

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

## DISSERTATION

Einfluss der Modulation der allogenen Immunogenität auf das  
Rejektionsverhalten von Gefäßtransplantaten  
in vivo am Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrei Zdroveac

aus Tiraspol

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk  
2. Prof. Dr. Dr. St. Anker  
3. Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann

Datum der Promotion: 27.03.2009

# Widmung

Meinen Eltern Ljuba und Rafail Zdoroveac.

Моим дорогим родителям, Любе и Рафаилу Здоровякам, посвящается.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Geschichte . . . . .	1
1.2	Gefäßersatzmaterialien . . . . .	2
1.3	Tissue Engineering . . . . .	3
1.4	Tissue Engineering in der kardio-vaskulären Chirurgie . . . . .	3
1.4.1	Künstliche Gefäßprothesen . . . . .	4
1.4.2	Neointima beim alloplastischen Gefäßersatz . . . . .	5
1.4.3	Problematik des alloplastischen Gefäßersatzes . . . . .	6
1.4.4	Besiedlung der ePTFE-Prothesen mit Endothelzellen . . . . .	6
1.4.5	Förderung der Ansiedlung von Neoendothel . . . . .	8
1.5	Studien mit endothelialisierten ePTFE-Prothesen . . . . .	8
1.6	Transplantatabstossung . . . . .	9
1.6.1	Remodeling . . . . .	10
1.6.2	Intimahyperplasie . . . . .	11
1.7	Immunogenität des Gefäßtransplantates . . . . .	12
1.7.1	Unterscheidung von „fremd“ und „selbst“ . . . . .	12
1.7.2	Die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes . . . . .	13
1.7.3	Direkter Weg der Alloantigenerkennung . . . . .	13
1.7.4	Indirekter Weg der Alloantigenerkennung . . . . .	14
1.8	Genetische Gefäßmodifikation . . . . .	15
1.8.1	Gentransfer . . . . .	15
1.8.2	Intrabody . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien . . . . .	19
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	19
2.1.2	Materialien . . . . .	21
2.1.3	Geräte . . . . .	22
2.1.4	Medikamente . . . . .	23
2.1.5	Instrumente . . . . .	23
2.1.6	Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	24
2.1.7	Antikörper . . . . .	24
2.2	Tiermodelle . . . . .	25
2.3	Versuchstiere . . . . .	26
2.3.1	Vorbereitung zur Transplantation . . . . .	26
2.4	ePTFE-Prothese mit anti-MHC-I modifizierten allogenen Endothelzellen . . . . .	26
2.4.1	Virale Transduktion der RAEC . . . . .	26
2.4.2	Besiedlung der ePTFE-Prothese mit ECs . . . . .	27
2.4.2.1	Tube Chamber . . . . .	27

2.4.2.2	Beschichtung mit Fibrinkleber . . . . .	28
2.4.3	Transplantation . . . . .	30
2.5	Allogene, mit anti-MHC-I-modifizierte Rattenkarotiden . . . . .	31
2.5.1	Adenovirale Transduktion in die Rattenkarotiden . . . . .	31
2.5.2	Transplantation . . . . .	32
2.6	Zellkultur der RAEC . . . . .	32
2.7	Durchflusszytometrie . . . . .	33
2.8	Immunhistochemie . . . . .	33
2.8.1	Probengewinnung . . . . .	33
	Carotis-Transplantation . . . . .	33
	ePTFE-Prothesen-Transplantation . . . . .	33
2.8.2	Immunhistochemische Anfärbung der A.carotis-Transplantate . . . . .	34
2.8.3	Immunhistologische Anfärbung der ePTFE-Prothesen . . . . .	34
2.8.4	Mikroskopische Analyse . . . . .	35
2.9	Morphometrie . . . . .	36
2.10	Konventionelle PCR und <i>TaqMan</i> real-time RT-PCR . . . . .	36
2.10.1	RNA-Extraktion . . . . .	36
2.10.2	Reverse Transkription . . . . .	37
2.10.3	PCR . . . . .	37
2.10.4	<i>TaqMan</i> real-time RT-PCR . . . . .	38
2.11	Statistische Analyse . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Besiedlung der ePTFE-Prothesen . . . . .	39
3.2	Etablierung der Technik für die Transplantation der 2 mm PTFE-Prothesen in die A.abdominalis der Ratte . . . . .	42
3.3	Immunhistochemische Untersuchungen transplantiertter ePTFE-Prothesen . . . . .	46
3.4	Modulation der MHC-I-Expression durch den adenoviralen Intrabody-Genstransfer in RAEC <i>in vitro</i> . . . . .	51
3.5	<i>Ad-Ox18scFv</i> -Genstransfer in die A.carotis und Nachweis des Transgens . . . . .	52
3.6	Entwicklung einer Atherosklerose und Analyse der Zellinfiltration in dem Al- lotransplantat . . . . .	53
3.7	Ergebnisse der Morphometrie . . . . .	58
3.8	mRNA-Expression von T-Zellmarkern und Zytokinen . . . . .	59
3.9	Humorale Immunantwort nach der allogenen Transplantation . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	Entwicklung der Transplantationsmodelle . . . . .	61
4.2	Transplantation der vaskulären ePTFE-Prothese . . . . .	62
4.2.1	Besiedlungsverfahren zur Endothelialisierung von ePTFE-Prothesen . . . . .	64
4.2.2	Operationstechnik . . . . .	65
4.2.3	Schwachpunkte alloplastischer Gefäßprothesen . . . . .	66
4.3	Carotis-Transplantation . . . . .	67
4.3.1	Reduzierte Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen in vaskulären Gefäßtransplantaten durch den <i>Ox18scFv</i> -Intrabody . . . . .	67
4.3.2	Zellinfiltration . . . . .	67

4.3.3	Reduzierte Expression von Zellmarkern und Zytokinen . . . . .	70
4.3.4	Intimahyperplasie . . . . .	71
4.3.5	Humorale Antwort . . . . .	72
4.3.6	Immunreaktion auf den adenoviralen Vektor . . . . .	72
4.4	Ausblick . . . . .	74
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>88</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>90</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	vaskuläre ePTFE-Prothese . . . . .	4
1.2	Bildung der Neointima in ePTFE-Prothesen . . . . .	5
1.3	Gefäßaufbau . . . . .	7
1.4	Intimahyperplasie . . . . .	11
1.5	Anti- und Intrabodies . . . . .	16
1.6	Herunterregulation der Zelloberflächenexpression von MHC-I durch anti-MHC-I-Intrabody . . . . .	17
2.1	Das Arbeitskonzept . . . . .	25
2.2	Das Prinzip der Besiedlungskammer . . . . .	27
2.3	Aufbau der Besiedlungskammer . . . . .	28
2.4	Besiedlung der ePTFE-Prothese mit RAEC . . . . .	29
2.5	Das Prinzip der Cuff-Technik . . . . .	30
2.6	Adenovirale Transduktion in die Rattenkarotiden . . . . .	31
2.7	Bestimmung der Infiltrationsdichte . . . . .	35
2.8	Berechnung der Neointimahyperplasie . . . . .	36
3.1	Nachweis der RAEC auf ePTFE-Prothese . . . . .	40
3.2	adhärente RAEC, Fibrinbeschichtung . . . . .	41
3.3	Zelltrümmer, Fibrinbeschichtung . . . . .	41
3.4	Vereinzelte RAEC, Fibrinbeschichtung . . . . .	41
3.5	Geschlossene Schicht von RAEC nach Beschichtung mit Fibronectin . . . . .	42
3.6	Apoptotische Zellen nach Beschichtung mit Fibronectin . . . . .	42
3.7	Transplantationstechnik. Ligierung infrarenaler Seitenäste . . . . .	44
3.8	Transplantationstechnik. Abklemmen der Aorta . . . . .	44
3.9	Transplantationstechnik. Vorbereitung der Gefäßstümpfe . . . . .	44
3.10	Transplantationstechnik. Fixation des Adapterringes an die Aorta . . . . .	44
3.11	Transplantationstechnik. Größenverhältnisse zwischen Aorta und ePTFE-Prothese . . . . .	45
3.12	Transplantationstechnik. Fixation des Adapterringes an die ePTFE-Prothese . . . . .	45
3.13	Transplantationstechnik. Überprüfung der Bluttrockenheit . . . . .	45
3.14	Transplantationstechnik. ePTFE-Interponat <i>in situ</i> . . . . .	45
3.15	Endothel, luminal Seite der transplantierten ePTFE-Prothese, vWF-Färbung. . . . .	46
3.16	Endothel, luminal Seite der transplantierten ePTFE-Prothese, CD31-Färbung. . . . .	47
3.17	Vereinzelte RAEC, luminal Seite der transplantierten ePTFE-Prothese, CD31-Färbung. . . . .	47
3.18	ePTFE-Prothese, CD68 <sup>+</sup> -Färbung . . . . .	49
3.19	ePTFE-Prothese, CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Färbung . . . . .	50
3.20	Adenoviraler <i>Ad-Ox18scFv</i> -Gentransfer in RAEC-Kultur. . . . .	51
3.21	Nachweis von Intrabody- und $\beta$ -Gal-Transgene in A.carotis . . . . .	52
3.22	Carotis-Immunhistochemie, Tag 7 nach der Transplantation . . . . .	55

3.23	Carotis-Immunhistochemie, Tag 28 nach der Transplantation . . . . .	56
3.24	A.carotis-Transplantation, Kontrollhistologie . . . . .	57
3.25	Reduktion der Intimahyperplasie durch <i>Ad-Ox18scFv</i> -Transduktion . . . . .	58
3.26	Reduktion der inflammatorischen Zellmarker durch <i>Ad-Ox18scFv</i> -Transduktion .	59
3.27	Expressionsniveau von Alloantikörper im Empfängerserum nach Transplantation	60

# Tabellenverzeichnis

1.1	Gefäßersatzmaterialien . . . . .	2
2.1	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	19
2.2	Materialien . . . . .	21
2.3	Geräte . . . . .	22
2.4	Medikamente . . . . .	23
2.5	Instrumente . . . . .	23
2.6	Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	24
2.7	Antikörper . . . . .	24
3.1	Ergebnisse der ePTFE-Besiedlung . . . . .	39
3.2	Zellmarkerexpression in Carotistransplantaten . . . . .	54

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Geschichte

Bedingt durch die gestiegene Lebenserwartung, nehmen Gefäßleiden in der Bevölkerung stetig zu. Nach Schätzungen liegt die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen (inzwischen) bei 25% der Bevölkerung<sup>1</sup>. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes war im Jahr 2003 die Todesursache bei mehr als 40% der Verstorbenen eine lokale oder generalisierte kardiovaskuläre Erkrankung. Das Durchschnittsalter der Patienten mit relevanten Erkrankungen des Gefäßsystems beträgt 68-71 Jahre. Im Jahr 2002 wurden in der Bundesrepublik Deutschland ca. 208.000 perkutane transluminale Angioplastien (PTCA) und 40.000 Bypass-Operationen durchgeführt. Die Gefäßinterposition gehört hiermit zu den häufigsten gefäßchirurgischen Eingriffen [1].

Die wissenschaftliche Arbeit auf diesem Gebiet begann erst im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts in Deutschland und Frankreich. Auf dem XI. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie im Jahre 1882 in Berlin wurde von ersten Venennähten (durch GRAUN, GCHEDE und GLUCK) berichtet. T.H.GLUCK entwickelte die *Patch*-Plastik an der A.carotis von Hunden. Er war auch der erste, dem eine direkte venöse Thrombektomie gelang. Bereits zur Zeit der vorletzten Jahrhundertwende existierte die Idee, einen Gefäßverschluss durch ein Interponat zu beseitigen.

Im Jahre 1903 gelang HÖPFNER zum ersten Mal eine tierexperimentelle Implantation von autologen Gefäßinterponaten. 1906 überbrückten CARREL und GUTHRIE bei Hunden die A. carotis communis durch ein Segment der V. jugularis. Die erste Bypass-Operation wird ERNST JEGER zugeschrieben. Er hatte 1913 in seinem Buch „*Die Chirurgie der Blutgefäße und des Herzens*“ die Technik der Bypass-Operation und Organtransplantation beschrieben. Im Laufe der Zeit beschäftigte sich die Forschung mit der Untersuchung heterologer, xenogener und alloplastischer Gefäßtransplantate. Das Auftreten von Komplikationen zeigte jedoch immer wieder, dass die Transplantate die notwendigen Anforderungen nicht erfüllen konnten; die Langzeitergebnisse der Untersuchungen vermochten nicht zufrieden zu stellen.

Ein Verbesserungsversuch bestand darin, autologe Venenimplantate mit einem Dacron-Netz zu unterstützen. Die von EITKEN und NORDEN im Jahre 1963 entwickelte externe Ummantelung

---

<sup>1</sup>PANKNIN HT, SCHWEMMLE K (2004) Operative Eingriffe bei alten Menschen

von Bypassvenen hatte zum Ziel, die Wandspannung zu verringern und durch eine Anpassung des Durchmessers die Flussverhältnisse zu optimieren. Eine neue Methode der Revaskularisierung mit *Biocompound*-Prothesen wurde vom ZURBRUGG und HETZER entwickelt. Sie ermöglicht die Verwendung von varikös-ektatisch veränderten autologen Venen in einer *Biocompound*-Prothese bei Patienten, bei denen kein eigenes geeignetes venöses oder arterielles Ersatzmaterial für eine Bypass-Operation zur Verfügung steht.

## 1.2 Gefäßersatzmaterialien

Die Einteilung der Gefäßersatzmaterialien erfolgt entsprechend deren Ursprung (Tabelle 1.1). Als optimaler Gefäßersatz gilt das autologe Transplantat, also körpereigene Venen oder Arterien, die zur Überbrückung der Gefäßläsion verwendet werden. Meist kommen hier V.saphena magna und A.thoracica zur Anwendung. Als homologe Transplantate werden meist Leichengefäße verwendet, während als xenogene Transplantate Arterien von Rindern und Schweinen Verwendung finden. Homologe und xenogene Transplantate bilden die Gruppe der Bioprothesen, zu der auch die aus Nabelschnurvenen gefertigte *Dardik*-Prothese gehört.

Angesichts des Gefahrenpotenzials von viralen Kontaminationen treten Xenotransplantate immer mehr in den Hintergrund. Trotzdem wird auf diesem Gebiet weiterhin Forschung betrieben. Aktuelle tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass die Vorbehandlung des Spenders mit „allochimären“ Antikörpern gegen das MHC-I des Endothels neben der chronischen Abstoßungsreaktion auch die Intimaproliferation reduzieren kann [2].

Im Gegensatz zu den Bioprothesen werden die alloplastische Gefäßtransplantate aus nichtorganischem Material, wie beispielsweise Teflon oder Polytetrafluoroethylen, hergestellt. Ausserdem werden derzeit tierexperimentelle Untersuchungen mit einem neuartigen Material, Bakterien-cellulose BASYC<sup>®</sup>, durchgeführt [3].

Gefäßersatzmaterialien			
autolog	homolog	heterolog	alloplastisch
<b>venös</b>	Arterie	bovine Prothese	Dacron
–V.Saphena magna	Vene	porcine Prothese	ePTFE
–V.cephalica	Dardik-Prothese		
<b>arteriell</b>	(V.umbilicalis)		
–A.thoracica int.			
–A.radialis			

**Tabelle 1.1:** Übersicht der am häufigsten verwendeten Gefäßersatzmaterialien

## 1.3 Tissue Engineering

*Tissue Engineering* ist ein interdisziplinärer Forschungsbereich, dessen Ziel es ist, Organ- und Gewebefunktion durch Herstellung von hybriden bioartifiziellen Konstrukten aufrecht zu erhalten oder zu ersetzen. Durch Verwendung autologer sowie genmodifizierter allogener Zellen besteht die Möglichkeit, durch Reduktion oder Wegfall der lebenslangen Immunsuppression die Lebensqualität des Patienten zu steigern. Beim Grundkonzept der Gewebezüchtung handelt es sich um eine Kombination biologischer oder artifizieller Matrices mit extrakorporal gezüchteten Zellen. In einigen Fachbereichen hat sich das *Tissue Engineering* einen festen Platz im klinischen Alltag erobert. Dieses Verfahren wird vor allem zur Herstellung von Herzklappen in der kardio-vaskulären Chirurgie, bei der Transplantation von Inselzellen bei Diabetes mellitus aber auch zur Herstellung dermalen Transplantate und zur Züchtung Knochen- oder Knorpelgewebe in der plastischen Chirurgie angewendet. Im Körper werden die artifiziellen Organe verschiedenen physiologischen und mechanischen Einflüssen ausgesetzt. Für kardiovaskuläre Implantate gelten besondere Anforderungen, weil sie im Blutkreislauf dem Perfusionsdruck und den Scherkräften standhalten sollen. Unter *in vitro* Bedingungen werden solche spezifischen Eigenschaften unvollständig ausgebildet. Die gezüchteten Zellen müssen in einer organotypischen Umgebung entsprechend konditioniert werden, damit sie nach der Implantation den organspezifischen Anforderungen gerecht werden können.

## 1.4 Tissue Engineering in der kardio-vaskulären Chirurgie

Vaskuläre Stenosen und daraus resultierende Minderperfusion der betroffenen Organe führen zu funktionellen und morphologischen degenerativen Veränderungen. Bei einer langsamen Progression des ischämischen Prozesses sind die betroffenen Strukturen in der Lage, durch entsprechende Adaptationsmechanismen eine Funktion- und Strukturintegrität aufrechtzuerhalten. Wenn die Perfusion einen kritischen Punkt erreicht, können die Organe einen irreparablen ischämischen Schaden erleiden, was bei Beteiligung lebenswichtiger Organe sogar zum Tode führen kann. Um eine adäquate Blutversorgung wieder herzustellen, wird die Stenosestelle durch ein Gefäßinterponat überbrückt. Wie bereits erwähnt wurde, sind autologe A.thoracica int. und V.saphena magna der optimale Gefäßersatz. Allerdings ist bei ca. 20% der Patienten aufgrund einer fortgeschrittenen generalisierten Vaskulopathie kein geeignetes Eigenmaterial für eine autologe Gefäßtransplantation vorhanden. Das gleiche Problem ergibt sich bei Patienten mit mehrfachen autologen Gefäßtransplantationen.

Als Alternative zur autologen Gefäßtransplantation wurden eine Reihe unterschiedlicher Gefäßersatzmaterialien (Tab. 1.1) entwickelt. Der Einsatz der Alternativmethoden wird jedoch durch bestimmte materialspezifische Eigenschaften eingeschränkt. So gehört ein allogener Gefäßersatz in die Kategorie „Organtransplantation“ und muss - wie dies bei jeder Transplantation notwendig ist - mit allen Konsequenzen durch eine antiproliferative, thrombozythenaggregations- und gerinnungshemmende Therapie unterstützt werden. Der Einsatz von künstlichen Gefäßprothesen (alloplastischer Gefäßersatz) ist eine weitere interessante Alternative. Das Prothesenmaterial enthält keine Antigenen, was eine klassische Alloantigenerkennung ausschließt. Durch die ausgelöste Fremdkörperreaktion kommt es jedoch zur Degeneration der Materialstruktur. Auf der luminalen Seite entwickelt sich eine Neoendothelhyperplasie, die zur Störung der Blutperfusion bis hin zur Okklusion der Gefäßprothese führen kann. Durch die Kultivierung von Endothelzellen auf der luminalen Oberfläche mittels *tissue engineering* kann

man alloplastische Gefäßprothesen generieren, die mit einem Endothel ausgekleidet sind, was die Langzeitergebnisse der Implantation einer solchen Prothese erheblich verbessert.

### 1.4.1 Künstliche Gefäßprothesen

In der Gefäßchirurgie werden bei einem Fehlen von geeigneten autologen Gefäßen aufgrund schlechten Venen- und Arterienmaterials (Varikosis, Atherosklerose, Zustand nach Thrombophlebitis oder Venenstripping) vaskuläre Prothesen aus Kunststoff zur arteriellen Revaskularisierung bei pAVK und KHK eingesetzt. Die erste routinemäßige klinische Anwendung der künstlichen *Vinyon-N*-Gefäßprothesen erfolgte durch VOORHEES *et al.* in den 50-er Jahren. Es wurde weiter nach geeigneten Materialien für Gefäßprothesen geforscht. DEBAKEY publizierte bereits 1958 die Ergebnisse seiner umfangreichen Experimente auf der Suche nach einem optimalen Material. Er kam zu dem Schluss, dass Dacron die Voraussetzungen für eine dauerhafte Prothese am besten erfüllt. Als Material für kleinlumige Gefäßprothesen erwies sich später Polytetrafluoroethylen, ePTFE (Abb. 1.1), auch unter dem Namen Teflon bekannt, als zweckdienlicher.



Abbildung 1.1: vaskuläre ePTFE-Prothese<sup>2</sup>

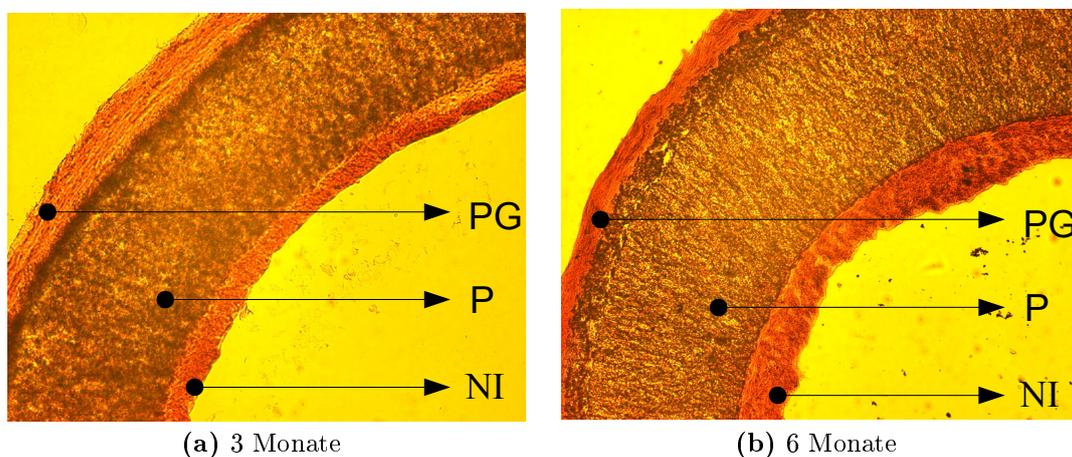
Der alloplastische Gefäßersatz hat sich im großlumigen Bereich bewährt. Der klinische Einsatz kleinlumiger alloplastischer Gefäße ist jedoch mit hohen Komplikationsraten behaftet. Trotz beachtlicher Vorteile im Vergleich zu anderen synthetischen Materialien stimmt auch ePTFE nicht in jeder Beziehung mit der Beschaffenheit eines körpereigenen Blutgefäßes überein. Die Oberflächenthrombogenität, eine im Anastomosenbereich entstehende turbulente Strömung und eine sich langsam entwickelnde Intimahyperplasie begünstigen thrombotische Komplikationen, welche schließlich zu einem Gefäßverschluss führen können.

<sup>2</sup>FlowLine Bipore<sup>®</sup>, Foto von ePTFE Vascular Grafts, JOTEC<sup>®</sup> GmbH, Deutschland, [www.jotec.net](http://www.jotec.net)

Die primäre Durchgängigkeitsrate von Bypässen aus ePTFE beim Verschluss der Unterschenkelarterie 5 Jahren postoperativ liegt zwischen 30% und 40%, im Vergleich zu 60-80% bei venösen Bypässen<sup>3</sup>, d.h. ein Großteil der Patienten muss sich innerhalb dieser Zeit einer erneuten Operation unterziehen.

### 1.4.2 Neointima beim alloplastischen Gefäßersatz

Die innere Schicht zwischen ePTFE-Innenfläche und Lumen der implantierten Gefäßprothese wird als Neointima bezeichnet (Abb. 1.2). Die einlagige Endothelzellschicht, welche die Neointima auskleidet und dem Gefäßendothel entspricht, wird als Neoendothel bezeichnet, wobei die Neointima selbst noch keine Voraussetzung für das Vorhandensein eines Neoendothels ist. Die Neointima weist beträchtliche Schwankungen in der Dicke auf. Durch einen fließenden Übergang zwischen transmural eingewachsenem Bindegewebe und Neointima ist letztere fest mit der Prothesenwand verankert. Die Neointima bildet in unterschiedlicher Dicke die innere



**Abbildung 1.2:** Bildung der Neointima in unbehandelten ePTFE-Prothesen 3 und 6 Monate nach der Transplantation in die A.abdominalis der Ratte.

NI –Neointima

P –Prothesenwand

PG–perivaskuläres Gewebe

Prothesenauskleidung. Sie besteht aus zellarmem Bindegewebe mit konzentrisch angeordneten Kollagenfasern. Ein zusammenhängendes neointimales Endothel zeigt sich lediglich in anastomosenahen Bereichen. Hier finden sich konzentrisch angeordnete glatte Muskelzellen (SMC), die von einer singulären Schicht von polygonalen Neoendothelzellen bedeckt sind [4]. Das Neoendothel ähnelt zwar dem Endothel originärer Gefäße, zeigt allerdings beträchtliche Variationen nicht nur bezüglich der Zellform und der Zellgröße, sondern auch bezüglich der Integration in die Zellverbände und in die bindegewebige Strukturen. Einige tierexperimentelle Untersuchungen mit hochporösem ePTFE zeigten, dass zwischen der ersten und der zweiten Woche nach dem Einsetzen der Prothese die Endothelzellen der eingewachsenen Kapillaren die luminale Prothesenfläche erreichen. Eine erhöhte Proliferationsaktivität der Endothelzellen und der darunter liegenden SMC wurde sogar mehrere Monate nach der Transplantation beobachtet [5].

<sup>3</sup>Quelle: Leitlinien zu Stenosen und Verschlüssen der Unterschenkelarterien, 2004

Wichtige Faktoren für die Neointimabildung sind neben der intakten Blutperfusion auch die auf die Innenfläche wirkenden Scherkräfte, welche sowohl vom Durchmesser der ePTFE-Prothesen als auch von der Flussgeschwindigkeit abhängen. Untersuchungen mit unterschiedlichen Prothesenmodellen und Perfusionsgeschwindigkeiten zeigten, dass es bei niedrigen Scherkräften meist zu einer ausgeprägten Neointimabildung kommt, während große Scherkräfte in kleinkalibrigen Prothesen in Assoziation mit ungenügender Neointimabildung und häufig auch mit parietalen Thromben auftreten [4]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass hoher Scherstress sogar bei bereits entwickelter Neointima zu deren Atrophie führt [6].

### 1.4.3 Problematik des alloplastischen Gefäßersatzes

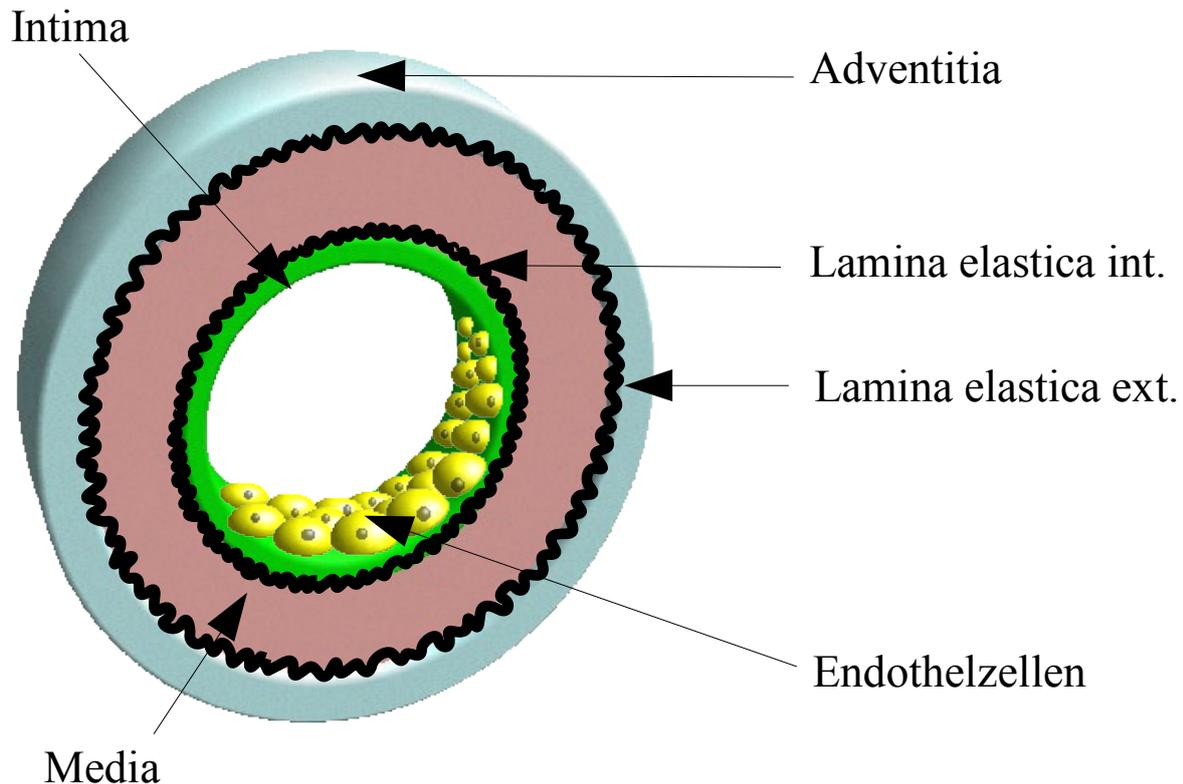
Alloplastische Materialien weisen eine Reihe von Schwachpunkten auf, welche zu Funktionseinschränkungen des Transplantates führen können. So führt beispielweise das Fehlen einer geschlossenen Endothelschicht und eine anhaltende mitotische Aktivität der SMC zu einer Stenose der Prothese und zu damit verbundenen thrombotischen und thromboembolischen Ereignissen. Ein Flexibilitätsverlust der Prothese (infolge der bindegewebigen Inkorporation) sowie die Degeneration und Dissektion der Neointima fördern die pathophysiologischen Prozesse, welche schließlich zum Funktionsverlust des Allotransplantates führen.

Um die Stenosierungsrate und die thrombotischen Komplikationen zu senken und dadurch die Langzeitergebnisse zu verbessern, wurde schon sehr früh versucht, die synthetische Protheseninnenfläche, die im unmittelbaren Kontakt mit dem Gerinnungs- und Immunsystem steht, antithrombotisch zu modifizieren, indem man die Oberflächenspannung des prothetischen Materials ändert oder sie mit Heparin beschichtet.

### 1.4.4 Besiedlung der ePTFE-Prothesen mit Endothelzellen

Weitere biomedizinische Ansätze, wie die Besiedlung der ePTFE-Prothesen mit Endothelzellen (ECs), konnten bereits in den 80-er Jahren Vorteile bezüglich Hämodynamik und Thrombogenität gegenüber unbehandelten Kunstgefäßen nachweisen [7]. Die Strategie der *Tissue Ingeneering* in der kardio-vaskulären Chirurgie besteht darin, vaskuläre Prothesen zu entwickeln, die in der anatomischen Struktur und in den physiologischen Parametern den nativen Gefäßen möglichst ähnlich sind.

Ein Blutgefäß besteht aus drei Schichten: Intima, Media und Adventitia (Abb. 1.3). Die innere Schicht (Intima) besteht in einem gesunden Gefäß aus einem einschichtigen Endothel und einem subendothelialen lockeren Bindegewebe, welches durch eine Basalmembran vom Endothel getrennt ist. Das Endothel dient hauptsächlich dem Gas- und Stoffaustausch, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gerinnungshomöostase und der adäquaten Perfusion. Die mittlere Schicht (Media) besteht aus konzentrisch angeordneten elastischen Lamellen, glatten Muskelzellen (SMC) und dazwischen liegenden Kollagenfasern. Auf der inneren Seite wird die Media durch Lamina elastica interna von der Intima abgegrenzt und auf der äußeren Seite durch die Lamina elastica externa von der Adventitia. Die Adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe mit schraubenartig angeordneten Kollagenfasern. Die in ihr verlaufenden Blut- und Lymphgefäße, aber auch die Nerven gewährleisten die Blutversorgung und die Innervation der Gefäßwand.



**Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes.** Ein wichtiges Merkmal eines Blutgefäßes ist seine Dreischichtung, die bei Arterien vom muskulären Typ besonders ausgeprägt ist.

