturmedium allein (SR, engl.: Spontan Release) zu erzielen. Dafür musste die Zellzahl bestimmt werden, bei der die Differenz zwischen MR und SR der Zellyse maximal ist. Je größer diese Differenz, desto feiner die Abstufung der ermittelten Werte.

Im Falle der Verwendung von YAC-1 lag die optimale Zellzahl bei 2×10^4 Zellen pro well. Um zu verdeutlichen, bei welcher eingesetzten Zielzellzahl die Differenz zwischen MR und SR am günstigsten ist, wurde deren prozentualer Anteil bezogen auf die maximale Zellyse (in Abbildung 8b) grafisch dargestellt. Hierbei bestätigte sich, dass bei 2×10^4 und 4×10^4 der prozentuale Anteil am höchsten war. Bei 4×10^4 Zellen war zwar der absolute Abstand noch größer, (Abbildung 8a), aber die Zahl der benötigten NKRP1(+) Zellen wäre so groß gewesen, das eine Isolation aus zwei Rattenmilzen nicht die erforderliche Zahl an NK-Zellen erbracht hätte. Die Lyse der YAC-1-Zellen erfolgte im Rahmen der Etablierung jedoch nicht durch NK-Zellen, sondern durch eine 4- stündige Inkubation mit 100µl Triton X pro well; (n=3).

Analog zur Maximierung der Differenz zwischen MR und SR durch die Ermittlung der optimalen Zellzahl wurde die optimale Calcein-Konzentration ermittelt, mit der die YAC-1-Zellen gefärbt wurden. Dazu wurde eine vierstufige Verdünnungsreihe mit Calcein erstellt, mit der die Zielzellen inkubiert wurden. Bei einer Konzentration von 20µM erreichte die Differenz zwischen MR und SR die höchsten Werte (siehe Abbildung 9). Bei niedrigen und hohen Konzentrationen (5µM bzw. 40µM) war die Differenz zu gering.

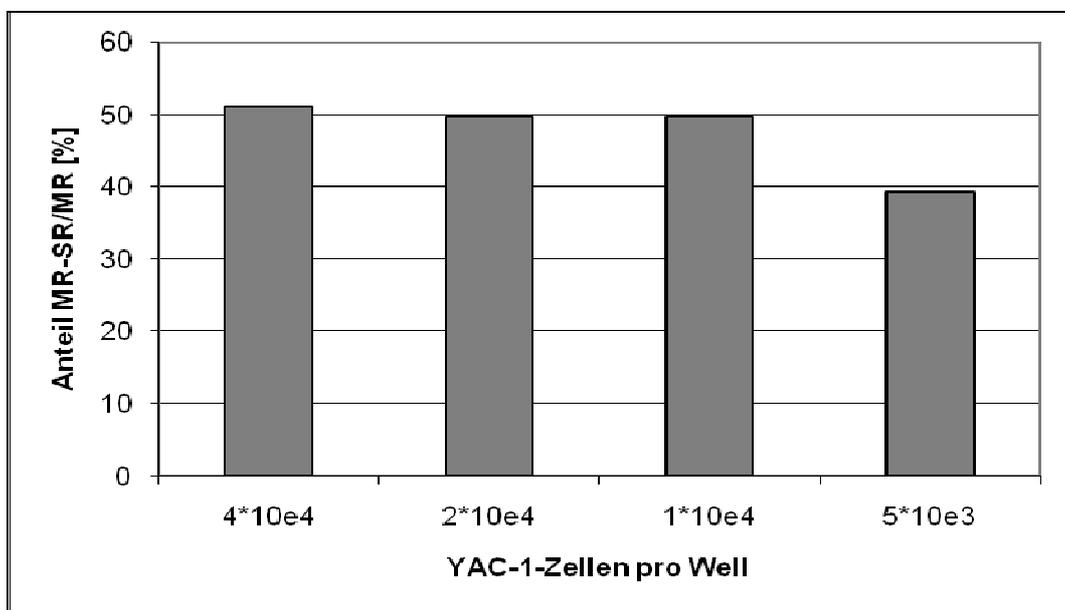
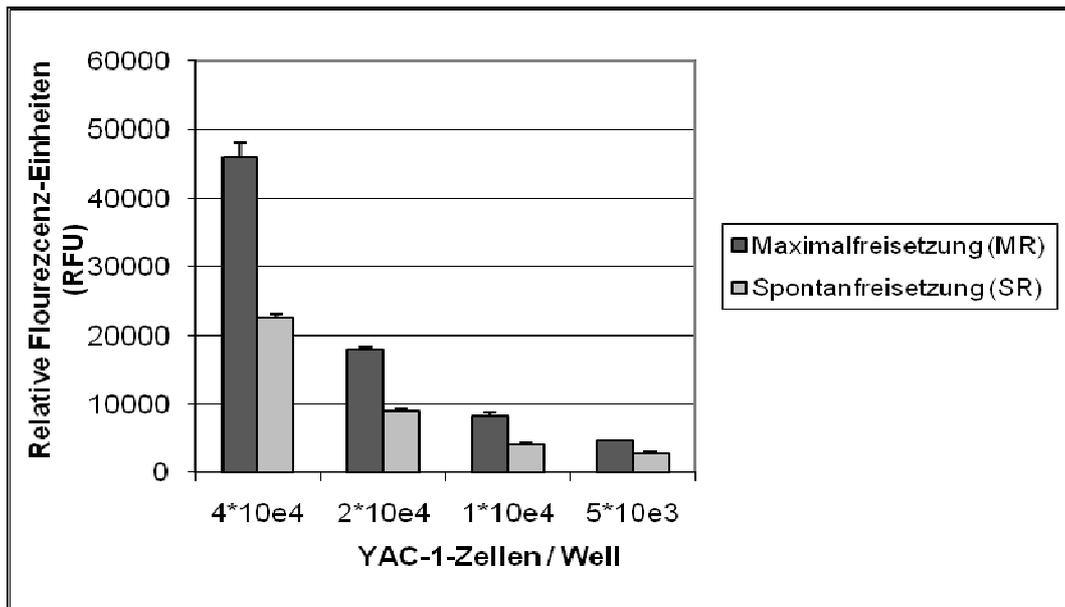


Abbildung 8: Etablierung des calceinbasierten Zytotoxizitäts-Tests – Bestimmung der optimalen Zellzahl

a) Die Differenz zwischen Maximal- und Spontanrelease stieg mit zunehmender Zielzellzahl an, erreichte aber bei 2×10^4 eine ausreichend diskriminierbare Größe.

b) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Differenz zwischen MR und SR am MR. Hier wurde bestätigt, dass 2×10^4 Zellen die geeignetste Zellzahl darstellte, da hierbei die Diskriminierung maximal und der Bedarf an Effektorzellen klein genug war.

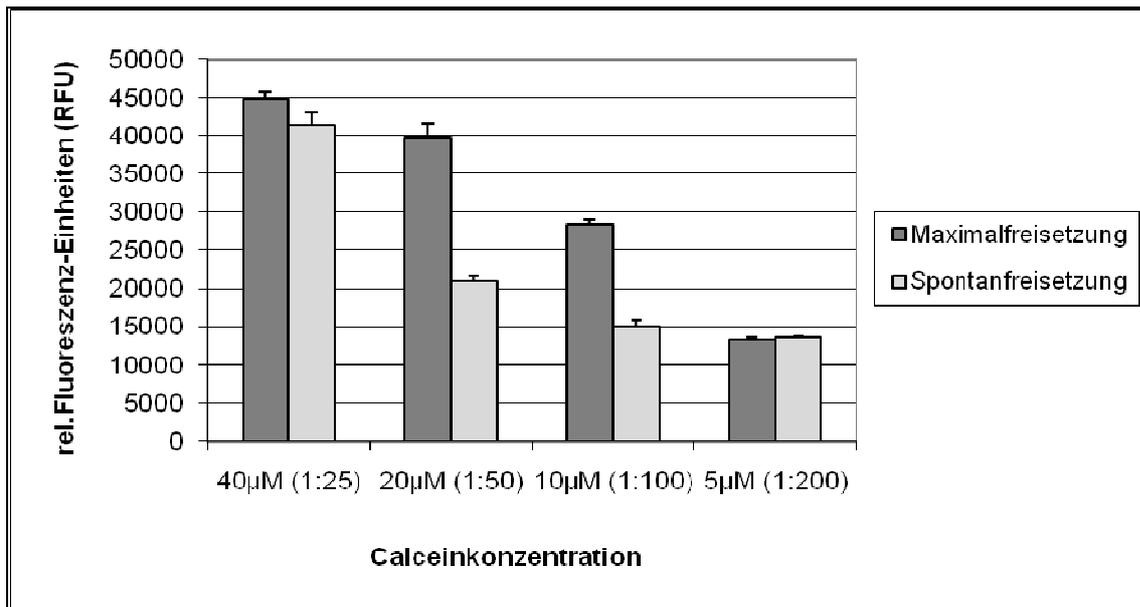


Abbildung 9: Etablierung des calceinbasierten Zytotoxizitäts-Tests – Bestimmung der optimalen Calcein-Konzentration

Der Abstand zwischen MR und SR erreicht bei einer Konzentration von 20mM Calcein sein Maximum. Die Lyse der YAC-1-Zellen erfolgte hierbei durch eine vierstündige Inkubation mit 100µl Triton X pro well. (n=3)

4.1.1.3 NK-Zell-Reaktivität gegenüber Wildtyp-RAEC und YAC-1-Zellen

In mehreren Versuchen wurden YAC-1-Zellen unter den gleichen Bedingungen, wie die RAEC, mit den aus Rattenmilzen isolierten NKRP1(+) Zellen inkubiert. Es konnte im Rahmen dieser Zytotoxizitätstests demonstriert werden, dass YAC-1 Zellen eine zur (NK-Zell:YAC-1-Zell)-Ratio proportionale Lyse zeigen, die bei einem (NK:YAC-1)-Verhältnis von 5:1, zu einer rechnerischen Lyse mit einem Mittelwert von $112,3\% \pm 29,9\%$ führte (Abbildung 10). Das ermöglicht den Einsatz von YAC-1-Zellen als Positivkontrolle, die somit im Zytotoxizitätstest als Indikator für die Verwendung vitaler NK-Zellen nutzbar sind. In den Auswertungen wurden nur die Zytotoxizitätstests berücksichtigt, bei denen in den Effektorzellsuspensionen mindestens 50% NKRP1(+)TCR(-) enthalten waren und bei denen die YAC-1-Zellen in der höchsten Effektor:Zielzell-Ratio vollständig lysiert wurden.

Bei der Analyse der Endothelzellen zeigte sich sowohl bei den syngenem LEW-RAEC als auch bei den allogenen DA-RAEC eine ebenfalls dosisabhängige Zelllyse, jedoch auf einem basalen Niveau. In der Tendenz weisen jedoch die allogenen DA-RAEC eine geringe spezifische Lyse ($9,8\% \pm 20,5\%$ bei einer Effektor-Zielzell-Ratio von 5:1) im Vergleich zu den syngenem LEW-RAEC ($40,2\% \pm 29,1\%$ bei einer Effektor-Zielzell-Ratio von 5:1) auf. Die Unterschiede zwischen den Lysewerten beider RAEC-Typen sind jedoch bei keiner Effektor:Zielzell-Ratio signifikant (Abbildung 10).

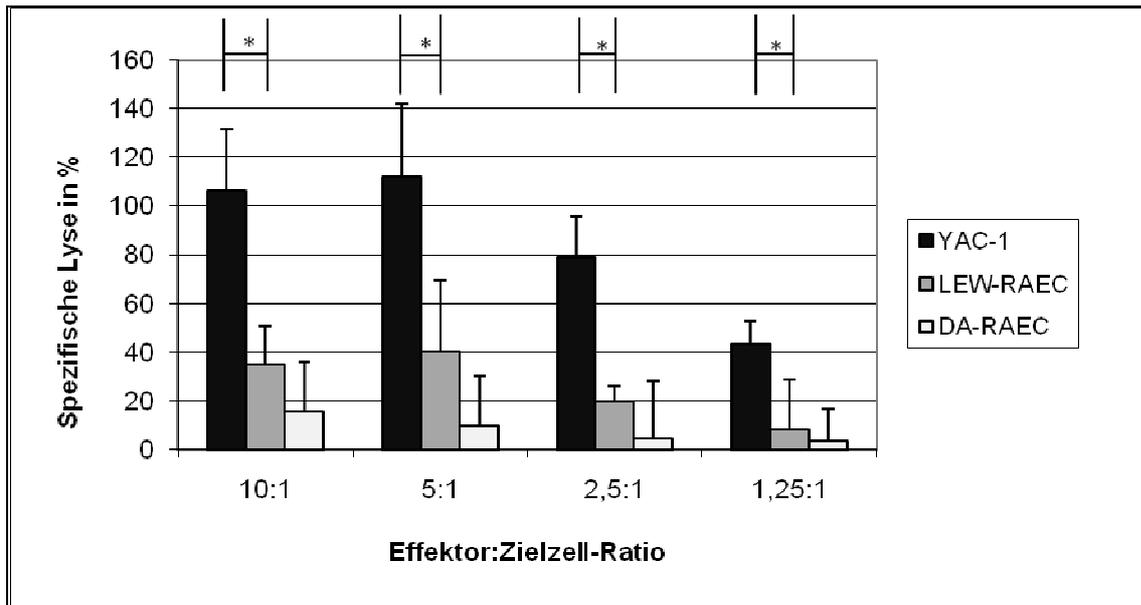


Abbildung 10: Zytolytischer Effekt der NK-Zellen auf syngene und allogene Wildtyp-RAEC

Dargestellt ist die spezifische Lyse der (syngenen) LEW-RAEC, der (allogenen) DA-RAEC, sowie der NK-sensitiven murinen Zelllinie YAC-1 (Positivkontrolle) durch NKRP1(+) Zellen bei verschiedenen Effektor:Zielzell-Ratios. Alle verwendeten Zelltypen zeigten eine dosisabhängige Lyse. Die Unterschiede zwischen den spezifischen Lysen der LEW-RAEC und der YAC-1-Zellen sind signifikant (*; $p < 0,05$). YAC-1 $n=3$, L-RAEC $n=3$, DA-RAEC $n=2$

4.1.1.4 NK-Zell-Reaktivität gegenüber RAEC mit verringerter MHC-I-Oberflächenexpression

Potentiell inhibierende Signale auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen werden u. a. durch die Gegenwart von MHC I Molekülen auf der Zielzelloberfläche ausgelöst. Die entscheidende Frage war, wie weit diese inhibierenden Signale durch herabgesetzte MHC I Oberflächenexpression verringert werden können, ohne das Signalgleichgewicht so weit in Richtung Aktivierung zu verschieben, dass eine Zytolyse erfolgt. Ein Teil der RAEC wurden durch die unter [2.1.7.2](#) beschriebene Expression eines Intrabodies in ihrer MHC I - Oberflächenexpression gehemmt.