Physiologische „Maskierung“ des Kunststoffes mit Endothelzellen (*Endothelial Cell Seeding*, ECS) konnte das hohe thrombotische Risiko tatsächlich senken. Aus einer Reihe von *in vivo* Untersuchungen und klinischen Studien aus den letzten 30 Jahren geht hervor, dass eine endotheliale Schicht auf der luminalen Seite der synthetischen Gefäßprothesen die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion mit folgender Neointimahyperplasie und thromboembolischen Komplikationen senkt. Es wurde nachgewiesen, dass endothelialisierte ePTFE-Prothesen das antikoagulatorische Protein C aktivieren und die Konversion von Prothrombin in Thrombin verhindern [8]. Das Verfahren der Besiedlung der ePTFE-Prothesen mit Endothelzellen wurde bereits im Jahr 1978 von HERRING, GARDNER und GLOVER im Hundemodell entwickelt. Die für die Besiedlung verwendeten ECs werden aus einer peripheren Vene oder Arterie gewonnen. Unter Einsatz von mechanischen und enzymatischen Ansätzen erfolgt zunächst die Isolierung, Präparation und Kultivierung der Primärzellen. Anschließend wird die Gefäßprothese in einem speziell für diesen Prozess konstruierten Bioreaktor mit gezüchteten ECs besiedelt. Es wurden eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, um die Ausbeute an ECs und deren Haftung auf der Prothesenoberfläche zu verbessern und ein konfluentes Zellwachstum zu erreichen. Erfolgreiche Untersuchungen im Hundemodell ließen sich allerdings auf den Menschen nicht übertragen. Klinische Untersuchungen mit autologen ECs besiedelten ePTFE-Prothesen als Femoropoplitealbypass zeigten 14 Wochen postoperativ kein konfluentes Endothelwachstum [9]. Die erste prospektive 1-jährige klinische Studie mit durch ECs besiedelten künstlichen Femoropoplitealinterponaten zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied bezüglich thromboembolischen Ereignissen und Perfusionsparametern [10]. Bereits 1985 hatte ROSEN-

MAN in tierexperimentellen Untersuchungen die schwache Adhärenz der Endothelzellen auf den ePTFE-Prothesen festgestellt. 24 Stunden nach der Implantation der Gefäßprothese wiesen lediglich 5% der vorher über 6 Wochen *in vitro* auf der Prothese gezüchteten Endothelzellen eine adäquate Haftung auf [11].

### 1.4.5 Förderung der Ansiedlung von Neoendothel

Schwache Zelladhärenz ist bei *in vivo* Untersuchungen ein limitierender Faktor bei der Besiedlung vaskulärer ePTFE-Prothesen mit ECs. Die Beschichtung der Protheseninnenfläche kann dazu beitragen, dass die ECs besser anhaften und sich ansiedeln. Verschiedene Versuche wurden unternommen, um die Ausbreitung und Adhärenz der Neoendothelzellen zu fördern. Eine Vielzahl von Beschichtungsverfahren wurden seit 25 Jahren untersucht. Die verwendeten Substanzen reichen von Gelatine, Albumin über Extrazellulärmatrix, Kollagen und Fibronectin bis hin zu verschiedenen Wachstumsfaktoren, Fibrinkleber, Salicylaten, um nur einige zu nennen. Viele wurden in Kombination mit dem *Endothelial Cell Seeding* getestet. Besonders wirkungsvoll für die Verbesserung des ECS scheinen Fibrin und Fibronectin zu sein [12][13].

Ähnliche Ergebnisse zeigte LINDBLAD bei der Inkubation der ePTFE-Gefäße in ECs-enthaltendem Blut [14]. ZILLA zeigte 1989 eine signifikante Verbesserung des Adhärenzverhaltens der humanen ECs in mit Fibrinkleber vorbehandelten ePTFE-Prothesen [15]. Manche Arbeitsgruppen favorisieren eine Kombination von verschiedenen Matrixsubstanzen wie beispielweise Fibrinogen, Fibronectin und Elastin für die Förderung der Endothelialisierung von ePTFE-Prothesen [16]. Eine niedrige Konzentration der *cross-linked* RGD-Peptiden im Fibrin fördert ebenfalls die ECs-Ansiedlung und -Adhäsion auf der ePTFE-Prothese [17].

## 1.5 Studien mit endothelialisierten ePTFE-Prothesen

In den ersten klinischen Studien über die Verwendung von endothelialisierten ePTFE-Prothesen bei kardiovaskulären Eingriffen konnte eine Senkung der Restenosierungsrate bei denjenigen Patienten festgestellt werden, bei denen endothelialisierte ePTFE-Prothesen eingesetzt worden waren. Weit höher war die Restenosierungsrate bei der Kontrollgruppe, also bei denjenigen Patienten, die einen unbesiedelten ePTFE-Bypass erhalten hatten [18]. Im Deutschen Herzzentrum zu Berlin wurden prospektiv Patienten beobachtet, die einen mit autologen ECs beschichteten aortokoronaren ePTFE-Bypass eingesetzt bekommen hatten [19].

Bei dieser Studie wurden den jeweiligen Patienten etwa 2 Monate vor dem geplanten Operationstermin Segmente einer kleinen Hautvene entnommen und anschließend Endothelzellen aus dem Zellverband enzymatisch herausgelöst. Unter Verzicht auf alle nicht humanen Zusätze zum Zellkultur-Medium, einer Minimierung des Serumeinsatzes und der Optimierung der Proliferationsstimulation wurde eine Endothelzelllinie gezüchtet, die anschließend im Lumen einer ePTFE-Prothese kultiviert wurde. Innerhalb von ca. 10 Tagen wurde eine mit Endothelzellen beschichtete Prothese an ein den Blutkreislauf imitierendes System angeschlossen. Unter diesen, beinahe physiologischen Bedingungen, die eine scherkraftresistente Zellanheftung ermöglichen, bildeten die ECs auf der Prothesenoberfläche eine konfluente Schicht [9].

Wie oben schon erläutert wurde, ist eine autologe Vene oder Arterie der ideale Gefäßersatz. Die Patienten mit einer weit fortgeschrittenen KHK oder pAVK verfügen aber meistens qualitativ und quantitativ nicht über ausreichend autologes Ersatzmaterial zur Überbrückung von Gefäßläsionen. Die oben erwähnten Methoden, bei denen arterielle Interponate zur Anwendung kommen, sind zeitaufwändig, so dass sie nur für eine im Voraus geplante Bypass-Operation in Frage kommen. Bei manchen Patienten verlangt jedoch ein vaskulopathologischer Prozess eine dringende operative Intervention. Hier braucht es eine Gefäßprothese, die einerseits eine niedrige Thrombogenität aufweist und andererseits binnen kürzester Zeit einsatzbereit sein kann.

## 1.6 Transplantatabstossung

Adaptive Immunreaktionen gegen das fremde Gewebe sind das größte Hindernis für eine erfolgreiche Organtransplantation. Man unterscheidet verschiedene Formen der Transplantatabstossung, die sich bezüglich des bevorzugten zeitlichen Auftretens, der Pathogenese und der Morphologie voneinander unterscheiden: die hyperakute, akute oder akzelerierte akute und die chronische Abstossung. Eine hyperakute Abstossung wird vor allem in vaskularisierten Transplantaten durch präformierte zytotoxische Alloantikörper verursacht. Durch ihre Bindung an die HLA-Oberflächenmoleküle der Spender-EC kommt es zur Komplementaktivierung, Fibrinablagerung und schließlich zur thrombotischen Okklusion kleiner Gefäße. Eine akute Abstossung erfolgt im Regelfall in den ersten ein bis fünf Wochen. Bei der vaskulären Allotransplantation werden die Intima und die Adventitia des Transplantates von CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten sowie von Makrophagen infiltriert. Die Zytokinfreisetzung von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und Makrophagen stimuliert die klonale T-Zell-Proliferation und rekrutiert zytotoxische CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Dies führt zur Zerstörung des Endothels mit konsekutiver Aktivierung des Gerinnungssystems, Thrombenbildung und schließlich zur Perfusionsstörung oder Gefäßokklusion.

Hyperakute Abstossung, welche durch präformierte anti-ABO- oder anti-HLA-Antikörper ausgelöst wird, kann durch Ausschluss der Anti-Spender-Antikörper mittels Kreuztestung weitgehend verhindert werden. Akute Abstossungsreaktionen lassen sich unter Berücksichtigung der polymorphen HLA-Antigene und unter der immunsuppressiven Pharmakotherapie reduzieren. Bei der chronischen Abstossungsreaktion eines vaskulären Allotransplantates handelt es sich um über Monate und Jahre fortschreitende morphologische Strukturveränderungen der Gefäßwand, die mit einer progredienten Funktionseinschränkung einhergehen und schließlich zu einem Funktionsverlust durch Okklusion führen. Es ist ein multifaktorieller Prozess, dem nicht nur eine Vielzahl von immunologischen Faktoren (Alloantigen-abhängigen) zugrunde liegt, sondern auch nichtimmunologische (Alloantigen-unabhängigen) Faktoren einschließt, wie Ischämie, Reperfusionsschaden oder turbulente Strömungen im Anastomosenbereich.

Im Unterschied zu einer akuten Abstossung, bei der zelluläre Infiltrate, Zellnekrosen und Stromaödem im Vordergrund stehen, wird eine chronische Abstossung durch proliferative Prozesse charakterisiert. Eine persistierende Zellinfiltration in der ersten Phase nach der Transplantation ist mit der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie mit der zunehmenden Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel verbunden. Durch die Zytokine werden weitere immunkompetente Zellen rekrutiert, die den Ciruculus vitiosus aufrecht erhalten. Die Wachstumsfaktoren regen die Fibroblasten zur Proliferation an, was schließlich zu morpho-

logischen Veränderungen führt. Ab einem gewissen Zeitpunkt bedarf es für die Unterhaltung struktureller Umbauprozesse keiner Stimulation mehr von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.

Im Endstadium der chronischen Abstossungsreaktion steht immer eine obliterierende Atherosklerose des vaskulären Allotransplantates. Die Ausprägung der Atherosklerose wird maßgeblich vom HLA-*Mismatching* und vom Ausmaß der durch die akute Reaktion verursachten Endothelschädigung bestimmt. Die transplantationsbedingte obliterierende Atherosklerose wird als Transplantatvaskulopathie oder *Bypass graft disease* bezeichnet und ist morphologisch einer primären atherosklerotischen Läsion ähnlich.

Im Gegensatz zu einer schleichenden, über Jahrzehnte fortdauernden Entwicklung der Primärläsion bildet sich eine ausgeprägte Transplantatatherosklerose innerhalb von wenigen Wochen bis Monaten aus [20]. Pathogenetisch stellt die atherosklerotische Vaskulopathie eine inflammatorische Reaktion dar [21]. Neben den pathophysiologischen Prozessen, die zu einer primären atherosklerotischen Läsion führen, wird der Einheilungsprozess des Transplantates durch weitere Faktoren beeinflusst. HLA-*Mismatching*, der präoperative morphologische und funktioneller Zustand des vaskulären Allotransplantates sowie durch Anastomosetechnik bedingte mechanische und funktionelle Alterationen spielen dabei eine wichtige Rolle [22]. *Bypass graft disease* ist durch folgende Prozesse gekennzeichnet:

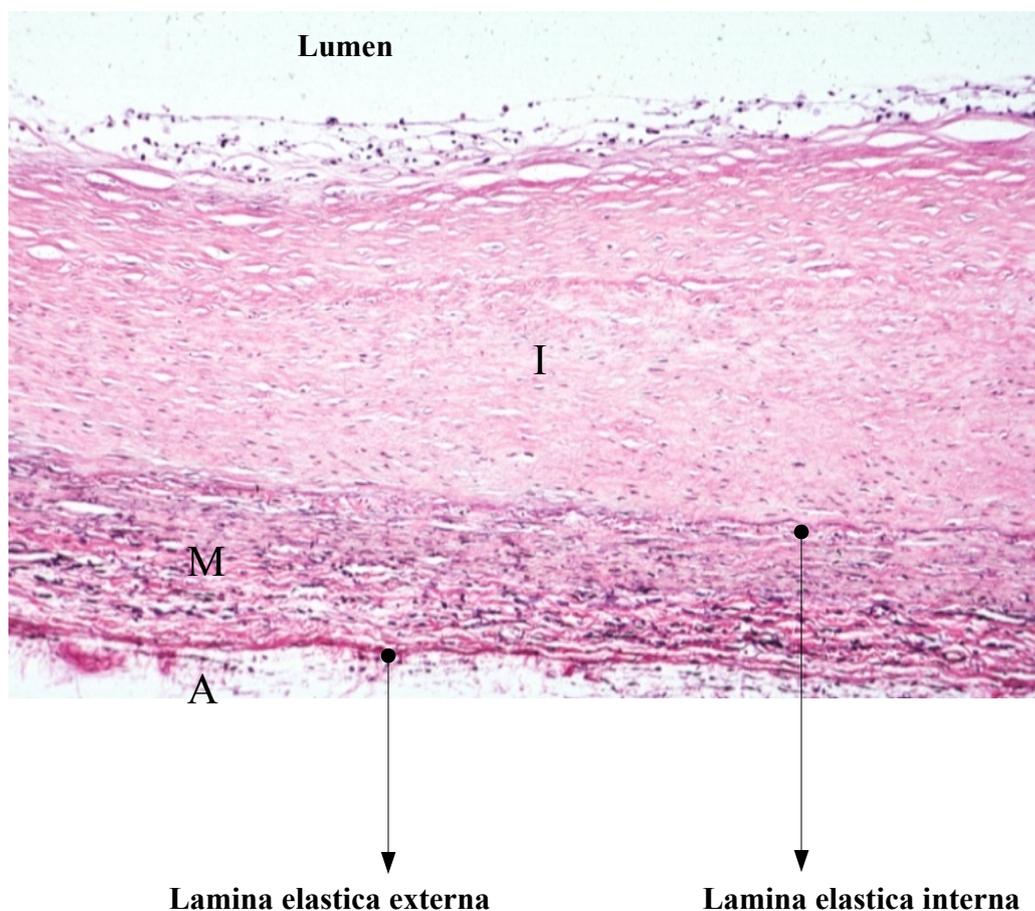
- *Remodeling*
- *Bildung parietaler Thromben*
- *Intimahyperplasie*
- *Intima- und Mediadissektion*

### 1.6.1 Remodeling

Strukturelle Umbauvorgänge in der Gefäßwand mit konsekutiven morphologischen und funktionellen Veränderungen des Gefäßes und hämodynamischen Alterationen werden allgemein als Remodeling definiert und stellen eine adaptive Reaktion an atherosklerotischen Läsionen dar [23]. Blutgefäße sind bis zu einem gewissen Grad in der Lage, bei einem fortschreitenden atherosklerotischen Prozess die Wandspannung und somit das ursprüngliche Lumen aufrechtzuerhalten. Dabei werden bei adaptiven Vaskulopathien nicht nur ein expansives Remodeling, welches bei einer fortgeschrittenen Plaquesbildung eine adäquate Blutperfusion gewährleistet, sondern auch ein restriktives Remodeling beobachtet, welches eine atherosklerotische Gefäßeinengung unterstützt [24].

## 1.6.2 Intimahyperplasie

Die Intimahyperplasie ist einer der wichtigsten transplantationsbedingten Vorgänge, die zu einer insuffizienten Gefäßperfusion führen. Sie wird als intimale Zellproliferation definiert, die von einer überschießenden Produktion extrazellulärer Matrixstrukturen begleitet wird (Abb. 1.4) [25]. Transplantationsbedingte Ischämie, initiale Endothelschädigung durch eine zellvermittelte antigenspezifische Immunreaktion sowie mechanische Irritationen bestimmen weitgehend die Ausprägung der Intimahyperplasie. Der Gefäßtyp ist ebenfalls ein prädektiver Faktor für den Grad der Vaskulopathie. Aktuelle klinische Untersuchungen der aortokoronaren Bypässe zeigten eine signifikant höhere Proliferation der SMC in venösen, wie V.saphena magna, im Vergleich zu arteriellen Bypässen, wie A.thoracica interna [26].



**Abbildung 1.4:** Intimahyperplasie im Rahmen einer „Bypass graft disease“<sup>4</sup>

L–Lumen, A–Adventitia,  
I–Intima, M–Media

<sup>4</sup>PEIR Digital Library, Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham

Bei der Entstehung der Intimahyperplasie spielen sich folgende Vorgänge ab:

1. Reduktion der Aktivität der cGMP abhängigen Signalkaskade [27]
2. Reduktion der *NO*-Aktivität [28]
3. Aktivierung der Gerinnungsfaktoren mit Bildung parietaler Thromben
4. Produktion von extrazellulärer Matrix
5. Proliferation und Migration der SMC aus der Media und Adventitia, welche einen wesentlichen Beitrag bei der Intimahyperplasie leisten [29]
6. Anhaltende Proliferation der neointimalen SMC
7. Umschalten des kontraktilen auf den synthetisierenden Phänotyp der SMC [30]

Bei der Konversion der SMC vom kontraktilen zum synthetischen Typ wird die Expression von kontraktilen Myofilamenten eingestellt. Durch Zytokinstimulation werden die SMC zu Proliferation und zu Kollagensynthese angeregt [31]. Kontrovers wird die Heterogenität und Mono- bzw. Oligoklonalität der proliferierenden neointimalen SMC diskutiert. Alternativ zu der Hypothese, dass alle medialen und adventitiellen SMC einer Phänotypänderung unterliegen, wurde das Konzept der prädisponierten Population der SMC in intimalen Plaques erarbeitet [32]. Dieses Konzept besagt, dass humane atherosklerotische Plaques Eigenschaften einer monoklonalen Läsion besitzen, was bereits mehrere Forschungsgruppen bestätigt haben [33]. Später wurde mittels Mikrodissektionstechnik nachgewiesen, dass die intimalen SMC oligoklonaler Natur sind [34] [35]. Die intimalen SMC stammen von den medialen und adventitiellen Myofibroblasten, von den ECs des Originalendothels und von den zirkulierenden pluripotenten Knochenmarkzellen ab [35].

## 1.7 Immunogenität des Gefäßtransplantates

### 1.7.1 Unterscheidung von „fremd“ und „selbst“

Das Immunsystem ist in der Lage, durch MHC-Moleküle zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden. Der HLA-Komplex beim Menschen zeigt einen ausgeprägten Polymorphismus. Geringe Unterschiede im HLA-Typ von Spender und Empfänger erhöhen die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Transplantation. Die Aktivierung von T-Lymphozyten durch Allo-MHC-Moleküle nach einer Transplantation wird als Alloreaktivität bezeichnet. Die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und den auf der Membranoberfläche der Spenderzellen präsentierten alloreaktiven MHC-Peptiden ist der zentrale Mechanismus einer Transplantatabstossung.

### 1.7.2 Die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Die T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen nicht in löslicher Form, sondern gebunden an spezialisierte Moleküle auf der Zelloberfläche. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC von engl.: *major histocompatibility complex*) ist der Genkomplex, der die Glykoproteine der Plasmamembran kodiert, die körpereigene und fremde Peptide binden. Die entsprechenden Genloci beim Menschen werden als „*human leukocyte antigen*“ (HLA) bezeichnet. Die von ihnen kodierten polymorphen Präsentationsmoleküle sind als MHC-Moleküle bekannt und werden kodominant exprimiert. An der Antigenpräsentation beteiligen sich zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Die Genloci beider Klassen zeichnen sich durch einen sehr ausgeprägten allelen Polymorphismus aus, welcher dazu führt, dass mit Ausnahme monozygoter Zwillinge eine vollständige Übereinstimmung der MHC-Antigene nie vorkommt. Genetisch unterschiedliche Individuen derselben Spezies bezeichnet man als allogene. Nur die Kombination von MHC-Molekülen und exo- und endogenen Peptiden bildet eine Erkennungsstruktur für den TCR und ermöglicht somit die Interaktion mit dem Immunsystem. Allogene MHC-Moleküle des Transplantates werden von den T-Lymphozyten des Empfängers ebenfalls als „fremd“ erkannt und stellen die zentrale Instanz im Verlauf einer Abstossungsreaktion dar. MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Die MHC-I-gebundenen Peptide, die hauptsächlich aus dem Zytoplasma stammen, werden von den  $CD8^+$ -Lymphozyten erkannt. Auf diese Weise können zytotoxische  $CD8^+$ -Lymphozyten die von intrazellulären Erregern, hauptsächlich Viren, befallenen Körperzellen identifizieren und eliminieren.

MHC-II Moleküle werden nur auf spezialisierten immunkompetenten Zellen exprimiert: auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z.B. Gewebsmakrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen, sowie auf Thymusepithel, auf aktivierten T-Lymphozyten nach der Stimulation mit *IFN- $\gamma$*  und *TNF- $\alpha$*  und auf Endothelien. Beide genannten Zytokine sind in der Lage, die Expression von MHC-II-Molekülen auf den ECs, Keratinozyten [36] und anderen epithelialen und Bindegewebszellen zu induzieren und somit atherosklerotische und autoimmune Prozesse sowie die Entwicklung von Transplantatvaskulopathien in Gang zu setzen [37][38].

### 1.7.3 Direkter Weg der Alloantigenerkennung

Die T-Zellaktivierung bei einer Abstossungsreaktion erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen: auf direktem und indirektem. Die direkte Alloantigenerkennung (*direct pathway*) spielt eine wichtige Rolle unmittelbar nach der Transplantation. Im Gegensatz zur „normalen“ Antigenerkennung, bei der das Fremdpeptid gebunden auf den Selbst-MHC-Molekülen präsentiert wird, erkennen die reaktiven T-Lymphozyten bei dem direkten Weg der Alloantigenerkennung ganze MHC-Moleküle auf der Oberfläche von APC des Spenderorgans. Dieses Phänomen lässt sich durch eine Kreuzreaktivität von T-Lymphozyten zwischen Fremdanthigenen im Kontext mit Selbst-MHC-Molekülen und einem Allo-MHC-Peptid-Komplex erklären. Dabei binden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten direkt an MHC-II-Moleküle. Die zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Lymphozyten erkennen MHC-I-Moleküle, müssen aber vorher durch „direkte“  $CD4^+$ -T-Lymphozyten aktiviert werden. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen ohne kostimulatorisches Signal der  $CD4^+$ -Lymphozyten an die MHC-I-Moleküle binden können und somit eine Effektorfunktion bei der direkten Alloantigenerkennung übernehmen [39].

Für eine Aktivierung der antigenspezifischen  $CD4^+$ -T-Lymphozyten ist ein zweites Signal notwendig, welches über die Interaktion von dem auf den APC exprimierten kostimulatorischen

Protein B7 mit CD28, seinem T-Zell-Liganden, initiiert wird. Eine Erkennung des Alloantigens erfolgt dem zu Folge nur in Anwesenheit von APC im Transplantat. „Direkte“ alloreaktive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten werden in der Milz oder in den das Transplantat drainierenden Lymphknoten aktiviert, wo sie eine Interaktion mit den APC des Transplantates eingehen. Eine präoperative Entfernung der APC aus dem Transplantat verhindert die Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten über den direkten Weg der Alloantigenerkennung und reduziert somit eine akute Abstossungsreaktion. Parenchym- und Endothelzellen exprimieren jedoch unter bestimmten Umständen, wie die Stimulation mit *IFN-γ*, die MHC-II-Moleküle. Für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind kostimulatorische Proteine der B7-Familie (CD86 und CD80) erforderlich, welche auf den professionellen APC exprimiert werden, nicht aber auf den ECs. Durch das Fehlen der B7-Proteine erfolgt eine „negative Selektion“ der T-Lymphozyten, so dass sie nach einer späteren Stimulation durch APC nicht mehr aktiviert werden können, was als *clonal anergy* bezeichnet wird. Es wurde jedoch bei Mäusen und Schweinen gezeigt, dass die ECs nach einer *in vitro*-Kultivierung mit CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten B7-Proteine exprimieren. Die Untersuchungen mit humanen ECs ergaben bisher noch keinen Nachweis der B7-Expression. DENTON *et al.* zeigten aber, dass die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach der Kultivierung mit aktivierten humanen ECs selber B7-Proteine exprimieren. Die aktivierten ECs exprimieren LFA-3 (*lymphocyte function-associated antigen 3*), welche über die CD28-abhängige Kostimulation CD86-Expression der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten induziert. Die auf diese Weise aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten produzieren *IFN-γ* und IL-2 [40]. Es bleibt aber noch unklar, ob dieser Mechanismus auch bei einer Alloantigenerkennung *in vivo* eine Rolle spielt.

#### 1.7.4 Indirekter Weg der Alloantigenerkennung

Der indirekte Weg gewinnt nicht nur in der Forschung zunehmend an Bedeutung, sondern auch bei der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen zur Vermeidung der Transplantatabstossung. Zelltrümmer zugrunde gegangener Endothel- oder Parenchymzellen sowie APC des Transplantates werden in die drainierenden Lymphknoten und über die Blutbahn in die Milz abtransportiert. Dort werden die MHC-Fragmente dieser Zellen von den Empfänger-APC aufgenommen, in Peptidantigene der Allo-MHC prozessiert und gebunden an Empfänger-MHC-II-Moleküle den CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten präsentiert.

Bei der Transplantation von mit Allo-ECs besiedelten ePTFE-Prothesen fehlen jedoch APC. Das bedeutet, dass eine gegen Allo-ECs gerichtete Abstossung auf dem indirekten Wege der Alloantigenerkennung erfolgt. Kontrovers wird die Rolle des endothelialen Chimerismus diskutiert, eines Phänomens, bei dem die Spender-ECs durch die Vorläufer-ECs des Empfängers ersetzt werden. Es wird vermutet, dass der endotheliale Chimerismus die Alloreaktivität reduzieren kann [41]. Der Anteil der vom Empfänger stammenden ECs im Endothel des Transplantates ist aber relativ gering, so dass schwer zu beurteilen ist, ob dieses Phänomen bei der Modulation der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielt.

## 1.8 Genetische Gefäßmodifikation

### 1.8.1 Gentransfer

Im fortgeschrittenen Stadium einer generalisierten atherosklerotischen Vaskulopathie erweisen sich autologe Gefäße als ungeeignet für eine Bypass-Therapie. Allogene Gefäßtransplantate lösen eine inflammatorische Immunreaktion aus, die schließlich zur einer Transplantatinsuffizienz führt. Durch eine gentechnische Modifikation kann die Immunogenität des allogenen Gefäßersatzes herabgesetzt und dadurch eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erreicht werden. Alternativ zu einem allogenen Gefäßtransplantat lässt sich mittels *Tissue Engineering* ein alloplastischer Gefäßersatz herstellen. Eine ePTFE-Prothese wird dabei mit autologen ECs besiedelt, welche die Thrombogenität der luminalen Prothesenfläche reduzieren. Für eine dringende Operationsindikation taugen jedoch solche Prothesen nicht, denn das Besiedlungsverfahren nimmt mehrere Tage in Anspruch.

Um dieses Problem zu umgehen, können vaskulären ePTFE-Prothesen mit ECs besiedelt werden, die zuvor genetisch modifiziert wurden. Durch die Modifikation wird ihre Immunogenität erheblich reduziert, so dass auf diese Weise eine Art universeller Gefäßersatz hergestellt werden kann. Solche ePTFE-Prothesen könnten ohne zeitliche Verzögerung jedem Patienten eingesetzt werden.

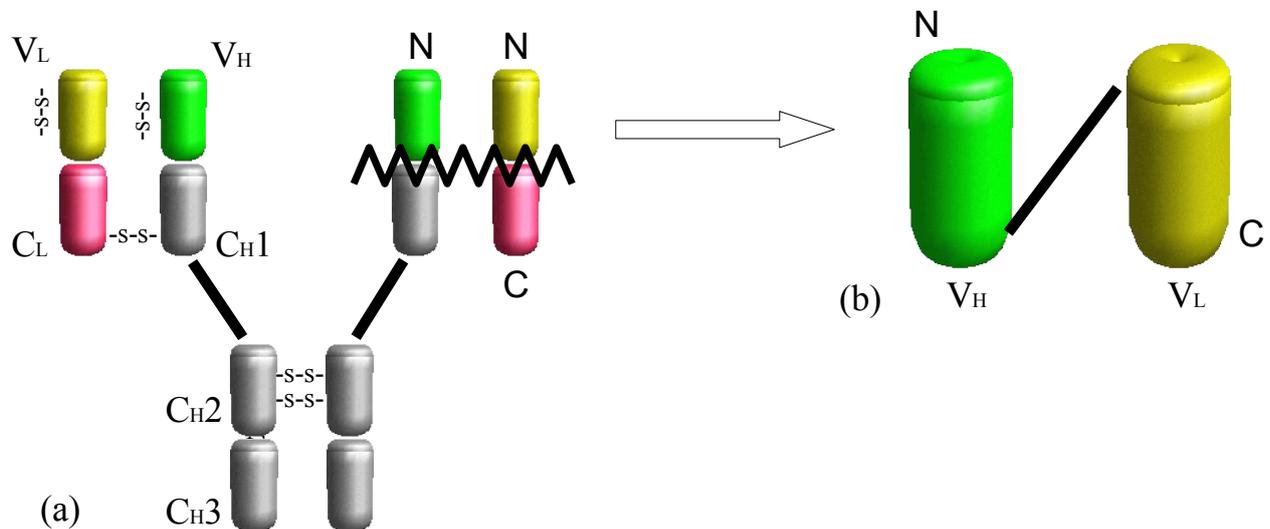
KANKI-HORIMOTO berichtete über erfolgreiche *in vitro* Versuche zur Besiedlung kleinkalibrierter ePTFE-Prothesen mit genetisch modifizierten mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (*medullary stem cells*, MSC) *in vitro*. Dabei wurde  $\beta$ -Gal-cDNA mittels eines adenoviralen Vektor in die MSC transduziert und anschließend die Expression von  $\beta$ -Gal auf der luminalen Oberfläche der ePTFE-Prothesen nachgewiesen [42]. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurden ePTFE-Prothesen entwickelt, deren luminalen MSC eine Überexpression von eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) aufweisen [43]. Rattenmodelle sind demnach geeignet, um die Besiedlung der ePTFE-Prothesen mit genmodifizierten ECs *in vivo* zu untersuchen.

Die am häufigsten bei einem Gentransfer verwendeten Vektoren sind rekombinante Adeno- und Retroviren. Adenoviren besitzen eine hohe Transduktionseffizienz und erreichen somit bei der Transfektion einen hohen intrazellulären Titer. Das Virusgenom wird jedoch nicht chromosomal integriert sondern bleibt extrachromosomal im Zytoplasma. Der Virustiter und die Expression des eingeschleusten Gens nehmen deswegen mit fortdauernder Zellproliferation ab bis sie nicht mehr nachweisbar sind. Der wesentliche Vorteil der Retroviren ist ihre chromosomale Integration in der Zielzelle und die damit verbundene dauerhafte Expression. Die Effizienz der retroviralen Transduktion und der erreichte intrazelluläre Titer sind jedoch niedrig.

### 1.8.2 Intrabody

Die Vorteile des Intrabody-Konzeptes sind neben der hohen Spezifität und Affinität der variablen Antikörperregionen auch ihr niedriges Molekulargewicht und ihre hohe Stabilität in bestimmten zellulären Kompartimenten. Als Intrabody werden im weitesten Sinne Antikörperfragmente bezeichnet, die intrazellulär ihre Zielmoleküle binden können, was praktisch zum Funktionsverlust dieser Moleküle führt. Intrabody ist das kleinste Antikörperformat und besteht aus einem *scFv*-Fragment (*single chain fragment variable*), welches durch die Assoziation der antigenerkennenden variablen Domänen der schweren ( $V_H$ ) und der leichten ( $V_L$ ) Antikörperketten entsteht [44][45]. Die beiden variablen Domänen werden zur Stabilisierung durch

ein Linkerpeptid miteinander verknüpft. Jede der beiden variablen Ketten von *scFv* trägt drei hypervariable komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementary determining regions*, CDR 1-3), die zusammen (analog zu Antikörpern) die Antigenbindungsstelle von Intrabody bilden. Die Abbildung 1.5 zeigt vergleichend Antikörper- und Intrabodystruktur.

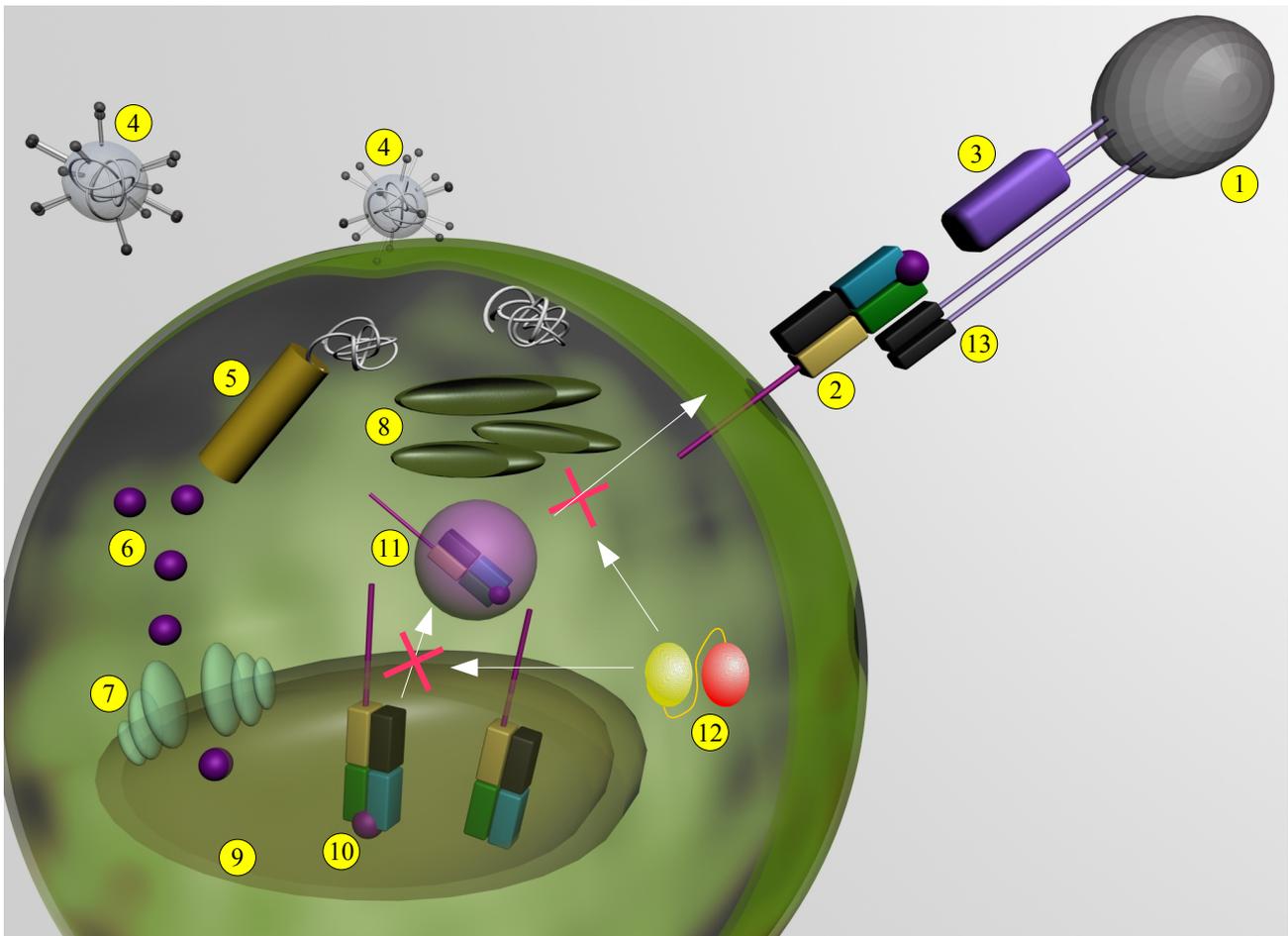


**Abbildung 1.5:** (a): Antikörper bestehen aus zwei gleichen schweren (H) und zwei gleichen leichten (L) Ketten, die über Disulfidbrücken (-S-S-) miteinander verknüpft sind. Über Disulfidbrücken sind ebenfalls variable Regionen der schweren und leichten Ketten verbunden (V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>), die antigenerkennende Strukturen tragen. Leichte besitzen eine und schwere Ketten drei konstante Domänen (C<sub>L</sub> und C<sub>H</sub>).

(b): Das *Single Chain Variable Fragment* (*scFv*) besteht aus einer V<sub>L</sub> und einer V<sub>H</sub>, verbunden über ein Linkerpeptid. Die (N)-Enden beider Domänen sind für Antigenerkennung und -bindung zuständig.

*ScFv* kann auf vielfache Weise die Funktion intrazellulärer Proteine beeinflussen. Durch das entsprechende Design kann es die komplementären Proteine in fast jedem Zellkompartiment binden. *ScFv* kann strukturelle und regulatorische Proteine inaktivieren und mit Nukleotiden interagieren. Bei einer Molmasse von 30 kDa kann es intrazellulär mit der Spezifität und der Affinität eines Antikörpers das jeweilige Antigen (Protein oder Nukleotid) binden, so dass das Antigen durch seine Konformationsänderung oder durch eine veränderte Lokalisierung inaktiviert wird [46]. Die Abbildung 1.6 zeigt schematisch die Interaktion zwischen MHC-I-Molekülen und anti-MHC-I-Intrabody.

Die Modulation der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen durch die Transduktion von ECs mit einem anti-MHC-I-Intrabody ist eine geeignete Strategie, die Immunogenität der ECs zu mindern und dadurch eine Immunreaktion gegen das Transplantat zu reduzieren. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass durch die adeno- und lentiviralen Zelltransduktion mit anti-MHC-I-Intrabody ein „MHC-I-*knock out*“-Phänotyp erzeugt werden kann [47] [48]. Der Benefit der reduzierten MHC-I-Expression zeigte sich in einer starken Verminderung zytolytischer Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten im Vergleich zu den nichttransduzierten Zellen.



**Abbildung 1.6:** Endogene Antigene werden durch MHC-I-Moleküle präsentiert. Der Antigen-MHC-I-Komplex wird vom  $CD8^+$ -T-Lymphozyten erkannt. Der anti-MHC-I-Intrabody bindet intrazellulär die MHC-I-Moleküle und reduziert hiermit ihre Zelloberflächenexpression.

1:  $CD8^+$ -T-Lymphozyt, 2: MHC-I 3: T-Zellrezeptor, 4: Antigene, 5: Proteasom, 6: Peptidantigene, 7: TAP-Komplex, 8: Golgi-Komplex, 9: ER, 10: Antigen-MHC-I-Komplex, 11: Transportvehikel für MHC-I-Moleküle, 12: anti-MHC-I-Intrabody, 13: Korezeptor. <sup>5</sup>

<sup>5</sup>Bild Vladimir Mensing

## Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer Konzepte für die Generierung geeigneter allogener Gefäßersatzmaterialien mittels Hemmung der allogenen Immunogenität. Folgende Teilaspekte wurden bearbeitet:

- Entwicklung von Methoden zur Besiedlung von künstlichen Gefäßersatzmaterialien (ePTFE-Prothesen) mit Rattenaortenendothelzellen (RAEC) *in vitro*.
- Etablierung eines *in vivo*-Transplantationsmodells für besiedelte ePTFE-Prothesen in der Ratte.
- Analyse des Einflusses einer MHC-I Modulation durch Expression von anti-MHC-I-Intrabody auf RAEC, als Bestandteil von ePTFE-Transplantaten.
- *Ex vivo* Gentransfer von anti-MHC-I-Intrabody in A.carotis-Transplantate der Ratte und deren orthotope Transplantation *in vivo*.
- Analyse der allogenen Abstoßungsreaktion, insbesondere der zellulären Infiltration und der Intimahyperplasie, in A.carotis-Transplantaten nach Expression von anti-MHC-I-Intrabody.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.1:** Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalien und Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma, Steinheim
Agar	Gibco, BRL, Gaithersburg, USA
Agarose	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
AmpliTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase, Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems PE, Rodgau-Jügesheim
Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen
Aquatex <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Saint Louis, USA
Ethanol	Baker Analyzed, Deventer, Ne
Formalin	Sigma, Steinheim
Gelatine	Sigma, Steinheim
Gentamicin	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Sigma, Steinheim

Fortsetzung auf der nächsten Seite ...

<u>Chemikalien und Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
Glutaraldehyd	Sigma, Steinheim
Glycerol	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hepes-Puffersubstanz	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Baker Analyzed, Deventer, Ne
Killik-Einbettmedium	Bio Optica, Milan, It
MMLV-Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
dNTP 's	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sv
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
Papain	Sigma, Steinheim
Penicillin	Life Technologies, Karlsruhe
Pferdeserum	Sigma, Steinheim
RNaseA	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase, Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blue	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, Steinheim

Chemikalien und Reagenzien

## 2.1.2 Materialien

**Tabelle 2.2:** Materialien

<u>Materialien</u>	<u>Hersteller</u>
6-,24-,48-,96-well Flach- und Rundbodenplatten	Nunc,Roskilde, Dk Falcon, Oxnard, USA
Alpha Graft <sup>®</sup> ePTFE-Prothesen	Alpha Research, Berlin
Beriplast <sup>®</sup> P Combi-Set 1ml	Aventis Behring, Marburg
Gelita Tampon 8x5x1 cm	Braun, Tuttlingen
Einfrierröhrchen (Cryo Tube <sup>™</sup> Vials)	Nunc,Roskilde, Dk
<u>Einmal-Injektionskanülen:</u> Neolus <sup>®</sup> 27G $3/4$ " Sterican <sup>®</sup> 23G 1", 18G $1\frac{1}{2}$ "	Terumo <sup>®</sup> , Leuven, Be Braun, Melsungen
Einwegpipetten 5/10/25ml	Greiner, Nürtingen
Eppendorfgefäße 0,5/1,5/2ml	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturröhrchen 15/50ml	Falcon, Oxnard, USA
Kulturflaschen T25/T75	Falcon, Oxnard, USA
Mikropipetten 0,5/10/20/100/1000 $\mu$ l	Eppendorf
<u>Nahtmaterial:</u> Vicryl <sup>®</sup> 2-0 Ethibond <sup>®</sup> 2-0 Prolene <sup>®</sup> 7-0, 10-0 NYLON BLACK 10-0 Nylon 10-0, Typ V	Ethicon <sup>®</sup> , Jonson&Johnson, B Ethicon <sup>®</sup> , Jonson&Johnson, B Ethicon <sup>®</sup> , Jonson&Johnson, B OOO Kontur, Ru S&T <sup>®</sup> , Neuhausen, CH
Röntgenfilmentwickler, -fixierer	Kodak, Chalon, Fr
<u>Silikon-Analyseschlauch:</u> Innen- $\varnothing$ 1,2mm/ Außen- $\varnothing$ 2,0mm Innen- $\varnothing$ 0,5mm/ Außen- $\varnothing$ 0,8mm Innen- $\varnothing$ 0,3mm/ Außen- $\varnothing$ 0,7mm	Thomafluid <sup>®</sup> , Reichelt Chemietechnik, Heidelberg
Spritzen Omnifix <sup>®</sup> 1/5/20/50ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,2/0,45 $\mu$ m	Schleicher Schuell, Dassel
Transfer-Pipette, 3,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht

### Materialien

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 2.3:** Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	Gössner, Hamburg
Besiedlungskammer (Tube Chamber System TCS 2c®)	Oligene, Berlin
Einfrierbox Nalgene™	Nunc, Roskilde, Dk
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand, It
Elektrophoresekammer	Renner, Dannstadt
Durchflusszytometer FACSort®/FACScan®	Becton Dickinson, San Jose, USA
Feinpipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Fotoausrüstung AxioCam® + AxioVision® 3.0	Zeiss, München
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart
Gel Imager & E.A.S.Y. Enhanced Analyses System	Herolab, Wiesloch
Gelkammer	Renner, Dannstadt
GeneAmp®5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Glaswaren	Schott, Mainz
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Berlin
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Kryotom	SLEE, Mainz
Lichtmikroskop	Leica, Braunschweig
RNA/DNA-Kalkulator Gene Quant®II	Pharmacia, Uppsala, Se
Schüttelinkubator Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Schüttler, Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Sterilwerkbänke	Heraeus, Berlin
Thermocycler 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
<u>Zentrifugen:</u> Biofuge Fresco Centricon T-324 Centrifuge 5410 eppendorf Megafuge 1.0 Ultrazentrifuge L7-55	Heraeus, Berlin kontron, Neufahrn Eppendorf, Hamburg Heraeus, Osterode Beckman, USA

Geräte

## 2.1.4 Medikamente

**Tabelle 2.4:** Medikamente

<u>Medikamente</u>	<u>Hersteller</u>
Ketavet <sup>®</sup> (Ketamin)	Pharmacia& Upjohn GmbH, Erlangen
Valium <sup>®</sup> (Diazepam)	Roche, Reinach, CH
Temgesic <sup>®</sup> (Buprenorphin)	Essex pharma, München
Zinacef <sup>®</sup> (Cefuroxim)	GlaxoSmithKline, München
Bepanthen <sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Cutasept <sup>®</sup> Antiseptikum	Bode Chemie, Hamburg

Medikamente

## 2.1.5 Instrumente

**Tabelle 2.5:** Instrumente

<u>Instrumente</u>	<u>Hersteller</u>
Applikationspinzette für Gefäßklemmen B-2	Fine Science Tools, Heidelberg
Mikro-Nadelhalter Barraquer <sup>®</sup>	Surgical Instruments & Hospital Supplies, Tuttlingen
<u>Mikrochirurgische Gefäßklemmen:</u>	
Vascular clamp B-2 Vascular clamp, Moria <sup>®</sup> 200/A	Fine Science Tools, Heidelberg
<u>Mikrochirurgische Pinzetten:</u>	
Dumont <sup>®</sup> Moria <sup>®</sup> MC40	Fine Science Tools, Heidelberg
Mikrochirurgische Schere, gebogen	Fine Science Tools, Heidelberg
Nadelhalter	B.Braun, Aesculap <sup>®</sup> Melsungen
Pinzetten	B.Braun, Aesculap <sup>®</sup> Melsungen
Scheren	B.Braun, Aesculap <sup>®</sup> Melsungen
Skalpelle	B.Braun, Aesculap <sup>®</sup> Melsungen

Instrumente

## 2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

**Tabelle 2.6:** Puffer, Lösungen und Medien

ABC-Peroxidase-Komplex	5 ml TBS, 1 Tr. Reagenz A, 1 Tr. Reagenz 2
EBM	PAA, Pasching, A
Einfriermedium	10% DMSO in FKS
FACS-Puffer	2% (v/v) FKS, 0,1% (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS
Kulturmedium für RAEC	2mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamicin, 10% FKS, add EBM
PBS (kommerziell)	Phosphate Buffered Saline (PAA, Pasching, A)
PBS (1L)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/PS	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in PBS
TBS-Waschpuffer	10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20

Puffer, Lösungen und Medien

## 2.1.7 Antikörper

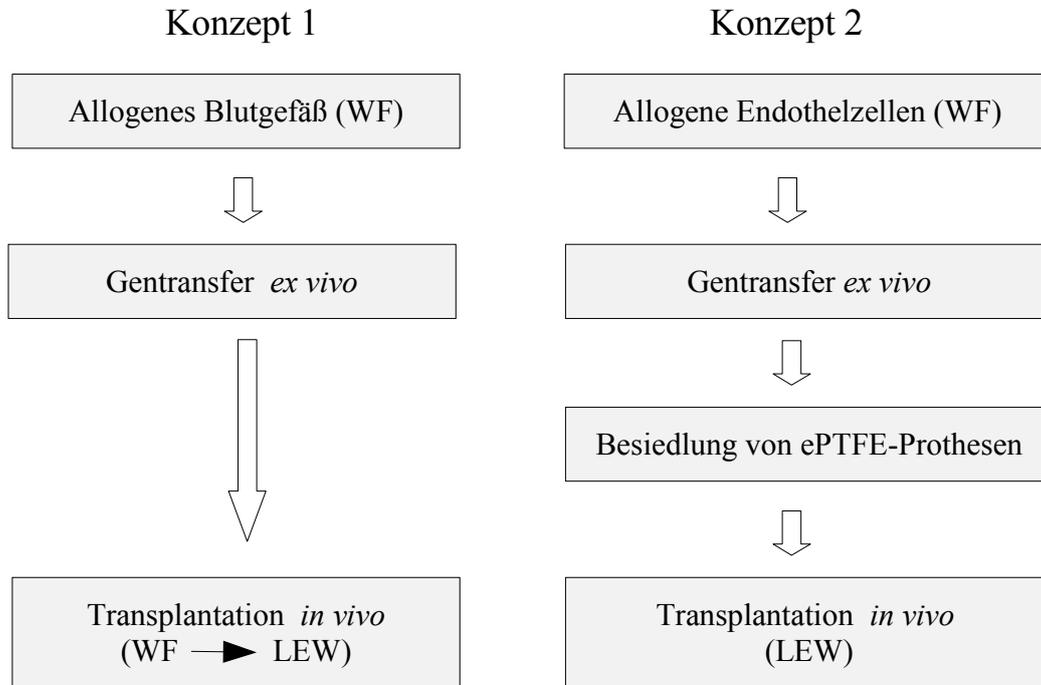
**Tabelle 2.7:** Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
anti-CD4 <sup>+</sup>	Serotec, Düsseldorf
anti-CD8 <sup>+</sup> (MRC OX-8)	Serotec, Düsseldorf
anti-CD68 <sup>+</sup> (ED1)	Serotec, Düsseldorf
<i>anti-α-Aktin</i>	Sigma, Steinheim
anti-CD31 <sup>+</sup>	BD Bioscience, Heidelberg
anti-vWF	Sigma, Steinheim
anti-MHC-I( <i>Ox18</i> )	BD Bioscience, Heidelberg
<i>anti-mouse-IgG</i> (H+L) (Biotin-markiert)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>F(ab)<sub>2</sub> anti-rat-IgG</i> (FITC-markiert)	Serotec, Düsseldorf
anti-Kaninchen-IgG (FITC-markiert)	Sigma, Steinheim
<i>anti-IgG1κ</i> Isotyp-Kontrolle (MOPC-21)	Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Kaninchen-anti-vWF-Antiserum	Sigma, Steinheim

Antikörper

## 2.2 Tiermodelle

Zur Untersuchung der anti-MHC-I-Intrabody-Transduktion in RAEC *in vivo* wurden in dieser Arbeit zwei Ratten-Modelle etabliert. Die Abbildung 2.1 stellt das Konzept der Arbeit dar.



**Abbildung 2.1:** Zwei Tiermodelle für die Untersuchung adenoviraler und lentiviraler anti-MHC-I-Intrabody-Transduktion in RAEC bei allogener Transplantation

Im Carotis-Modell wurde die Transduktion der allogenen vaskulären Transplantate mit einem adenoviralen anti-MHC-I-Intrabody-Konstrukt untersucht. Zunächst wurde der Wistar-Furth Ratte (WF) ein Segment der A.carotis entnommen und mit dem anti-MHC-I-Gen tragenden Adenovirus *Ad-Ox18scFv* inkubiert. Auf diese Weise gewonnene genmodifizierte allogene Gefäßtransplantate wurden im nächsten Schritt in die A.carotis der Lewis-Ratte (LEW) verpflanzt. Im zweiten Modell wurden ePTFE-Gefäßprothesen mit 2 mm  $\varnothing$  verwendet. Die ECs wurden nach der Methode von NICOSIA *et al.* aus der Aorta einer LEW- bzw. WF-Ratte gewonnen und in konventionellen Kulturflaschen gezüchtet. Die entstandene Zellkultur wurde anschließend mit einem lentiviralen Konstrukt (*Le-Ox18scFv*) transduziert. Das Virus trägt die Sequenz eines Intrabody, der *in vitro* die Expression der MHC-I Moleküle an der Oberfläche der Endothelzellen herunterreguliert. Anschließend wurde die Prothese mit auf diese Weise modifizierten ECs kultiviert. Nachdem sich eine konfluente ECs-Schicht gebildet hatte, wurde sie in die Bauch-aorta einer LEW-Ratte interponiert. Nach definierten Zeiträumen wurden die Transplantate in beiden Modellen wieder entnommen. Anschließend wurden die Präparate auf morphologische Strukturveränderungen, zelluläre Infiltration, Zytokinexpression, endotheliale Expression von MHC-I und *Ox18scFv* und auf die Bildung von Alloantikörpern untersucht.

## 2.3 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 200-350 g schweren, 6-10 Wochen alten, männlichen LEW- und WF-Ratten aus der Zucht von *Harlan-Winkelmann, Borcheln* durchgeführt. Alle Tiere erhielten Standardfutter und Leitungswasser. Präoperativ wurde keine Nahrungskarenz eingehalten. Die Ratten wurden in Gruppen von zwei bis fünf Tieren pro Käfig gehalten. Die Umweltbedingungen wurden mit einer Temperatur von 20°C ( $\pm$  2°C), einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem Tag-Nachtzyklus von je 12 h konstant gehalten.

Das Aktenzeichen der behördlichen Genehmigung für die Tierversuche: G0338/00 vom 23.04.2001.

### 2.3.1 Vorbereitung zur Transplantation

Die Versuchstiere wurden im Alter von 6 bis 10 Wochen operiert. Alle Operationen erfolgten in Rückenlage, die Ratten wurden dabei an Vorder- und Hinterbeinen auf einer Präparierplatte fixiert. Alle erhielten eine Injektionsnarkose, die mit 4 mg/kg i.m. *Ketavet*<sup>®</sup> und 0,5 mg/kg i.m. *Relanium*<sup>®</sup> i.m. eingeleitet wurde. Bei Bedarf wurde intraoperativ für den Erhalt der Narkose *Ketavet*<sup>®</sup> nachdosiert. Um einem Austrocknen der Cornea während der OP vorzubeugen, wurde eine *Bepanthen*<sup>®</sup>-Augensalbe aufgetragen. Das Operationsfeld wurde rasiert und mit *Cutasept F*<sup>®</sup>-Antiseptikum desinfiziert. Zur perioperativen Antibiotikaprophylaxe wurde 100 mg/kg i.m. *Zinazef*<sup>®</sup> verabreicht.

## 2.4 ePTFE-Prothese mit anti-MHC-I modifizierten allogenen Endothelzellen

### 2.4.1 Virale Transduktion der RAEC

Für die anti-MHC-I-Modifikation der allogenen RAEC wurde ein lentivirales Konstrukt hergestellt, welches das anti-MHC-I-Intrabody-Transgen (*Ox18scFv*) kodiert. Die lentivirale Gen-Transduktion ermöglicht eine dauerhafte und stabile Expression des gewünschten Proteins. Die Transfektionsversuche wurden mit der freundlichen Unterstützung von Cornelia Doebis vom Institut für Medizinische Immunologie durchgeführt.

Die RAEC wurden auf 24-well Kulturplatten bzw. auf 6 cm-Petrischalen bis einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Dies entspricht einer Zellkonzentration von ca.  $1 \times 10^5$  pro 24-well Kulturplatte bzw.  $1 \times 10^6$  pro Schale. Für die adenovirale Zellinfektion wurde eine definierte Anzahl von Viruspartikeln in ein entsprechendes Mediumvolumen (EBM/2%FCS) unter Zugabe von 8  $\mu\text{g/ml}$  Polybrene aufgenommen, so dass sich eine MOI von 100 ergab. Die MOI (multiplicity of infection) gibt die Anzahl der Viruspartikel pro infizierte Zelle an. Die Transduktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l/well}$  (24-well Platte) Viruslösung für 30 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurde 1 ml/well EBM/10%FKS zugesetzt. Die Zellen wurden nun weitere 48 h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

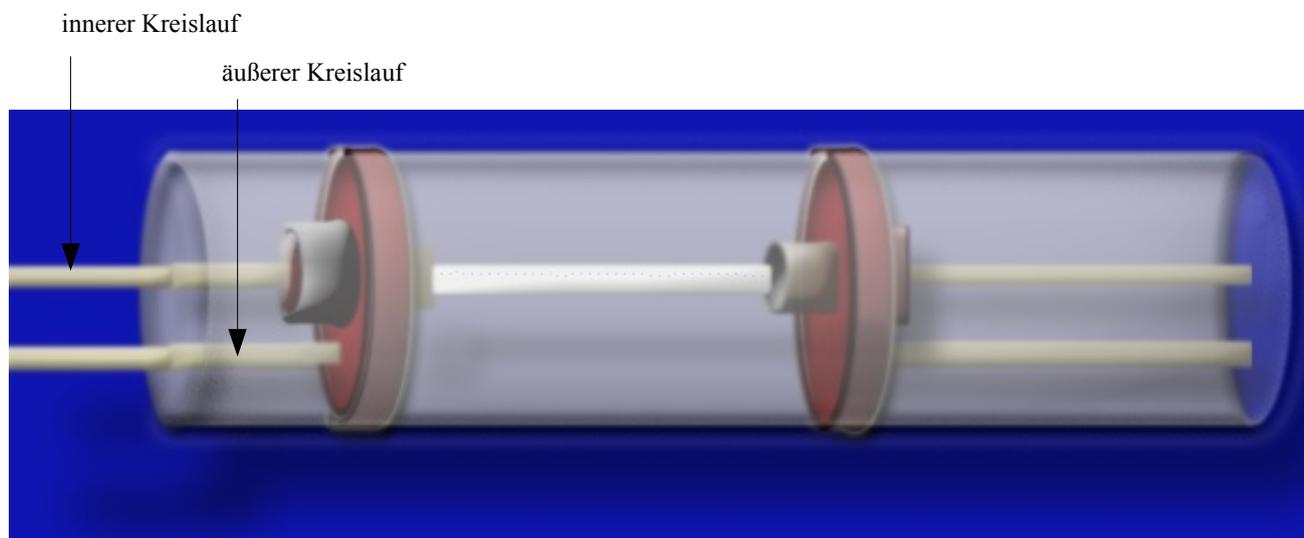
Die lentivirale Transduktion erfolgte in der Viruslösung (MOI 100) (in EBM/10% FKS) unter Zugabe von 100  $\mu\text{g/ml}$  DEAE-Dextran im Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l/well}$  (24-well Platte) für 18 h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde die Infektionslösung durch ein frisches EBM/10% FKS (1 ml/well in 24-well Platte) ausgetauscht.

## 2.4.2 Besiedlung der ePTFE-Prothese mit ECs

### 2.4.2.1 Tube Chamber System

In unserer Arbeit wurden vaskuläre ePTFE-Prothesen *Alpha Graft*<sup>®</sup> der Firma ALPHA RESEARCH mit dem Innendurchmesser von 2 mm verwendet, während zur Besiedlung der ePTFE-Prothese mit durch anti-MHC-I-Intrabody transduzierten Ratten-ECs das *Tube Chamber System TCS 2c*<sup>®</sup> der Firma OLIGENE (Berlin) zur Anwendung kam.

Die Abbildung 2.2 zeigt das Prinzip der Besiedlungskammer. Das System besteht aus zwei Kreisläufen. Die vaskuläre ePTFE-Prothese, die zwischen zwei Anpressringen eingespannt ist, gehört zum inneren Kreislauf. In die Anpressringe sind ebenfalls Schläuche des äußeren Kreislaufs eingelassen, so dass die ePTFE-Prothese in das Kulturmedium eingetaucht ist.



**Abbildung 2.2:** Das Prinzip der Besiedlungskammer (*Tube Chamber System TCS 2c*<sup>®</sup>)

Das Lumen und die äußere Oberfläche der ePTFE-Prothese sind unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Lösungen perfundierbar. Turbulente Strömungen an den Übergängen zwischen der Prothese und der Kammer werden durch das spezielle Design der Anschlussstutzen ausgeschlossen. Das komplett autoklavierbare *Tube Chamber System TCS 2c*<sup>®</sup> bietet zudem eine visuelle Kontrollmöglichkeit durch den transparenten Hohlzylinder. Die Kammer besteht aus 3 Teilen: einem Hohlzylinder und zwei Kammerkolben. Der durchsichtige Hohlzylinder bildet den Korpus des *TCS 2c*<sup>®</sup>. Die Kammerkolben verschließen die beiden Seiten des Hohlzylinders. In den Kammerkolben sind die Anschlüsse für den Zu- und Abfluss der Perfusionslösung eingelassen. Die ePTFE-Prothese wird über spezielle Adapter an den Kammerkolben angeflanscht. Durch Festdrehen der Spannmutter des beweglichen Kammerkolbens wird dieser gegen die Innenwandung des Hohlzylinders abgedichtet<sup>6</sup>.

<sup>6</sup>Produktinformation der Firma OLIGENE<sup>®</sup>

Die genaue Anleitung zur Montage des *Tube Chamber Systems* ist unter [www.oligene.de](http://www.oligene.de) verfügbar

Nach der Montage wird die *Tube Chamber* mit einer zwischen zwei Kammerkolben eingespannten ePTFE-Prothese in eine dampfdurchlässige Sterilisationsfolie eingewickelt und ca. 20 min im Dampfsterilisator bei 121°C sterilisiert. Nach Abkühlung wird die Schutzfolie unter sterilen Bedingungen unter der Box entfernt.

### 2.4.2.2 Beschichtung mit Fibrinkleber



**Abbildung 2.3:** Aufbau der Besiedlungskammer

Um optimale Bedingungen für die Zelladhäsion gewährleisten zu können, wurden die Prothesen mit Fibrinkleber beschichtet.

Zur Beschichtung der Prothesen mit Fibrinkleber (Beriplast P®Combi-Set 1ml) kam eine modifizierte Methode nach *Zilla* zur Anwendung [49]. Die Mengenangaben und Konzentrationen der Fibrinogenkomponente und der Thrombinlösung zur Beschichtung beziehen sich jeweils auf eine 10 mm lange Gefäßprothese (Innendurchmesser 2 mm).

Um einen vollständigen Verschluss des Prothesenlumens zu vermeiden wurden zwei Verdünnungen (1:25 und 1:50) von Thrombin verwendet.

## Beschichtung

- Der Hohlzylinder wird in einem Stativ senkrecht befestigt. Die kürzeren Schläuche an einem Kammerkolben sind dabei nach unten gerichtet. Unter dem Hohlzylinder wird eine große Petrischale platziert.
- Die Luer-Anschlüsse des äußeren Kreislaufes werden mit Schraubenverschlüssen abgedichtet.
- Zunächst wird die Prothese über den axialen Verbindungsschlauch mit PBS-Lösung gespült, um Reste des Destillierwassers nach der Sterilisation zu entfernen.
- In eine Insulinspritze wird 0,5 ml Fibrinogenlösung aspiriert und dann ohne Kanüle an den unteren Luer-Anschluss des inneren Kreislaufes gesetzt. Die Prothese wird blasenfrei mit Fibrinogenlösung gefüllt.
- Der obere Luer-Anschluss wird verschlossen, damit die Fibrinogenlösung nicht herunterläuft.
- Die Insulinspritze wird vom unteren Anschluss gelöst und durch eine andere, mit PBS-Lösung gefüllte, ersetzt.
- Durch vorsichtiges Hineinpressen von PBS-Lösung über den unteren Anschluss wird der Druck im inneren Kreislauf und dementsprechend im Lumen der Prothese aufgebaut.

Beim Druckaufbau wird die Fibrinogenlösung durch die Poren in der Prothesenwand herausgepresst, was auch durch Bilden kleiner Tropfen auf der Außenseite der Prothese sichtbar ist. Der Druckaufbau erfolgt langsam, um das Prothesenmaterial möglichst gleichmäßig mit Fibrinogen zu durchtränken.

- Anschließend wird das Lumen der Prothese und des inneren Kreislaufes dreimal mit PBS-Lösung gespült.
- Die ePTFE-Prothese wird mit Thrombinlösung (Verdünnung 1:50) gefüllt. Diese sollte man sofort auslaufen lassen, um durch Fibrinogenpolymerisation entstehende Fibrinpuffen zu vermeiden. Der innere Kreislauf wird mit einer leeren 20 ml-Spritze mit Luft gespült, um das Lumen der Prothese offen zu halten. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Beim dritten Mal wird die Thrombinlösung in in der Prothese für ca. 1 Minute belassen.
- Die Prothese wird mit der vorbereiteten Thrombinlösung (Verdünnung 1:25) gefüllt und durch die Prothesenwand herausgepresst, um die Fibrinogenpolymerisationsvorgänge zu optimieren. Zum Schluss wird die Prothese mit 30 ml PBS-Lösung gespült und bis zur Besiedlung in PBS aufbewahrt.



**Abbildung 2.4:** Eingespannte ePTFE-Prothese wurde mit RAEC besiedelt und die Außenkammer mit Zellkulturmedium gefüllt

Nachdem die ePTFE-Prothese mit Fibrin beschichtet worden war, wurde sie mit Endothelzellsuspension gefüllt. Für die Besiedlung einer Prothese mit der Länge von 3 cm wurden  $3 \times 10^6$  durch Trypsinisierung geerntete RAEC in  $400 \mu\text{l}$  EBM/10% FKS aufgenommen. Die eingespannte Prothese mit flankierenden Schläuchen wurde zunächst mit PBS-Lösung gefüllt. Der obere längere Schlauch wurde offen gelassen. Über den unteren kürzeren Schlauch wurde die Prothese mit der ECs-Suspension gefüllt. Die PBS-Lösung im oberen Abschnitt entweicht dabei über den längeren Schlauch, so dass die ECs-Suspension das gesamte Lumen der ePTFE-Prothese ausfüllt. Die PBS-Lösung verhindert dabei eine Ausbreitung der ECs-Suspension in die Schläuche,

wodurch eine hohe Konzentration der ECs im Prothesenlumen aufrechterhalten wird. Anschließend wurde die Außenkammer mit EBM/10% FKS gefüllt, so dass die Prothese in waagerechter Position vollständig bedeckt war (Abbildung 2.4). Es erfolgte eine Inkubation der Prothese in der *Tube Chamber* über 4 h unter Rotation von 1 rpm bei  $37^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden beide Kreisläufe der *Tube Chamber* an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und die Perfusionsgeschwindigkeit innerhalb der nächsten 4 h kontinuierlich bis auf  $10 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$  gesteigert. Die besiedelte ePTFE-Prothese in der *Tube Chamber* wurde weitere 48 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 2.4.3 Transplantation

Die A.abdominalis der LEW- und WF-Ratten misst ca. 1 mm im Durchmesser. Die kleinsten vaskulären ePTFE-Prothesen, die für tierexperimentelle Zwecke serienmäßig hergestellt werden, haben ein Durchmesser von 1,5-2,0 mm. Nach unserer Information wurden kleinere, 1 mm  $\varnothing$  ePTFE-Prothesen früher zu Etablierung rein mikrochirurgischer Operationsmethoden verwendet und sind zur Zeit auf dem Markt nicht mehr verfügbar. Der innere Durchmesser der von uns verwendeten ePTFE-Prothesen (Abb. 2.5-a) ist doppelt so groß wie der einer A.abdominalis der Ratte (Abb. 2.5-c). Bei einer direkten Anastomose erreicht der Umfang der Arterie das Zweifache seines Ausgangswertes  $Umfang = 2\pi \cdot r$ , bei  $r_{ePTFE} = 2 \cdot r_{Arterie}$ . Durch die entstehenden Zugkräfte im Anastomosenbereich reißt die Gefäßwand ein, was zu einer Anastomoseninsuffizienz führt. Um dieses Problem zu umgehen, etablierten wir ein mikrochirurgisches Transplantationsmodell, bei dem eine 2 mm  $\varnothing$  ePTFE-Prothese über einen Adapterring aus Silikon (Abb. 2.5-b) mit der A.abdominalis der Ratte anastomosiert wurde.