Tabelle 11 vergleicht die MHC-I-Oberflächenexpression der verschiedenen RAEC-Kulturen mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Anfärbung mit einem OX18-AK und einem PE-markierten Sekundärantikörper. Die in der mit „Wildtyp (WT)“ gekennzeichneten Zeile der Tabelle 11 dargestellten Zellen wurden nicht transduziert, haben aber als Kontrollfraktion den mechanischen Sortierprozess zum Aufreinigen der Kulturen durchlaufen. Ihre MHC-I-Expression entspricht dem physiologischen Ausmaß und wird als Referenzwert genutzt.

36,4% der in der zweiten Zeile (Tabelle 11) mit (nur GFP) bezeichneten RAEC konnten erfolgreich mit dem Konstrukt für eine GFP-Expression transduziert werden. Die MHC-I-Oberflächenexpression von 95,1% dieser Kultur entspricht dem Niveau der Wildtypzellen. Sie dienen als Indikator für immunologische Veränderungen durch den Transduktionsvorgang. Die in der unteren Zeile (Tabelle 11) mit (OX18) gekennzeichneten RAEC wiesen nach der Transduktion mit dem Intrabody und dem GFP-Gen zu 55% eine herunterregulierte MHC-I-Oberflächenexpression auf. Das MHC-I-Expressionslevel dieser Kultur lag somit deutlich unter dem physiologischen Ausmaß. Somit standen drei verschiedene RAEC-Kulturen für Zytotoxizitätstest zur Verfügung mit deren Hilfe die aus der verminderten MHC-I-Expression resultierenden Veränderungen der Immunogenität analysiert werden konnten.

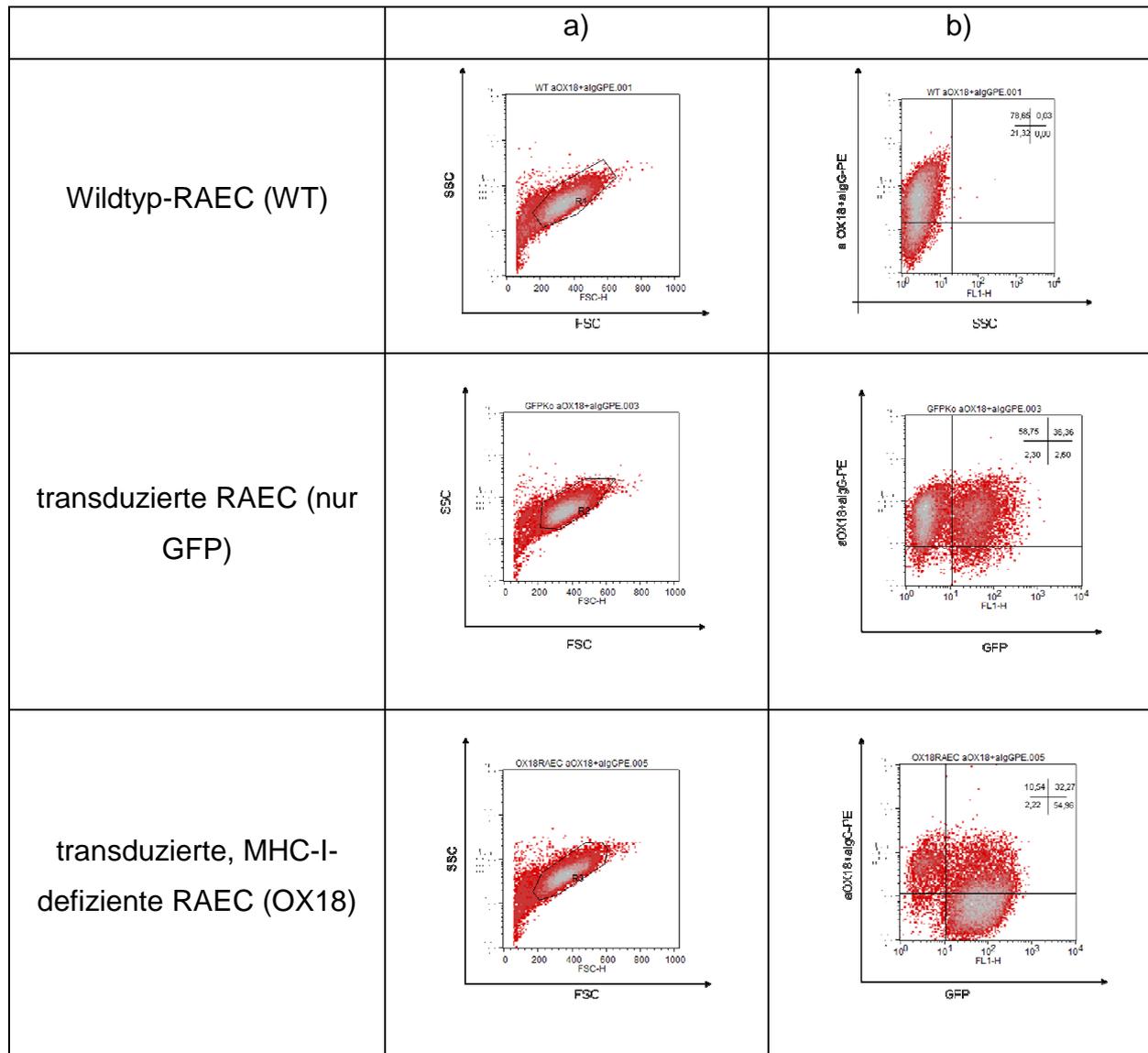


Tabelle 11: Vergleich der MHC-I-Oberflächenexpression transduzierter und nicht-transduzierter DA-RAEC

Spalte a): Die hier gezeigten FSC/SSC-Abbildungen zeigen in den mit R1 bis R3 markierten Bereichen die auf ihre MHC-I-Oberflächenexpression zu untersuchenden, vitalen Zellpopulationen (oben: Wildtyp-RAEC, Mitte: kontrolltransduzierte, GFP(+)-RAEC, unten: transduzierte GFP(+)-MHC-I-defiziente RAEC)

Spalte b): Auf den **oben** gezeigten Wildtypzellen ließen sich in 78,7% MHC-I-Moleküle anfärben (obere Quadranten. Dieses MHC-I-Expressionniveau wird als physiologisch gewertet und als Referenzwert zu Grunde gelegt. Da die Zellen untransduziert, also GFP(-) waren, wurde als zweites Merkmal die Granularität (SSC) gewählt. Die in der **Mitte** gezeigten kontrolltransduzierten RAEC exprimierten in 36,4% GFP und zeigen eine physiologische MHC-I-Oberflächenexpression (rechter, oberer Quadrant). Diese Zellen wurden erfolgreich transduziert und dienten als Indikator für immunologische Veränderungen durch den Transduktionsvorgang. Die **unten** gezeigten RAEC zeigten in 55% eine herabgesetzte MHC-I-Oberflächenexpression bei gleichzeitiger Expression von

GFP. Diese Zellpopulation war ausreichend rein um in späteren Zytotoxizitätstests und Transplantationsversuchen mit den Kontrollzellen verglichen werden zu können; (n=1).

Abbildung 11 zeigt die zytolytische Wirkung der mit NK-Zellen angereicherten Zellsuspensionen auf verschiedene allogene Zielzellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Effektor:Zielzell-Ratios. Die hohe Lyserate der YAC-1-Zellen (ca.95%) ist signifikant höher als bei den allogenen DA-RAEC und zeigt, dass es sich bei den Effektorzellen um NK-Zellen handelte (pos. Kontrolle). Bezüglich der Lyse von RAEC-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen festgestellt werden.

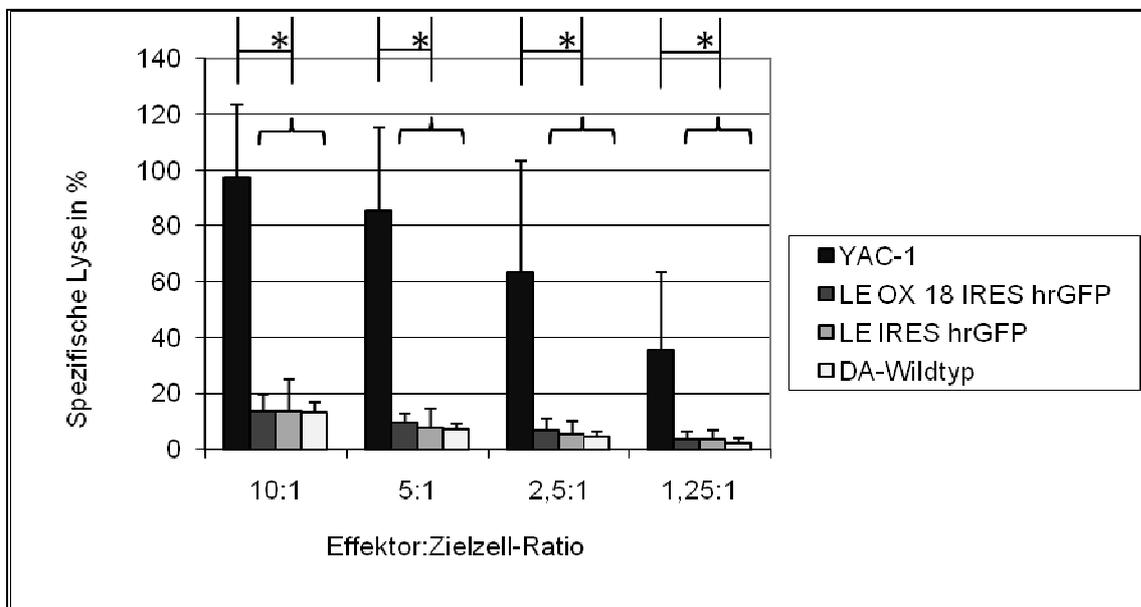


Abbildung 11: Vergleich der Sensitivität von Wildtyp-Endothelzellen und MHC-I-defizienten allogenen RAEC gegenüber der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen

Dargestellt ist die spezifische Lyse von YAC-1-Zellen sowie aller drei untersuchten RAEC-Typen: DA-Wildtyp-RAEC, Intrabody-transduzierten-DA-RAEC (LE OX18 IRES hrGFP) und kontroll-transduzierten DA-RAEC (LE IRES hrGFP) in Abhängigkeit von der Effektor- und Zielzell-Ratio. Alle Zelltypen zeigten eine dosisabhängige Lyse. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der spezifischen Lysen zwischen den gezeigten RAEC-Typen detektiert werden. Bei allen abgebildeten Effektor:Zielzell-Ratios sind die spezifischen Lysen der YAC-1-Zellen gegenüber den spezifischen Lysen der RAEC signifikant höher, * $p < 0,05$. YAC-1: n=4, OX18:n=5, GFP: n=5, DA: n=4

4.1.1.5 Reaktivität NKRP1(-) Zellen gegenüber RAEC

Die Zellen, die während der MACS-Separation von der (+)-Fraktion getrennt wurden, werden als (-)-Fraktion bezeichnet, da die meisten Zellen einen NKRP1(-) Phänotyp aufweisen. Der durchschnittliche Anteil NKRP1(+) Zellen nach allen Separationsschritten betrug 74,59 % (n=6). Da die Anreicherung der (+)-Fraktion auf durchschnittlich 74% NKRP1(+) Zellen noch eine Kontamination von mindestens 26% NKRP1(-) Zellen beinhaltet, war es wichtig herauszufinden, ob durch die Kontamination eine Verfälschung der Ergebnisse entsteht. Die Isolate wurden außerdem mit einem α -T-Zell-Rezeptor (TCR) Antikörper gefärbt um „Verunreinigungen“, z. B. durch NKT-Zellen quantifizieren zu können. Um den Einfluss der verunreinigenden Zellen auf die Testergebnisse zu prüfen, wurden Zellen der NKRP1(-)-Fraktion in Zytotoxizitäts-Tests unter gleichen Bedingungen eingesetzt, wie die Zellen der NKRP1(+)-Fraktion.

Abbildung 12 zeigt die zytolytische Wirkung der NK-Zell-armen Zellsuspension, deren Zellen in den „Verunreinigungen“ der NKRP1(+)-Fraktion zu finden sind. Bei allen Effektor:Zielzell-Ratios kann die spezifische Lyse der Zielzellen als „basal“ bezeichnet werden. Eventuelle „Verunreinigungen“ der NKRP1(+) Zellen mit Zellen der NKRP1(-) Fraktion haben somit keinen verfälschenden Einfluss auf das Ergebnis der Zytotoxizitätstests mit Zellen der (+)-Fraktion.

Es muss aber berücksichtigt werden, dass die „Verunreinigungen“ der (+)-Fraktion und die Zellen der (-)-Fraktion Unterschiede aufweisen könnten. Durch die Isolation mit Hilfe eines α -NKRP1-Antikörpers können in der (+)-Fraktion NKT-Zellen enthalten sein, welche in der (-)-Fraktion nur in geringerem Maß zu finden sind.

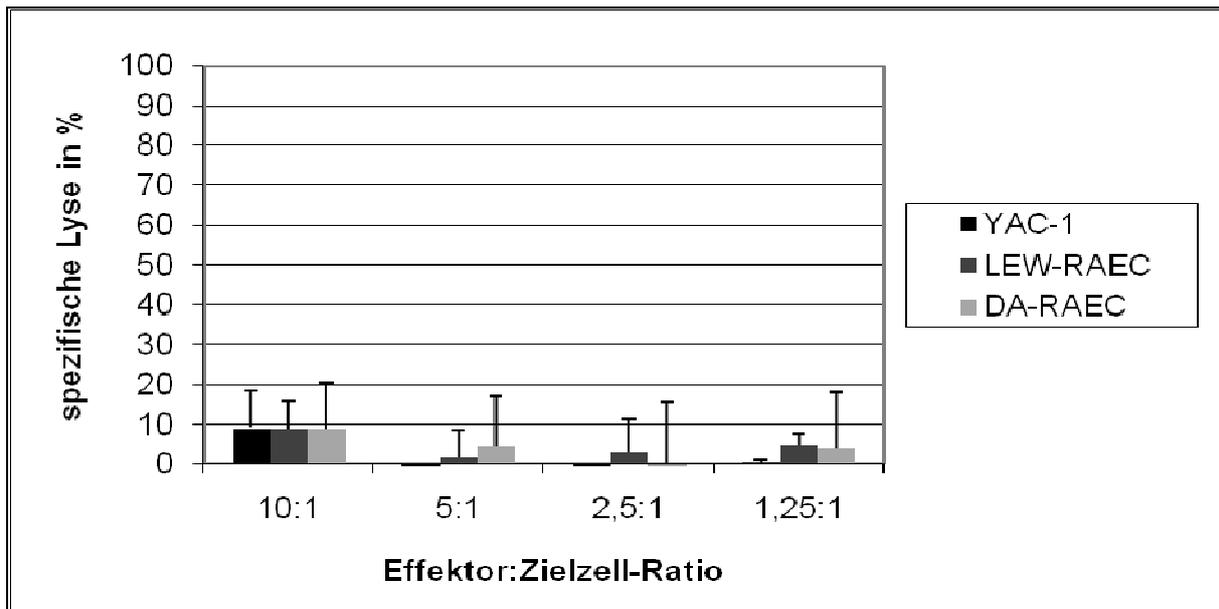


Abbildung 12: Zytolytischer Effekt der NKRP1(-)-Fraktion syngene und allogene Wildtyp-RAEC sowie YAC-1-Zellen

NKRP1(-) Zellen verursachen bei allen eingesetzten Effektor:Zielzell-Ratios eine als basal zu bezeichnende Lyse aller verwendeter Zielzellen. Somit kann eine Verfälschung der Zytotoxizitätstest durch Zellen der NKRP1(-) Fraktion ausgeschlossen werden. Die Unterschiede der spezifischen Lysen sind nicht signifikant, $p > 0,05$. YAC-1 $n=3$, L-RAEC $n=3$, DA-RAEC $n=2$

4.2 Transplantation von Gefäßersatzstücken aus azellulärer Matrix und RAEC

4.2.1 Quantitative Betrachtung der Transplantationsversuche

Es konnten für diese Arbeit insgesamt 43 Tiere operiert werden. Bei 41 Tieren erfolgte die Organentnahme 4 Wochen +/- 2 Tage nach der Implantation. Insgesamt wurden 13 mit LEW-RAEC besiedelte, 7 mit DA-RAEC besiedelte, 8 mit OX18-RAEC besiedelte, 9 mit GFP-RAEC besiedelte und 6 zellfreie Matrices transplantiert. In den 43 Transplantationen sind auch die vorzeitig beendeten (n=5) und die für nachfolgende Untersuchungen nicht genutzten Versuche enthalten (n=5). Die fünf Transplantationsversuche, die vorzeitig abgebrochen werden mussten, betrafen folgende Gefäßtransplantate: 1 x mit LEW-RAEC besiedelt am 3.Tag post-OP, 1 x mit DA-RAEC besiedelt am 1. Tag post-OP, 2 x mit GFP-RAEC besiedelt am 1. bzw. 2.Tag post-OP und 1 x mit OX18-RAEC besiedelt am 16. Tag post-OP. Bei Versuchsabbruch wurde das jeweilige Tier sofort obduziert. Meistens waren nahtbedingte Stenosen mit daraus folgendem Gefäßverschluss die wahrscheinlichste Todes- bzw. Abbruchursache.