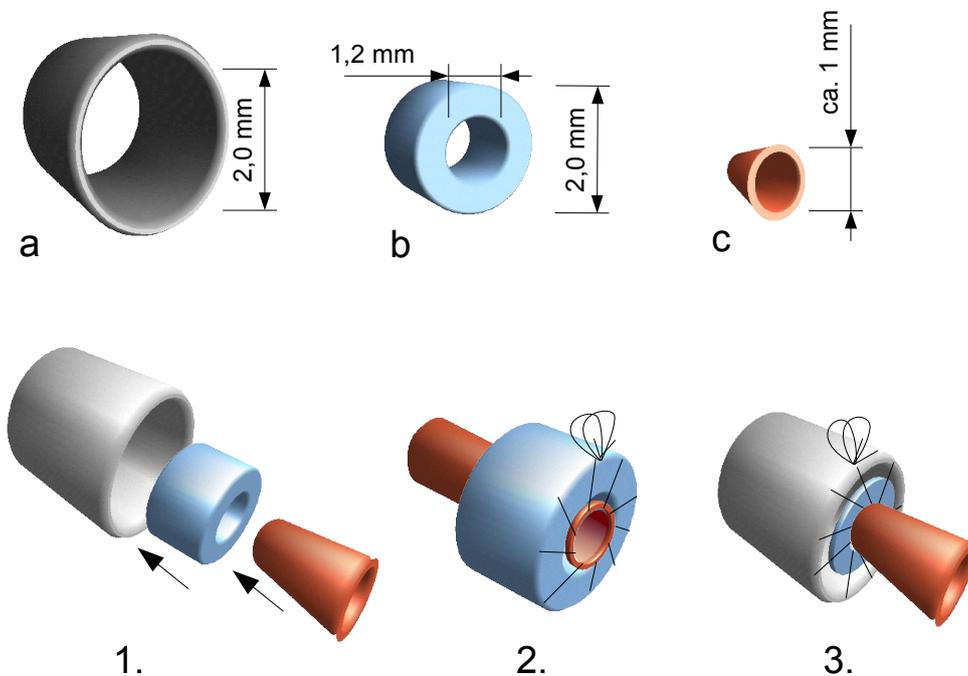


Abbildung 2.5: Das Prinzip der Cuff-Technik

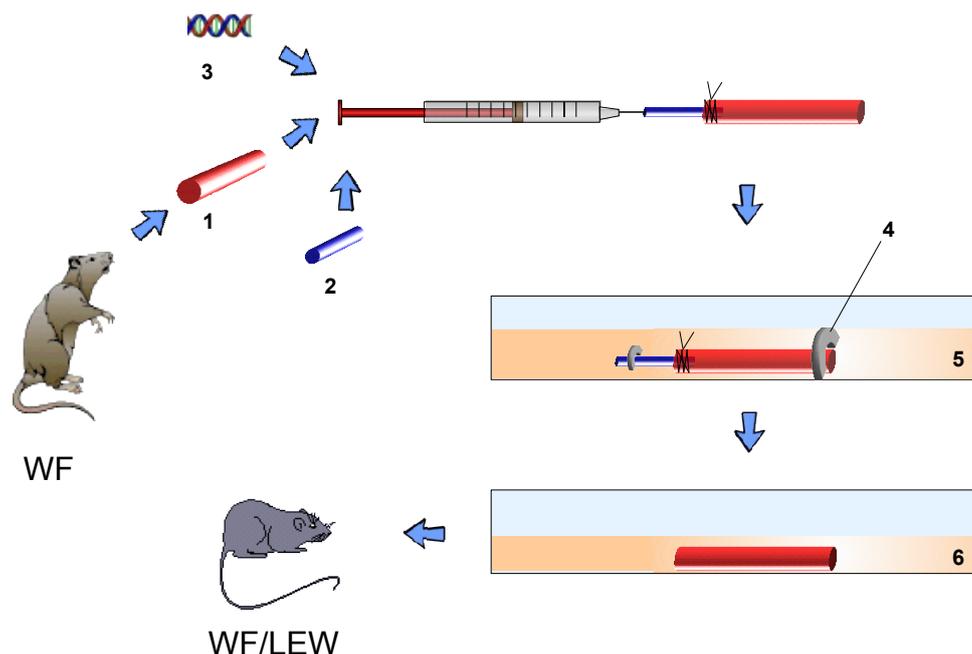
Bei der *Cuff-Technik* (Abb. 2.5-1.) werden ein Adapterring und die A.abdominalis teleskopartig in die ePTFE-Prothese hineingeschoben. Dabei wird zunächst ein Adapterring an einem Ende mit der Arterie (Abb. 2.5-2.) und dann am anderen Ende mit der ePTFE-Prothese (Abb. 2.5-3.) anastomosiert.

Unmittelbar vor der Operation wurde die *Tube Chamber* unter sterilen Bedingungen auseinander gebaut. Dabei wurden von jedem Prothesenrand ca. 0,5 cm lange Segmente entfernt, die durch Instalation im *Chamber-System* beschädigt worden waren. Ein 0,5 cm langer Segment wurde reseziert und für die Bestimmung der Besiedlungsdichte verwendet. Für die Transplantation wurden nur diejenigen Prothesen verwendet, die ein geschlossenen Zellrasen aufwiesen. Das verbliebene 3 cm langes Prothesenstück wurde bis zur Transplantation in Kulturmedium unter 37°C aufbewahrt.

## 2.5 Allogene, mit anti-MHC-I-modifizierte Rattenkarotiden

### 2.5.1 Adenovirale Transduktion in die Rattenkarotiden

Die *Ad-Ox18scFv*-Transduktion der allogenen Carotistransplantate ist schematisch in der Abbildung 2.6 dargestellt.



**Abbildung 2.6:** Adenovirale Transduktion in die Rattenkarotiden.

1: A.carotis (WF); 2: Silikonschlauch; 3 und 5: Virussuspension; 4: mikrovaskulärer Clip; 6: EBM-Medium

Direkt nach der Explantation wurde jede Donorarterie zum Entfernen von Blutresten mit PBS gespült. Nach einer gründlichen Spülung unmittelbar vor der Transduktion wurde ein 2 cm langes Carotissegment in eine  $\varnothing$  3,5 cm Schale gelegt. Ein 3 cm langes Stück des Silikonschlauches (Innendurchmesser 0,5 mm, Außendurchmesser 0,8 mm) (Thomaflud<sup>®</sup>, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, G) wurde zurecht geschnitten. Das eine Ende des Silikonröhrchens wurde in das proximale Lumen eines entnommenen Gefäßes hineingeführt und mit einem 10-0 Faden (S&T, Neuhausen, Switzerland) fixiert. Eine 27 Gauge Kanüle wurde nun in das andere Ende in das Röhrchen eingeschoben. Anschließend wurden 150  $\mu$ l EBM bzw. EBM/2%FCS mit  $2 \times 10^8$  pfu Ad-Konstrukt (adenovirales Konstrukt) mittels einer Insulinspritze durch die Kanüle ins Gefäßlumen appliziert. Sobald der Austritt von Viruslösung am anderen Ende des Gefäßes optisch zu beobachten war, wurde das Gefäß am distalen Ende mit einem mikrovaskulären Clip (FST GmbH, Heidelberg, Germany) verschlossen. Mit der Spritze wurde noch weiter vorsichtig nachgedrückt, bis das Gefäß prallgefüllt war, und anschließend am proximalen Ende mit einem Gefäßclip verschlossen. Das Gefäß wurde dann in die restliche Viruslösung eingelegt und

in einer 36 cm  $\varnothing$  Kulturschale für ca. 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Mikroclips wurde das Carotissegment mit PBS sowohl von außen als auch intraluminal gründlich gespült und schließlich über 24 h in komplettem EBM-Medium bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 2.5.2 Transplantation

Unter dem Dissektionsmikroskop erfolgte zunächst mit einem Skalpell ein Mittellinienschnitt der Halsregion vom Bereich der Insertionsstelle des Musculus masseter bis oberhalb des Manubrium sterni, die Muskelschichten über der Mittellinie wurden stumpf auseinander gedrängt. Die Speicheldrüsen wurden medial vorsichtig anatomisch vom umgebenden Gewebe gelöst und auf die laterale Seite geklappt. Anschließend präparierte man stumpf mit einer geraden (*S&T*<sup>®</sup> JF-3 TC) und einer gebogenen (*S&T*<sup>®</sup> JFC-7 TC) Pinzette die einzelnen Halsmuskeln und zog diese mit Spitzhacken zur Seite. Nach stumpfem Präparieren und Darstellung der A.carotis communis (ACC) wurde diese oberhalb der Clavicula sowie weiter distal, bifurkationsnah mit zwei geschienten Gefäßklemmen (ABB-22 nach *Acland*, *S&T*<sup>®</sup>) abgesetzt. Das Carotissegment zwischen den Klemmen wurde in der Mitte mit einer mikrochirurgischen Dissektionsschere durchtrennt und beide Stümpfe gleich über eine atraumatische Plastikkanüle mit NaCl-Lösung gespült. Von beiden Stümpfen wurde sorgfältig mit einer Präparatiosschere die überschüssige Adventitia entfernt. Anschließend wurde das Carotistransplantat aus dem Medium entfernt, mit NaCl-Lösung gespült und auf die gleiche Weise wie die Gefäßstümpfe von der Adventitia befreit. Für die Anastomosen kam eine *end-to-end* Technik, die mit 10-0 *Nylon*-Faden (*S&T*<sup>®</sup>) mit Einzelknopfnähten ausgeführt wurde, zur Anwendung. Die Gefäßklemmen wurden entfernt, es erfolgte die Anastomosenkontrolle und eine gründliche Spülung der Wunde. Die Haut wurde mit fortlaufender Technik mit 5-0 *Prolene*<sup>®</sup>-Faden verschlossen.

## 2.6 Zellkultur der RAEC

Die Primärlinien der Endothelzellen der Ratten (RAEC) wurden von Martina Seifert (Medizinische Immunologie, Charité, Berlin) aus Rattenaorten von WF- und LEW-Ratten isoliert, entsprechend der von NICOSIA *et al.* beschriebenen Methode [50]. Die isolierten Zellen wurden zunächst in EBM mit 10% FKS unter Zusatz von 100  $\mu\text{g/ml}$  ECGS (*Endothelial Cell Growth Supplement*) und 20 U/ml Heparin bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Später wurden RAEC in EBM mit 10% FKS unter Zusatz von 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamicin und ohne ECGS und Heparin in Gelatine-beschichteten Kulturgefäßen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tagen gewechselt. Nach dem Erreichen eines konfluenten Zellrasens konnten die Zellen mehrfach passagiert werden. Beim Passagieren wurde das Medium abgezogen und der Zellrasen mit 5 ml PBS pro 25 cm<sup>2</sup> (75 ml) Gewebekulturflasche gewaschen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen durch Inkubation mit 2 ml 0,1%-Trypsin-EDTA über 5 min vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Mit 5 ml komplettem Medium wurde die Trypsinierung gestoppt. Die Zellablösung wurde durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette unterstützt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen resuspendiert, ca. 3-5 $\times$ 10<sup>5</sup> Zellen in eine neue Gewebekulturflasche überführt und in Endothelzellmedium weiter kultiviert.

## 2.7 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS) handelt es sich um eine Messmethode, mit der zelluläre Antigene mittels fluoreszenz-markierter Antikörper nachgewiesen werden. Für die FACS-Analyse wurden ECs aus den Kulturgefäßen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach der Neutralisierung des Trypsins durch komplettes Endothelzellmedium wurde die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in ein Eppendorfgefäß mit einer festgelegten Menge FACS-Puffer auf die erwünschte Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro  $150 \mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen *anti-Ratten RT1.A (Ox18)* Antikörper (*mAb OX18*) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) als Marker für extrazelluläre MHC-I-Expression gefärbt. Der *anti-IgG1 $\kappa$*  (*mAb MOPC-21*) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) wurde als isotypischer monoklonaler Kontrollantikörper verwendet. Alle Analysen wurden mit dem Durchflusszytometer FACScan<sup>®</sup> durchgeführt und mittels CellQuest<sup>®</sup>-Software (beide Becton Dickinson, San Jose, USA) ausgewertet.

## 2.8 Immunhistochemie

### 2.8.1 Probengewinnung

**Carotis-Transplantation** Am 7. und 28. Tag nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Blut- und die Gewebeprobe gewonnen. Zunächst wurde den Tieren unter Injektionsnarkose mit 4 mg/kg i.m. *Ketavet*<sup>®</sup> und 0,5 mg/kg i.m. *Relanium*<sup>®</sup> i.m. direkt aus den Herzkammern ca. 5 ml Blut abgenommen und für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Carotistransplantate wurden mit umgebendem Gewebe und flankierenden Empfängerkarotiden *en block* explantiert. Zunächst wurden Gefäßdurchgängigkeit und Anastomosen kontrolliert. Nach der Halbierung der so gewonnenen Gewebestücke wurden die proximalen Hälften für die Immunhistochemie in *Tissue-Tec*<sup>®</sup> blasenfrei eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die distalen Hälften wurden für quantitative *TaqMan* real-time RT-PCR schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Proben bei  $-70^\circ\text{C}$ . Beim Zuschnitt der Gewebehälften wurde zunächst aus dem mittleren Gefäßbereich ein Querschnitt entnommen. Dieser Schnitt lag nur wenig proximal, bzw. distal der Gefäßmitte. Von jeder Probe wurden in einem Kryotom bei  $-20^\circ\text{C}$  5  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte gefertigt und diese auf beschrifteten und mit 3-APT-Silane (*Sigma*<sup>®</sup>, Steinheim, Germany) beschichteten Objektträger (*SuperFrost*<sup>®</sup>) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet und 10 min in Aceton fixiert. Nach dem vollständigen Trocknen an der Luft wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

**ePTFE-Prothesen-Transplantation** Die Entnahme und Zuschnitt der ePTFE-Prothesen wurde auf ähnliche Weise durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Fertigung eines Längsschnittes mit der Anastomosenregion von ca. 10-15 mm Länge.

## 2.8.2 Immunhistochemische Anfärbung der A.carotis-Transplantate

Die immunhistochemische Analyse der Carotis-Präparate erfolgte durch anti-CD4<sup>+</sup>-, anti-CD8<sup>+</sup>-, anti-CD68<sup>+</sup>-, *anti- $\alpha$ -Aktin* und Hämatoxylin-Färbung. Vor der Färbung wurden die Präparate mit einem Fettstift (DAKO) umrahmt, welcher ein Abfließen der später aufgebrachtten Färbereagenzien von den Schnitten verhindert.

Zur anti-CD68<sup>+</sup>-, anti-CD4<sup>+</sup>-, anti-CD8<sup>+</sup>-, *anti- $\alpha$ -Aktin*-Färbung wurden die Schnitte nach zweimaligem Waschen mit TBS/Tween(TBST)-Puffer in TBST/1% BSA mit 5% Pferdeserum für 1 h bei RT geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem Erstantikörper, anti-CD68<sup>+</sup>, anti-CD4<sup>+</sup>, anti-CD8<sup>+</sup>(alle 1:100, SL 1 mg/ml), *anti- $\alpha$ -Aktin*(1:500, SL 4 mg/ml), bei 4°C über Nacht. Nach zweimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem Biotinmarkierten Sekundärantikörper, einem anti-Maus-IgG (H+L). Nach zweimaligem Waschen wurden die Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blocklösung geblockt. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden ABC-Peroxidase-Komplex (30 min, RT) und AEC-Lösung (6 min, RT) als Markerverstärker zugegeben. Zum Schluss wurden die Präparate erneut dreimal mit TBS gewaschen und mit *Haemalaun*<sup>®</sup> gefärbt. Auf die Objektträger wurde das *Aquatex*<sup>®</sup> Eindeckelmedium aufgebracht und die Schnitte mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.

## 2.8.3 Immunhistologische Anfärbung der ePTFE-Prothesen

Zur vWF-Färbung wurden ePTFE-Präparate mit PBS gespült und 30 min bei 4°C in Aceton fixiert. Nach weiterem Waschschriff mit PBS wurden die Präparate 20 min bei RT in Schafserum (verdünnt mit PBS 1:20) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungen abzusättigen. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der ePTFE-Schnitte mit dem unmarkierten Erstantikörper, einem anti-vWF-Ak (Kaninchen-anti-vWF-Antiserum, 1:200) und einem Kaninchen-IgG-Kontroll-Ak (1:200), bei 4°C über Nacht. Nach drei Waschschriffen mit PBS erfolgte die Inkubation mit FITC-markierten anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörpern (1:160) für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Präparate 10 min in PBS gewaschen und mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

Zur anti-CD31<sup>+</sup>-Färbung wurde das gleiche Protokoll wie für die anti-CD4<sup>+</sup>-, anti-CD8<sup>+</sup>-, und anti-CD68<sup>+</sup>-Färbung der Carotis-Schnitte verwendet. Als Erstantikörper wurde anti-CD31<sup>+</sup> (1:100, SL 0,5 mg/ml) eingesetzt.

Zur Hämatoxylin-Färbung der besiedelten ePTFE-Prothesen wurden Prothesensegmente mit einer Länge von ca. 1 cm mit 4% Formalin/0,5% Glutaraldehyd für 1 h fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gewaschen und mit Hämatoxylin für 5 min bei RT gefärbt. Nach gründlicher Spülung mit Aqua dest. wurden die Präparate längs aufgeschnitten, mit der Innenseite nach oben auf die Objektträger aufgebracht und in *Aquatex*<sup>®</sup> Eindeckelmedium eingebettet.

## 2.8.4 Mikroskopische Analyse

An den gewonnenen Schnitten wurden die immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden wie oben beschrieben monoklonale Antikörper gegen die CD4<sup>+</sup>, gegen die CD8<sup>+</sup> und gegen die CD68<sup>+</sup> zum Nachweis von Gewebsinfiltration von immunkompetenten Zellen verwendet sowie Antikörper gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin zum Nachweis von Myofibroblasten bzw. Intimahyperplasie. Zur Überprüfung der Spezifität wurden syngene und autologe Gefäßschnitte der Ratte als Negativkontrolle mitgefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena, Germany) bei 40-facher Vergrößerung begutachtet und die Zahl der CD4<sup>+</sup>-, der CD8<sup>+</sup>-, und der CD68<sup>+</sup>-positiven Zellen bestimmt. Die Dichte der Zellinfiltration wurde unter Verwendung eines Gitternetzes im Okular des Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) mit einer *Point-counting-Methode* bestimmt [51]. Wie in der Abbildung 2.7 dargestellt, wurde die Infiltrationsdichte der Gefäßwandstrukturen im Querschnitt als Quotient von spezifisch gefärbten Zellen zu Gesamtzellzahl pro Flächeneinheit bestimmt:

**Formel 2.7:** Bestimmung der Infiltrationsdichte

$$\text{Infiltrationsdichte} = \frac{\text{Zahl der gefärbten Zellen}}{\text{absolute Zellzahl}} \times 100\%$$

Die Zelldichte und Farbintensität in allen Gefäßwandschichten wurde mittels eines Scoring-System bestimmt: – (fehlende Färbung), + (sehr wenig), ++ (wenig), +++ (moderat) und ++++ (sehr viel gefärbte Zellen). Für jede Wandschicht wurden jeweils fünf Regionen randomisiert und in jeder die Infiltrationsdichte für jeden Zelltypen bestimmt. Die Analyse wurde von zwei Untersuchern unabhängig von einander durchgeführt. Die Ergebnisse wurden separat eingetragen und miteinander verglichen.

## 2.9 Morphometrie

Alle Präparate wurden nach der Färbung mit einer Digitalkamera (Olympus E-330) fotografiert. An den dabei entstandenen Bildern erfolgte die morphometrische Ausmessung. Für die Bewertung wurden die Daten im mittleren Abschnitt des Transplantates herangezogen. Aus den drei höchsten Messwerten wurde der Mittelwert bestimmt. Es wurden an einem Carotisschnitt folgende Parameter ermittelt: der Lumendurchmesser, die Dicke der Neointima und die Dicke der Schicht zwischen der Lamina elastica interna und externa. Die Neointimahyperplasie wurde mittels folgender Formel ermittelt:

**Formel 2.8:** Berechnung der Neointimahyperplasie

$$\text{Neointimahyperplasie} = \frac{I}{I + M} \times 100\%$$

wobei:     I    = Fläche der Intima  
           M    = Fläche der Media

Die Kreisflächen wurden mit der Formel:  $\text{Fläche} = \pi r^2$  berechnet.

## 2.10 Konventionelle PCR und *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“<sup>7</sup> mit freundlicher Unterstützung durch Sabine Brösel vom Institut für Medizinische Immunologie durchgeführt.

### 2.10.1 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Carotissegment mittels TRIzol<sup>®</sup>-Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Das Carotissegment wurde in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> homogenisiert ( 1ml TRIzol<sup>®</sup> pro 50 mg Gewebe). Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurde 200  $\mu$ l 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  $\mu$ g Glycogen wurde das Gemisch bei -80° über Nacht inkubiert. Ins Reaktionsgefäß mit der RNA-Lösung wurden 500  $\mu$ l 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.

<sup>7</sup>Erstellt durch Katrin Vogt, Institut für Medizinische Immunologie, Charité

Der Überstand wurde verworfen und das entstandene RNA-enhaltende 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  $\mu$ l DEPC-Wasser resuspendiert und 10 Minuten bei 55°C inkubiert.

### 2.10.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die Herstellung einer cDNA-Probe wurde 2  $\mu$ g RNA eingesetzt. Nach Zugabe von 16  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O und 2  $\mu$ l odT-Primer wurde das Gemisch kurz abzentrifugiert und 10 Minuten bei 75° zur Lösung der Sekundärstrukturen inkubiert. Anschließend wurde ein Mixansatz vorbereitet:

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

18,5  $\mu$ l 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.

### 2.10.3 PCR

Die zu untersuchenden Gensequenzen wurden aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleotiden *in vitro* mittels konventioneller PCR amplifiziert. Dabei wurde die *AmpliTaq*<sup>®</sup>DNA Polymerase benutzt.

Für den Nachweis der Intrabody-Expression wurde cDNA in 40 Amplifikationszyklen mit den spezifischen Primern für die Sequenzen der anti-MHC-I-Intrabody (Metabion, Martinsried, Germany) Intrabody-For (5'- GTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG-3') und Intrabody-Rev (5'- TTC TTA TTA CAG CTC GTC CTT TTC GC-3') vervielfältigt. Als Positivkontrolle wurde parallel ein Ansatz mit Primern für das „Haushaltsgen“-Gen  *$\beta$ -Aktin* mitgeführt, einem Protein, das von jeder Zelle exprimiert wird.

### 2.10.4 *TaqMan* real-time RT-PCR

In dieser Arbeit wurde die Expression von *Ox18scFv*, CD3<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, *TNF-α*, *IFN-γ* und Haushaltsgen *β-Aktin* der Ratte quantitativ mittels real-time RT PCR durch GeneAmp<sup>®</sup>5700 *Sequence Detection System* (TaqMan, Perkin-Elmer Biosystems, Weiterstadt, Germany) ermittelt. Alle Primer wurden mit der *Primer express*<sup>®</sup>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  $C_{\tau}$ -Wert (*threshold cycle*) ermittelt. Als  $C_{\tau}$ -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:

$$X = (1 + E)^{-\Delta C_{\tau}}$$

wobei  $\Delta C_{\tau} = C_{\tau}(\text{Zielsequenz}) - C_{\tau}(\beta\text{-Aktin})$   
E-Effizienz der Reaktion

## 2.11 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mean (SEM) aufgeführt, wobei sich der SEM aus der Standardabweichung geteilt durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Stichprobe berechnet.

Zur Signifikanzanalyse der Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen wurde der nicht-parametrische Man-Whitney-U Test für ungepaarte Proben verwendet. Die Differenzen zwischen den Gruppen wurden als signifikant bezeichnet für  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$ (\*\*) und  $p \leq 0.001$ (\*\*\*).

Die Auswertung der lymphozytären Infiltration in vaskulären Transplantaten erfolgte semi-quantitativ für jede einzelne Gefäßschicht mit folgender Einteilung des Infiltrationsgrades:

- : keine
- +: geringe
- ++: moderate
- +++ : starke
- ++++: sehr starke

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Besiedlung der ePTFE-Prothesen

Unter Verwendung von *Beriplast*<sup>®</sup> Fibrinkleber wurden insgesamt 39 ePTFE-Prothesen mit RAEC besiedelt. Anschließend wurden die besiedelten ePTFE-Prothesen im *Tube Chamber System TCS 2c*<sup>®</sup> unter Perfusionsbedingungen für 2 bis 4 Tage inkubiert. Zur Untersuchung des Adhärenzverhaltens der RAEC erfolgte mittels Hämatoxylin-Färbung deren Nachweis auf der luminalen fläche der Prothesen. Die Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der Endothelialisierung von ePTFE-Prothesen zusammen.

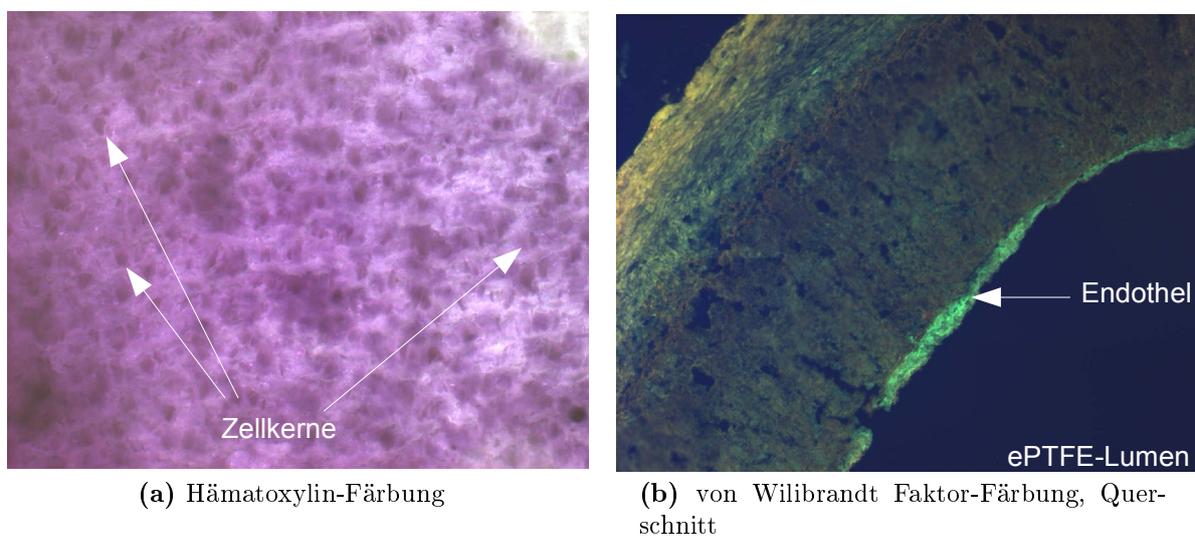
		Besiedlungseffizienz			
		konfluent	nicht konfluent	keine RAEC	
RAEC-Typ	Kontrolle (syngen)	LEW (13)	4	4	5
		LEW-b-Gal (1)	1	-	-
		LEW-IRES <sub>hr</sub> GFP (1)	-	-	1
	Kontrolle (allogen)	WF (11)	4	2	5
		WF Le-Mock (3)	-	2	1
		WF Le-EGFP (4)	1	2	1
		DA (2)	-	-	2
	Intrabody	WF Ox18scFv-IRES <sub>hr</sub> GFP (4)	-	-	4

**Tabelle 3.1:** Ergebnisse der Besiedlung von ePTFE-Prothesen mit RAEC.

In der syngenischen Kontrollgruppe untersuchten wir das Adhärenzverhalten der unbehandelten LEW-RAEC, sowie der LEW-RAEC, welche mit einem Konstrukt transduziert wurden, das für hrGFP- bzw.  $\beta$ -Gal-Gen kodiert. In der allogenen Kontrollgruppe verwendeten wir außer unbehandelten WF-RAEC und DA-RAEC die WF-RAEC, welche mit lentiviralen Konstrukten transduziert wurden, die das EGFP-Gen kodieren, sowie *mock*-WF-RAEC. Vier ePTFE-Prothesen wurden mit WF-RAEC besiedelt, die mit einem, das Intrabody-Gen (*Ox18scFv*) kodierenden, lentiviralen Konstrukt transduziert wurden.

Für die Besiedlung einer ePTFE-Prothese wurden  $3,0 \times 10^6 - 5,0 \times 10^6$  RAEC verwendet. Nach

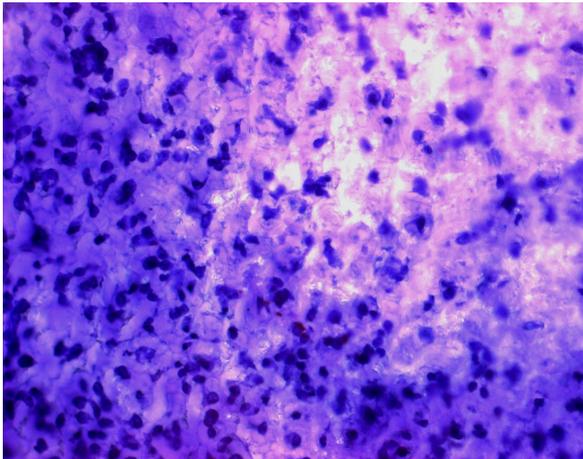
4 h stationärer Inkubationsphase unter Rotation wurde das Kulturmedium aus der ePTFE-Prothese abgezogen. Durch die Zählung der restlichen RAEC im abgezogenen Kulturmedium konnten Rückschlüsse über die Zahl der angesiedelten Zellen gemacht werden. Die Zählung ergab, dass von den eingesäten Zellen nach 4 h im rotierenden Inkubator ca. 80% der Zellen an der fibrinbeschichteten Prothesenoberfläche anhaften. Dieser Anteil der adhären Zellen nach der stationären Phase war in allen Experimenten etwa gleich, unabhängig vom Zelltyp und von transduzierten lentiviralen Konstrukten. Bei einer Prothesenlänge von 5 cm und dem Durchmesser von 2 mm, ergibt sich eine, den Zellen zur Verfügung stehende, Ansiedlungsfläche von ca. 3 cm<sup>2</sup>. Bei der durchschnittlichen primären Zellzahl von  $4,0 \times 10^6$  und der Ansiedlungsrate von 80% entsprach es einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^6 / \text{cm}^2$ . Daraus ergibt sich, dass die Innenfläche der ePTFE-Prothesen von einer dichten geschlossenen Zellschicht ausgekleidet war. Nach ca. 2-3 Tagen Inkubation unter Perfusionsbedingungen zeigten lediglich



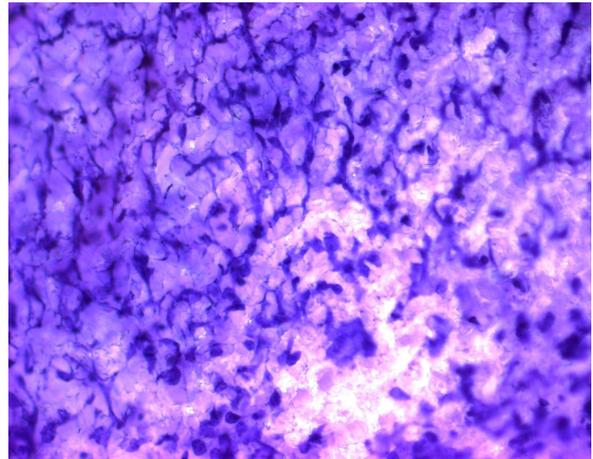
**Abbildung 3.1:** Nachweis der LEW-RAEC 2 Tage nach der Besiedlung unter statischen Bedingungen. Vergrößerung (100 $\times$ )

fünf ePTFE-Prothesen aus der syngen Kontrollgruppe eine geschlossene EC-Schicht auf der Innenfläche, davon waren vier Prothesen mit LEW-RAEC und eine mit LEW- $\beta$ -Gal-RAEC besiedelt (Abb. 3.1a). Die RAEC zeigten eine für ECs typische ausgestreckte Morphologie, mit einem ovalen Kern und langen zytoplasmatischen Ausläufern. Durch die vWF-Färbung mit FITC-markiertem anti-vWF-Antikörper kann eine geschlossene Endothelschicht auf der luminalen Seite der ePTFE-Prothese dargestellt werden (Abb. 3.1b).

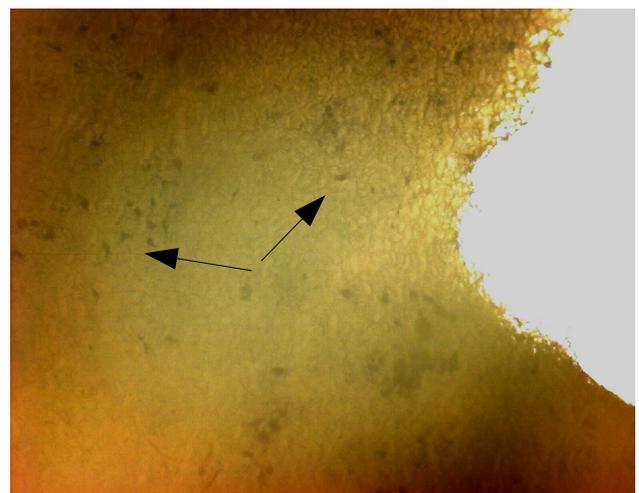
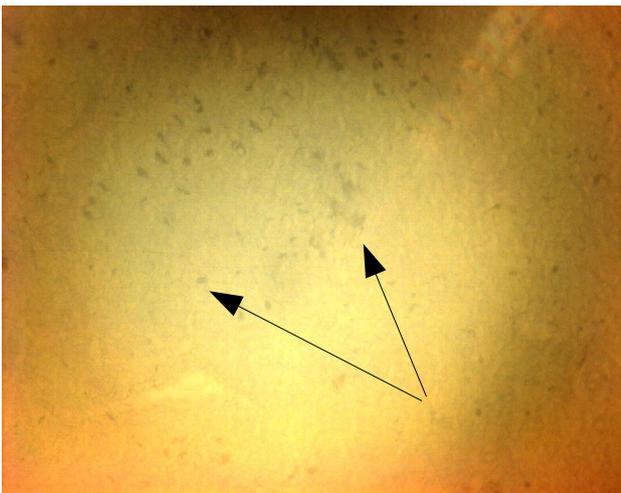
Aus der allogenen Gruppe wies nur eine einzige Prothese eine geschlossene ECs-Schicht auf. Bei den anderen Prothesen zeigten sich breit verstreute unterschiedlich große Areale mit ECs-Clustern oder nur vereinzelte Zellen. Bei mehr als der Hälfte aller besiedelten ePTFE-Prothesen konnten nach der *shear-stress*-Inkubationsphase überhaupt keine Zellen auf der Innenfläche gefunden werden (Abb. 3.2–3.4). Diese ePTFE-Prothesen wurden aus den späteren Untersuchungen ausgeschlossen.



**Abbildung 3.2:** LEW-RAEC, Fibrinbeschichtung, Hämatoxylin-Färbung. Unten im Bild sind dichte Zellcluster zu sehen, oben rechts nur vereinzelte EC. (100×)

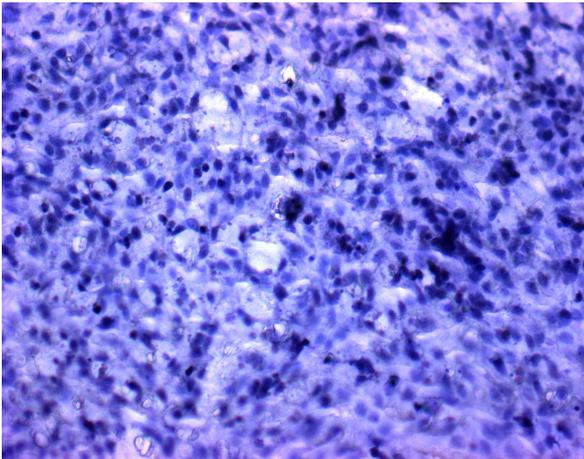


**Abbildung 3.3:** LEW-RAEC, Fibrinbeschichtung, Hämatoxylin-Färbung. Vereinzelte EC und Zelltrümmer. (100×)

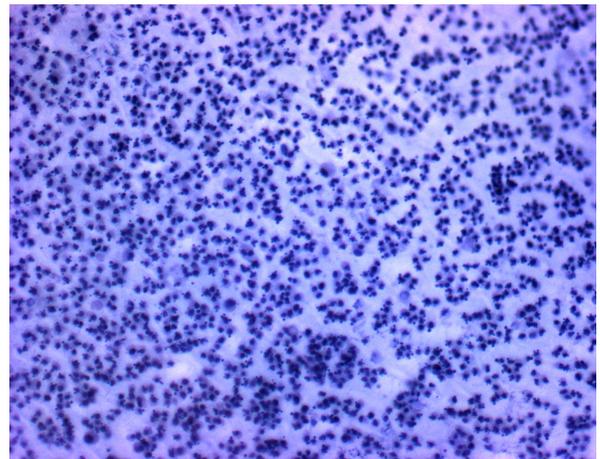


**Abbildung 3.4:** LEW-RAEC, Fibrinbeschichtung, keine Hämatoxylin-Färbung. Vereinzelte ECs. Vergrößerung (40×)

Nach einer Reihe von Besiedlungsversuchen mit den Fibrin beschichteten ePTFE-Prothesen wurden einige ePTFE-Prothesen vor der Besiedlung mit Fibronectin beschichtet. Insgesamt wurden vier mit Fibronectin beschichtete ePTFE-Prothesen mit unbehandelten LEW-RAEC besiedelt. In allen vier ePTFE-Prothesen bildeten die RAEC nach 2-3 Tagen Inkubation unter *shear stress* Bedingungen eine dichte Zellschicht auf der Innenfläche (Abb. 3.5). In manchen ePTFE-Prothesen fanden sich jedoch apoptotische RAEC mit abgekugelten Zellkernen (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.5:** LEW-RAEC, Fibronectinbeschichtung, Hämatoxylin-Färbung. Die EC weisen eine typische ausgestreckte Morphologie mit ovalen Kernen und langen Zellausläufern auf. (100×)



**Abbildung 3.6:** LEW-RAEC, Fibronectinbeschichtung, Hämatoxylin-Färbung. Apoptotische Zellen mit abgekugelten Zellkernen und Zelltrümmern. (100×)

Alle besiedelten ePTFE-Prothesen, welche nach der Inkubation unter *shear stress* Bedingungen eine geschlossene ECs-Schicht auf der Innenfläche aufweisen konnten, wurden für die Transplantation verwendet.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass sich die Nutzung des *TCS-2c*<sup>®</sup>-Systems problematischer gestaltete als erwartet, weil das Material des Systems nach sachgemäß durchgeführten Autoklavierungen und Besiedlungsvorgängen innerhalb kurzer Zeit verschleißt. Dies führte zu einer Infizierung des Kulturmediums und der ePTFE-Prothesen, so dass häufig das Resultat mehrtägiger Arbeit zunichte gemacht wurde.

## 3.2 Etablierung der Technik für die Transplantation der 2 mm PTFE-Prothesen in die A.abdominalis der Ratte

Aufgrund der Verfügbarkeit von ePTFE-Prothesen mit einem minimalen Innendurchmesser von 2 mm war es erforderlich eine Anastomosetechnik für Protheseninterposition in die A.abdominalis zu etablieren. Nachfolgend sind die einzelnen Arbeitsschritte erläutert und in Bildern dokumentiert.

Unter einem Dissektionsmikroskop erfolgte zunächst ein medianer 3-4 cm langer Bauchschnitt. Hier wurde die A.abdominalis unter Beachtung der benachbarten Strukturen dargestellt und frei präpariert. Alle infrarenalen Seitenäste bis zur Bifurkation wurden mit einem 10-0 *Prolene*<sup>®</sup>-Faden (*Ethicon*<sup>®</sup>) ligiert. Die dorsalen abdominalen Strukturen mit V.cava wurden durch eine, aus einem sterilen Handschuh geschnittene, Unterlage geschützt (Abb. 3.7). Die A.abdominalis wurde distal der A.renalis und proximal der Bifurkation mit zwei *S&T*<sup>®</sup>-Gefäßklemmen (B-2 nach *Acland*) abgeklemmt (Abb. 3.8) und mit einer Schere senkrecht zur Achse durchtrennt (Abb. 3.9).

Nach einer gründlichen Spülung mit physiologischer NaCl-Lösung wurden beide Gefäßstümpfe in sterile, vorher zurechtgeschnittene Adapterringe aus Silikon<sup>8</sup> hineingeschoben und mit 10-0 *Prolene*<sup>®</sup>-Faden mittels einer fortlaufenden Naht am distalen Rand des Adapters fixiert (Abb. 3.10). Die Abbildung 3.11 zeigt die Größenverhältnisse zwischen einer ePTFE-Prothese, einem Adapterring und der A.abdominalis der Ratte.

Um der Entstehung einer arteriellen Luftembolie vorzubeugen, wurde dann die ePTFE-Prothese mit der Länge von ca. 3 cm blasenfrei mit NaCl-Lösung gefüllt und über die beiden Adapterringe gezogen. Die Anastomosen zwischen der Prothese und dem proximalen Adapterring wurden mit 7-0 *Prolene*<sup>®</sup>-Faden in fortlaufender Nahttechnik angefertigt (Abb. 3.12). Die Gefäßklemmen wurden entfernt. Nach der Überprüfung der Anastomosensuffizienz und nach der Kontrolle auf Bluttrockenheit (Abb. 3.13 und 3.14) wurde die Bauchmuskulatur mit fortlaufender Nahttechnik mit resorbierbarem *Vicryl*<sup>®</sup> 5-0 verschlossen. Die Hautnaht erfolgte mit nicht resorbierbarem *Ethibond*<sup>®</sup>-Faden 4-0 mit fortlaufender Technik. Bei der Implantation der ePTFE-Prothese wurde ihre Länge so gewählt, dass kein Zug auf die Anastomosen entsteht. Die gesamte Operationsdauer betrug im Mittel 100 min, die Ischämiezeit 30-40 min. Alle Eingriffe wurden von demselben Operateur vorgenommen. Bei keinem Tier kam es während der Operation zur Prothesenthrombose. Postoperativ wurde zur Schmerzprophylaxe *Temgesic*<sup>®</sup> (0,05 mg/kg, i.m.) verabreicht. In der Aufwachphase wurde den Tieren für die Wärmezufuhr eine Rotlichtlampe eingeschaltet. Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei allen Tieren komplikationsfrei.

Der Durchmesser einer ePTFE-Prothese ist fast doppelt so groß wie der einer Rattenaorta. Würde die ePTFE-Prothese direkt mit der Rattenaorta anastomosiert, würde die Aortenwand aufgrund der enormen Spannung einreißen. Die Methode mit dem Adapterring aus Silikon ist keine ideale Lösung, ermöglicht es aber, die ePTFE-Prothese mit der Rattenaorta zu adaptieren. Die Strömungsverhältnisse in den Anastomosenbereichen sind dadurch hämodynamisch nicht besonders günstig. Ausschlaggebend für diese Arbeit war jedoch die suffiziente Blutperfusion der ePTFE-Prothese, welche durch diese Anastomosentechnik nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

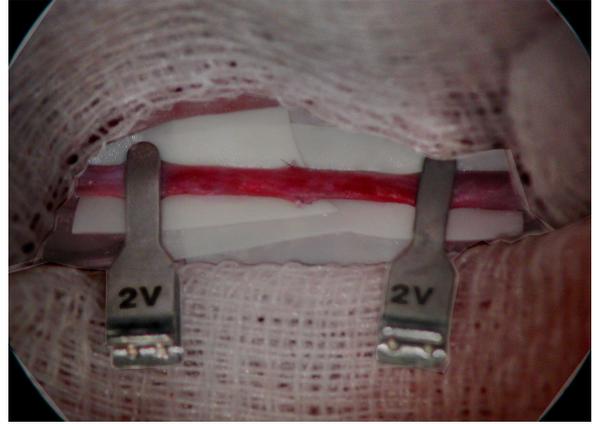
---

<sup>8</sup>Ein Adapterring stellt einen 2-3 mm hohen Zylinder dar, welcher aus einem *Thomafloid*<sup>®</sup>-Silikon-Analyseschlauch (innen-Ø 1,2 mm, außen-Ø 2,0 mm) geschnitten wird.

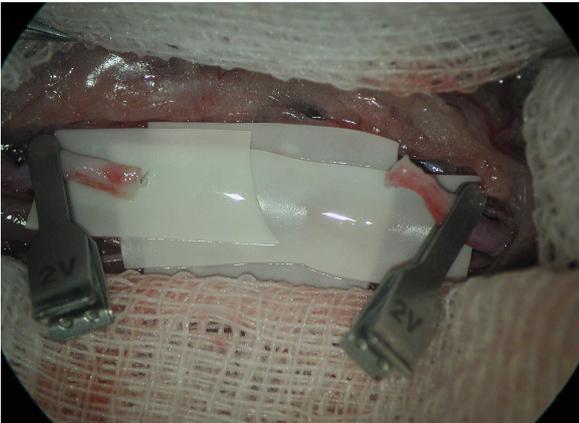
## Transplantation der ePTFE-Prothese in die A.abdominalis der Ratte mittels *Cuff*-Technik



**Abbildung 3.7:** Ligierte Seitenäste der infrarenalen A.abdominalis; unter dem Gefäß sind Silikonunterlagen als Gewebeschutz angebracht.



**Abbildung 3.8:** Die Aorta ist kranial und kaudal mit Gefäßklemmen abgesetzt.



**Abbildung 3.9:** Die Aorta ist durchtrennt, die beiden Gefäßstümpfe werden mit NaCl-Lösung gründlich gespült.



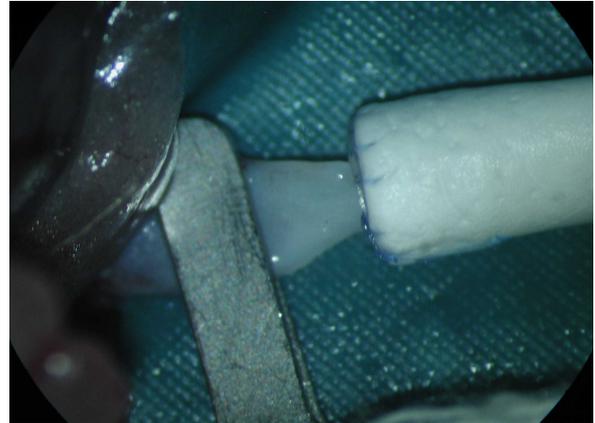
**Abbildung 3.10:** Ein Gefäßstumpf wird in einen Adapterring hineingeschoben und an sein distales Ende in fortlaufender Technik mit einem 10-0 *Prolene*®-Faden angenäht.

*Fortsetzung auf der nächsten Seite...*

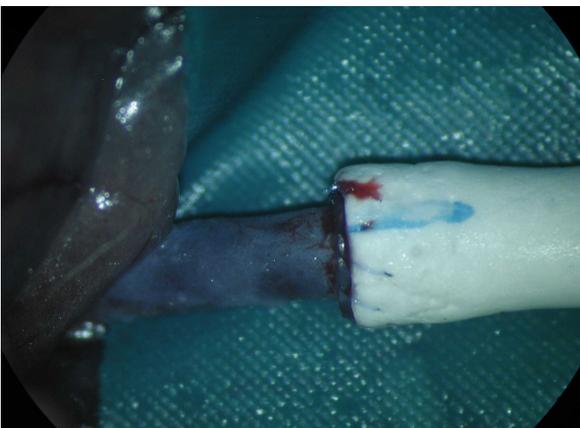
## Transplantation der ePTFE-Prothese in die A.abdominalis der Ratte mittels *Cuff*-Technik



**Abbildung 3.11:** Größenverhältnisse zwischen Rattenaorta und ePTFE-Prothese. Der Durchmesser einer ePTFE-Prothese ist ca. doppelt so groß wie derjenige einer Rattenaorta.



**Abbildung 3.12:** Der Adapterring wird in die ePTFE-Prothese hineingeschoben. Sein proximales Ende wird an die Prothese in fortlaufender Technik mit einem 7-0 *Prolene*<sup>®</sup>-Faden angenäht.



**Abbildung 3.13:** Die Gefäßklemmen werden entfernt und die Anastomosensuffizienz überprüft. Auf dem Foto zeigt sich ein minimaler Blutaustritt durch einen Stichkanal.

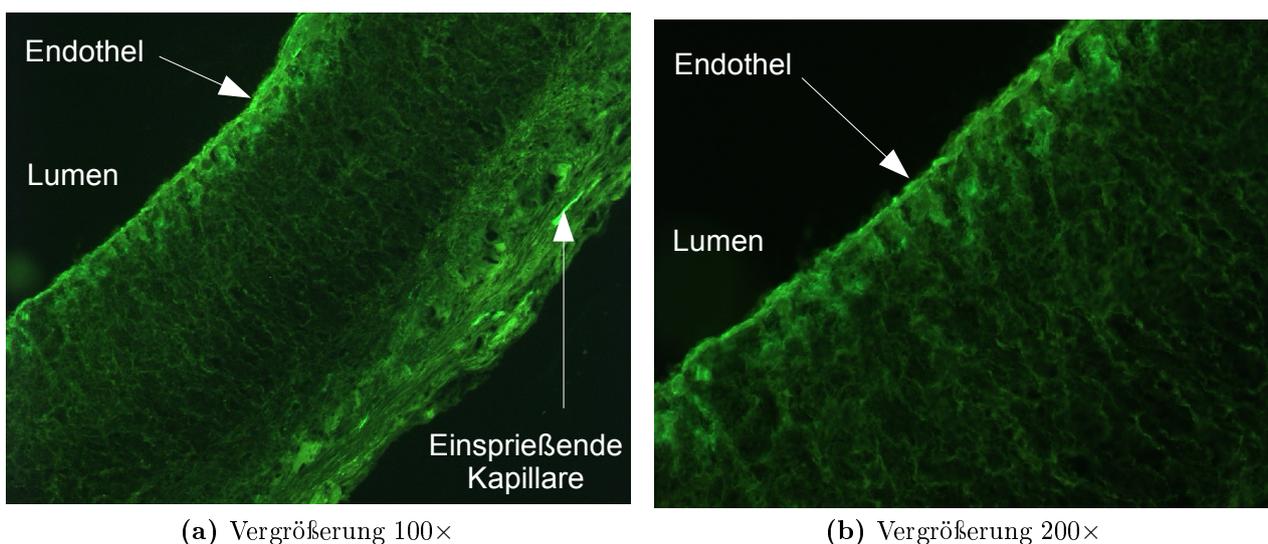


**Abbildung 3.14:** Dies ist ein fertiges ePTFE-Interponat.

### 3.3 Immunhistochemische Untersuchungen transplantiertter ePTFE-Prothesen

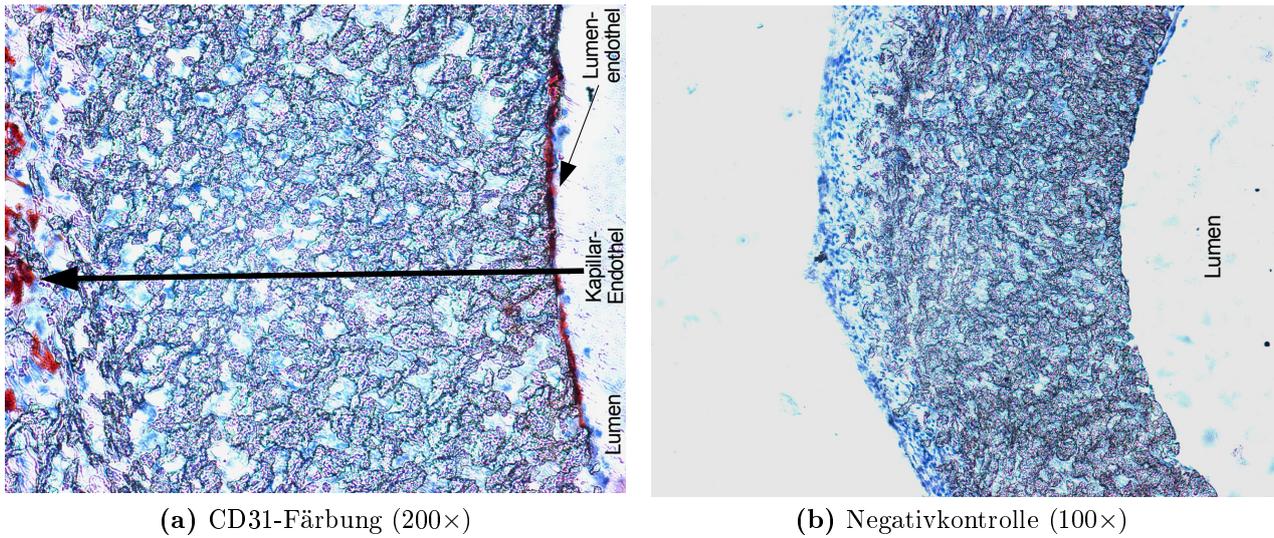
Die mit RAEC besiedelten ePTFE-Prothesen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1-5 Wo) nach der Operation entnommen. Eine makroskopische Inspektion zeigte, dass die ePTFE-Prothesen bei allen Versuchstieren 3 bis 5 Wochen nach der Operation offen waren. Auf der gesamten Prothesenlänge fanden sich keine Kaliberschwankungen. Lediglich im Anastomosenbereich zeigten sich leichte fibrinöse Auflagerungen, welche jedoch keine wesentliche Beeinträchtigung der Blutperfusion verursachen konnten.

Alle transplantierten ePTFE-Prothesen wurden einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Sowohl in der *Ox18scFv*-Gruppe als auch in der allogenen und in der syngenem Kontrollgruppe fanden sich bei der Endothelfärbung mit FITC-markierten anti-vWF-, und anti-CD31<sup>+</sup>-Antikörpern Bereiche mit einem einschichtigen Endothel. Eine geschlossene Endothelschicht fand sich jedoch nur in zwei ePTFE-Prothesen aus der syngenem Kontrollgruppe (Abb. 3.15a,b und 3.16a). Eine gute Kontrolle für die Spezifität der Färbung ist die Darstellung des Endothels der Kapillaren, die von außen in die ePTFE-Wand einspießen (Abb. 3.15a).

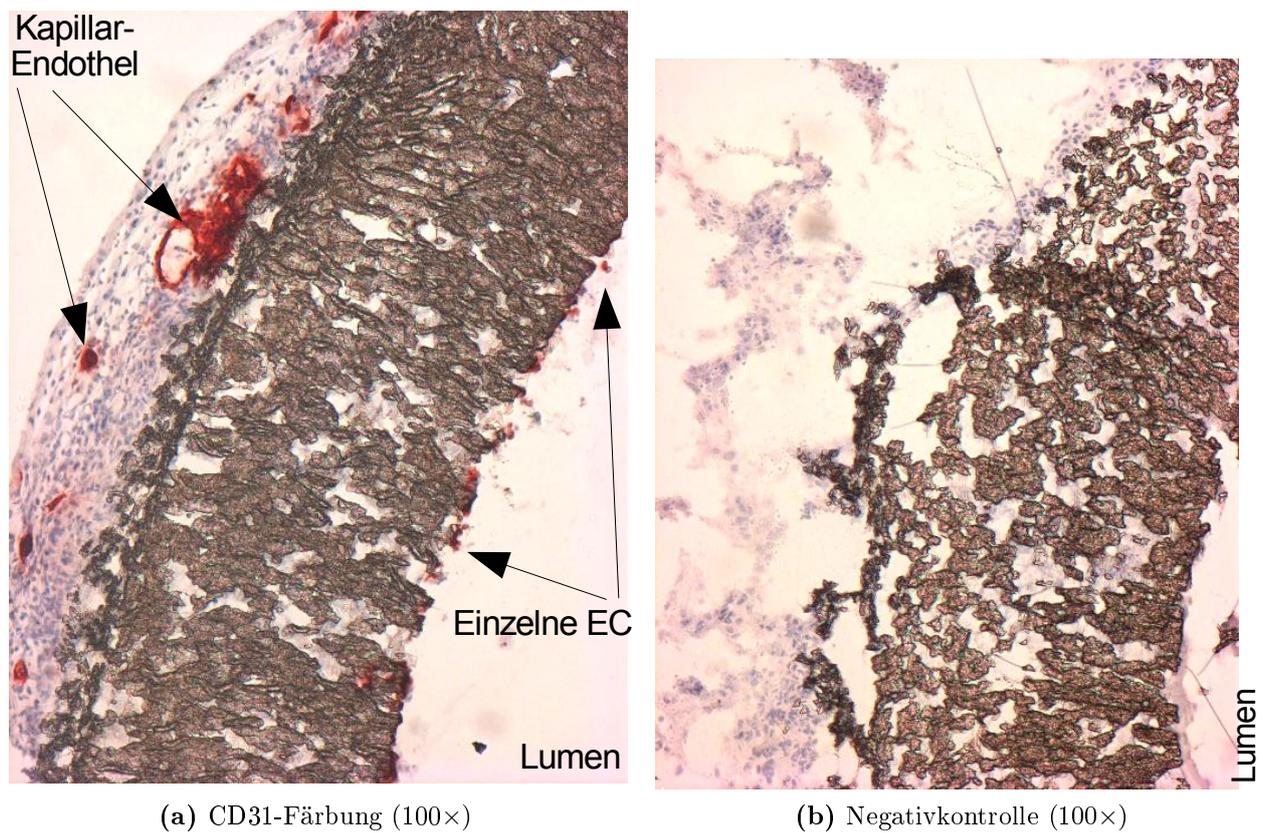


**Abbildung 3.15:** Konfluentes Endothel auf der luminalen Seite einer ePTFE-Prothese aus der syngenem Kontrollgruppe 5 Wochen nach der Transplantation.

Bei den anderen Transplantaten aus der *Ox18scFv*-Gruppe und aus den beiden Kontrollgruppen zeigte sich ein nur unvollständig ausgebildetes Endothel, mit wenigen auf der luminalen ePTFE-Seite verstreuten EC-Arealen (Abb. 3.17a).



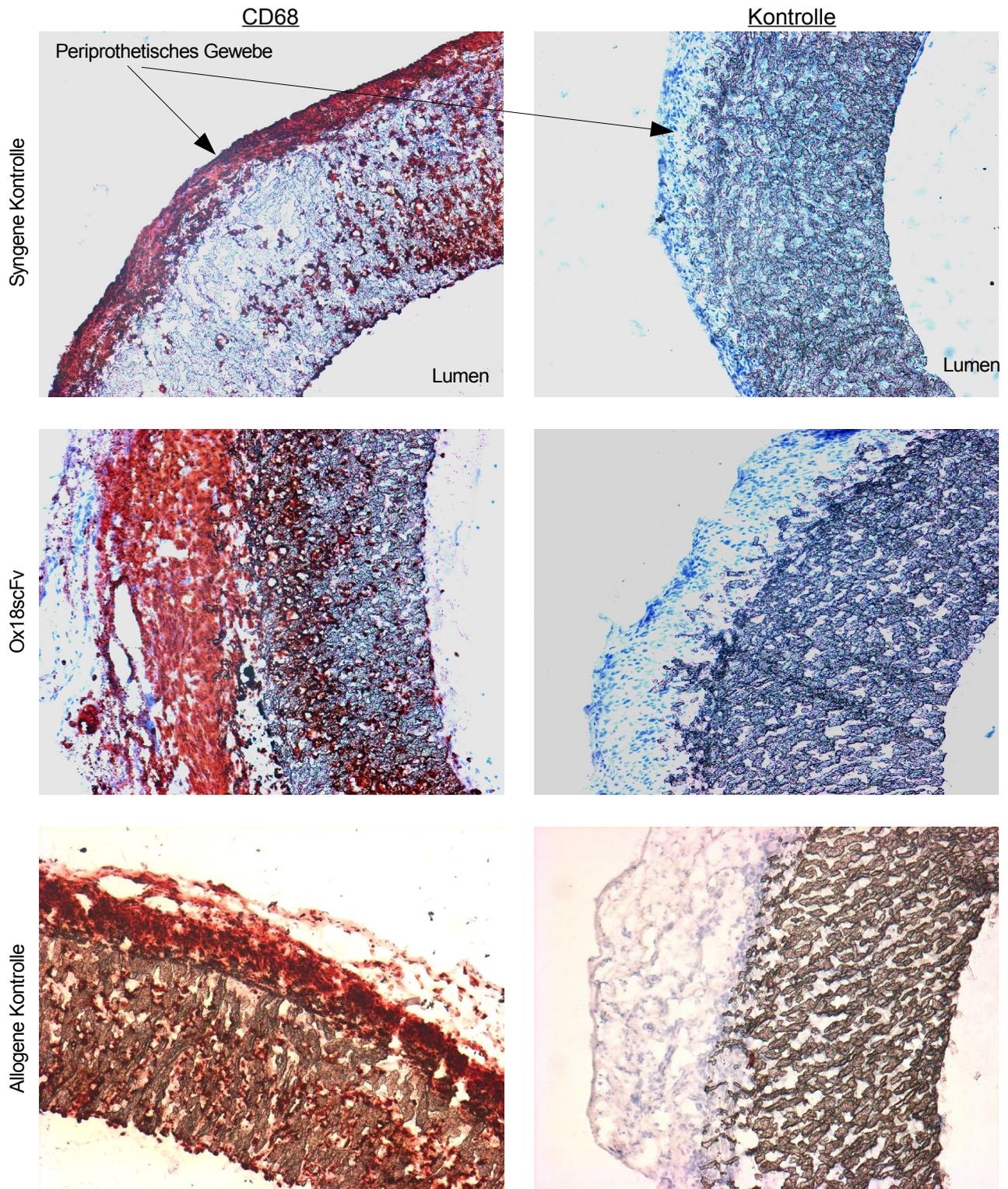
**Abbildung 3.16:** Konfluentes Endothel auf der luminalen Seite einer ePTFE-Prothese aus der syngeneten Kontrollgruppe. 5 Wochen nach der Transplantation.



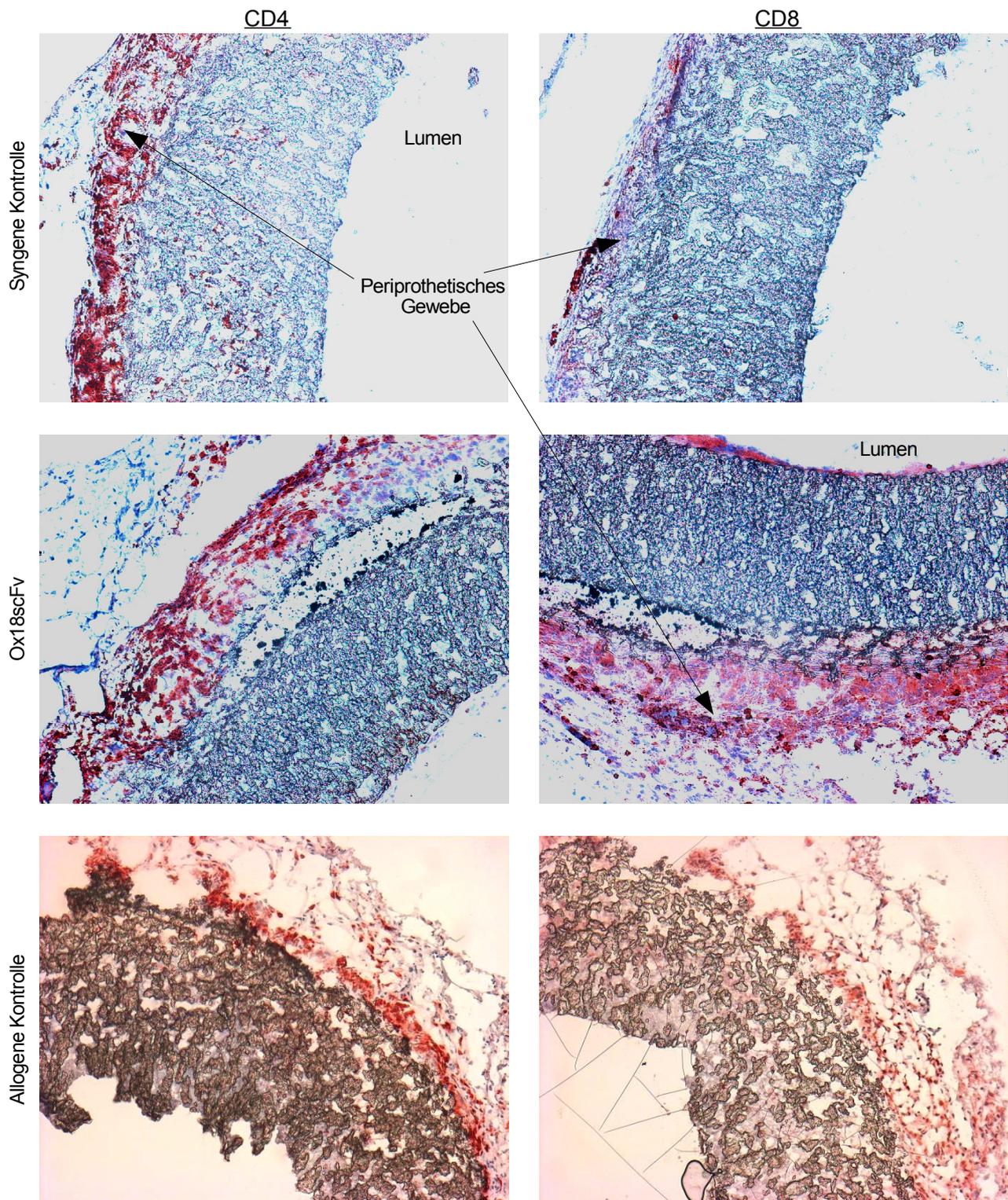
**Abbildung 3.17:** Vereinzelte EC auf der luminalen Seite einer ePTFE-Prothese aus der allogenen Kontrollgruppe. 3 Wochen nach der Transplantation.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich übereinstimmend in allen Transplantaten eine massive Infiltration der Prothesenwand und des periprothetischen Gewebes mit Gewebsmakrophagen, wobei die zelluläre Dichte im Außenbereich der Prothesenwand viel höher war als im lumennahen. Im Ausprägungsgrad der Makrophagen-Infiltration ließen sich zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen keine Unterschiede feststellen (Abb. 3.18).