Zwei mit sygenen RAEC besiedelte Explantate waren 4 Wochen nach OP zugewachsen und vollständig undurchlässig. Die Tiere überlebten trotzdem scheinbar gesund bis zum geplanten Explantationstermin nach 4 Wochen. Deren Explantate wurden jedoch nicht für PCR-Untersuchungen genutzt. Ein mit GFP-RAEC besiedeltes Gefäßersatzstück war bei Explantation vereitert. Auch dieses Explantat wurde bei den anschließenden PCR-Untersuchungen nicht berücksichtigt. Bei einem Tier erfolgte die Entnahme bereits nach 2 Wochen. Bei der Entnahme erschien das Gewebe noch nicht frei von der, durch die Implantation verursachten, Wundheilung. Die Gewebeentnahme gestaltete sich hierbei, wahrscheinlich aufgrund von Verwachsungen, schwierig. Diese Transplantation wurde in den anschließenden PCR-Untersuchungen ebenfalls nicht berücksichtigt. Ein Tier wurde wegen des Verdachts auf eine Oxyuren-Infektion nicht in die Analysen einbezogen.

Es wurden 5 Gruppen erfolgreich transplantiert und die Explantate anschließend sowohl immunhistochemisch, als auch mittels quantitativer RT-PCR (LEW-RAEC: n=6, DA-RAEC: n=6, OX18-RAEC: n=6, GFP-RAEC: n=6, Matrix: n=6) untersucht.

4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen der Gefäßersatzstücke

4.2.2.1 Expression des endothelspezifischen Markers CD31

Betrachtet man zunächst die Expression des Endothelzellmarkers CD31, so ließen sich in den Gefäßersatzstücken relevante Charakteristika nachweisen. Die vor der Implantation mit Endothelzellen besiedelten Gefäßersatzstücke zeigten in der Intima große und in der Media kleine CD 31(+) Zellpopulationen. Auch in den unbesiedelt implantierten Matrixstrukturen zeigten sich nach vierwöchigem Verbleib im Transplantatempfänger relativ hohe Werte in der Intima und kleine Werte in der Media-äquivalenten Schicht, da vermutlich Endothelzellen des Transplantatempfängers aus den angrenzenden Aortenbereichen eingewachsen waren (Abbildung 13). Hinsichtlich der CD 31 Expression in den mit RAEC besiedelten Gefäßersatzstücken zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

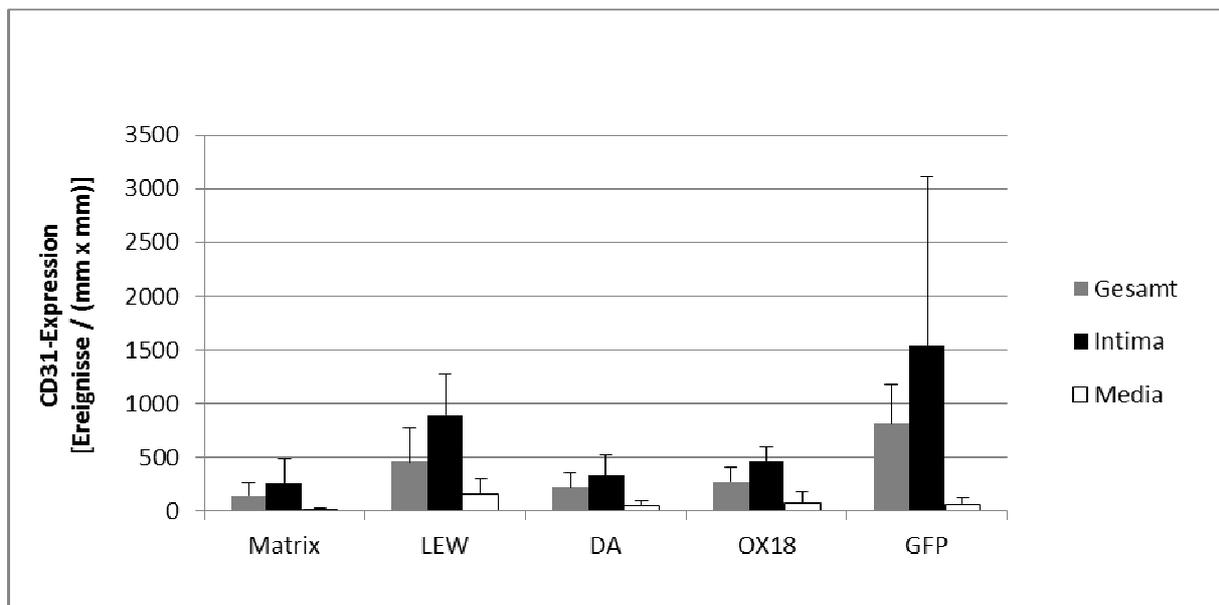


Abbildung 13: Computergestützte Quantifizierung CD31(+) Zellen in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

In den unbesiedelten Matrixstücke sind vier Wochen nach Implantation CD31(+) Zellen nachweisbar. Matrices, syngen -, allogene - und mit transduzierten RAEC besiedelte Gefäßstücke weisen keine signifikant unterschiedlichen CD31 Expressionen in den Intimae auf, $p > 0,05$. In allen Gefäßersatzstücken stammt der größte Anteil der gesamten CD31-Expression aus Zellen der Intima. Matrix $n=6$, LEW $n=6$, DA $n=5$, OX18 $n=4$, GFP $n=5$

Da die Endothelzellen Hauptträger der antigenen Eigenschaften sind, muss davon ausgegangen werden, dass eine Vergleichbarkeit der Immunogenität verschiedener Gefäßersatzstücke nur dann möglich ist, wenn man von gleichen Mengen an Endothelzellen im Gefäßersatzstück ausgehen kann. Geht man von gleicher Dichte der CD31-Oberflächenexpression auf den verschiedenen Zelltypen aus, so könnten unterschiedlich starke Immunreaktionen auf unterschiedliche Endothelzellichten in den Gefäßersatzstücken zurückzuführen sein. Um eine quantitative Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde das CD31-Signal der mit LEW-Endothelzellen besiedelten Gefäßersatzstücke als Referenzwert genommen, da diese Gefäße am ehesten der physiologischen Gefäßsituation entsprechen. Alle anderen spezifischen Marker-Signale wurden dazu relativ in Bezug gesetzt und ein Korrekturfaktor ermittelt, der angab um das Wievielfache sich die Zellzahlen im Transplantat unterschieden. Dieser Korrekturfaktor wurde auf alle anderen gemessenen Parameter angewandt, um eine Standardisierbarkeit zu gewährleisten. Gemessen wurde allerdings nicht die absolute Zellzahl, sondern eine Anzahl gemessener Farbstoffsignale. Es wird davon ausgegangen, dass die Intensität dieser Farbstoffsignale (Ereignisse) proportional zur Zahl der detektierten Moleküle ist.

In entsprechenden Isotyp-Kontrollen (MOPC-Antikörper) zeigten sich in allen Präparaten nach der Explantation vernachlässigbar geringe Signalstärken im Bereich der Intima und Media (Daten nicht gezeigt). Das gilt für alle immunhistochemisch aufgearbeiteten Gewebeschnitte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei allen Transplantatgruppen und allen Färbungen mit den Sekundärantikörpern quantitativ kaum falsch erhöhte Signale durch unspezifische Bindungen entstanden. Eine Verfälschung der Messergebnisse durch unspezifische Bindungen konnte somit ausgeschlossen werden. Das ließ sich auch mit Hilfe der computerassistierten Bildmorphometrie bestätigen (Daten nicht abgebildet).

4.2.2.2 Nachweis der MHC Klasse I

Als weiteres phänotypisches Merkmal der Zellpopulationen in den Gefäßersatzstücken wurde die Expression des MHC-I-Proteins quantifiziert.

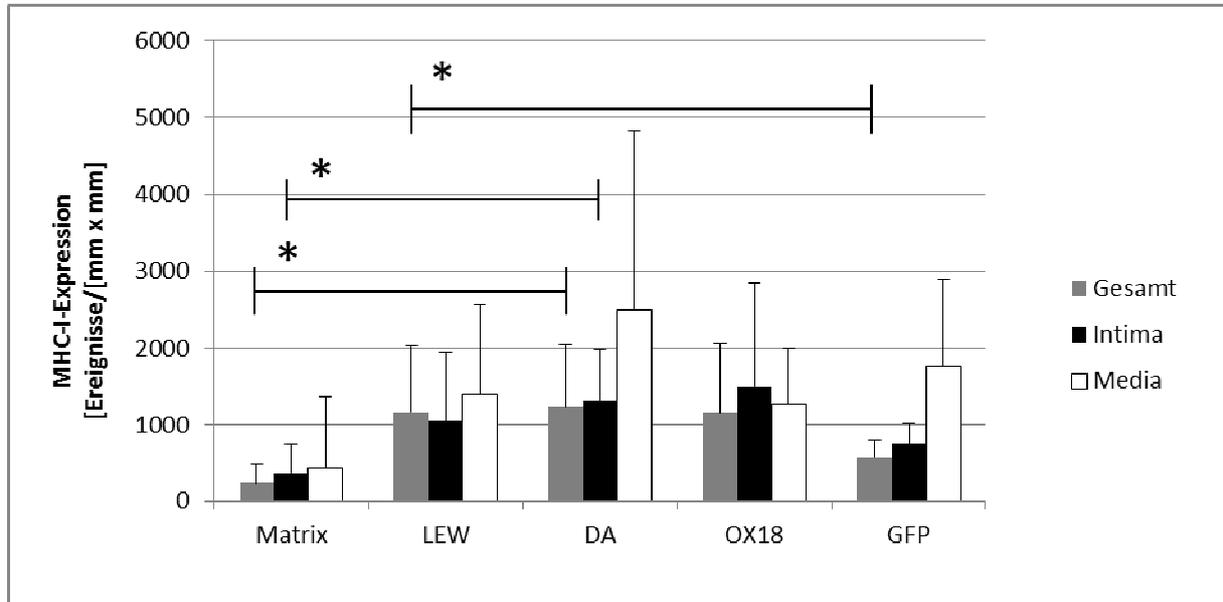


Abbildung 14: Computergestützte Quantifizierung der MHC-I-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

Unter Berücksichtigung des oben genannten Korrekturfaktors zeigten sich bei allen besiedelten Gefäßen tendenziell höhere Werte als bei den Matriximplantaten. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der MHC-I-Expressionsdichte zeigte sich in Matrices gegenüber allogenen (DA) besiedelten Gefäßersatzstücken, sowohl im Bereich der Intima, als auch hinsichtlich der Gesamtsignaldichte aus Intima und Media.

Aus ungeklärter Ursache zeigten die OX18-Zellen vier Wochen nach Implantation keine verringerte MHC-I-Oberflächenexpression mehr. Lediglich GFP-Zellen wiesen, aus allen Wandschichten summiert, ein signifikant reduziertes Expressionslevel gegenüber den syngen (LEW) besiedelten Gefäßersatzstücken auf, ($p = 0,031$). Matrix $n=6$, LEW $n=6$, DA $n=6$, OX18 $n=4$, GFP $n=5$

4.2.2.3 Nachweis der Leukozyteninfiltration durch Nachweis von CD45

Abbildung 15 stellt die durchschnittliche Stärke der CD45-Expression in den verschiedenen Transplantatgruppen dar. Da es sich bei CD45 um einen Marker handelt, der auf allen Leukozyten exprimiert ist, lässt sich somit ein guter Überblick gewinnen, wie ausgeprägt die Infiltration mit potentiell immunogenen Zellen innerhalb der verschiedenen Transplantatgruppen ist. Die Zusammensetzungen der Infiltrate bezüglich der einzelnen Leukozytensubtypen werden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die für eine leukozytäre Infiltration sprechende CD45 Signaldichte in Transplantaten mit transduzierten RAEC und in unbesiedelt transplantierten Matrices war mit der Signaldichte in syngen (LEW-RAEC) besiedelten Transplantaten vergleichbar. Eine geringere CD45-Signaldichte zeigte sich überraschenderweise in allogenen (DA) besiedelten Transplantatstücken. Diese weist sowohl zu Transplantaten mit transduzierten RAEC als auch zu unbesiedelt transplantierten Matrices einige signifikante bis hoch-signifikante Unterschiede auf.

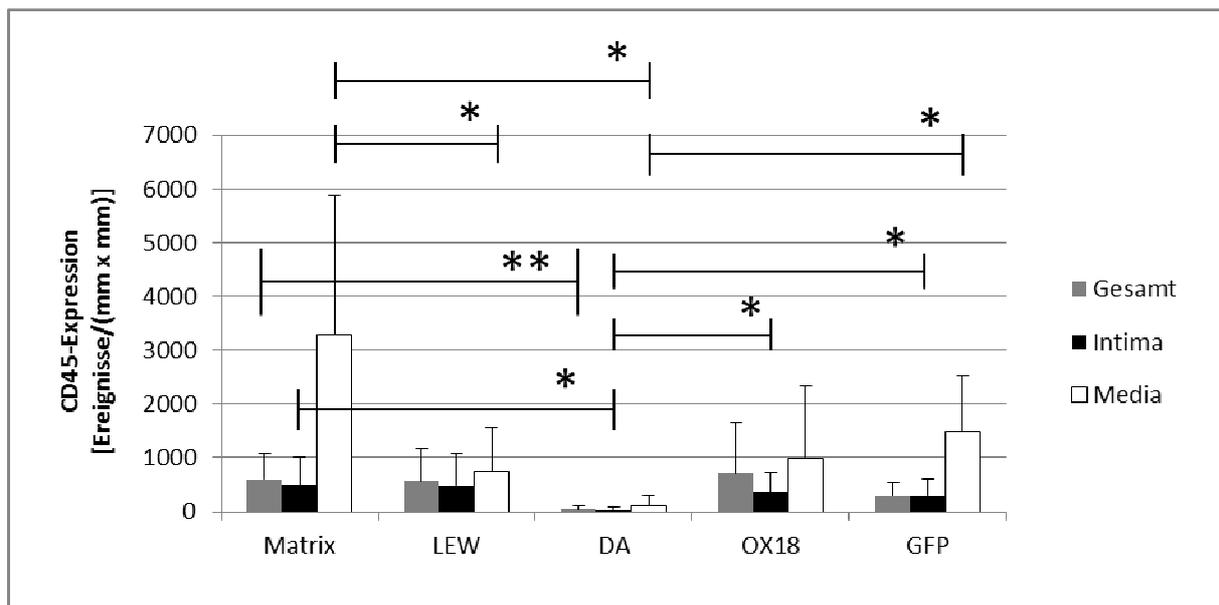


Abbildung 15: Computergestützte Quantifizierung der CD45-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

Die mit transduzierten RAEC besiedelten Gefäßexplantate und die unbesiedelt transplantierten Matrices wiesen in den Intimae signifikant höhere CD45 Signaldichten auf als die Intimae der mit allogenen RAEC (DA) besiedelten Gefäßstücke. Die Gesamtsignaldichte in Intimae und Mediae der Matrices war hochsignifikant stärker als in allogenen besiedelten Transplantaten, $p < 0.01^{**}$. Zwischen syngen (LEW) und allogenen (DA) besiedelten Explantaten gab es zum Zeitpunkt der Explantation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CD45-Signaldichte. Ein niedriges CD45-Expressionsniveau

zeigte sich in den Schichten der allogenen besiedelten Gefäßexplantate. Die höchste Dichte CD45(+) Zellen wurde in der Tunica-Media-äquivalenten Schicht der Matrices gemessen. Diese war signifikant höher, als in den Mediae syngen besiedelter Gefäße. Gefäßersatzstücke mit transduzierten RAEC wiesen gegenüber mit syngen RAEC besiedelten Transplantaten vergleichbare CD45-Signaldichten auf. Matrix n=6, LEW n=6, DA n=4, OX18 n=4, GFP n=5.

4.2.2.4 Nachweis des NK-Zell-spezifischen Markers NKRP1

Im Hinblick auf die Immunogenität der in ihrer MHC-I-Oberflächenexpression veränderten Zellen sind NKRP1(+) Zellen von besonderer Bedeutung. Den größten Anteil NKRP1(+) Zellen machen NK-Zellen aus. Erniedrigte MHC-I-Expressionlevel sind ein möglicher Aktivierungsreiz, der NK-Zellen zur Lyse der MHC-I- armen Zellen anregt. Transplantatstücke mit transduzierten Zellen, mit syngen Zellen und unbesiedelte Matrices zeigten 4 Wochen nach Implantation eine vergleichbare, basale Infiltration mit NKRP1(+)-Zellen. Zwischen den gezeigten Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede der NKRP1-Expression feststellen (Abbildung 16).

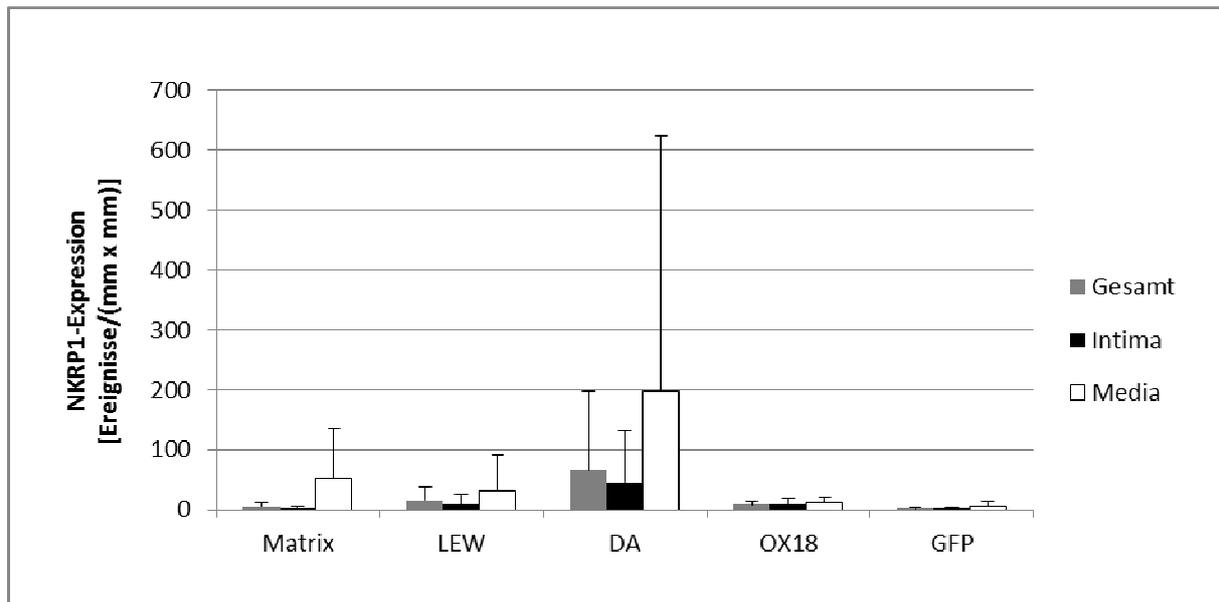


Abbildung 16: Computergestützte Quantifizierung der NKRP1-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

Transplantate mit transduzierten RAEC wiesen keine signifikant stärkere NK-Zell-Infiltration gegenüber Matrices bzw. den mit syngen LEW-RAEC besiedelten Gefäßersatzstücken auf ($p > 0,05$). Matrix n=6, LEW n=6, DA n=6, OX18 n=4, GFP n=5

4.2.2.5 Nachweis der TCR-Expression im Gefäßtransplantat

Das vom OX18-Antikörper detektierte Molekül in Ratten (=RT1A) entspricht beim Menschen dem MHC-I-Molekül. Die Reduktion der RT1A-Oberflächenexpression sollte vor allem der Verminderung der Erkennung fremder Peptide durch Empfänger-T-Zellen dienen. Da T-Zellen eine Schlüsselrolle bei Abstoßungsreaktionen haben, ist die Bestimmung der T-Zell-Infiltration von entscheidender Bedeutung. Geringe T-Zell-Infiltration könnte ein Zeichen verringerter Immunogenität und Abstoßungstendenz gegenüber den Gefäßkonstrukten sein. Die Bestimmung des T-Zell-Rezeptor-Signals (TCR-Signal) wird als proportional zur T-Zell-Infiltration gewertet und gibt somit Hinweise auf die immunologische Verträglichkeit der Implantate gegenüber der zellulären Abwehrkomponente des Empfängerorganismus. Die allogenen DA-RAEC riefen die stärkste T-Zell-Infiltration hervor. Obwohl nach der Explantation für die OX18-RAEC keine Verringerung der RT1A-Oberflächenexpression mehr nachweisbar war, zeigten die Gefäße mit diesen Zellen zusammen mit den zellarmen Matrixstücken die durchschnittlich niedrigste T-Zell-Infiltration. In der Intima der GFP-Gefäße, der Schicht mit der höchsten CD31-Signaldichte (Abbildung 13), zeigten sich geringere T-Zell-Infiltrate als bei den Gefäßen mit syngenen LEW-RAEC. Für die unterschiedlichen TCR-Signaldichten aller Transplantatgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen ($p > 0,05$) (Abbildung 17).

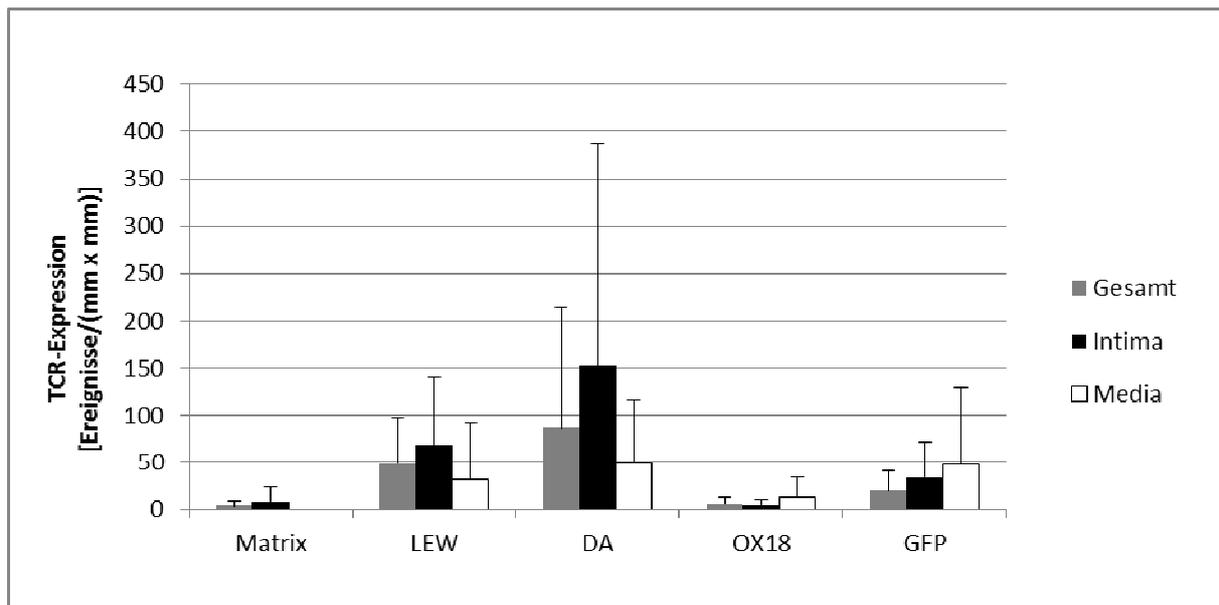


Abbildung 17: Computergestützte Quantifizierung der TCR-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

Obwohl die Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression der transduzierten RAEC unmittelbar nach der Explantation nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 14), schienen die Gefäßstücke mit transduzierten RAEC (OX18 u. GFP) gegenüber syngen (LEW) besiedelten Transplantaten und gegenüber unbesiedelt transplantierten Matrices hinsichtlich der Reaktion TCR(+) Zellen vier Wochen nach Transplantation vergleichbar immunogen zu sein. Matrix n=5, LEW n=6, DA n=6, OX18 n=4, GFP n=4

4.2.2.6 Nachweis von APC-Infiltraten durch Bestimmung der ED-1-Expression

Analog zu den vorher beschriebenen Leukozytentypen sollte mit diesem Marker die Infiltration durch Makrophagen und Monozyten beschrieben werden um unspezifische Immunreaktionen des angeborenen Immunsystems charakterisieren zu können. Die Infiltration durch Makrophagen und Monozyten betraf für alle Gefäßtypen die Media stärker als die Intima (Abbildung 18). Für diesen Marker zeigten sich innerhalb aller Gruppen vergleichbare Expressionsniveaus. Nur im Vergleich zwischen Matrices und GFP-besiedelten Gefäßstücken ließen sich signifikant unterschiedliche ED1-Expressionen feststellen, was vor allem die Tunicae mediae betraf. In den mit transduzierten RAEC besiedelten Intimae zeigten sich im Vergleich mit allogenen besiedelten Transplantaten (DA-RAEC) keine signifikanten Unterschiede der ED1-Expressionen, ($p > 0,3$).

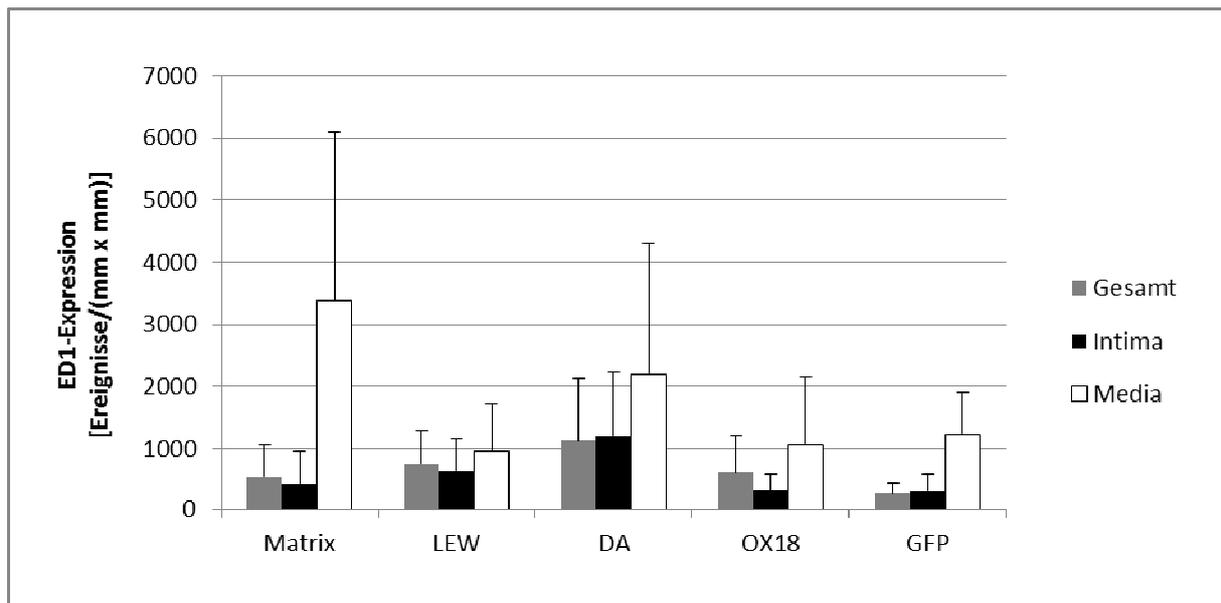


Abbildung 18: Computergestützte Quantifizierung der ED1-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation

Auch hier zeigten sich in Gefäßstücken mit transduzierten RAEC APC-spezifische Signaldichten, die quantitativ mit denen vergleichbar waren, die in Gefäßstücken mit untransduzierten RAEC gefunden wurden. Die APC-spezifischen Signale in der Media-äquivalenten Schicht der Matrices waren tendenziell höher als die in besiedelten Gefäßersatzstücken. Matrix $n=5$, LEW $n=6$, DA $n=6$, OX18 $n=4$, GFP $n=5$

4.2.2.7 Immunhistochemische Auswertungen in Fotoformat

Anhand der folgenden Bildtabellen mit repräsentativen Aufnahmen sollen die immunologischen Reaktionen aller untersuchten Transplantatgruppen visualisiert werden. Beurteilt wurden bei den immunhistochemisch aufgearbeiteten Gewebeschnitten nur die Intima und die Media, da innerhalb der Adventitia durch mechanische Manipulation während der Implantation Störsignale unklarer Quantität zur Infiltration immunkompetenter Zellen und somit möglicherweise zu falsch positiven Signalen geführt hätten. Mit Hilfe computergestützter Bildmorphometrie wurde zunächst ermittelt, wie stark das endothelzellspezifische CD31-Signal innerhalb der Transplantate mit verschiedenen zellulären Komponenten war. Diese Werte geben Auskunft über die Menge der im Transplantat enthaltenen Endothelzellen, der hinsichtlich immunologischer Reaktionen relevantesten Komponente der Gefäßersatzstücke. In Gefäßersatzstücken, die aus einer zellfrei implantierten Bindegewebsmatrix bestanden, zeigte sich, dass 4 Wochen nach Implantation in dem Bereich der histologischen Schnittebene eine Intima aus Endothelzellen nachgewachsen war. Die Lymphozytensignale (CD45 und TCR), das NK-Zell-Signal (NKRP1) sowie das Monozyten-/Makrophagen-Signal (ED1) zeigen in den explantierten Matrices im Vergleich zum Eigengewebe lichtmikroskopisch vergleichbare Signalstärken (siehe Tabelle 12).