Der Ausprägungsgrad der CD4<sup>+</sup>-Infiltration, der sich in allen Gruppen nur zwischen mäßig und schwach bewegte, verunmöglichte es, gruppenspezifische Merkmale herauszukristallisieren und entsprechende verlässliche Aussagen zu machen. Daher konnte auch der Vergleich der verschiedenen Gruppen keine relevanten Ergebnisse hervorbringen (Abb. 3.19). Eine mäßige Infiltration von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zeigte sich vor allem im periprothetischen Gewebe. Nur in wenigen Präparaten der *Ox18scFv*- sowie der beiden Kontrollgruppen fand sich eine schwache CD8<sup>+</sup>-Infiltration der Prothesenwand. Die CD8<sup>+</sup>-Infiltration des Endothels im Bereich der Intima variierte ebenfalls stark innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 3.19). Für alle eingesetzten immunhistochemischen Zellmarker konnten dem nach keine deutlichen Unterschiede zwischen den Transplantaten mit syngener, allogener oder allogener *Ox18scFv*-RAEC-Besiedlung detektiert werden. Deshalb war es nicht möglich, in diesem Modell eine Aussage über die Eignung von MHC-I-defizienten Endothelzellen für eine luminale Besiedlung von ePTFE-Gefäßprothesen zu treffen. Die allgemeine starke Infiltration aufgrund einer Fremdkörperreaktion überdeckten die Ergebnisse der untersuchten antigen-spezifischen lymphozytären Reaktion.



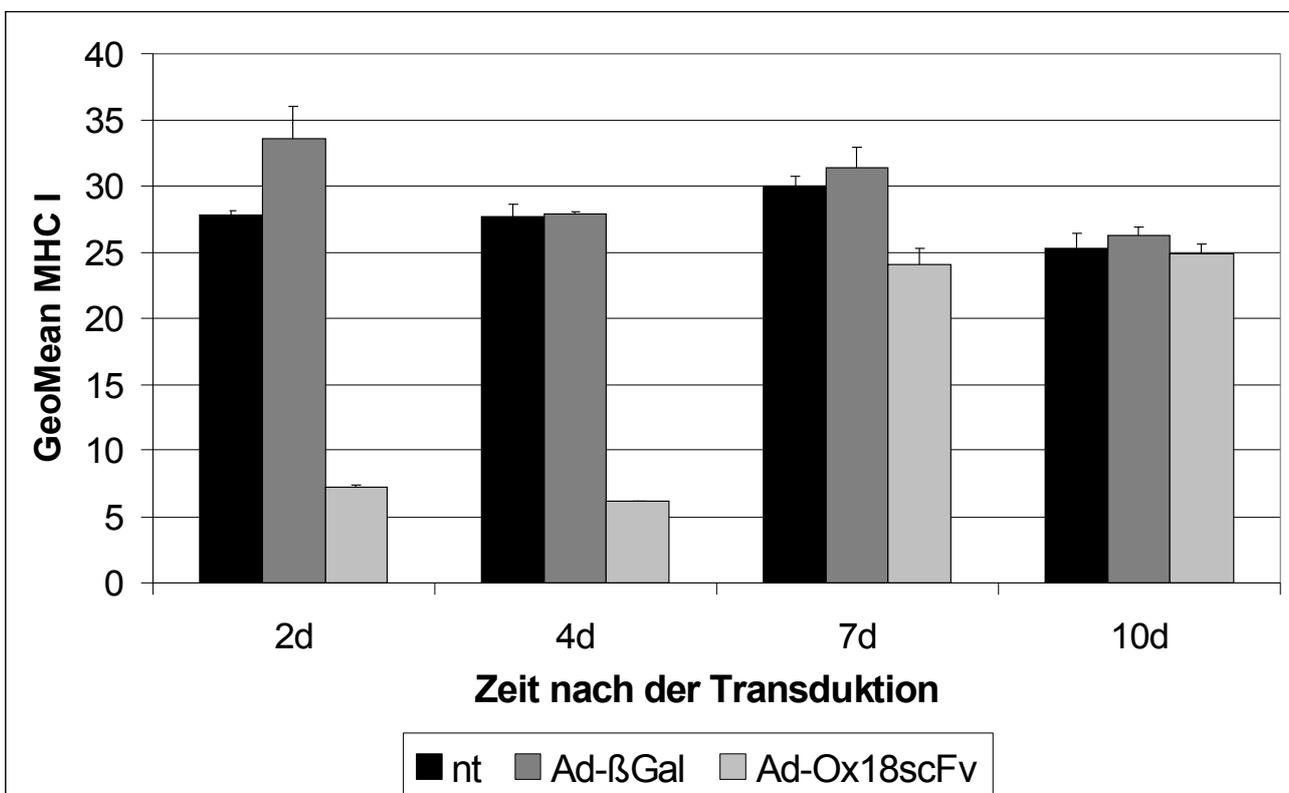
**Abbildung 3.18:** Die massive, bis an das Lumen reichende Infiltration der Prothesenwand und des periprothetischen Gewebes durch Gewebsmakrophagen zeigte sich in allen Untersuchungsgruppen gleichermaßen. 4 Wochen nach der Transplantation.  
Vergrößerung 100×



**Abbildung 3.19:** Moderate Infiltration des periprothetischen Gewebes durch  $CD4^+$ -Lymphozyten in der syngenischen Kontroll- und *Ox18scFv*-Gruppe; dagegen keine  $CD4^+$  in der Wand einer Prothese aus der allogenen Kontrollgruppe. Schwache bis moderate Infiltration des periprothetischen Gewebes durch  $CD8^+$ -Lymphozyten; keine, bzw. einzelne  $CD8^+$  in der Prothesenwand in allen Untersuchungsgruppen. 4 Wochen nach der Transplantation. Vergrößerung  $100\times$

### 3.4 Modulation der MHC-I-Expression durch den adenoviralen Intrabody-Gentransfer in RAEC *in vitro*

In Vorversuchen wurden RAEC der WF-Ratten *in vitro* mit *Ad-Ox18scFv* oder *Ad- $\beta$ -Gal* transduziert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von MHC-I 2, 4, 7 und 10 Tage nach der Transduktion analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Ad-Ox18scFv* zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenexpression des MHC-I führt. Bei der zum Vergleich mitgeführten *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierten Kontrollgruppe wurde dagegen ein unverändertes Expressionsniveau detektiert. Allerdings war die MHC-I-Herunterregulation durch den *Ad-Ox18scFv* zeitlich begrenzt. Am 10. Tag nach der Transduktion erreichte die MHC-I-Expression der *Ad-Ox18scFv*-transduzierten RAEC das gleiche Niveau wie bei den *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierten RAEC (Abb. 3.20).



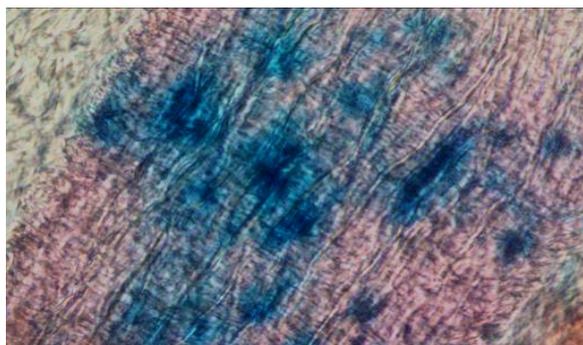
**Abbildung 3.20:** Adenoviraler *Ox18scFv*-Gentransfer erzeugt vorübergehend einen MHC-I-knockout-Phänotyp in RAEC.

Oberflächenexpression der MHC-I-Moleküle in *Ad-Ox18scFv*- und *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierten RAEC sowie in nichttransduzierten Kontroll-RAEC (nt). Das Ergebnis wird als *GeoMean*-Wert der MHC-I-Oberflächenexpression dargestellt, (n=3).

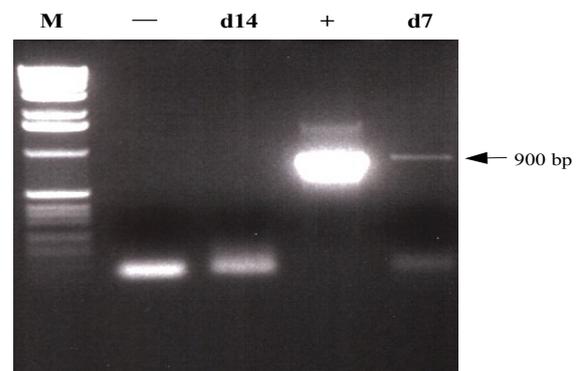
### 3.5 *Ad-Ox18scFv*-Gentransfer in die *A.carotis* und Nachweis des Transgens

Die adenovirale Transduktion isolierter *A.carotis* der WF-Ratte erfolgte *ex vivo* durch luminale Applikation von  $10^8$  pfu *Ad-Ox18scFv* bzw. *Ad-β-Gal* (Kapitel 2.5.1). Nach mehrmaligem Spülen mit dem Medium wurden adenoviral transduzierte Gefäßsegmente für 24 h im endothelialen Zellkulturmedium kultiviert, um einem proinflammatorischen Effekt der adenoviralen Gentransduktion vorzubeugen. Anschließend wurden die Gefäße transplantiert.

Die Carotis-Allotransplantate wurden 7, 14 und 28 Tage nach der Transplantation entnommen und die Expression des *Ad-Ox18scFv* im Transplantat untersucht. Die Effizienz des *ex vivo* adenoviralen Gentransfers wurde in den Carotis-Transplantaten der *Ad-β-Gal*-transduzierten Kontrollgruppe durch eine enzymhistochemische Farbreaktion nachgewiesen. Die Abbildung 3.21a zeigt eine *X-Gal*-Färbung der *Ad-β-Gal*-transduzierten RAEC auf der luminalen Oberfläche eines Arteriensegmentes. Der Nachweis des Transgens *Ox18scFv* erfolgte mittels einer konventionellen PCR mit spezifischen Primern (Abb. 3.21b).



(a) *X-Gal*-Färbung;  
(Vergrößerung 200×)



(b) Nachweis des Intrabody-Gens in RAEC

#### Abbildung 3.21: Nachweis von Intrabody- und $\beta$ -*Gal*-Transgene in *A.carotis*.

(b): Als Kontrollen wurden Wasser (-) und ein *Ox18scFv*-enthaltendes Plasmid (+) mitgeführt. Die linke Spalte zeigt den Molekulargewichtsmarker.

Die PCR-Analyse zeigte am Tag 7 nach der Transplantation eine *Ox18scFv*-Expression in den transduzierten Carotistransplantaten (Bande **d7**). Bei einem adenoviralen Gentransfer wird das Transgen nicht in das zelluläre Genom integriert. Seine Replikation erfolgt extrachromosomal im Zytoplasma, was bei der weiteren Zellproliferation zum Verlust des Transgens führt. So konnte bereits ab dem 14. postoperativen Tag (Bande **d14**) keine Expression von *Ox18scFv* mehr nachgewiesen werden.

### 3.6 Entwicklung einer Atherosklerose und Analyse der Zellinfiltration in dem Allotransplantat

Die Carotis-Transplantate aller Untersuchungsgruppen (*Ad-Ox18scFv*, *Ad-β-Gal*, allogene und syngene Kontrollgruppen) wurden am 7. bzw. 28. postoperativen Tag entnommen und anschließend einer histochemischen und morphometrischen Untersuchung unterzogen. Für die Ermittlung des Phänotyps der infiltrierenden Zellen wurden deren Oberflächenantigene mit spezifischen Antikörpern definiert. Untersucht wurde die Verteilung von Monozyten/Makrophagen (CD68<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und glatten Muskelzellen (SMC) in allen Gefäßwandschichten (Intima, Media und Adventitia) des Transplantates.

Im Verlauf der akuten Transplantatabstoßung zeigte sich in allen allogenen Untersuchungsgruppen eine progrediente Zellinfiltration der Gefäßwand, deren Ausprägung in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit variierte.

Die Transplantate beider Kontrollgruppen, der *Ad-β-Gal*-transduzierten allogenen und der nichttransduzierten allogenen, wiesen zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion mit massiver Zellinfiltration in der Intima und Adventitia auf, die auf eine akute Abstoßungsreaktion zurück zu führen war (Tab. 3.2). Die *Ad-Ox18scFv*-transduzierten Allotransplantate zeigten eine Reduktion der zellulären Infiltration sowohl in der Intima als auch in der Adventitia. In beiden Wandschichten konnte im Vergleich mit den nativen und *Ad-β-Gal*-behandelten allogenen Kontrolltransplantaten eine signifikant niedrigere Infiltration von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und Makrophagen festgestellt werden. Ebenso war die Anzahl infiltrierender CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten nach 7 und besonders deutlich nach 28 Tagen reduziert. Die Transplantate der syngenen Kontrollgruppe zeigten zu keinem Zeitpunkt eine zelluläre Infiltration. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst.

			Zellmarkerexpression in Carotistransplantaten					
			CD68		CD4		CD8	
			Int.	Adv.	Int.	Adv.	Int.	Adv.
<b>7d</b>	<i>Ad-Ox18scFv</i>	n=4	–	+	+	+	–	+
	<i>Ad-β-Gal</i>	n=4	+	+++	+	+++	–	+++
	Allogen	n=3	–	+	++	+++	+	++
	Syngen	n=3	–	–	–	–	–	–
<b>28d</b>	<i>Ad-Ox18scFv</i>	n=4	++	++	+	+	++	+
	<i>Ad-β-Gal</i>	n=4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Allogen	n=3	+++	+++	+++	++	++	+++
	Syngen	n=3	–	+	–	–	–	–

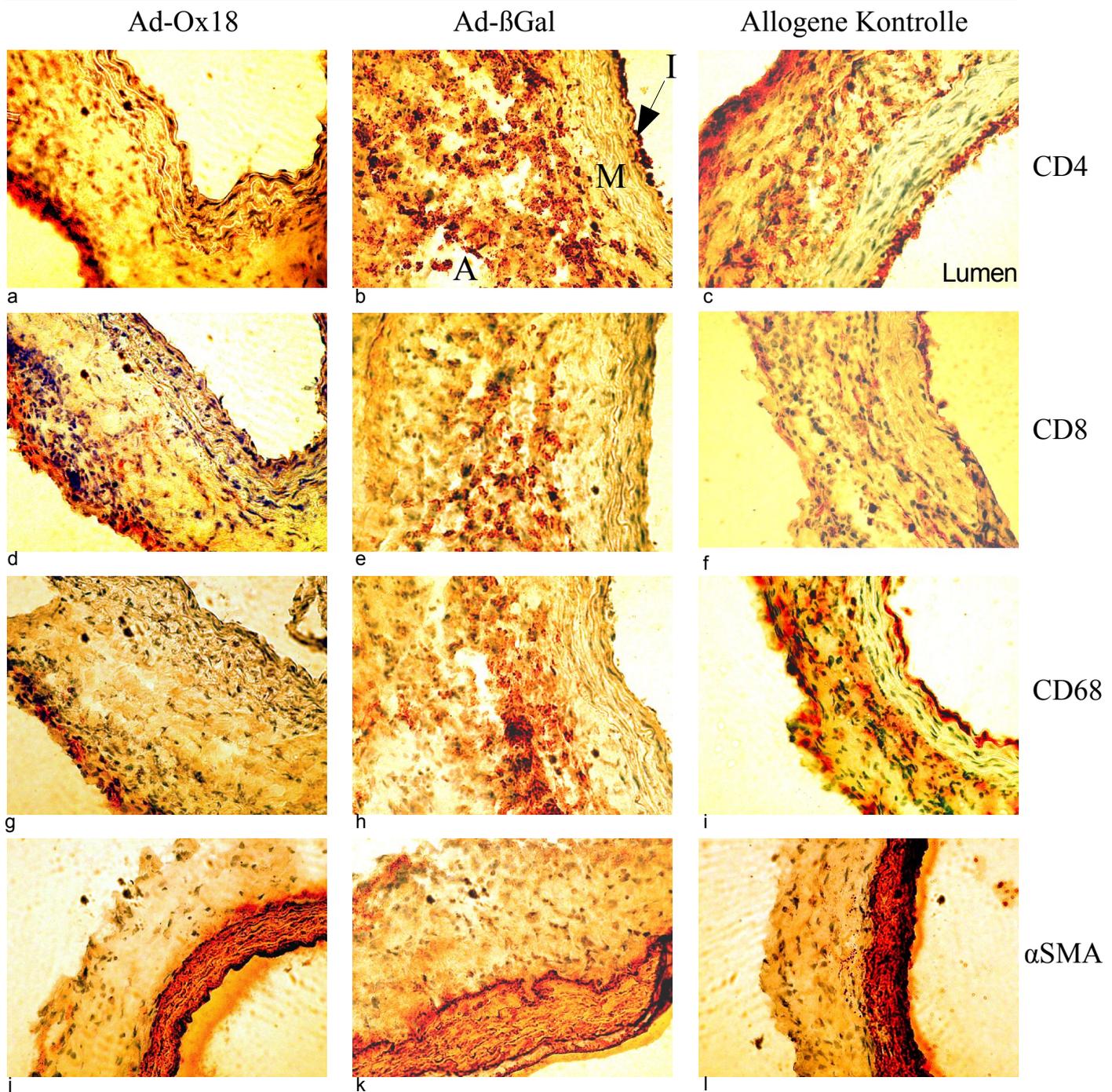
**Tabelle 3.2:** Übersicht über die Zellmarkerexpression in allen Untersuchungsgruppen vom Carotis-Transplantat-Modell.

Die Zelldichte und Farbintensität in allen Gefäßwandschichten wurde mittels eines Scoring-System bestimmt: – (fehlende Färbung), + (sehr wenig), ++ (wenig), +++ (moderat) und ++++ (sehr viel gefärbte Zellen)

Int. - Intima, Adv. - Adventitia

Beide allogenen Kontrollgruppen, sowohl die nichttransduzierte als auch die *Ad-β-Gal*-transduzierte, zeigten bereits am Tag 7 nach der Transplantation eine massive Infiltration der Adventitia, bis hin zur Lamina elastica externa, durch CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten (Abb. 3.22 b und c). Die allogenen Kontrolltransplantate zeigten außerdem eine starke CD4<sup>+</sup>-Infiltration der Intima. Die *Ad-Ox18scFv*-Transplantate wiesen nur in den peripheren Adventitiaregionen eine leichte CD4<sup>+</sup>-Infiltration auf, sowie vereinzelte adhärierende CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten auf der luminalen Seite. Die *Media*-nahen Adventitiabereiche wurden von der CD4<sup>+</sup>-Infiltration hingegen ausgespart (Abb. 3.22 a).

Die Makrophagen und die CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zeigten in der allogenen (Abb. 3.22 f und i) und der *Ad-β-Gal*-Gruppe (Abb. 3.22 e und h) ebenfalls eine starke Infiltration der Adventitia bis zur Lamina elastica externa. Auf der luminalen Seite der *Ad-β-Gal*-Transplantate fanden sich nur einzelne Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten. Die allogenen Transplantate zeigten eine leichte CD68<sup>+</sup>-Färbung in der Intima sowie einzelne adhärierende CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten auf der luminalen Seite. Die *Ad-Ox18scFv*-Transplantate wiesen nur in distalen Adventitiaregionen eine geringe Infiltration durch Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten auf (Abb. 3.22 d und g). Am Tag 7 nach der Transplantation konnte in der *Ad-Ox18scFv*-Gruppe keine Veränderung des Verteilungsmusters von SMC in der Gefäßwand festgestellt werden (Abb. 3.22 j). Transplantate

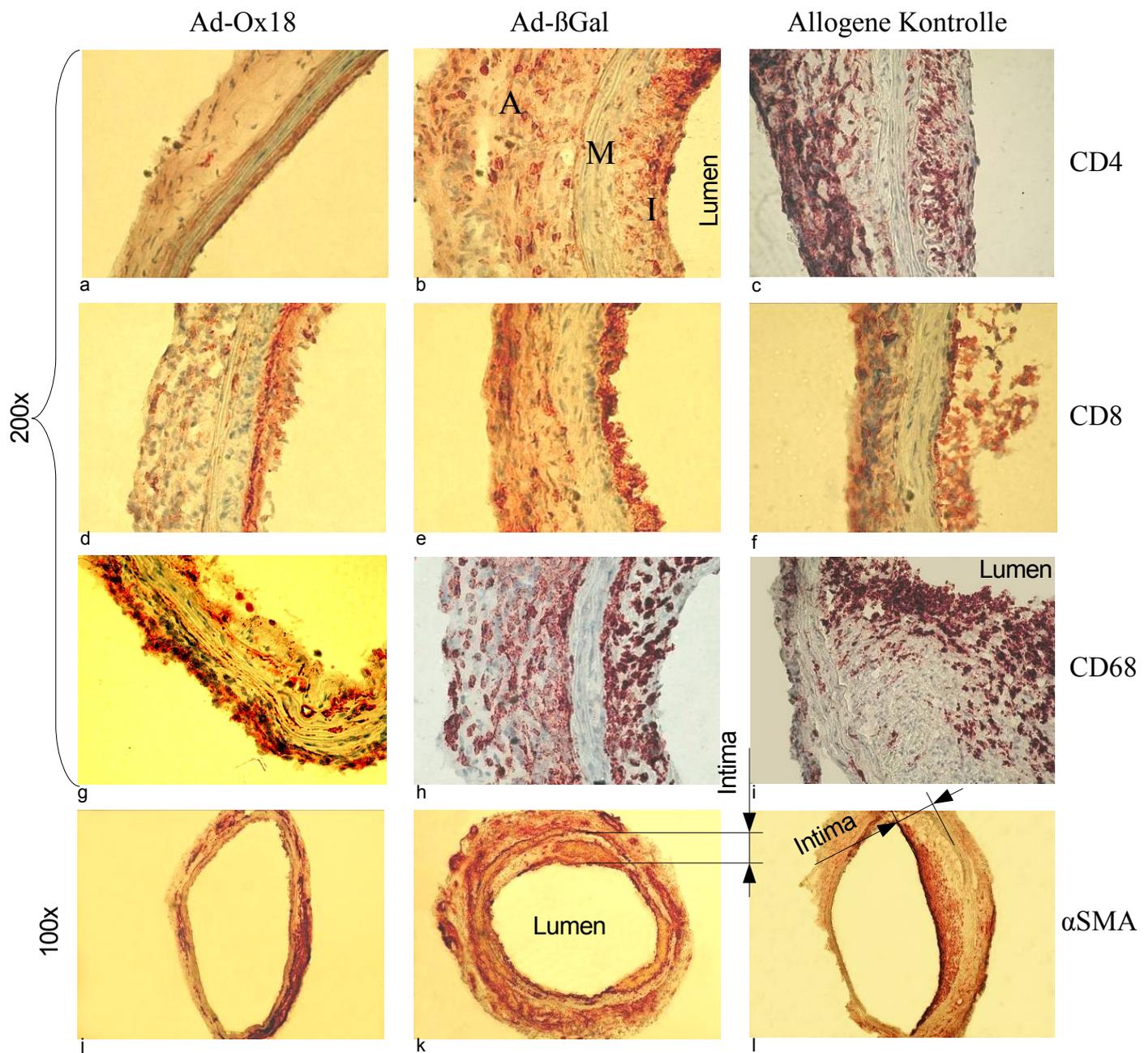


**Abbildung 3.22: Tag 7 nach der Transplantation.**

**Vergrößerung: 200×**

Carotistransplantate: allogene *Ad-Ox18scFv*-transduzierte Gruppe (**links**) sowie zwei allogene Kontrollgruppen, eine *Ad-β-Gal*-transduzierte (**mittig**) und eine nichttransduzierte Kontrollgruppe (**rechts**). Intima (I), Media (M) und Adventitia (A) sind auf dem oberen mittleren Foto beschriftet.

aus der allogenen und aus der *Ad-β-Gal*-Kontrollgruppe zeigten in den adventitianahen Mediaregionen leichte Unregelmäßigkeiten der  $\alpha$ -Aktin-Färbung mit Unterbrechung der Lamina elastica externa (Abb. 3.22 k und l).



**Abbildung 3.23: Tag 28 nach der Transplantation.**

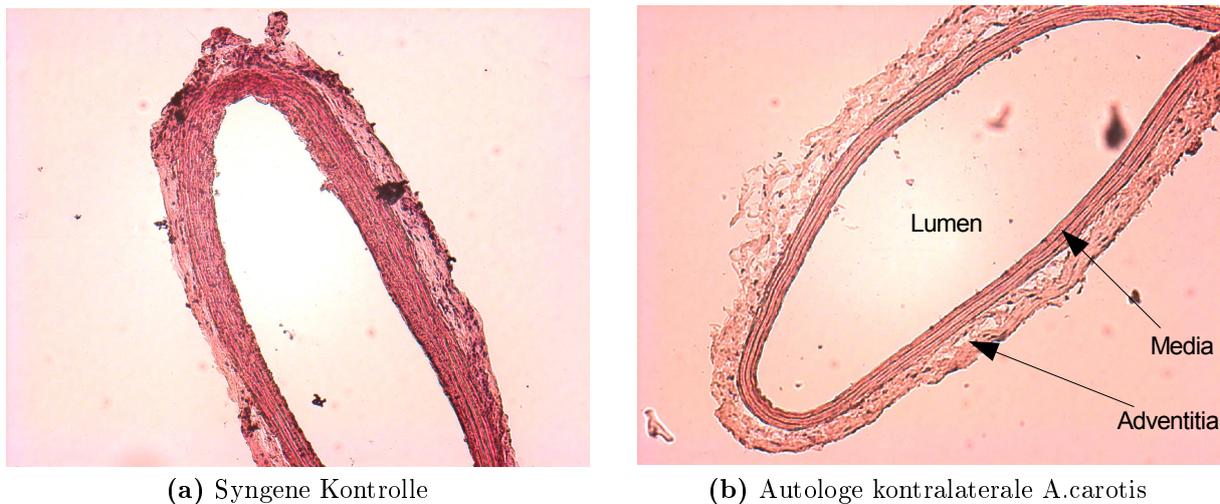
**Vergrößerung:** 200× für CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>; 100× für SMC.

Carotistransplantate: allogene *Ad-Ox18scFv*-transduzierte Gruppe (**links**) sowie zwei allogene Kontrollgruppen, eine *Ad-β-Gal*-transduzierte (**mittig**) und eine nichttransduzierte Kontrollgruppe (**rechts**). Intima (I), Media (M) und Adventitia (A) sind auf dem oberen mittleren Foto beschriftet.

Am Tag 28 nach der Transplantation zeigten die allogenen und die *Ad-β-Gal*-Transplantate eine massive Infiltration der gesamten Adventitia und der bereits hypertrophierten Intima (Abb. 3.23 b und c). Die CD4<sup>+</sup>-Infiltration der *Ad-Ox18scFv*-Gefäße war relativ gering. Eine starke zelluläre Infiltration der Adventitia durch CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zeigte sich in der allogenen und der *Ad-β-Gal*-Kontrollgruppe, in den *Ad-Ox18scFv*-Transplantaten war sie weniger ausgeprägt. Die Intima in diesen drei Gruppen war jedoch von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten stark infiltriert (Abb. 3.23 d-f). Im Vergleich zu den beiden allogenen Kontrollgruppen, die eine massive Makrophagen-Infiltration der Intima und der Adventitia aufwiesen, waren die *Ad-*

*Ox18scFv*-Transplantate durch Makrophagen nur mäßig infiltriert (Abb. 3.23 g-i). In der hypertrophierten Intima und in der Adventitia der beiden allogenen Kontrollgruppen zeigte sich am Tag 28 eine ausgeprägte  $\alpha$ -Aktin-Expression. In der Media-Schicht der beiden Gruppen fand sich nur an wenigen Stellen - als Zeichen des Verlustes der SMC - eine  $\alpha$ -Aktin-Färbung.

Auf den Abbildungen 3.24a und 3.24b sind zum Vergleich die Ergebnisse der HE-Färbung von Kontrollpräparaten zu sehen (ein syngenes Transplantat und eine autologe A.carotis aus der kontralateralen Halsseite am Tag 28 nach der Transplantation). Das syngene Präparat weist keine zelluläre Infiltration auf. Die Media ist zwar leicht hypertrophiert, eine strukturelle Veränderung kann jedoch nicht festgestellt werden.

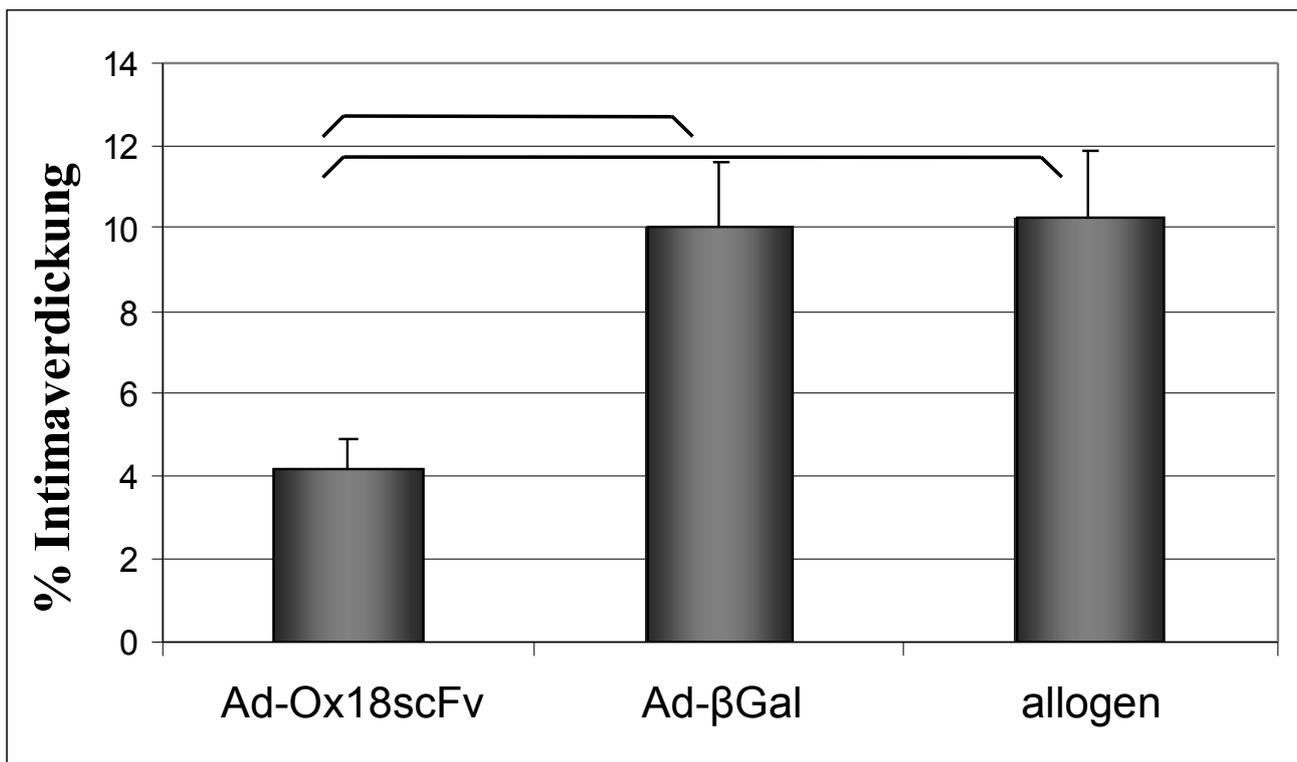


**Abbildung 3.24:** HE-Färbung von A.carotis-Transplantaten, Kontrollhistologie mit einer syngenen (a) und einer autologen A.carotis (b) aus der kontralateralen Halshälfte

### 3.7 Ergebnisse der Morphometrie

Die morphometrische Analyse und Ermittlung der relativen Intimaverdickung ergab eine deutliche Differenz zwischen den *Ad-Ox18scFv*-exprimierenden und den beiden allogenen (*Ad- $\beta$ -Gal*- und nichttransduzierten) Kontrolltransplantaten.

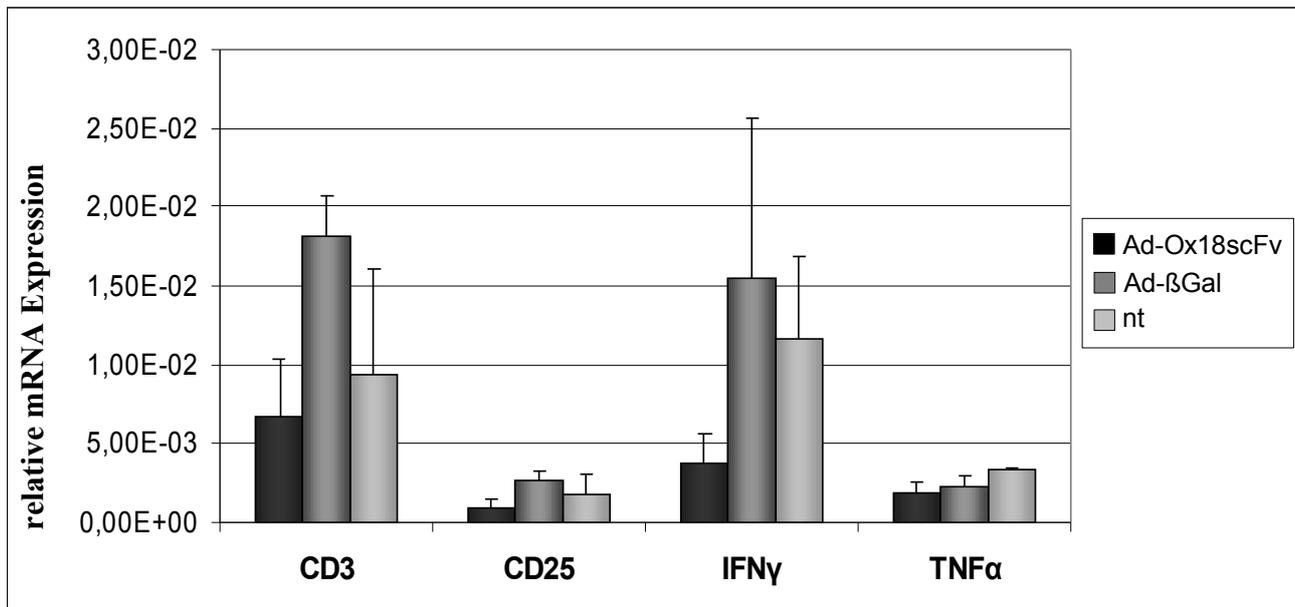
Am Tag 7 fanden sich in den beiden allogenen Kontrollgruppen geringfügige Veränderungen in der Morphologie der Media, jedoch keine wesentliche Größenunterschiede zu der *Ad-Ox18scFv*-Gruppe (Abb. 3.22 j-l). Am Tag 28 nach der Transplantation zeigten die nativen allogenen sowie *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierte Gefäße eine signifikant höhere Intimaverdickung im Vergleich zu den *Ad-Ox18scFv*-transduzierten Transplantaten (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.25: Reduktion der Intimahyperplasie durch *Ad-Ox18scFv*-Transduktion.** Morphometrische Analyse am Tag 28. (n=4, p<0,05.)