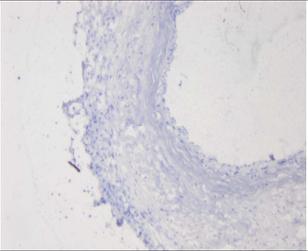
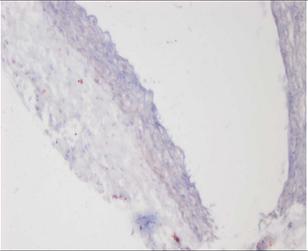
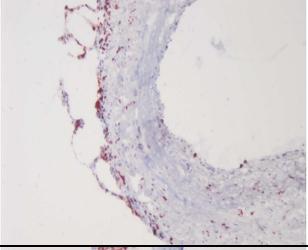
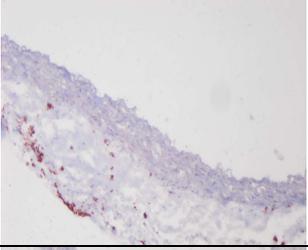
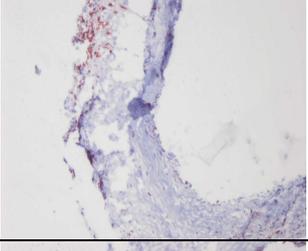
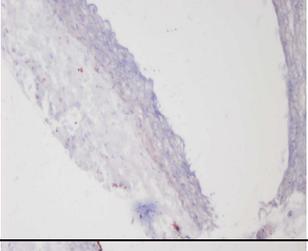
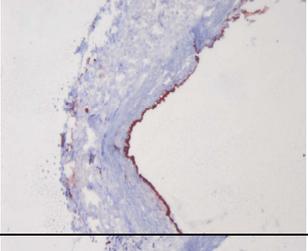
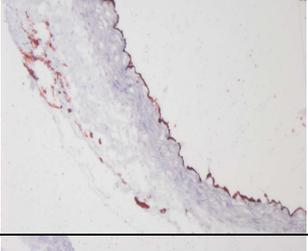
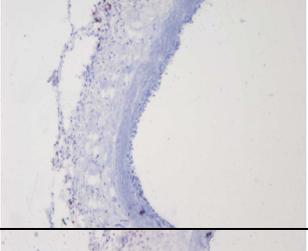
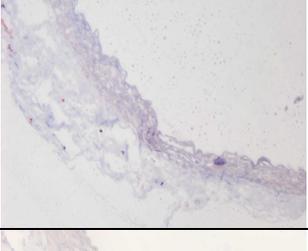
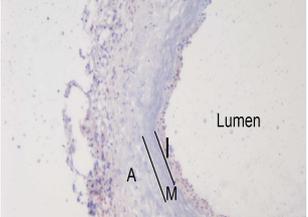
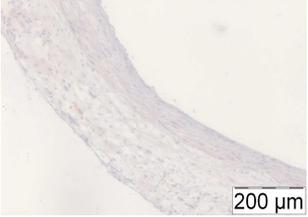
Marker	Matrix	Eigengewebe
TCR		
ED1		
CD45		
CD31		
NKRP1		
MOPC		

Tabelle 12: Immunhistochemischer Bildvergleich Matrix vs. Eigengewebe

Die repräsentativen Färbungen zeigen in der Gegenüberstellung von Matrix und Eigengewebe vergleichbar starke Infiltrate aller spezifischen Marker. Auch in der unbesiedelten Matrix ließ sich nach Explantation eingewachsenes Endothel nachweisen. In der Abbildung für die MOPC-Kontroll-Färbung des Matrixfotos ist beispielhaft die Schichtenanordnung benannt. I: Intima, M: Media, A: Adventitia

In Tabelle 13 werden immunhistochemische Bilder von Gefäßtransplantaten besiedelt mit syngenen Endothelzellen und allogenen RAEC verglichen. Die Bezeichnung LEW und DA bezieht sich in der Tabelle auf die Herkunft der in den Gefäßtransplantaten enthaltenen RAEC. Im verwendeten Transplantationsmodell waren alle Empfängertiere vom Stamm Lewis (LEW). Die LEW-Präparate zeigten somit den Zustand der Präparate 4 Wochen nach syngener Transplantation. Die DA-Präparate zeigten den Zustand allogener Transplantate nach vierwöchigem Verbleib im Empfängertier. Betrachtet man zunächst wieder die CD31-Färbung zum Nachweis von Endothelzellen, so fällt auf, dass im gezeigten LEW-Gefäß eine deutlich ausgeprägte und dichtere Intimaauskleidung besteht. Bezogen auf Intima und Media zeigten sich in allogenen DA-Gefäßen bei TCR-Färbungen geringfügig stärkere Immunreaktionen und bei ED1-Färbungen deutlich stärkere Immunreaktionen, im Vergleich zu den syngenen LEW-Transplantaten. Die CD45- und die NKRP1-Färbungen zeigen deutliche Signale in den LEW-Präparaten, jedoch überwiegend im Bereich der Adventitia.

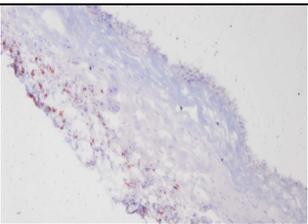
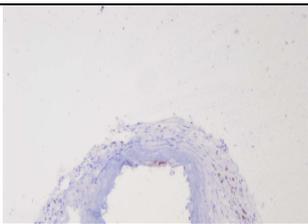
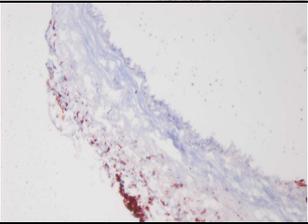
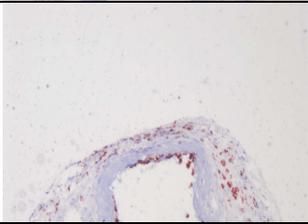
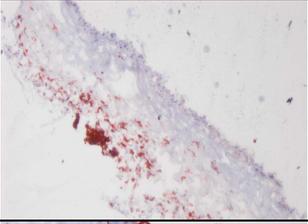
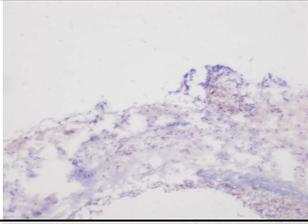
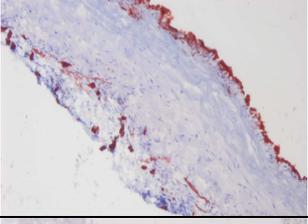
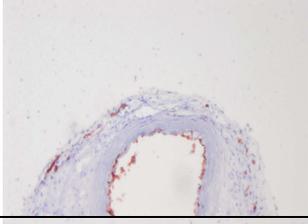
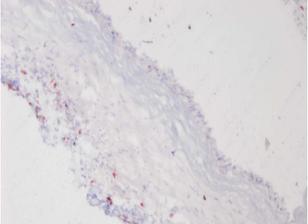
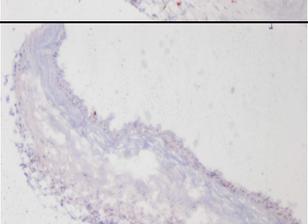
Marker	LEW-RAEC	DA-RAEC
TCR		
ED1		
CD45		
CD31		
NKRP1		
MOPC		

Tabelle 13: Immunhistochemischer Bildvergleich: LEW-RAEC vs. DA-RAEC

Trotz einer weniger dichten Endothelzellschicht in der Intima allogener besiedelter Transplantate, zeigte sich hier ein stärkeres Infiltrat mit ED1(+) Zellen, bei ansonsten ähnlicher Morphologie. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Bildmorphometrie (Abbildung 16) zeigt sich im Vergleich syngener und allogener RAEC keine signifikant unterschiedliche NKRP1-Infiltration. Trotz fehlender Signifikanz bei den bildmorphometrischen Messungen der TCR- und ED1-Infiltration (Abbildungen 17 und 18) erscheinen die Infiltrate in den Intimae der abgebildeten Präparate für beide Marker in allogenen besiedelten Gewebeschnitten (DA-RAEC) stärker, als in den syngenen besiedelten (LEW-RAEC).

Tabelle 14 vergleicht Transplantate mit den zuvor beschriebenen gentechnisch veränderten DA-Zellen. Die CD31-Färbung wies in beiden Gefäßpräparaten konfluente Intimaauskleidungen mit Endothelzellen nach. In allen gezeigten Präparaten wird deutlich, dass der vierwöchige Verbleib im Empfängertier zur deutlichen Ausprägung einer Neointima mit luminaler Einengung geführt hat. Nach der TCR-Färbung zeigten sich im GFP-Präparat schwächere Signale in der Intima und Media. In OX18-Transplantaten zeigte sich kein wesentliches TCR-Signal. Der Monozyten- und Makrophagen-Marker ED1 war in beiden Präparaten deutlich in der Media nachweisbar. In der Intima der GFP-Gefäßstücke war ED1 deutlich, in OX18-Transplantaten nur in geringem Maß nachweisbar.

Ähnliche Verhältnisse zeigten sich beim Leukozytenmarker CD45. NKRP1-Signale waren in beiden Präparaten in Intima und Media kaum nachweisbar. Gleiches galt, wie schon zuvor, für die Isotypkontrolle MOPC.

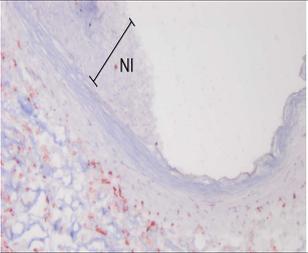
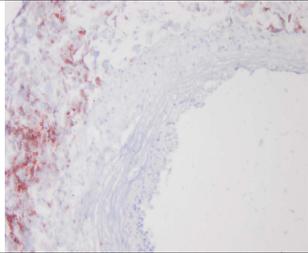
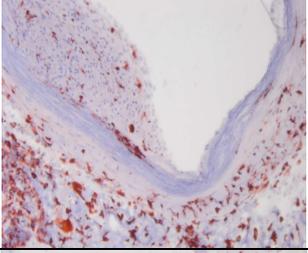
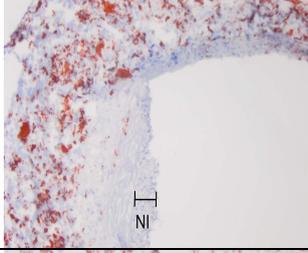
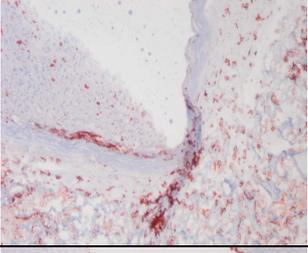
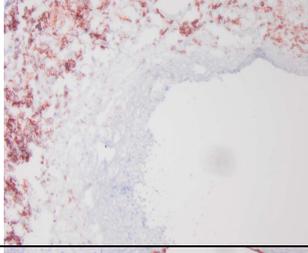
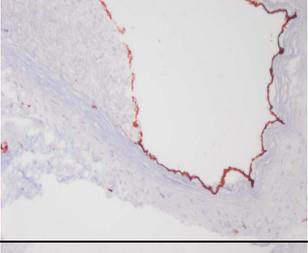
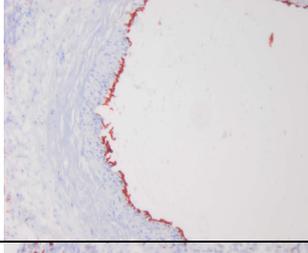
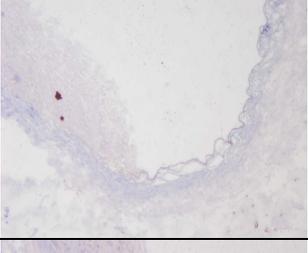
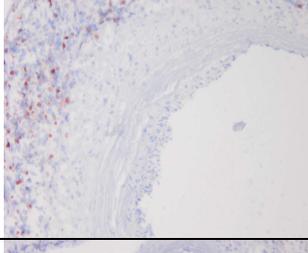
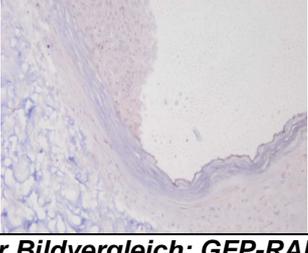
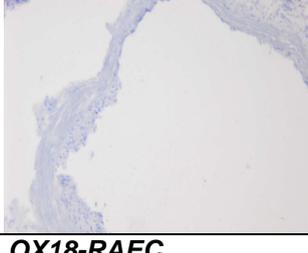
Marker	GFP	OX 18
TCR		
ED1		
CD45		
CD31		
NKRP1		
MOPC		

Tabelle 14: Immunhistochemischer Bildvergleich: GFP-RAEC vs. OX18-RAEC

Vier Wochen nach Explantation zeigte sich in Gefäßschnitten der GFP-Gruppe eine deutliche Neointima (NI: Neointima, siehe TCR-Färbung), in der OX18-Gruppe war diese deutlich geringer ausgeprägt, (siehe ED1-Färbung). Die inflammatorischen Infiltrate waren in Intima und Media beider Transplantatgruppen nur schwach ausgeprägt.