### 3.8 mRNA-Expression von T-Zellmarkern und Zytokinen

In Gewebeproben aller Untersuchungsgruppen wurde die zelluläre Infiltration durch Nachweis der mRNA-Expression von T-Zellmarkern und Zytokinen mittels real time RT-PCR evaluiert. Die durch quantitative Analyse ermittelte mRNA-Expression der T-Zellmarker  $CD3^+$  und  $CD25^+$  korreliert mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Analyse (Abb. 3.26).



**Abbildung 3.26: Reduktion der inflammatorischen Zellmarker in allogenen Carotitransplantaten durch die *Ad-Ox18scFv*-Transduktion. Tag 7.** Die Ergebnisse der mRNA-Expression von  $CD3^+$ -,  $CD25^+$ -, *IFN- $\gamma$* -, und *TNF- $\alpha$* -Gene sind auf die  *$\beta$ -Aktin*-mRNA bezogen. (n=3)  
(nt – nichttransduziert)

Am Tag 7 ergab die PCR-Analyse eine starke Erhöhung der Expression von *IFN- $\gamma$*  in den Kontrolltransplantaten. Diese Hochregulation konnte durch den adenoviralen Gentransfer von *Ox18scFv* deutlich reduziert werden. So wiesen die *Ad-Ox18scFv*-transduzierten Transplantate am Tag 7 das niedrigste mRNA-Expressionsniveau von *IFN- $\gamma$*  auf. Außerdem zeigten die *Ad-Ox18scFv*-Gefäße eine deutlich reduzierte Expression von  $CD3^+$  bezogen auf die Expression von  *$\beta$ -Aktin* im Vergleich zu den *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierten und nichttransduzierten allogenen Kontrolltransplantaten (Abb. 3.26). Die Differenz im Expressionsniveau von *IFN- $\gamma$*  und  $CD3^+$  in allen Gruppen war jedoch nicht signifikant, da die Anzahl der Untersuchungstiere pro Gruppe nur 3 betrug. Ein fast identisches Bild beim Nachweis der Expression von  $CD25^+$  und *TNF- $\alpha$*  zeigte sich am Tag 7 in allen drei Gruppen. Alle Transplantate wiesen nur ein schwaches Expressionsniveau von  $CD25^+$  und *TNF- $\alpha$*  auf.

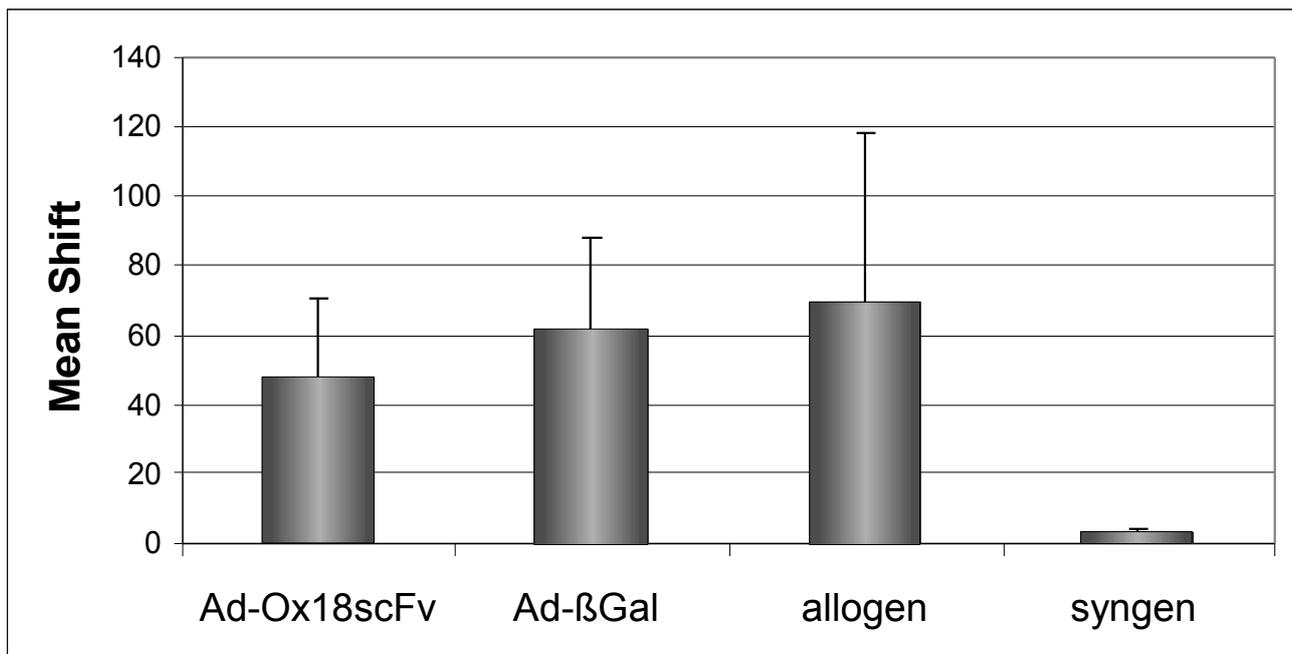
Ähnliche Verhältnisse beim mRNA-Expressionsniveau wurden ebenfalls am 28. postoperativen Tag beobachtet.

### 3.9 Humorale Immunantwort nach der allogenen Transplantation

Aufgrund der geringen Größe des transplantierten Arteriensegmentes und der im Vergleich zu Haut- oder Viszeralorgantransplantation kleinen Zahl von Spender-APC fiel die IgG-Alloantikörperantwort am 28. postoperativen Tag insgesamt schwach aus.

Die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bei Empfängern nach der Transplantation von *Ad-Ox18scFv*-transduzierten Karotiden zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein marginal reduziertes Niveau der Expression von anti-MHC-I-Alloantikörper.

Das Expressionsniveau der Alloantikörper wurde über die Bindung von IgG aus dem Serum der Empfängertiere an allogene Thymozyten des Spenders bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.27 als *Mean Fluorescence shift* (MFI-Shift) dargestellt. Der MFI-Shift ist die Differenz der MFI-Werte nach der Inkubation der Milzzellen mit dem Serum der Empfängertiere und einem Kontrollserum. Im Serum der Kontrollgruppe mit einem syngenem Gefäßtransplantat wurden keine Alloantikörper nachgewiesen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen der *Ad-Ox18scFv*-transduzierten und der beiden Kontrollgruppen festgestellt werden.



**Abbildung 3.27:** Die temporäre Herunterregulation von MHC-I-Oberflächenexpression hat im Transplantationsmodell der Rattenkarotiden keinen Einfluss auf die Induktion der humoralen Immunantwort. (N=4)

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Entwicklung der Transplantationsmodelle

Trotz umfassender Kenntnisse über die Pathomechanismen der Immunreaktionen und weit fortgeschrittener Möglichkeiten der Transplantationsmedizin bleibt die Abstossungsreaktion einer der Hauptgründe für die Transplantatdysfunktion und schließlich für den Transplantatverlust. *Tissue Engineering* und Gentherapie bieten neue Optionen für transplantationsmedizinische Eingriffe. Durch einen Gentransfer lassen sich beispielweise therapeutische Gene in die Zellen einschleusen, welche gezielt die Expression von antigenpräsentierenden Molekülen auf der Zelloberfläche modulieren.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die genetische Modifikation von vaskulären Transplantaten durch einen anti-MHC-I-Intrabody (*Ox18scFv*) und die Klärung der Frage, ob dieser Intrabody aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften eine protektive Wirkung auf das Transplantat *in vivo* ausübt. In einem Transplantationsmodell der Ratte konnten wir *in vivo* die Expression des *Ox18scFv* nachweisen. Die dadurch erreichte Senkung der Immunogenität resultierte in einer Abschwächung der akuten und der chronischen Transplantatabstossung.

In unseren früheren Arbeiten wurden bereits RAEC *in vitro* mit rekombinanten adenoviralen und lentiviralen Konstrukten transduziert, welche das anti-MHC-I-Intrabody-Gen tragen. Die resultierende Reduktion der Immunogenität der modifizierten Zellen zeichnete sich durch verminderte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber lytischer Aktivität von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus [48][52]. Dabei ließ sich durch den adenoviralen Gentransfer in RAEC *in vitro* nur eine transiente Expression von *Ox18scFv* erzielen, die bereits ab dem 10. Tag nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Der Effekt der Herunterregulation von MHC-I durch *Ox18scFv* konnte ebenfalls nach kurzer Zeit nicht mehr gezeigt werden [48]. Die lentivirale Transduktion der RAEC zeigte demgegenüber eine anhaltende *Ox18scFv*-Expression mit einer dauerhaften Herunterregulation von MHC-I [52]. Um diesen immunprotektiven Effekt in einem Tierversuch zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Transplantationsmodelle der Ratte untersucht.

Im ersten Modell diente ein Segment der A.carotis als vaskuläres Transplantat. Dabei wurde für die Transduktion mit *Ox18scFv ex vivo* ein gesamtes arterielles Segment verwendet.

Im anderen Modell etablierten wir zunächst ein Besiedlungsverfahren der mit *Ox18scFv* transduzierten RAEC in einer kleinkalibrigen ePTFE-Prothese. Anschließend wurde die *Cuff*-Technik für die Transplantation der ePTFE-Prothese in die A.abdominalis der Ratte entwickelt. Schließlich wurde das Adhärenzverhalten der besiedelten RAEC und die Zellinfiltration von Immunzellen in die transplantierte Prothese untersucht.

Bei unserem Projekt konnten wir nicht auf ein bereits etabliertes ähnliches Modell zurückgreifen, weil es in der Literatur kaum Informationen über die Besiedlung kleinkalibriger ePTFE-Prothesen (<2 mm Durchmesser) mit RAEC gibt. Bei den meisten publizierten Besiedlungsversuchen handelte es sich um die Besiedlung und Transplantation großkalibriger ePTFE-Prothesen (>6 mm Durchmesser). Die am häufigste verwendeten ECs stammen vom Kaninchen, gefolgt vom Schwein, Hund und Schaf.

Da in unserem Projekt bisher alle *in vitro* Versuche an Ratten-Zellen durchgeführt wurden und der Intrabody gegen Ratten-MHC-I entwickelt wurde, war die logische Konsequenz der bisher gemachten Arbeit - trotz des Fehlens von ähnlichen Modellen - die Entwicklung eines *in vivo* Modells ebenfalls an Ratten. Außerdem ist die Ratte ein besonders häufig genutztes Versuchstier, denn die vergleichsweise niedrigen Haltungskosten, die etablierten mikrochirurgischen Operationstechniken aber auch die geringen Haltungsanforderungen machen sie zu einem geeigneten Objekt der Grundlagenforschung.

## 4.2 Transplantation der vaskulären ePTFE-Prothese

Wie bereits erwähnt, fehlt den Patienten für einen arteriellen Bypass in bis zu 30% der Fälle ein geeigneter autologer Gefäßersatz. Als Material für alloplastische Gefäßprothesen haben sich in solchen Fällen Dacron und ePTFE seit Jahrzehnten bewährt. Erfolgreiche Ergebnisse liefern sie jedoch nur im großlumigen Bereich. Kleinlumige Prothesen (< 5-6 mm) zeigen dagegen eine hohe Verschlussrate durch thrombotische Ereignisse. Dies konnten wir auch in unseren Vorversuchen bei der Transplantation unbehandelter ePTFE-Prothesen in die Ratte beobachten. Für die Verminderung der Thrombogenität wird versucht, die Materialoberfläche zu modifizieren. Bereits etabliert und kommerziell erhältlich sind alloplastische Gefäßprothesen mit Beschichtungen aus Gelatine, Kollagen, Heparin, Silber und Karbon.

Alloplastische Gefäßprothesen, unbehandelt oder modifiziert, erreichten bei weitem noch nicht die Qualität der autologen Venen. Thrombotische Prozesse und relativ schnelle Entwicklung der Neoendothelhyperplasie, die wir auch in unseren Vorversuchen mit unbehandelten ePTFE-Prothesen beobachten konnten, schränken die Anwendung solcher Prothesen erheblich ein und machen sie zum Gefäßersatz zweiter Wahl.

Die präoperative Endothelialisierung wirkt protektiv gegen diese Prozesse und kann somit die Funktionstüchtigkeit des Transplantates verlängern. HERRING *et al.* haben als erste vorgeschlagen, die Thrombogenität kleinlumiger Prothesen durch präoperative Endothelialisierung zu senken. Eine spontane Endothelialisierung der ePTFE-Prothese, die bei manchen Spezies stattfindet [5], wurde bei anderen Spezies sowie beim Menschen [53] nur in den Anastomosenbereichen beobachtet. Dabei stammen die Endothelzellen von den angrenzenden originären Gefäßen [54]. Sie wachsen *per continuitatem* auf das Prothesenlumen zu. Der Rest der Prothese weist auf der Innenseite lediglich einzelne Endothelzellen auf, welche von den zirkulierenden ECs-Vorläuferzellen stammen oder von intramuralen Kapillaren, die das Prothesenlumen erreicht haben. Diese Endothelzellen bilden keine geschlossene Schicht und können somit die Funktion eines Endothels nicht ausüben.

Um eine bessere Adhärenz und Retention der ECs in alloplastischen Prothesen zu erreichen und deren antithrombotische Eigenschaften zu optimieren, werden Prothesen vorbehandelt. ZILLA *et al.* zeigten bereits 1989 eine bessere Haftung von ECs durch die Beschichtung von ePTFE-Prothesen mit Fibrinkleber [15]. Später wurden andere Substanzen wie Fibronectin, Kollagen Typ I und IV, Blutplasma, Fibrin mit und ohne Thrombin, untersucht und miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse bei der Besiedlung von humanen ECs ließen sich durch die Prothesenbeschichtung mit Fibrinkleber erreichen [55]. LAUBE *et al.* verwendete bereits erfolgreich in einer klinischen Studie mit koronaren Bypassen den Fibrinkleber vor der Endothelialisierung der ePTFE-Prothesen [19].

Die Zellhaftung kann durch den Zusatz der Adhäsionspeptide zum Fibrinkleber weiter gesteigert werden [17]. Diese so genannten RGD-Peptide tragen die Arg-Gly-Asp-Sequenz, die von den Integrinen auf der ECs-Oberfläche erkannt werden.

Es gibt grundsätzlich zwei Strategien der Besiedlung von ECs in alloplastischen Prothesen: *single-staged seeding* und *double-staged seeding*. Bei der erstgenannten Methode werden die ECs fast unmittelbar nach der Extraktion besiedelt, bei der anderen werden die ECs vor der Besiedlung über einen längeren Zeitraum kultiviert, um die Zellzahl zu vergrößern. Dies kann mehrere Wochen in Anspruch nehmen, so dass diese Methode nur bei elektiven Bypass-Operationen anwendbar ist. Da es sich in den meisten Fällen um eine dringende Intervention handelt, kommt nur die *single-staged seeding* Strategie in Frage.

Diese Strategie hat jedoch einen Nachteil: durch die enzymatische Behandlung humaner Venen lässt sich nur eine relativ niedrige Zellmenge extrahieren, weil das Venenmaterial bei einer Person nur begrenzt vorhanden ist. Bei der anschließenden Besiedlung der Prothese wird wegen der niedrigen Zellzahl nur eine kleine Besiedlungsdichte auf der Prothesenoberfläche erreicht. Zahlreiche Tierexperimente und prospektive klinische Studien zeigten jedoch, dass sich der Konfluezgrad des Endothels und somit die Reduktion der thrombotischen Ereignisse direkt proportional zu der bei der präoperativen Besiedlung verwendeten Zellkonzentration verhält [56]. Die „Qualität“ der extrahierten ECs ist ein weiterer Faktor, der die Zellretention auf der Prothesenoberfläche beeinflusst. Bis zu 30% der zunächst adhären ECs proliferieren nicht oder lösen sich ab. Der Anteil dieser Zellen ist besonders hoch bei den Patienten mit Diabetes und bei Rauchern. Unter den Bypass-Patienten ist aber gerade der Anteil solcher Patienten sehr hoch.

Eine höhere Besiedlungsdichte und bessere Zellretention lässt sich durch die *double-staged seeding* Strategie erreichen, wie dies YU *et al.* zeigten [57]. Durch die Züchtung von extrahierten ECs in einer Zellkultur erhält man eine Zellmenge (das Mehrfache des Ausgangswertes), welche die schwache Adhärenz und den Zellverlust ausgleichen kann. Aufgrund der Kultivierungszeit von bis zu 5 Wochen bleibt diese Strategie aber den Patienten vorbehalten, deren Zustand einen elektiven Eingriff zulässt.

Da es sich in unserer Arbeit bei allen Transplantationen um die elektiven Eingriffe handelte, wurde für die Prothesenbesiedlung die *double-staged seeding* Strategie verwendet.

Eine optimale endothelialisierte Prothese sollte eine möglichst hohe ECs-Dichte aufweisen und zu jedem Zeitpunkt einsatzbereit sein. Bei der klassischen *double-staged seeding* Strategie, die eine optimale Endothelialisierung gewährleistet, ist man auf autologe ECs angewiesen. Durch den von uns entwickelten *Ox18scFv*-Intrabody besteht die Möglichkeit, von den Vorzügen dieser Strategie zu profitieren, indem man allogene ECs züchtet, die wenig immunogen sind und für die Endothelialisierung alloplastischer Gefäßprothesen unabhängig vom HLA-Mismatch verwendet werden können. Die Zellmodifikation durch *Ox18scFv* wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits *in vitro* an Keratinozyten [48] und Endothelzellen [52] untersucht. Für die Untersuchung

*in vivo* wurde ein Hauttransplantationsmodell der Ratte etabliert. Es ist dementsprechend nahe liegend, dass wir im nächsten Schritt die Genmodifikation der ECs *in vivo* in einem Rattenmodell untersuchten.

Die Verwendung endothelialisierter Prothesen blieb jedoch wegen der schwachen Retention von ECs auf der Prothesenoberfläche eingeschränkt. Abhängig von der Tierart, der Materialbeschaffenheit, der ECs-Quelle (V.jugularis, V.umbilicalis, microvaskuläre ECs) und der Interponatstelle zeigten *in vivo* Untersuchungen unterschiedliche Ergebnisse.

In unserer Arbeit mit Ratten-ECs zeigte sich beispielweise eine schwache Adhärenz und Retention auf der mit Fibrin beschichteten ePTFE-Oberfläche bereits bei unbehandelten RAEC. Aus diesem Grund konnte die eigentliche Fragestellung, nämlich nach dem Einfluss der Modulation der Allogenität durch den Intrabody-Gentransfer auf das Rejektionsverhalten von endothelialisierten alloplastischen Gefäßtransplantaten, nicht beantwortet werden.

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse, zu welchen man bei der Besiedlung von ePTFE-Prothesen gekommen war, haben andere Arbeitsgruppen versucht, die ECs mittels Gentransfer zu modifizieren um deren Adhärenz zu steigern. DICHEK *et al.* transduzierten in einem Baboon-Modell ECs mit einem retroviralen Vektor, der das tPA-(tissue plasminogen activator) und das uPA-Gen (urokinase-plasminogen activator) kodiert. Die Transduktion dieser Vektoren in den besiedelten ECs führte zu reduzierter Plättchenadhäsion und Fibrinakkumulation. Dabei zeigte sich durch die Überexpression von uPA noch zusätzlich ein positiver Effekt auf die Adhäsion und Retention der ECs [58], während die Überexpression von tPA auf die Zellhaftung keinen Einfluss hatte [59]. Vaskuloprotektive Effekte in endothelialisierten Prothesen werden auch durch die Überexpression von NO erwartet, bedingt durch den adenoviralen Gentransfer von eNOS [43].

#### 4.2.1 Besiedlungsverfahren zur Endothelialisierung von ePTFE-Prothesen

Beim Versuchsaufbau unseres Modells wurde die Besiedlungsapparatur der Firma Oligene<sup>®</sup> verwendet. Die Besiedlungskammer (*Tube Chamber System TCS 2c*<sup>®</sup>) ermöglicht es, die ECs in einer Gefäßprothese unter dynamischen *shear stress* Bedingungen zu züchten. RADEMACHER *et al.* zeigten in einem Schweinmodell, dass die ECs unter solchen Bedingungen eine höhere Adhärenz und Retention auf der Prothesenoberfläche aufweisen [60]. In unserem Modell wurden alle Parameter für die Besiedlung einer 5 cm langen ePTFE-Prothese mit RAEC adaptiert.

In dem von AHLSEDE und WILLIAMS beschriebenen *in vivo* Untersuchung der Endothelialisierung von ePTFE-Prothesen (1 mm Durchmesser) in einem Rattenmodell wiesen alle besiedelten Prothesen eine fast konfluente Endothelschicht auf ( $\approx 93\%$  der luminalen Fläche bedeckt vs.  $\approx 1,1\%$  der Fläche bei unbesiedelten Prothesen) [61]. Die Ausfallquote bei ePTFE-Interponaten (1 mm Durchmesser) in der A.abdominalis bei Ratten durch peri- und postoperativer Komplikationen variieren sehr stark. Während bei KON *et al.* 19 von 20 Ratten (95%) mehrere Wochen nach der Operation überlebten [62], waren es bei KIDD *et al.* wegen der perioperativen Sterblichkeit nur 55% [62]. Bezüglich der Offenheitsrate kleinkalibriger interponierter Prothesen variieren die Ergebnisse einzelner Autoren ebenfalls erheblich: von 0% innerhalb der ersten 24 h [63] bis 100% zwei Wochen nach der Operation [64]. Die große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen rührt wahrscheinlich von den unterschiedlichen Operationstechniken her, und obwohl mittlerweile häufig standardisierte Techniken verwendet

werden, liefern die Untersuchungen mit ePTFE-Interponaten bei Ratten auch unter Verwendung der gleichen Technik unterschiedliche Ergebnisse.

ePTFE-Prothesen mit einem Durchmesser von 1 mm sind die kleinsten, die in der Forschung je Anwendung gefunden haben. Sie wurden vor allem bei der Entwicklung mikrochirurgischer Techniken in den 80-er und den früheren 90-er Jahren verwendet. Bei der Suche nach ePTFE-Prothesen für unser Modell fanden wir bei keinem kommerziellen Hersteller solche 1mm-Prothesen im Angebot. Deshalb wurde auf 2mm-Prothesen der Firma *Alfa Research*<sup>®</sup> zurückgegriffen.

Die Ergebnisse der Endothelialisierung von Gefäßprothesen in unserem Modell erfüllten unsere Erwartungen nicht. Lediglich zwei Prothesen aus der syngenen Kontrollgruppe wiesen nach einer mehrwöchigen Implantationszeit eine geschlossene Endothelschicht auf. Die restlichen Präparate zeigten entweder keine ECs oder nur kleine ECs-Cluster. Interessanterweise sind die beiden Prothesen mit einem konfluenten Endothel mit Fibronectin beschichtet worden. Bei der Endothelialisierung kleinkalibriger Prothesen mit humanen ECs zeigte die Vorbehandlung mit Fibrinkleber die besten Ergebnisse. Wegen der kleinen Anzahl Versuchstiere ist es jedoch voreilig, den Rückschluss zu ziehen, dass Fibronectin für die Adhärenzsteigerung der Ratten-ECs besser geeignet ist als Fibrinkleber. Über die Verwendung von RAEC für die Herstellung endothelialisierter Prothesen gab es keine vergleichbaren Literaturdaten, so dass wir uns beim Aufbau unseres Modells an den Untersuchungen mit anderen Spezies orientiert haben. Die Zelleigenschaften unterschiedlicher Spezies können dabei immense Unterschiede aufweisen. So zeigten CLOWES *et al.* in einem Baboon-Modell, dass die transmural einsprießenden Kapillaren nach einer kurzen Implantationszeit bei unbehandelten ePTFE-Prothesen eine geschlossene Endothelschicht bilden [5]. Die Hoffnung, dass humane Kapillaren das gleiche Verhalten aufweisen und in der Lage sind, ein funktionstüchtiges Endothel zu bilden, erfüllte sich jedoch nicht [53]. Diese Ergebnisse waren auf kein anderes Tiermodell übertragbar. Es ist daher gut möglich, dass die Ergebnisse, die in der Forschung im Zusammenhang mit humanem Fibrinkleber für eine Spezies Gültigkeit besitzen, nicht auf das Rattenmodell übertragen werden können. Dies würde bedeuten, dass humaner Fibrinkleber bei der Ratte - anders als beispielweise beim Schwein - für die Adhärenzsteigerung der ECs in ePTFE-Prothesen nicht geeignet ist. Ob Fibronectin im Rattenmodell tatsächlich viel effektiver als Fibrinkleber ist, ließe sich nur durch weitere Untersuchungen beantworten.

Der Effekt der MHC-I-Modulation in RAEC konnte in dieser Arbeit wegen der mangelhaften Zellretention nicht untersucht werden.

## 4.2.2 Operationstechnik

Für die Interposition einer 2mm-Prothese etablierten wir eine *Cuff*-Technik mit Adapterringen aus Silikon (Kapitel 2.4.3). Es gibt einzelne wenige Publikationen, die die Verwendung einer ePTFE-Prothese mit 2mm Durchmesser als Interponat für die A.abdominalis der Ratte beschreiben [65]. Alle Versuche, diese Prothesen mit der Rattenaorta *end-to-end* zu anastomosieren, sind wegen der Durchmesserdiskrepanz fehlgeschlagen. Die Vergrößerung der Kontaktflächen durch schräg angeschnittene Aortenstümpfe erbrachten keinen Vorteil. Aufgrund der Größendifferenz zwischen der ePTFE-Prothese und der Rattenaorta entsteht eine Wandspannung im Anastomosenbereich. Dadurch reißt die Aortenwand ein, was zu Anastomoseninsuffizienz führt.

Der Adapterring aus Silikon kann natürlich nicht mit den konventionellen Anastomosentechniken konkurrieren. Die *Cuff*-Technik wurde nur als Problemlösung entwickelt, um endothelialisierte 2mm-ePTFE-Prothesen in einem Rattenmodell untersuchen zu können. Der Rand des in die Prothese hineingeschobenen Ringes bewirkt eine turbulente Blutströmung in Anastomosenbereichen, und der Winkel zwischen der Prothesenfläche und der exponierten Adapterkante bietet ideale Bedingungen für Fibrinablagerungen und Thrombenbildung. Bei den Vorversuchen während der Entwicklung dieser Anastomosentechnik wiesen die Prothesen in diesem Winkelbereich nach einer 3-monatigen Implantationszeit eine ausgeprägte Neointimahyperplasie auf. Das Neoendothel reichte jedoch nur bis zum Niveau der Ringinnenfläche hin, so dass die Blutperfusion in keiner der Prothesen wesentlich beeinträchtigt war. Unser Ziel war schließlich die Untersuchung der besiedelten RAEC in der Prothese, daher mussten die suboptimalen Strömungsverhältnisse und starke Neointimahyperplasie in Anastomosenbereichen in Kauf genommen werden. Für die histologische Auswertung wurde der mittlere Bereich der Interponate verwendet. Es wurde davon ausgegangen, dass die ECs in diesem Bereich keiner zusätzlichen Belastung durch die turbulente Strömung ausgesetzt waren.

### 4.2.3 Schwachpunkte alloplastischer Gefäßprothesen

Die luminale Seite der Prothese weist bereits eine Stunde nach der Transplantation einen Fibrinüberzug mit einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten auf. Wenige Tage später dringen sie vom Lumen her in die Prothesenwand ein. Kapillare sprießen in die Prothese ein, so dass innerhalb weniger Wochen die gesamte Prothesenwand vom Granulationsgewebe durchdrungen ist. Eine geschlossene Endothelschicht auf der Innenseite kann diesen Prozess verhindern. Außer den bereits erwähnten thrombotisch-proliferativen Prozessen auf der Innenseite der Prothese, welche direkt zu hämodynamischen Funktionsstörungen führen, werden auch degenerative Prozesse im Prothesenmaterial beobachtet, welche die Blutperfusion ebenfalls nachteilig beeinflussen.

Die Prothese wird auch von der Außenseite von mesenchymalen und immunkompetenten Zellen durchwandert, wovon die meisten Zellen CD68-positiv sind. Bei einer längeren Verweildauer im Organismus rücken degenerative Prozesse der Prothesenwand in den Vordergrund. Die Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen beherrschen das Bild einer Fremdkörperreaktion. Lücken im fibrillären Maschenwerk und phagozytierte fibrilläre Prothesenstrukturen in Form intrazellulärer Einschlüsse weisen auf die degenerative Umbauprozesse der Prothesenwand hin. Nach einer langen Implantationszeit treten sogar heterotope Ossifikationen im Prothesenmaterial auf. Bei einigen ePTFE-Prothesen konnten wir solche Prozesse bereits drei Wochen nach der Implantation beobachten.

Künstliche Gefäßprothesen führen auch zu andersartigen Komplikationen. Im Abdominalraum fördern alloplastische Gefäßprothesen durch den direkten Darmkontakt die Entstehung eines Briden- oder Adhäsionsileus. Gefürchtete Komplikationen sind außerdem lokale Infektionen mit aorto-enterischen Fisteln bis hin zu Peritonitis und Sepsis [66].

Allein durch die Endothelialisierung der Prothesen können degenerative Veränderungen also nicht verhindert werden. Degenerative Umbauprozesse führen genauso wie Intimahyperplasie oder Thrombose ebenfalls zu dysfunktionellen Störungen, wenn auch erst nach viel längerer Implantationszeit.

## 4.3 Carotis-Transplantation

### 4.3.1 Reduzierte Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen in vaskulären Gefäßtransplantaten durch den *Ox18scFv*-Intrabody

Allogene Blutgefäße besitzen die gleichen mechanischen Eigenschaften wie die autologen. Alloreaktivität und dadurch bedingte thrombostenosierende Prozesse erschweren jedoch deren Einsatz in der kardio-vaskulären Chirurgie. Durch die Gentherapie kann die Immunogenität allogener Blutgefäße reduziert oder vollständig unterdrückt werden, was sie zu einer interessanten Alternative gegenüber autologen Gefäßtransplantaten macht.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine durch *Ox18scFv*-Transduktion bedingte temporäre Herunterregulation der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen in vaskulären Allotransplantaten zur Modulation der akuten inflammatorischen Immunreaktion und zur Reduktion histologischer Zeichen einer chronischen Abstossungsreaktion des Transplantates führt.

In allen Untersuchungsgruppen zeigte sich histologisch das Bild einer Abstossungsreaktion. So kam es beispielsweise zu morphologischen Strukturalterationen im Sinne einer Transplantatvaskulopathie mit vaskulären und perivaskulären Zellinfiltraten und zur funktionellen Veränderung der SMC und deren Umverteilung innerhalb der Gefäßstrukturen. Die Abstossungsreaktion äußerte sich außerdem in frakturierten Lamina elastica int. und ext. sowie in der durch die Intimaproliferation bedingten Lumeneinengung. Bei den mit *Ox18scFv*-behandelten Transplantaten jedoch konnte nicht nur eine weniger deutlich ausgeprägte inflammatorische Reaktion sondern auch eine verzögerte Entwicklung der Transplantatvaskulopathie festgestellt werden. Die PCR-Ergebnisse, die eine Reduktion der *IFN- $\gamma$* -mRNA-Expression zeigten, untermauern unsere Annahme, dass die Transduktion von ECs mit *Ox18scFv* eine Reduktion der Allogenenität herbeiführt.

### 4.3.2 Zellinfiltration

Die Intensität der Zellinfiltration im Transplantat korreliert meist mit dem Schweregrad der Abstossung und den daraus resultierenden Organschäden. In der vorliegenden Arbeit zeigten die mit *Ox18scFv*-transduzierten vaskulären Transplantate eine deutliche Reduktion der Zellinfiltration. Der Grad der Infiltration in der *Ox18scFv*-Gruppe nimmt zwar im Verlauf der Zeit kontinuierlich zu, erreicht jedoch nicht den Infiltrationsgrad der Kontrollgruppen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant, weil die Zahl der Tiere in jeder Gruppe nur vier betrug.