4.2.3 Nachweis von Inflammations- und Abstoßungsmarkern auf mRNA-Expressionsebene

Die besiedelten Gefäße wurden vier Wochen nach Implantation aus dem Transplantat-empfänger entfernt und Teile der Gefäßersatzstücke mittels PCR-Analyse auf die folgenden Parameter untersucht. CD3, IFN γ und IP 10 dienten der Bestimmung von Entzündungsreaktionen. Tissue factor und eNOS wurden zur Charakterisierung des Funktionszustands des Endothels in den Gefäßersatzstücken herangezogen. Anders als bei den immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich besonders hohe T-Zell-spezifische Infiltrationen bei den transduzierten Zellen (siehe Abbildung 19a). Diese lagen sogar über den Werten allogener untransduzierter RAEC. IFN γ ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin und gibt Auskunft über den Umfang der Inflammation zum Zeitpunkt der Explantation. Die Werte der transduzierten Zellen und die der allogenen RAEC lagen deutlich über denen syngener RAEC (Abbildung 19b). Das Chemokin IP 10 (CXCL10) ist Ligand eines Chemokinrezeptors (CXCR3), der v.a. auf aktivierten NK-Zellen, Th1-Helferzellen und Endothelzellen zu finden ist und eine Rolle bei zellulären Immunreaktionen spielt. Dieser Marker sollte somit Auskunft über die Stimulation der genannten immunkompetenten Zellen in den Gefäßstücken geben. Hier zeigten die Gefäße, die transduzierte Zellen enthielten, ein Expressionsniveau, dass mit denen, die syngene Zellen enthalten, vergleichbar war. Die allogenen besiedelten Gefäßstücke zeigten in der Tendenz höhere Werte, jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 19c).

Die Bestimmung der Marker für funktionsrelevante Gene der RAEC zeigten ähnliche Ergebnisse. Die eNOS ist in gesundem Endothel konstitutiv exprimiert und dient der Produktion von vasodilatatorisch wirksamem Stickstoffmonoxid. Die Bestimmung dieses Parameters gibt demnach Auskunft über die Funktionsfähigkeit des Endothels hinsichtlich der Gefäßweiterregulation. Hier fielen wieder die transduzierten Zellen durch erhöhte Werte gegenüber syngenen und allogenen Zellen auf (Abbildung 20a). Tissue factor spielt eine Rolle bei der Blutgerinnung, sowie bei der Zytokin-vermittelten Angiogenese und Apoptose von RAEC. Dieser Parameter sollte Auskunft über den immunologisch bedingten Reizzustand geben, dem die RAEC durch leukozytäre Zytokinsekretion unterlagen. Das Ergebnis entspricht dem der

eNOS Werte. Die Werte transduzierter Zellen lagen über dem Niveau allogener RAEC. In Transplantaten mit OX-18-RAEC zeigten sich die höchsten Werte (Abbildung 20b).

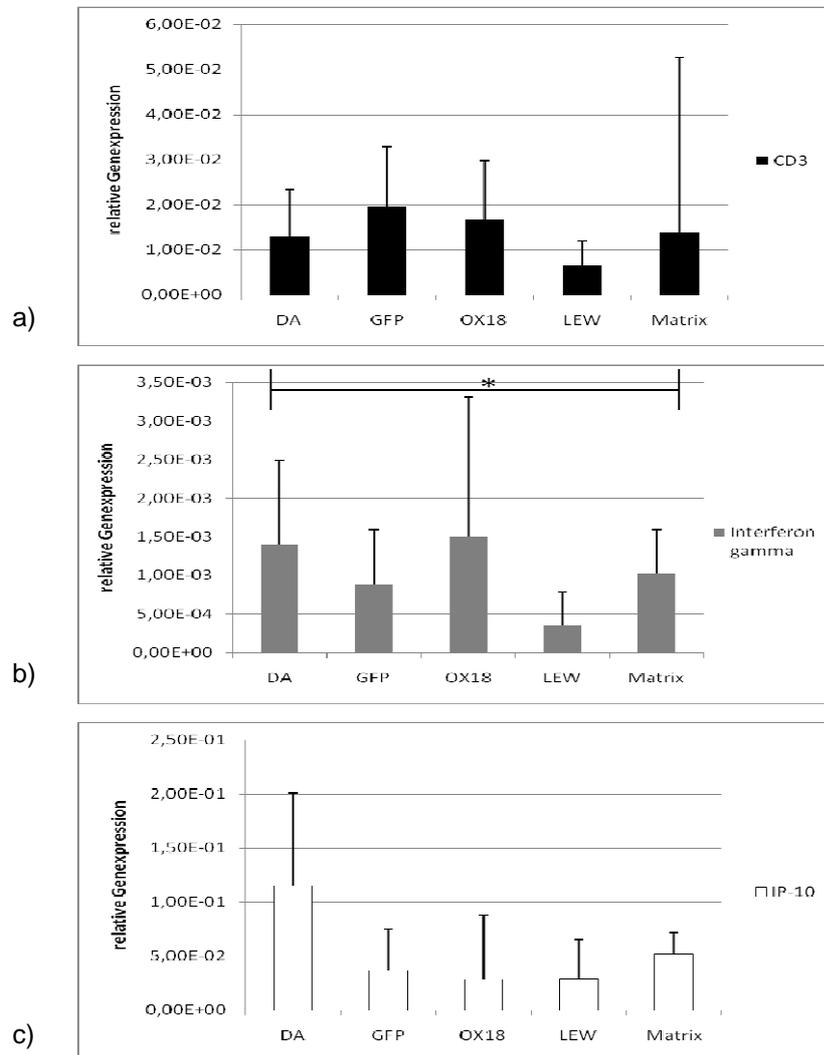


Abbildung 19: Nachweis inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation mittels PCR

Dargestellt ist die relative Genexpression inflammationsabhängiger Indikatorgene gegenüber der Expression des „housekeeping genes“ (β -actin). Syngene RAEC zeigten die geringste Expression der untersuchten Gene.

b) Die entzündungsabhängigen Signale allogener RAEC waren deutlich stärker und signifikant höher als in unbesiedelten Matrices. Die relativen Genexpressionen in transduzierten RAEC sind mit denen allogener Zellen vergleichbar.

a und c) Sowohl bei der CD3-Expression als auch bei der IP-10-Expression gab es zum Messzeitpunkt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Transplantatgruppen.

(**CD3**: DA n=5, GFP: n=6, OX18: n=6, LEW: n=4, **IFN γ (Interferon gamma)**: DA: n=5, GFP: n=6, OX18: n=6, LEW: n=4, **IP 10**: DA: n=5, GFP: n=6, OX18: n=6, LEW: n=4)

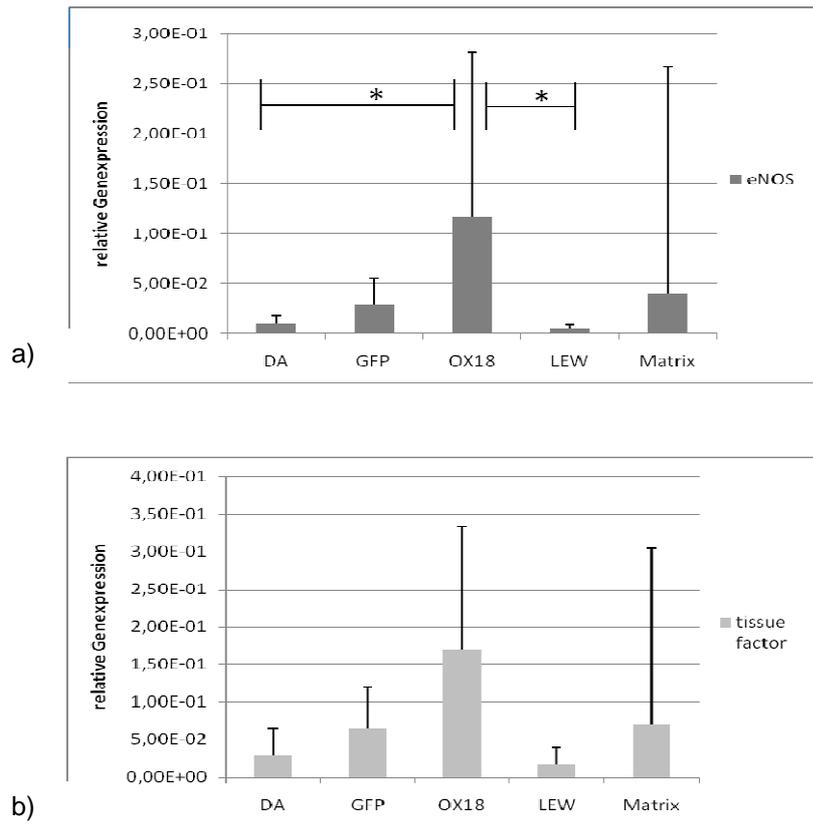


Abbildung 20: Quantifizierung der mRNA-Expression funktionsrelevanter Gene in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation mittels PCR

Dargestellt ist die relative Genexpression funktionsrelevanter Indikatorgene gegenüber der Expression des „housekeeping genes“ (β -actin).

a) OX18(+) RAEC zeigen ein signifikant höheres Genexpressionsniveau als untransduzierte RAEC. Syngene RAEC zeigen eine als basal zu bewertende Expression.

b) Die Genexpression von tissue factor ist in transduzierten RAEC vergleichbar mit der in Matrices und liegt (nicht signifikant) höher als in nicht-transduzierten RAEC.

(eNOS: DA: n=5, GFP: n=6, OX18: n=6, LEW: n=4, tissue factor: DA: n=5, GFP: n=6, OX18: n=6, LEW: n=4)

5 Diskussion

5.1 Isolation und Charakterisierung von NK-Zellen

In der Literatur sind verschiedene Organe mit besonders hoher NK-Zell-Konzentration beschrieben. Mit speziesabhängigen Unterschieden werden vor allem Leber, Knochenmark, Milz und Lymphknoten als NK-Zell-reiche Organe benannt und sind damit potentiell als besonders geeignet für Isolationen anzusehen [24]. Milzen stellen im Vergleich zu anderen Organen, wie z.B. Lymphknoten eine gute Quelle zur Isolation von NKRP1(+)-Zellen aus Ratten dar. Wie die durchschnittliche Versechsfachung der NKRP1(+)-Zell-Konzentration, von ca. 12% Ausgangswert auf ca. 74% nach der Isolation zeigt, konnte ein Protokoll im Rattenmodell erfolgreich etabliert werden. Die Qualität und Quantität der isolierten Zellen machte die Durchführung von Zytotoxizitätstest möglich. Die absolute Zellzahl der isolierten NK-Zellen schwankte zwischen $2,2 \times 10^6$ und 10×10^6 aus jeweils 2 Milzen pro Isolation. Andere Arbeitsgruppen berichten von NK-Zell-Isolationen aus Knochenmark mit >98% NKR-P1⁺ Zellen [25], benennen aber weder den jeweiligen durchflusszytometrisch bestimmten Anteil NKR-P1⁺TCR⁺ NKT-Zellen noch die absoluten Zahlen der isolierten Zellen. Per Verweis auf Smeltz et al., 1999 wird der NKT-Zell-Anteil mit 1-2% beziffert. Die Arbeitsgruppe um Gao et al. beschreibt den Anteil von aus Rattenlebern isolierten NKRP1A⁺CD3⁻ Zellen mit 25-35% und den Anteil NKRP1A⁺CD3⁺ Zellen mit <10% der isolierten Lymphozyten [26]. Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Isolationen aus Rattenmilzen betrug dieser ca. 10% (Abbildung 6).

Aufgrund der gewonnenen Daten der Durchflusszytometrie, sowie den Ergebnissen der Zytotoxizitätstests mit der Tumorzelllinie YAC-1, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um lysefähige Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) handelt. Die YAC-1-Zellen sollten als Positivkontrolle dienen, da sie nur durch NK-Zellen lysiert werden und mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Verunreinigung der NKRP1(+) Isolate mit NKRP1⁺TCR⁺ NKT-Zellen gezeigt werden konnte (Abbildung 6). Nur bei vollständiger Lyse der YAC-1-Zellen bei einer NK:RAEC-Ratio von 10:1 wurden die Isolate für ausreichend rein befunden und die Resultate statistisch verwertet.

5.2 Immunogenität MHC-I-armer RAEC in vitro

Das Bild von der Rolle der NK-Zellen bei Abstoßungsreaktionen hat sich im Laufe der letzten Jahre gewandelt. Heidecke et al. fanden in den Achtziger Jahren keine Hinweise einer Beteiligung von NK-Zellen bei der Abstoßung allogener Transplantate [41]. In der aktuellen Fachliteratur wird gegenteiliges beschrieben. Kurz nach Nieren- und Herztransplantationen konnte eine verstärkte NK-Zell-Infiltration der Transplantate nachgewiesen werden [27-29]. Watson et al. beschreiben eine verstärkte IFN γ Freisetzung durch NK-Zellen nach Interaktion mit allogenen Endothelzellen. Diese bewirkt eine verstärkte MHC I- und MHC II-Expression und macht das Spenderorgan somit anfälliger für Angriffe CD8 positiver T-Zellen [30-32]. Des Weiteren fördern NK-Zellen die Proliferation und die Effektor-Funktionen alloreaktiver T-Zellen nach Herztransplantationen [33]. Kim et al. gelang es eine über den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D vermittelte Beteiligung von NK-Zellen bei der Abstoßung allogener Herztransplantate nachzuweisen [34]. Auch Petersson et al. schreiben NK-Zellen eine aktive Rolle bei der Abstoßung allogener Organe zu [29]. Somit stehen valide Daten zur Verfügung, die belegen, dass NK-Zellen sowohl durch Sekretion von Zytokinen, z.B. IP10 (CXCL10) [35], als auch durch Ihre Fähigkeit zur Zellyse zur Abstoßung allogener Organtransplantate beitragen können [29]. NK-Zellen erkennen u.a., entsprechend der „Missing self“-Hypothese von Klas Kärre, veränderte oder fehlende MHC-I-Moleküle (entsprechend RT1A-Molekülen in Ratten).

Im Vergleich mit den YAC-1-Zellen zeigte sich in Zytotoxizitätstests, dass untransduzierte Ratten-Aorten-Endothelzellen (RAEC) einer zur NK:RAEC-Ratio proportionalen Lyse ausgesetzt waren, welche im Ausmaß als basal bezeichnet werden kann (Abbildung 4). Es zeigten sich basale Lyseraten bei syngenen und allogenen Wildtyp-RAEC, wobei syngene LEW-RAEC eine stärkere spezifische Lyse als allogene DA-RAEC aufwiesen (Abbildung 10). Diese unterschiedlichen Lyseraten sind jedoch nicht signifikant.

In der Positivkontrolle der in vitro Versuche zeigte sich eine vollständige Lyse der YAC-1-Zellen, weshalb von der Verwendung intakter NK-Zell-Isolate ausgegangen werden konnte.

Obwohl die verwendeten untransduzierten DA-RAEC allogene zu den NK-Zellen waren, aber keine quantitativ veränderte MHC-I-Expression besaßen, zeigte sich, dass sie in den o.g. in vitro-Versuchen keine NK-Zell-Aktivierung provozierten. Zu der in der Literatur beschriebenen Erkennung von allogenen Transplantaten [27-32] sind möglicherweise weitere zelluläre bzw. humorale Faktoren erforderlich. Die zuvor beschriebenen Zytotoxizitätstests basieren ausschließlich auf der direkten Interaktion von NK-Zellen und RAEC ohne die Einflüsse eines kompletten Immunsystems.

Die transduzierten RAEC würden, laut Missing-Self-Hypothese, eine NK-Zell-Aktivierung provozieren. Allerdings zeigten sich sowohl gegenüber untransduzierten als auch transduzierten RAEC nur basale Lyseraten. Es zeigte sich im in vitro-Versuch keine durch Transduktion und daraus resultierende Verringerung der MHC-I-Oberflächenexpression signifikant erhöhte Aktivierung von NK-Zellen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es nicht zu einer dauerhaften, kompletten MHC-I-Defizienz kam, sondern nur zur vorübergehend verringerten Oberflächenexpression. Da trotz Transduktion einige MHC-I-Moleküle zur Zelloberfläche gelangten, könnte deren Interaktion mit inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren ausreichend gewesen sein, um eine NK-Zell-Aktivierung zu verhindern. Des Weiteren könnten an der Abstoßungsreaktion in vivo evtl. weitere, vielleicht noch unbekannt, Faktoren an der Auslösung einer Abstoßungsreaktion beteiligt sein, die mit Zytotoxizitätstests nicht ausreichend simuliert werden können.

Die Erkennung allogener Zellen durch zelluläre Immunkomponenten ist eine wesentliche Aufgabe von CD8-T-Zellen, die in den verwendeten Effektorzell-Isolaten nicht enthalten sind. Deren Verhalten gegenüber den verwendeten RAEC sollten zur umfassenden Charakterisierung einer Abstoßungsreaktion ebenfalls betrachtet werden.

Somit eigneten sich die durch Transduktion veränderten RAEC für ein Transplantationsmodell in Ratten, mit dem untersucht werden konnte, ob sich die verminderte MHC-I-Oberflächenexpression günstig, im Sinne einer geringeren Fremderkennung und daraus resultierenden Abstoßung, auswirkt.

5.3 Immunogenität MHC-I-armer RAEC in vivo

Nach der isolierten Betrachtung der NK-Zell-RAEC-Interaktion in vitro sollte die Immunogenität kompletter Gefäßersatzstücke nach mehrwöchigem Verbleib in einem Empfängerorganismus beurteilt werden. Die transduzierten und untransduzierten RAEC konnten erfolgreich auf die luminalen Seite der Matrizes aufgebracht werden und bildeten dort eine konfluente und gegenüber mechanischen Belastungen, wie z.B. Scherkräften bei Durchspülung mit Flüssigkeit, stabile Gefäßauskleidung, die mikroskopisch als intakte einschichtige Endothelzellschicht erschien. Die Gefäßersatzstücke ließen sich bei subjektiv guter chirurgischer Handhabbarkeit in Ratten implantieren, so dass ein Vergleich zwischen den verschiedenen endothelialen Auskleidungen möglich wurde. Bei diesem Versuchsaufbau war, im Gegensatz zu den in vitro-Vorversuchen, nicht nur die NK-Zell-Interaktion mit den RAEC, sondern die Reaktionen des gesamten Immunsystems gegenüber allen Komponenten der Gefäßersatzstücke Gegenstand der Betrachtung. Zum einen sollte die Immunogenität transduzierter und nicht-transduzierter RAEC verglichen werden, um beurteilen zu können, ob eine MHC-I-Reduktion einen Vorteil, in Form von geringerer Transplantatstoßung, bedeutet. Des Weiteren sollte der Effekt der MHC-I-Oberflächenreduktion als Trigger für die potentielle Aktivierung von NK-Zellen genauer spezifiziert werden. Dafür wurden sowohl molekulare als auch immunhistologische Untersuchungsmethoden herangezogen, die zusammengenommen Aussagen über bestimmte immunogene Eigenschaften solcher Transplantate ermöglichen sollten.

Berücksichtigt man den immunmorphometrischen Vergleich der MHC-I-Oberflächenexpression (Abbildung 14), sowie die FACS-Daten (Tabelle 11), muss an der Nachhaltigkeit der RAEC mit verminderter MHC-I-Oberflächenexpression gezweifelt werden. Es zeigten sich in den durchgeführten in vivo Versuchen nach vierwöchigem Verbleib der Gefäßersatzstücke im Empfängertier immunmorphometrisch bezüglich der NK-Zell-Infiltration keine immunogenen Eigenschaften der Gefäßersatzstücke mit allogenen, transduzierten RAEC gegenüber denen mit syngenem, untransduzierten RAEC. Bei nach Explantation vergleichbar hoher MHC-I-Expression zeigten sich immunmorphometrisch in beiden

Transplantatgruppen vergleichbar starke NK-Zell-Infiltrate in allen Wandschichten (Abbildung 16). Auch die immunmorphometrische Quantifizierung der TCR(+) Zell-Infiltration zeigte in den Explantaten mit transduzierten OX18(+)hrGFP(+) Zellen eine mit syngen besiedelten Transplantaten vergleichbare Signalstärke (Abbildung 17). Auch im Vergleich der Infiltrationen mit Monozyten bzw. Makrophagen (Abbildung 18), zeigten sich für die Intimae innerhalb der luminal besiedelten Transplantate keine signifikanten Unterschiede. Da die MHC-I-Oberflächenexpression aller RAEC vier Wochen nach Implantation vergleichbar hoch war, darf die Frage gestellt werden, ob ein evtl. protektiver Effekt auf die Transduktion des hrGFP-Gens und daraus resultierende Exprimierung des grünen Fluoreszenzproteins eine gegenüber syngen RAEC verstärkte Infiltration mit T-Zellen und NK-Zellen verhindert hat. Sollte es einen immunprotektiven Effekt durch hrGFP gegenüber den untersuchten Zellen gegeben haben, ist jedoch nicht auszuschließen, dass hrGFP als Fremdprotein über das verbliebene MHC-I von CD8-T-Zellen, oder über MHC-II, welches von aktivierten Endothelzellen exprimiert wurde, von CD4-T-Zellen (Th1 und Th2) oder B-Zellen erkannt wurde und auf nicht erfasstem Weg eine entsprechende Rejektionskaskade in Gang setzte. Vergleicht man die Explantate mit transduzierten RAEC mit denen mit untransduzierten RAEC makroskopisch bzw. nach immunhistochemischer Präparation unter dem Mikroskop, so fällt, trotz immunmorphometrisch gleicher NK- und T-Zell-Infiltrate, vor allem bei erstgenannten Transplantaten die Tendenz zur verstärkten Bildung einer Neo-Intima sowie zur Ausprägung von Wandverdickung mit luminaler Einengung auf (Tabellen 13 und 14). Daraus ergibt sich ein erhöhter Strömungswiderstand, ein höheres Thromboserisiko und eine verringerte Gefäßweitenregulation.

Um Aussagen über Genexpressionsmuster der Zellen in den Gefäßersatzstücken treffen zu können, wurden RT-PCR-Messungen durchgeführt. Da immunhistologisch sowohl leukozytäre Infiltrate, als auch Endothelzellen in den Gefäßersatzstücken nachgewiesen werden konnten, ist eine Zuordnung der genassoziierten Signale zu bestimmten Zelltypen im Gesamtkonstrukt nicht möglich. Es zeigten sich im Vergleich der einzelnen RAEC-Gruppen funktions- und inflammationsrelevante Genexpressionmuster.

In Explantaten mit Intrabody-haltigen Zellen wurde gegenüber Explantaten mit nicht-transduzierten RAEC eine signifikant erhöhte Expression des für die

Gefäßweitenregulation relevanten eNOS-Gens nachgewiesen. Dies könnte eine Stressreaktion, z.B. auf die luminale Einengung durch inflammationsbedingte Neo-Intima-Formation sein (Abbildung 20a). Sowohl in Explantaten mit OX-18(+)hrGFP(+)-RAEC als auch in Explantaten mit hrGFP(+)-RAEC zeigte sich eine gegenüber Matrices und Explantaten mit nicht-transduzierten, allogenen RAEC (nicht signifikant) erhöhte Genexpression von Regulatoren der Gerinnung (tissue factor) (Abbildung 20b). Die Werte für das proinflammatorische Zytokin Interferon gamma lagen in den Gefäßstücken, die untransduzierte, aber allogene RAEC enthielten, signifikant höher als in den unbesiedelten Matrices (Abbildung 19b). Alle Gefäßtransplantate wiesen bezüglich der T-Zell-spezifischen CD3-Expression und der Genexpression des proinflammatorischen Chemokins IP10 (CXCL 10) vier Wochen nach Implantation vergleichbare Werte auf (Abbildungen 22a und c). Zum Messzeitpunkt gab es auf Genexpressionsebene somit durch diese Marker keinen Hinweis auf eine akute, und durch T-Zell/-NK-Zell-Interaktionen aufrecht erhaltene, Abstoßungsreaktion. Die immunmorphometrisch gezeigte vergleichbare T-Zell- und NK-Zell-Infiltration in Gefäßen mit transduzierten RAEC und mit nicht-transduzierten RAEC wurde auf molekularer Ebene eher bestätigt als widerlegt. Die RT-PCR-Daten deuten aber bezüglich der Interferon gamma-Genexpression darauf hin, dass es im Vergleich zwischen Gefäßstücken mit transduzierten und Gefäßstücken mit nicht-transduzierten RAEC eine stärkere immunologische Reaktion auf die transduzierten RAEC gab, welche gegenüber den syngenen RAEC mit veränderter Gerinnungs- und Gefäßweitenregulation reagierte. Das kann im Sinne einer akuten Abstoßungsreaktion gegenüber transduzierten RAEC interpretiert werden. Möglicherweise wird die Rejektion durch die Expression bisher noch nicht näher definierter Oberflächenmoleküle auf Grund der viralen Transduktion getriggert. Auch eine Aktivierung der Endothelzellen nach Gentransfer und die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. VCAM-1, kann nicht ausgeschlossen werden. Hierzu wären weiterführende Experimente notwendig.

Dieses Ergebnis molekulargenetischer Untersuchungen wird durch die erhobenen histologische Befunde ergänzt. Vor allem in den Gefäßstücken, die transduzierte RAEC enthalten, zeigte sich eine verstärkte Neo-Intima-Formation und somit deutliche Hinweise auf eine akute Abstoßungsreaktion. Dennoch gab es sowohl in

vitro als auch in vivo keine Beweise für eine Beteiligung von NK-Zellen an diesem Abwehrprozess.

Es muss berücksichtigt werden, dass in vivo nach vierwöchigem Verbleib der Gefäße im Empfängertier immunmorphometrisch auf den transduzierten RAEC keine verringerte MHC-I-Oberflächenexpression mehr nachweisbar war (Abbildung 14). Somit wurde den NK-Zellen des Transplantatempfängers durch die transduzierten RAEC auch kein aktivierender Reiz im Sinne der Missing-Self-Hypothese geboten. Die transduzierten RAEC und die nicht-transduzierten RAEC schienen zwar in den immunmorphometrischen und molekulargenetischen Untersuchungen in Bezug auf die NK-Zell- und T-Zell-Aktivitäten vergleichbar immunogen zu sein, es sollte aber bedacht werden, dass es sich bei den Untersuchungen um Momentaufnahmen handelte, die lediglich den Zustand nach vierwöchigem Verbleib im Empfängerorganismus zeigten. Spekulativ könnten folgende immunologische Prozesse eine Rolle bei der erhöhten Abstoßung der transduzierten RAEC geführt haben: Die transduzierten RAEC könnten eine geringere Proliferationsfähigkeit aufweisen. Evtl. lagen die transduzierten RAEC trotz des Reinigungsprozesses nicht in ausreichender Reinheit vor und wurden, unter gleichen Wachstumsbedingungen, im Wirtsorganismus von den nicht erfolgreich transduzierten RAEC überwuchert. Somit würde die luminale Endothelzellschicht einem allogenen Transplantat entsprechen. Die Folge wäre eine entsprechende akuter Abstoßungsreaktion, die bereits vor der Explantation und der folgenden phänotypischen und genotypischen Charakterisierung der Abstoßungsreaktion nahezu beendet gewesen sein könnte. Das würde sowohl die beobachtete Neointima-Formation als auch die vergleichbar hohe MHC-I-Expression transduzierter und nicht-transduzierter RAEC erklären. Bei normaler MHC-I-Oberflächenexpression ist auch die zuvor beschriebene Alloreaktivität durch NK-Zell/-T-Zell-Interaktion [27-32], die weitestgehend im Zeitraum zwischen Implantation und Explantation abgelaufen sein könnte, nicht ausschließbar. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die in vitro nachgewiesene MHC-I-Oberflächenverringering nicht dauerhaft anhielt und es auf unbekanntem Weg zu einer verstärkten MHC-I-Oberflächenexpression, z.B. durch gesteigerte MHC-I-Genexpression oder Freisetzung von intrazellulär akkumuliertem MHC I, kam und dies dann, ebenfalls zur Provokation einer akuten Abstoßung führte. Andere

Abstoßungsreaktion, z.B. über RT1B-vermittelte (RT1B entspricht dem humanen MHC-II) Signalwege sowie antikörpervermittelte Reaktionen von Phagozyten und Granulozyten über Fc-Rezeptor-Aktivierung, z.B. gegenüber eingebrachten Fremdproteinen, wären mit den durchgeführten Untersuchungen nicht genau erfassbar, waren jedoch möglicherweise beteiligt.

Auch könnte zum Beispiel eine antikörperabhängige Opsonierung der transduzierten Zellen nach Fremderkennung eine NK-Zell, Granulozyten- oder Phagozytenvermittelte Lyse über eine Fc-Rezeptor-Aktivierung in Gang gesetzt haben, die zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Untersuchung eventuell bereits abgeklungen waren. Dagegen sprechen jedoch Daten aus einer Arbeit von C. Doebis et al., welche *in vitro* eine verringerte humorale Immunreaktion gegenüber den hier verwendeten transduzierten RAEC beschrieb [20]. Jedoch scheint eine *in vitro* stabile Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression *in vivo* aus noch unklarer Ursache an Stabilität zu verlieren.

Somit erlauben die immunhistochemischen Präparate nur eine Beurteilung der immunologischen Abstoßungsmechanismen zum Zeitpunkt der Explantation. Die Abstoßungsmechanismen im Zeitraum zwischen Implantation und Explantation bleiben weitestgehend unklar.

Untersuchungen mit Organentnahmen zu anderen Zeitpunkten wären für eine Aussage zur Kinetik der Abstoßungsreaktionen unter Berücksichtigung der quantitativen und qualitativen Beiträge der einzelnen Leukozytenarten sinnvoll, waren jedoch nicht vorrangig Gegenstand dieser Arbeit.

Das Endergebnis einer akuten Abstoßungsreaktion, Neo-Intima-Formation und somit gestörten Fluss-, Gerinnungs- und Kontraktionsfähigkeit lässt die Verwendung der hier gezeigten transduzierten RAEC im Rahmen des Tissue Engineering von kleinkalibrigen Gefäßersatzstücken als ungeeignet erscheinen.

Die technische Durchführbarkeit der Herstellung von Gefäßen aus Endothelzell-besiedelten Matrices konnte jedoch gezeigt werden. Die so gewonnenen künstlichen Gefäße haben subjektiv beim Operateur den Eindruck hinterlassen, eine mit

natürlichen Gefäßen vergleichbare Materialeigenschaft, in Bezug auf die chirurgische Handhabbarkeit, aufzuweisen.

Ob die bisher nicht therapeutisch angewandte Methode der Expression eines α -MHC-I-Intrabodies je klinische Bedeutung gewinnen wird, ist bisher nicht absehbar. Es wäre jedoch interessant auch gegen andere immunologische Schlüsselmoleküle Intrabodies zu entwickeln, z.B. RT1A (MHC-II) oder Zytokinrezeptoren (z.B. IFN γ -Rezeptor) um diese hinsichtlich ihres Beitrags zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen zu untersuchen.

6 Ausblick

Bei der Gewinnung von Gefäßersatzstücken durch luminale Besiedlung von Bindegewebsmatrices mit Zellen, stellen die RAEC, ob gentechnisch verändert oder unverändert, nur eine mögliche Komponente dar.

Die in der Literatur beschriebenen immunologisch günstigen Eigenschaften von endothelialen Progenitorzellen und Stammzellen eröffnen neue Perspektiven im Rahmen des Tissue Engineering von Gefäßersatzstücken [22]. Daher beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit der Gewinnung und Evaluation verschiedener Stammzellpopulationen. Mesenchymale Stammzellen stellen eine mögliche Variante dar. Eine aus Blutgefäßen gewonnene Stammzelle aus mesenchymartigem Gewebe wurde von Tintut et al. isoliert und hinsichtlich der Verwendbarkeit bei der Konstruktion von Gefäßersatzstücken untersucht. Die Gruppe zeigte eine Differenzierung entlang osteoblastischer Zelllinien und die Expression von Oberflächenantigenen, die auf mesenchymalen Stammzellen zu finden sind, z.B. CD 29 und CD 44 [36]. Auch Nabelschnurblut und daraus gewonnene Stammzellen, sowie das Aspirat aus humanem Unterhautfett werden in der Literatur zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen beschrieben [37, 38]. Die Verwendung unterschiedlichster Schablonen, entlang derer mesenchymale Stammzellen wachsen und in deren Grenzschicht sich adäquate Zell-Polymer Adhäsion ausbildet sind ebenfalls Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [39].

Multipotente adulte Progenitorzellen (engl.: multipotent adult progenitor cells, MAPC) stellen eine weitere, vielversprechende alternative Zellquelle dar, vor allem aufgrund ihrer Differenzierbarkeit in Endothelzellen [40]. Auch hämatopoetische Stammzellen sind Gegenstand zahlreicher, ähnlicher Studien. Genetisch modifizierte Stammzellen und embryonale Stammzellen werden in Zukunft auch bei den o.g. Fragestellungen zunehmend in den Fokus der kardiovaskulären Forschung gelangen.

In der derzeit verfügbaren Fachliteratur bleiben einige Fragen unbeantwortet, z.B. ob die auf Gefäßersatzstücke aufgetragenen Zellschichten tatsächlich so fest haften, dass kein Abreißen und Fortspülen mit dem Blutfluss erfolgt, was wiederum das Risiko der Entstehung von Thrombosen und Embolien steigern könnte. Erste

Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Endothelzellen zeigten, dass einige Zeit nach Implantation von endothelbesiedelten Aortenersatzstücken in Rattenmilzen offenbar mit dem Blutstrom transportierte Zellen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

Somit müssten vor einem evtl. klinischen Einsatz zunächst noch wichtige, z.T. sicherheitsrelevante Daten, z.B. zur Frage der mechanischen Stabilität gegenüber Scherkräften durch Blutströmungen, zum Potential der malignen Entartung, zur immunologischen Verträglichkeit und zur kostenoptimierten Herstellung, gewonnen werden.

7 Literaturverzeichnis

- [0] Pratschke J, Stauch D, Kotsch K, Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation, *Transplant Int.*, 2009, 22, 859-868
- [1] Westgaard et al., The lektin like receptor KLRE1 inhibits Natural Killer Cell Cytotoxicity, *Journal of Exp. Med.*, 2003, Vol. 197
- [2] Chambers, W.H., Vujanovic, N.L., De Leo, A.B., Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-aktivated killer cells, *J. Exp. Med.*, 1989, 169
- [3] Yokoyama WM, Ryan JC, Hunter JJ et al. , cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6, [J Immunol.](#), 1991, 147(9):3229-36
- [4] American Heart Association, www.americanheart.org, 2003
- [5] Vollmar J., *Rekonstruktive Chirurgie der Arterien*, 4th Ed., Stuttgart, Georg Thieme, 1982
- [6] Loop F.D., Internal-thoracic artery grafts, biologically better coronal arteries, Editorial, *NEJM*, 1996
- [7] Edelman ER, Vascular tissue engineering-designer arteries, *Circ. Res.*, 1999, 85, 1115-7
- [8] Mamode N, Scott RN, Graft type for femoro-popliteal bypass surgery, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2001, CD001487
- [9] Greisler H.P. et al, interactions at blood/material interface, *Ann. Vasc. Surg.*, 1990, 4, 98-103
- [10] Herring MB, Endothelial cell seeding , *J Vasc Surg*, 1991, 13:731-2
- [11] Fischlein T, Zilla P, Eberl T et al., Initial clinical data on human in vitro endothelialization of vascular prostheses, *Intern Soc Applied Cardiovasc Biol*, Basel S Karger AG, 2, pp 131-8
- [12] Meinhart J., Deutsch M., Zilla P., Eight years of clinical endothelial cell transplantation. Closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts, *ASAIO J* 1997, 43, M515-521
- [13] Abbott WM, Vignati JJ, Prosthetic grafts: when are they a reasonable alternative?, *Semin Vasc Surg.*, 1995, 236-45
- [14] Weinberg, Dell; *Science*, 1986, 231: 317-400

- [15] L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J*, 1998, 12:47-56
- [16] Conte MS, Birinyi LK, Miyata T, Fallon JT, Gold HK, Whittemore AD, Mulligan RC, Efficient repopulation of denuded rabbit arteries with autologous genetically modified endothelial cells, *Circulation* 1994, 89 (5), 2161-9
- [17] Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A., Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix, *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000, (4):381-6,
- [18] Walles T, Puschmann C, Haverich A, Mertsching H., Acellular scaffold implantation- no alternative to tissue engineering *Int J Artif Organs* 2003, 26(3):225-34
- [19] Neuberger S, Cattaneo A, Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells, *Embo J.*, 1990, 9(1):p.101-8).
- [20] C. Doebis, S. Schu, J. Ladhoff, A. Busch, F. Beyer, J. Reiser, R.F. Nicosia, S. Brösel, H.-D. Volk, M. Seifert, An anti-Major Histocompatibility Complex I intrabody protects endothelial cells from an attack by immune mediators. *J Cardiovascular Research* 2006, 72:331-338
- [21] K. Kärre, NK cells, MHC class I molecules and the missing self, *Scand J Immunol.* 2002, 55(3):221-8
- [22] Low immunogenicity of endothelial derivatives from rat embryonic stem cell-like cells, Ladhoff J, Bader M, Brösel S, Effenberger E, Westermann D, Volk HD, Seifert M, *Cell Res.* 2009, 19(4):507-18,
- [24] Lian RH, Kumar V, Murine natural killer cell progenitors and their requirements for development, *Semin Immunol* 2002; 14:453
- [25] Wolf NA, Swanborg RH, DA rat NK⁺CD3⁻ cells inhibit autoreactive T-cell responses, *Journal of Neuroimmunology* 119, 2001, 81-87
- [26] Gao B, Radaeva S, Park O, Liver natural killer and natural killer T-Cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases, *J. Leuc. Biol.*, 2009, 86, 513-528
- [27] Benichou G, Yamada Y, Aoyama A et al., Natural killer cells in rejection and tolerance of solid organ allografts, *Curr Opin Organ Transplant*, 2010, 13
- [28] Nemlander A, Saksela E, Häyry P, Are natural killer cells involved in allograft

- rejection? Eur J Immunol 1983; 13:348
- [29] Petersson E, Ostraat O, Ekber H, et al. Allogeneic heart transplantation activates alloreactive NK-cells, Cell Immunol 1997; 175:25
- [30] Watson CA, Pezelbauer P, Zhou J, Pardi R, Bender JR, Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK-cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms, J Immunol 1995; 154:3222
- [31] Ayalon O, Hughes EA, Cresswell P, et al. Induction of transporter associated with antigen processing by interferon gamma confers endothelial cell cytoprotection against natural killer-mediated lysis, Proc. Natl Acad Sci, USA 1998; 95:2435
- [32] McDouall RM, Batten P, McCormack A, Yacoub MH, Rose ML, MHC class II expression on human heart microvascular endothelial cells: exquisite sensitivity to interferon gamma and natural killer cells, Transplantation 1997; 64:1175
- [33] McNerney ME, Lee KM, Zhou P, et al., Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection, Am J Transplant 2006; 6: 505
- [34] Kim J, Chang CK, Hayden T, et al., The activating immunoreceptor NKG2D and its ligands are involved in allograft transplant rejection, J Immunol 2007; 179: 6416
- [35] Kondo T, Morita D, Watarai Y, et al. Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells, Transplantation 2000; 69: 969
- [36] Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, Demer LL, Multilineage potential of cells from the artery wall. Circulation 2003, 108: 2505
- [37] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH, Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001, 7:201
- [38] Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD, Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells, Braz J Med Biol Res 2003, 36:1179
- [39] Dvorin EL, Wylie-Sears j, Kaushal S, Martin DP, and Bischoff J, Quantitative evaluation of endothelial progenitors and cardiac valve endothelial cells: Proliferation and differentiation on poly-glycolic acid/poly-4-hydroxybutyrate scaffold in response to vascular endothelial growth factor and transforming growth factor β 1, Tissue Eng 2003, 9:487

- [40] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM, Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow, *J Clin Invest* 2002, 109:337
- [41] Heidecke CD, Araujo JL, Kupiec-Weglinski JW, et al., Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts, *Transplantation* 1985, 4:441

8 Bildverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt einer Arterie, _____	8
Tabelle 1: Geräte _____	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien _____	18
Tabelle 3: Chemikalien _____	19
Tabelle 4: Puffer und Medien für die Zellkultur _____	20
Tabelle 5: Antikörper _____	20
Tabelle 6: primäre Endothelzellen _____	23
Tabelle 7: Primärzellen und Zelllinien _____	23
Tabelle 8: Operationsmaterial _____	24
Abbildung 2: Prinzip der Isolation NKRP1(+)-Zellen mittels MACS-Separation _____	28
Abbildung 3: Isolationsschritte für die Gewinnung von NKRP1 (+) und NKRP1(-) Zellen und ihre weitere Kultivierung in vitro _____	29
Tabelle 9: OP-Ablauf – Freipräparieren der Aorta _____	36
Tabelle 10: OP-Ablauf – Einnähen des Transplantates _____	38
Abbildung 4: Effektive Anreicherung NKRP1(+)/TCR(-) Zellen durch etablierte Protokolle: _____	47
Abbildung 5: Phänotypische Charakterisierung der Milzzellisolate vor MACS-Separation _____	49
Abbildung 6: Anteil NKRP1(+)/TCR(-) Zellen im (+)-Isolat nach MACS-Separation _____	50
Abbildung 7: Anteil NKRP1(+)/TCR(-) Zellen im (-)-Isolat nach MACS-Separation _____	51
Abbildung 8: Etablierung des calceinbasierten Zytotoxizitäts-Tests – Bestimmung der optimalen Zellzahl _____	54
Abbildung 9: Etablierung des calceinbasierten Zytotoxizitäts-Tests – Bestimmung der optimalen Calcein-Konzentration _____	55
Abbildung 10: Zytolytischer Effekt der NK-Zellen auf syngene und allogene Wildtyp-RAEC _____	57
Tabelle 11: Vergleich der MHC-I-Oberflächenexpression transduzierter und nicht-transduzierter DA-RAEC _____	59
Abbildung 11: Vergleich der Sensitivität von Wildtyp-Endothelzellen und MHC-I-defizienten allogenen RAEC gegenüber der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen _____	60
Abbildung 12: Zytolytischer Effekt der NKRP1(-)-Fraktion syngene und allogene Wildtyp-RAEC sowie YAC-1-Zellen _____	62
Abbildung 13: Computergestützte Quantifizierung CD31(+) Zellen in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	64
Abbildung 14: Computergestützte Quantifizierung der MHC-I-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	66
Abbildung 15: Computergestützte Quantifizierung der CD45-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	67
Abbildung 16: Computergestützte Quantifizierung der NKRP1-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	68
Abbildung 17: Computergestützte Quantifizierung der TCR-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	70
Abbildung 18: Computergestützte Quantifizierung der ED1-Expression in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation _____	71
Tabelle 12: Immunhistochemischer Bildvergleich Matrix vs. Eigengewebe _____	73
Tabelle 13: Immunhistochemischer Bildvergleich: LEW-RAEC vs. DA-RAEC _____	75
Tabelle 14: Immunhistochemischer Bildvergleich: GFP-RAEC vs. OX18-RAEC _____	77
Abbildung 19: Nachweis inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation mittels PCR _____	79
Abbildung 20: Quantifizierung der mRNA-Expression funktionsrelevanter Gene in den Gefäßersatzstücken vier Wochen nach Implantation mittels PCR _____	80

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Volk, dem ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Gelegenheit der Promotion in seinem Institut herzlich danke.

Mein weiterer Dank gilt den labortechnischen Assistentinnen im Ida-Simon-Haus, besonders Elke Effenberger und Sabine Brösel, für die Unterstützung in labor-technischen Fragen.

Besonderer Dank gilt auch folgenden wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen: Dr. Juliane Ladhoff für zahlreiche fachliche Hilfestellungen und Dr. Isabella Schmitt-Knosalla für den hervorragenden mikrochirurgischen Unterricht.

Meinen Eltern danke ich besonders für die großartige und umfassende Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

Frau PD Dr. Martina Seifert möchte ich in ihrer Funktion als Arbeitsgruppenleiterin und Betreuerin meiner Arbeit einen besonderen Dank aussprechen. Mit besonderem Gespür für die Bedürfnisse ihrer Mitarbeiter, mit unerschütterlicher Fürsorge und nicht zuletzt bewundernswerter Kompetenz vermittelte sie zu jeder Zeit das Gefühl einer optimalen Betreuung und ermöglichte mir viele interessante Einblicke in die Welt der immunologischen Forschung.

10 Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Bernhard Fleischer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem
Thema:

*Charakterisierung der Reaktivität von Natürlichen Killerzellen gegenüber allogenen
MHC I modulierten Endothelzell-Transplantaten – in vitro und in vivo*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien
anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist dieser Version kein Lebenslauf beigefügt