In der ersten Phase der Auseinandersetzung zwischen Transplantat und Immunsystem des Empfängers kommt es zu einer akuten Abstossungsreaktion des Allotransplantates mit inflammatorischer Infiltration der Intima und der Adventitia mit CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und mit anderen mononukleären Zellen. Diese aktivierten inflammatorischen Zellen sezernieren ein breites Spektrum an Zytokinen wie IL-1, IL-2, IL-6, *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , welche zirkulierende Leukozyten aktivieren und über die Modulation der Oberflächenexpression von endothelialen Adhäsionsmolekülen deren Einwanderung ins Transplantat regulieren. Zytokine stimulieren ebenfalls die Proliferation vaskulärer SMC und deren Migration in die Intima. Die chronische Abstossung, die sich im Verlaufe der nächsten Wochen und Monate entwickelt, manifestiert sich als stenosierende Transplantatvaskulopathie.

Akute und chronische Reaktionen kann man nicht als zwei voneinander unabhängige Entitäten betrachten. In zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen wurde ein wesentlicher Einfluss akuter Abstossungsreaktionen auf die Entwicklung der chronischen Transplantatabstossung gezeigt. Im Anfangsstadium maßgebend ist dabei nicht die Intensität der akuten Reaktion oder der Schweregrad der Organschäden, sondern das Reaktionsmuster der  $CD4^+$ -Lymphozyten. Dies wurde von TULLIUS *et al.* folgendermaßen nachgewiesen: In einem starken Abstossungsmodell mit einem kompletten „*Missmatch*“ wurden Nierentransplantationen durchgeführt. Einige Tage später erfolgte eine syngene Rücktransplantation. Anschließend wurde eine mögliche Reversibilität der Zeichen der akuten Abstossung nach der syngenen Rücktransplantation untersucht. Es wurde gezeigt, dass nach der Rücktransplantation die Zeichen einer akuten Reaktion in den Transplantaten mit der  $T_H2$ -assoziierten Immunantwort vollständig umkehrbar waren. Die Transplantate mit einem dominierenden  $T_H1$  Zytokinmuster zeigten hingegen persistierende morphologische Strukturveränderungen mit weiter zunehmenden Organdysfunktionen [67] [68].

Bei einer längeren Implantationszeit treten im Allotransplantat nach einem kritischen Zeitintervall morphologische und funktionelle Veränderungen auf, die nach der Rücktransplantation nicht mehr reversibel sind und sogar weiter zunehmen [69]. In diesem Fall kann die Entwicklung und das Fortschreiten einer Vaskulopathie auch in Abwesenheit immunogener Faktoren nicht mehr aufgehalten werden. Dies legt nahe, dass nichtimmunologische Ursachen bei der chronischen Abstossung ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen. Neben operationsbedingten Faktoren, wie Organischämie, Operationstrauma und Reperfusionsschaden sind wahrscheinlich alloantigen-unabhängige molekulare Mechanismen der wichtigste Faktor bei diesem pathologischen Prozess. Proliferative Aktivität und Migration von Fibroblasten, endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle, Störung der endothelialen Barrierefunktion und andere Mechanismen werden durch die akute Abstossung ausgelöst. Ist ein bestimmter Zeitpunkt überschritten, können sich diese Prozesse verselbständigen und bleiben auch nach der Entfernung der auslösenden Faktoren aktiv, was in eine progrediente chronische Transplantatdysfunktion mündet.

Zusammenfassend wird die chronische Transplantatabstossung als ein multifaktorielles Geschehen betrachtet, das sowohl von immunologischen als auch von nicht immunologischen Faktoren beeinflusst wird. Die akute Abstossung scheint jedoch dabei der wichtigste kausale Faktor zu sein. Ein wichtiges Argument dafür ist die Korrelation zwischen dem Schweregrad der chronischen Organdysfunktion und der Anzahl der akuten Abstossungsepisoden bei transplantierten Patienten [70]. Es bleibt jedoch noch unklar, warum sich bei einer Suppressionstherapie eine chronische Abstossungsreaktion entwickelt, während eine akute dabei effektiv unterbunden wird. TULLIUS vermutet, dass es sich in diesem Fall um eine „auf dem subklinischen Niveau persistierende akute Abstossungsreaktion“ handeln könnte.

Es gibt also Hinweise dafür, dass durch die Reduktion der akuten Reaktion auch die chronische Transplantatdysfunktion hinausgezögert werden kann. Die transendotheliale Migration der inflammatorischen Zellen stellt ein Schlüsselereignis bei der Entwicklung der inflammatorischen Reaktion und später der Transplantatvaskulopathie dar. Durch die Genmodifikation der Endothelzellen kann die transendotheliale Einwanderung der immunkompetenten Zellen ins Transplantat reduziert werden.

Der MHC-I-Komplex hat eine Schlüsselfunktion bei der Alloantigenerkennung durch die zytotoxische  $CD8^+$ -T-Lymphozyten. Durch die Herunterregulation der MHC-I-Expression wird deren Aktivierung verhindert. Dies hat die Reduktion der akuten Abstossung zur Folge. Durch die fehlende Zytokinausschüttung und die Stimulation durch Wachstumsfaktoren bleiben auch die Mechanismen inaktiv, welche die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie auslösen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Hypothese, dass durch frühe Inhibition der inflammatorischen Immunantwort die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie mit Intimahyperplasie im ersten Monat nach der Transplantation reduziert werden kann. Es wurde gezeigt, dass die Expression des *Ox18scFv* in ECs des Carotis-Allotransplantates eine makrophagiale und lymphozytäre Infiltration der Gefäßwand reduziert. Bei der morphometrischen Analyse wurde eine Reduktion der intimalen Proliferation festgestellt. Da die Intimaproliferation ein zuverlässiges Zeichen dafür ist, dass eine chronische Transplantatdysfunktion vorliegt, deutet die Reduktion der Intimaproliferation darauf hin, dass die *Ox18scFv*-bedingte Reduktion der MHC-I-Expression die Entwicklung einer chronischen Abstoßung verlangsamen kann.

Durch die reduzierte Oberflächenexpression von MHC-I werden sowohl der direkte als auch der indirekte Wege der Alloantigenerkennung beeinflusst. Der MHC-I/Peptidantigen-Komplex ist der Ligand für den CD8<sup>+</sup>-Rezeptor. Bei der reduzierten endothelialen MHC-I-Expression sinkt dementsprechend die Zahl der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, die auf dem „direkten Weg“ das Endothel angreifen können. Die direkte Alloantigenerkennung durch CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten spielen in unserem Modell deswegen eine untergeordnete Rolle, weil das vaskuläre Transplantat nur wenig APC enthält, deren MHC-II-Moleküle mit dem CD4<sup>+</sup>-Rezeptor interagieren.

Unter bestimmten Umständen, z.B. unter einer Zytokinstimulation bei Autoimmunprozessen, wird aber eine endotheliale MHC-II-Expression beobachtet [38]. Das Endothel größerer Säugtiere, einschließlich dasjenige des Menschen, weist in bestimmten Gefäßregionen (z.B. in Koronargefäßen) sogar eine konstitutive MHC-II-Expression auf. Das Ratten-Endothel zeigt dagegen keine konstitutive MHC-II-Expression [71].

Bei der allogenen Transplantation findet man die MHC-II-Expression auch im Spender-Endothel. Es wurde jedoch von KAPESIDOU *et al.* gezeigt, dass die MHC-II-exprimierenden ECs vom Empfänger stammen. Dies erklärt sich dadurch, dass die Spender-ECs im Transplantat teilweise durch Empfänger-ECs ersetzt werden [72]. Somit agieren Empfänger-ECs im Transplantatendothel als APC und fördern dadurch die indirekte Alloantigenerkennung. Bei der direkten Alloantigenerkennung dagegen ist die endotheliale MHC-II-Expression im Ratten-Modell nicht von besonders großer Bedeutung.

Der direkte Weg der Alloantigenerkennung spielt nur kurze Zeit nach der Transplantation eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung. *Passenger leucocytes* des Spenders, deren MHC-II-Moleküle von direkten Empfänger-CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkannt werden, verlassen nach einigen Wochen das Transplantat, so dass die Intensität der direkten Alloantigenerkennung langsam abklingt, bis sie schließlich sistiert. Demgegenüber gewinnt kontinuierlich der indirekte Weg an Bedeutung. In mehreren klinischen Studien wurden die Spezifität der aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei transplantierten Patienten untersucht. Dabei konnte bei den meisten Patienten mit chronischer Transplantatabstoßung eine hohe Aktivität der „indirekten“ alloantigenspezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt werden. Dagegen zeigten Patienten ohne Zeichen einer chronischen Abstoßung keinen solchen Anstieg [73][74]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die indirekte Alloantigenerkennung bei der Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion ein wichtiger Faktor ist.

Die Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen ist in der Lage, den indirekten Weg der Alloantigenerkennung zu modulieren. Beim indirekten Weg werden die MHC-I-Fragmente der Spenderzellen aus den Zelltrümmern des Transplantats in die regionalen Lymphknoten und letztendlich in die Milz abtransportiert, wo sie von APC aufgenommen und präsentiert werden. Durch die reduzierte MHC-I-Expression im Transplantat sinkt dementsprechend die Zahl der MHC-I-Komplexe, die für die Antigenpräsentation durch APC des Empfängers zur

Verfügung steht. Dadurch wird die Zahl der durch die indirekte Antigenerkennung aktivierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und der Makrophagen gesenkt. Dies hat eine Reduktion der lympho- und monozytären Infiltration des Transplantates zur Folge, die wir in unserem Modell beobachtet haben.

Der immunmodulatorische Effekt von *Ox18scFv* kann zwar die Anzahl der infiltrierenden Zellen reduzieren, ist jedoch nicht in der Lage, die Einwanderung komplett zu unterbinden. In den *in vitro*-Versuchen mit RAEC zeigte sich, dass der *Ox18scFv* die Oberflächenexpression von MHC-I zwar effizient reduzieren kann, einen vollständigen MHC-I-*knockout* Phänotyp jedoch nicht zu erzeugen vermag. In Anbetracht dieser *in vitro* Untersuchungen ist anzunehmen, dass sich eine restliche Oberflächenexpression von MHC-I nach der Transduktion eines ganzen Gefäßes mit *Ox18scFv* wohl ebenfalls nicht vermeiden lässt. Ein Teil der MHC-I-Molekülen entkommt der intrazellulären Bindung durch den *Ox18scFv* und kann somit die Alloantigenerkennung weitervermitteln. Außerdem zeigten die Ergebnisse des  $\beta$ -Gal-Nachweises, dass nicht alle ECs in der Intimaschicht transduziert werden und damit auch noch eine restliche MHC-I-Expression verbleibt.

Die genaue Relation CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/Makrophagen war schwer abzuschätzen, da die Makrophagen der Ratte ebenfalls CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Rezeptoren exprimieren. Es hat sich herausgestellt, dass die meisten Blutmonozyten in unbehandelten Ratten eine hohe Oberflächenexpression von CD4<sup>+</sup> aufweisen. Bei einer akuten Abstossung oder mittels Stimulation durch *IFN*- $\gamma$  wird die CD4<sup>+</sup>-Expression reduziert und die Expression von CD8<sup>+</sup> und MHC-II aktiviert [75] [76]. Daraus folgt, dass anti-CD4<sup>+</sup>- und anti-CD8<sup>+</sup>-Antikörper auch die entsprechenden Epitope der Makrophagen binden können. So ist es nicht auszuschließen, dass die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Färbung in der vorliegenden Arbeit nicht nur durch die entsprechende Lymphozytenpopulationen, sondern zum Teil auch durch Makrophagen zustande kommt. Um diese Frage zu klären, sind weitere Untersuchungen mit Doppelmarkierung (CD68<sup>+</sup> plus CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>) erforderlich.

### 4.3.3 Reduzierte Expression von Zellmarkern und Zytokinen

Die Ergebnisse der Immunhistochemie stimmen mit der Untersuchung der Zytokin- und Zellmarker-mRNA Expression überein, die durch RT-PCR erfolgte. In *Ad-Ox18scFv*-transduzierten Carotis-Transplantaten fand sich eine leichte bis moderate Reduktion der CD3<sup>+</sup>- und der CD25<sup>+</sup>-mRNA Expression. Die Expression von *IFN*- $\gamma$ -mRNA hingegen zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine starke Reduktion.

Durch die Transduktion von *Ox18scFv* wird die Oberflächenexpression von MHC-I reduziert. Man kann eine Kausalkette von Ereignissen konstruieren, welche durch die reduzierte MHC-I-Expression ausgelöst wird: zunächst sinkt die Menge der MHC-I-Fragmente des Spenders, die von APC des Empfängers präsentiert werden. Dies führt zu einer reduzierten Aktivierung der CD8<sup>+</sup>- sowie CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, welche in den indirekten Weg der Alloantigenerkennung einbezogen sind. Wegen der niedrigen Zahl der aktivierten CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und wegen der reduzierten Oberflächenexpression ihres Rezeptorliganden (MHC-I) auf den Spenderzellen sinkt die Einwanderung der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in das Transplantat. Aktivierte CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten sind neben den T<sub>H</sub>1-Lymphozyten wichtige Quellen von *IFN*- $\gamma$ . *IFN*- $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen. Die logische Konsequenz daraus ist, dass durch die reduzierte Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten auch die Aktivierung von Makrophagen reduziert wird. Die Reduktion der Zellinfiltration und die verminderte Expression von *IFN*- $\gamma$  in der Intrabody-Gruppe lässt sich auf diese Weise kausalpathologisch mit der *Ox18scFv*-Transduktion verknüpfen.

Es wurde bereits erwähnt, dass *IFN- $\gamma$*  durch direkte Aktivierung der SMC atherosklerotische Prozesse einleiten kann. Serologische Neutralisation oder verminderte *IFN- $\gamma$* -Expression führen zu einer Reduktion der Neointimahyperplasie bei allogener Transplantation. Andererseits kann Überexpression dieses Zytokins eine Transplantatvaskulopathie auslösen und verstärken. Dementsprechend kann angenommen werden, dass ein reduziertes *IFN- $\gamma$* -Expressionsniveau bei *Ox18scFv*-transduzierten Carotis-Allotransplantaten für die am Tag 28 beobachtete Reduktion der Intimahyperplasie mitverantwortlich ist (Abb. 3.26). Allerdings ist die *Ox18scFv*-Transduktion nicht in der Lage diesen Prozess vollständig zu unterdrücken. Es wäre jedoch voreilig, die signifikanten Unterschiede bei der Neointimaformation, die sich beim Vergleich der Intrabody-transduzierten Gruppe mit der Kontroll-Gruppe zeigen, allein der Reduktion der *IFN- $\gamma$* -Expression zuzuschreiben.

Die *IFN- $\gamma$* -Expression wird unter anderem durch IL-2 kontrolliert. IL-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Monozyten und stimuliert darüber hinaus die Bildung freier Radikale durch die Makrophagen, was maßgebend zur Auslösung von oxidativem Stress beiträgt. IL-1 und IL-2 sind weitere bedeutende Mediatoren bei inflammatorischen Reaktionen. Wegen der wechselseitigen Beeinflussung der Zytokine sollte in weiteren Versuchen deren Expressionsmuster untersucht werden. Bekannt ist, dass *IFN- $\gamma$*  und IL-4 zwei wichtige Gegenspieler bei „*Remodeling*“-Vorgängen im Rahmen einer Transplantatvaskulopathie sind. Die Integrität der Gefäßwand wird durch die  $T_H1/T_H2$ -Balance aufrechterhalten. Eine Relationsverschiebung zugunsten der T-Lymphozyten vom Typ  $T_H2$  mit einer hohen IL-4-Expression und einer Blockade des *IFN- $\gamma$* -Signalweges bringt die „*Remodeling*“-Prozesse aus dem Gleichgewicht. Dies führt zur Dominanz proteolytischer Aktivität, welche in einem Wandaneurysma endet.  $T_H1$ -prädominante inflammatorische Reaktionen mit überwiegender *IFN- $\gamma$* -Expression fördert die proliferative Aktivität, welche zu atherosklerotischen Alterationen führt und schließlich eine Gefäßstenose verursacht [77].

Dieses ein Beispiel zeigt, wie fragil und sensibel das Gleichgewicht der Zytokine ist. Weitere Versuche sollen zeigen, wie sich die Reduktion der MHC-I-Expression auf weitere Zytokine auswirkt. Die  $T_H1/T_H2$ -Zytokinbalance und vor allem IL-4, als wichtiger Gegenspieler von *IFN- $\gamma$* , sind dabei von großem Interesse. Diesbezüglich sollte die Untersuchung der  $T_H1/T_H2$ -Zytokinbalance sowie die Bestimmung der IL-4-Expression zu einem späteren Zeitpunkt in Erwägung gezogen werden.

Es ist bekannt, dass *TNF- $\alpha$*  ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Abstossungsreaktion spielt. Es besteht eine enge Korrelation zwischen einem hohen Expressionsniveau von *TNF- $\alpha$*  und der Intensität der Transplantatabstossung [78]. In unserem Modell zeigte sich jedoch in allen Untersuchungsgruppen ein gleich niedriges Expressionsniveau von *TNF- $\alpha$* -mRNA. Die gleichen Ergebnisse in der syngenen und der allogenen Kontrollgruppen lassen vermuten, dass die Gruppenunterschiede im Expressionsniveau von *TNF- $\alpha$*  wegen einer extrem niedrigen Masse der untersuchten Carotisstücke unter der Nachweisgrenze lagen.

#### 4.3.4 Intimahyperplasie

Die morphometrische Analyse der vaskulären Transplantate zeigte eine deutlich reduzierte Intimahyperplasie in der *Ad-Ox18scFv*-Gruppe. Auch wenn am Tag 7 morphometrisch noch keine Unterschiede zwischen allen Untersuchungstieren festzustellen waren, wiesen die adventitia-nahen Mediaregionen der beiden Kontrollgruppen zu diesem Zeitpunkt bereits kleine morphologische Strukturveränderungen auf. Unmittelbar danach kam es zu einer raschen Intimaproliferation in den beiden Kontrollgruppen, so dass der Proliferations-

index in diesen Gruppen am Tag 28 signifikant höher war als in der *Ox18scFv*-Gruppe. *Ox18scFv* konnte die Intimaproliferation deutlich verlangsamen, war jedoch nicht in der Lage, diesen Prozess vollständig zu verhindern. Gemäß der Erwartungen wurde durch *Ad-Ox18scFv* eine Verzögerung der intimalen Proliferation von SMC und deren Umschaltung vom kontraktile auf den synthetischen Typ beobachtet. Dies wurde durch die Verteilung von  $\alpha$ -Aktin-Färbung in der Media und Adventitia bestätigt. Am Tag 28 kam es noch in keiner Gruppe zu einer relevanten Stenose. An dieser Stelle muss man jedoch sagen, dass die morphometrisch erfassten Ergebnisse auch innerhalb der einzelnen Gruppen eine erhebliche Variation aufwiesen. Um die Ergebnisse zu validieren und um zu klären, wie lange der protektive Effekt von *Ox18scFv* auf die Entwicklung der Intimahyperplasie persistiert, sind noch weitere Untersuchungen mit größeren Untersuchungskollektiven erforderlich.

Zusätzlich müsste in den ersten postoperativen Wochen die Funktion von SMC bzw. deren Phänotyp untersucht werden, denn fehlende morphologische Veränderungen in der Media-Struktur sind noch kein sicheres Zeichen für einen immunprotektiven Effekt. ANDRIAMBELOSON konnte in einem allogenen Transplantationsmodell der Ratte einen vollständigen Funktionsverlust der SMC innerhalb von 14 Tagen nach der Transplantation nachweisen, obwohl sichtbare morphologische Veränderungen erst zwei Wochen später beobachtet wurden [79].

#### 4.3.5 Humorale Antwort

Alloantikörper können sich durch Komplementaktivierung ebenfalls an der Transplantatabstossung beteiligen, jedoch ist ihre Rolle in diesem Prozess noch nicht ausreichend untersucht [80]. Es wurde gezeigt, dass anti-MHC-I-Antikörper - durch die Aktivierung der Tyrosinkinase und durch die nachfolgende Phosphorylierung der intrazellulären Proteine - zur Expressionssteigerung des FGF-Rezeptors (*fibroblast growth factor*) in den ECs führen [81]. Eine dadurch ausgelöste intrazelluläre Signaltransduktion unterstützt eine chronische Abstossungsreaktion und zwar durch die Produktion des endothelialen *tissue factor*'s [82] [83] und durch die Modulation der proliferativen Aktivität von ECs und SMC. Dabei unterstützen *IFN- $\gamma$*  und *TNF- $\alpha$*  aufgrund der Steigerung der MHC-I-Expression die inflammatorische Immunreaktion. In unserem Modell zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der insgesamt schwach ausgefallenen IgG-Alloantikörperantwort in allen Untersuchungsgruppen, so dass über den Effekt der MHC-I-Herunterregulation auf die humorale Antwort keine Aussage gemacht werden kann. Von experimentellen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die Alloantikörper, welche gegen die endothelspezifischen Antigene gerichtet sind, eng mit der Entwicklung einer chronischen Transplantatabstossung assoziiert sind [84]. Carotis-Transplantate haben im Vergleich zu Viszeralorganen eine sehr geringe Masse, so dass die Alloantikörperantwort in unserem Modell wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze lag.

#### 4.3.6 Immunreaktion auf den adenoviralen Vektor

Mit dem adenoviralen Vektor besitzen wir ein Werkzeug für einen effizienten Gentransfer. Es wurde in unserer Arbeit gezeigt, dass die adenovirale Transduktion *Ox18scFv* in die ECs die MHC-I-Expression und somit deren Immunogenität reduzieren kann. Andererseits sind die adenoviralen Vektoren in der Lage, selber eine inflammatorische Immunreaktion gegenüber der transduzierten Zelle auszulösen, an der die Abwehrmechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort beteiligt sind. In adenoviralen Vektoren der neuen Generation wird

---

eine gesamte kodierende Region deletiert (*helper-dependent Ad vectors*), so dass die Aufnahmekapazität für Transgen-DNA vergrößert und gleichzeitig die erworbene Immunantwort minimiert wird [85]. Die angeborene Immunantwort lässt sich von *helper-dependent Ad vectors* jedoch nicht reduzieren. Sie bleibt das letzte große Problem für eine effiziente Anwendung adenoviraler Vektoren beim Menschen [86].

Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems spielen eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunantwort auf die viralen Pathogene. Granulozyten werden als erste Zellpopulation während der Akutphase einer antiviralen Reaktion rekrutiert. Die von ihnen sezernierten Zytokine lösen eine Immunkaskade aus und besitzen selber eine antivirale Aktivität. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sezernieren *IFN- $\gamma$* , welches eine virus-spezifische adaptive T<sub>H</sub>1-dominante Immunantwort hervorruft. Makrophagen, die später an den Ort des Geschehens einwandern, sind das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Sie agieren als APC, sezernieren aber auch antivirale Zytokine und können infizierte Zellen eliminieren.

Um die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Reaktion auf den adenoviralen Vektor zu minimieren, werden transduzierte Carotis-Transplantate 24 Stunden vor der Transplantation in Medium inkubiert.

Es ist schwer zu beurteilen, in welchem Ausmaß die Ad-Vektor-spezifische Immunität in unserem Modell das Endergebnis beeinflusst. Der Reduktion der Zellallogenität durch das *Ox18scFv*-Transgen steht die Immunogenität des adenoviralen Vektors gegenüber. *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierte Gefäße weisen keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten allogenen Kontrollgruppe auf. Lediglich die Zahl der CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in der Adventitia und der Intima *Ad- $\beta$ -Gal*-transduzierter Carotis-Transplantate war am Tag 28 im Vergleich zur unbehandelten allogenen Kontrollgruppe minimal erhöht. Außerdem konnte in dieser Arbeit eine deutliche Reduktion inflammatorischer Zeichen durch das Intrabody-Transgen nachgewiesen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das proinflammatorische Potenzial des Ad-Vektors in unserem Modell nur unwesentlich ins Gewicht fällt. Der proinflammatorische Effekt des Ad-Vektors ist zudem von kürzerer Dauer als der immunmodulierende des *Ox18scFv*. Die Ad-Vektor-spezifische Immunogenität verschwindet, sobald die Ad-Vektor-Expression sistiert. Auch wenn bereits nach wenigen Tagen die *Ox18scFv*-Transgen-Expression nicht mehr nachweisbar ist, hält der immunprotektive Effekt der MHC-I-Herunterregulation durch *Ox18scFv* an.

Eine genauere Beurteilung der Ad-Vektor-spezifischen Immunaktivität würde die Untersuchung *Ox18scFv*-transduzierter Gefäßtransplantate bei der syngenen Transplantation erfordern.

## 4.4 Ausblick

Es wurde bereits erwähnt, dass endothelialisierte ePTFE-Prothesen über einen klaren Vorteil gegenüber den nicht endothelialisierten verfügen. HERRING *et al.* räumen jedoch ein, dass dies nur die großlumigen Prothesen betrifft. In einer klinischen Studie zeigten sie, dass die endothelialisierten kleinlumigen ePTFE-Prothesen bei peripheren *below-the-knee* Bypassen keinen Benefit gegenüber nicht endothelialisierten aufweisen. Die Prothesendysfunktion war dabei nicht mit einer unzureichenden Endothelialisierung, sondern mit der Neointimahyperplasie in den Anastomosenbereichen assoziiert [87]. Dies bedeutet, dass die physikalischen Eigenschaften von ePTFE oder Dacron – wie die Starrheit des Materials – und eine relativ größere Wanddicke im Vergleich zu Blutgefäßen die limitierenden Faktoren bei der Transplantation kleinkalibriger Prothesen sind [88].

In der jüngsten Vergangenheit werden neuartige Materialien untersucht, deren physikalische Eigenschaften möglichst denen der originalen Blutgefäße ähneln.

Für die Herstellung artifizieller Gefäße mittels *Tissue Engineering* können auch partiell oder komplett dezellularisierte Blutgefäße als Matrix verwendet werden. So entfernten zunächst TEEBKEN *et al.* in einem xenogenen Transplantationsmodell aus einem Blutgefäß alle zellulären Elemente. Nach der Besiedlung mit humanen ECs und SMC und der anschließenden Inkubation unter pulsatilen Bedingungen entwickelte sich ein einschichtiges geschlossenes Endothel. Komplette Dezellularisierung eines xenogenen Gefäßtransplantates verhinderte in diesem Modell eine adaptive Immunantwort, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der Wandfibrose [89].

GOMES *et al.* verwendeten deendothelialisierte Blutgefäße in einem allogenen Modell. Es zeigte, dass die Besiedlung solcher Gefäße mit syngenen SMC eine Neointimahyperplasie reduzieren kann [90]. Die Thrombogenität einer solchen Gefäßprothese, verursacht durch den direkten Kontakt von SMC mit dem Blut, kann durch anschließende Besiedlung von syngenen ECs vermindert werden [57].

Mittels *Tissue Engineering* wird versucht, komplett biologische vaskuläre Prothesen zu entwickeln, ohne Zusatz von synthetischen Materialien. Als anatomisches Gerüst des Gefäßes werden dabei extrazelluläre Matrixproteine (ECM Proteine, *extracellular matrix proteins*) verwendet. Ähnlich wie bei alloplastischen Prothesen werden diese Matrices mit Zellen besiedelt und anschließend in einer organtypischen Umgebung inkubiert. Der Vorteil solcher biologischen Konstrukte ist, dass ihre Matrixproteine kein starres inertes Gerüst bilden, sondern unter Einfluss von SMC und ECs in ihrer Struktur moduliert werden können. Solche Prothesen sind in der Lage, sich während der Inkubationsphase optimal an den wachsenden Druck und den *shear stress* anzupassen. Bereits 1986 verwendete WEINBERG Typ-I-Kollagen als Matrix für die Herstellung einer mehrschichtigen Bioprothese [91]. Solche Gefäße weisen eine Mediaschicht mit kollagenproduzierenden SMC und ein funktionell aktives Endothel auf. Ihre mechanische Reißfestigkeit erreichte jedoch auch nach der Wandverstärkung mit einem *Dacron-Mesh* bei weitem nicht die Festigkeit der originalen Gefäße.

Ein prinzipiell neues Konzept entwickelte L'HEUREUX. In mehreren Schritten wird aus den autologen Zellen eine dreischichtige vaskuläre Gefäßprothese gezüchtet [92]. Autologe Zellen sind nicht immunogen, das Fehlen synthetischen Materials schließt eine Fremdkörperreaktion aus, und sowohl die Zellen als auch die azellulären Strukturen in einem solchen Konstrukt haben ein ausgeprägtes Anpassungsvermögen. Der Schwachpunkt solcher Prothesen war bisher ihre

---

niedrige Reißfestigkeit, so dass sie nur in Niederdruck-Systemen ( $< 20$  mm Hg) in der Pädiatrie eingesetzt werden konnten [93].

Neu im Modell von L'HEUREUX ist, dass jede einzelne Wandschicht separat herangezüchtet wird. Die SMC werden zunächst in einer konventionellen Kulturflasche in Anwesenheit von Ascorbinsäure kultiviert, welche die Produktion der extrazellulären Matrix fördert. Nach einigen Wochen bildet sich eine Schicht, die wie ein Rasen vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden kann. Diese aus SMC und extrazellulärem Kollagen bestehende Schicht wird um ein ePTFE-Tubus gewickelt und unter pulsatilen Bedingungen kultiviert. Diese Schicht bildet später die Media der Gefäßprothese. Eine Woche später wird auf die gleiche Weise die nächste, ebenfalls SMC- und kollagenhaltige Schicht (die künftige Adventitia) hinzugefügt. Die anschließende Inkubation über acht Wochen unter physiologischen Bedingungen lässt beide Schichten zu einer festen, stabilen Einheit fusionieren, welche die Wand der Gefäßprothese bildet. Eine solche Prothese hält einen hydrostatischen Druck von über 2500 mm Hg, dem 1.5-fachen dessen, was die *V.saphena magna* aushalten kann. Zum Schluss werden ECs auf der luminalen Prothesenseite kultiviert. Der gesamte Prozess der Züchtung solcher biologischer Gefäßprothesen dauert über drei Monate, was ihren klinischen Einsatz wesentlich erschwert.

Eine ausgeprägte mechanische Stabilität lässt sich auch mit synthetischen resorbierbaren Polymeren erreichen, welche einer Fibroblastenkultur als tubuläre 3-D-Matrix dient. Mit Polyglycolsäure (*polyglycolic acid*, PGA) und Polyethylenglycol (PEG) als Gerüstsubstanzen werden Gefäßprothesen gezüchtet, deren Reißfestigkeit die der originalen venösen Transplantate übersteigt. Zusätzlich können diese Polymermatrices weiter optimiert werden, indem in ihre Struktur bestimmte Moleküle wie RGD-Adhäsionspeptide, Heparin, und *growth factors* integriert werden. MATSUMARA *et al.* beschreiben die Besiedlung von resorbierbaren synthetischen Gefäßmatrices mit BMC (*bone marrow cells*) und deren Inkubation unter physiologischen Bedingungen. Die BMC exprimieren dabei nach einigen Wochen Fibroblasten- und SMC-Marker, die Zellen der luminalen Seite der Prothese zeigen aber die Expression von endothelialen Zellmarkern wie Faktor VIII oder CD31 [94].

Außer verbesserten mechanischen und antithrombotischen Eigenschaften sind biologische Prothesen noch in einem anderen Punkt den nicht resorbierbaren synthetischen überlegen: Sie können sich an das Wachstum des gesamten Organismus anpassen, was sie für den Einsatz in der Pädiatrie interessant macht. Der monatelange Prozess der Züchtung (wie auch bei komplett biologischen Prothesen) ist jedoch der entscheidende Nachteil solcher Prothesen.

Die Kombination unterschiedlicher Konzepte für die Herstellung bioartifizieller vaskulärer Transplantate ist der Ausgangspunkt künftiger Therapiemethoden kardio-vaskulärer Erkrankungen.

# Zusammenfassung

## Hintergrund

Die in der kardiovaskulären Chirurgie verwendeten autologen Gefäßtransplantate weisen häufig aufgrund präoperativ vorbestehender systemischer atherosklerotischer Veränderungen hämodynamische Funktionsstörungen auf. Die Verwendung von allogenen und von endothelialisierten alloplastischen Transplantaten als Gefäßersatz stellt eine mögliche Alternative dar. Die Spenderendothelzellen (ECs) und die antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Transplantates induzieren jedoch eine über die MHC-Klasse-I (MHC-I) Antigene vermittelte Immunantwort, welche zu Transplantatabstossung führt. Durch Herunterregulation der MHC-I-Expression könnte die Transplantatimmunogenität gesenkt und die allogene Immunreaktion reduziert werden.

## Methoden

Eine Reduktion der MHC-I-Expression in kardiovaskulären Transplantaten erfolgte mittels Gentransfer der anti-MHC-I-Intrabody. Die Effizienz der viralen Konstrukte wurde zunächst *in vitro* an isolierten Rattenaorten und an Rattenendothelzellen (RAEC) getestet. Der immunmodulatorische Effekt der anti-MHC-I-Intrabody wurde anschließend *in vivo* an zwei Transplantationsmodellen der Ratte untersucht. Im ersten Modell wurden die allogenen A.carotis vor der Transplantation mit einem für anti-MHC-I-Intrabody kodierenden adenoviralen Vektor transduziert. Im zweiten Modell wurden die endothelialisierten ePTFE-Prothesen als alloplastisches Interponat in der A.abdominalis verwendet, wobei die RAEC vor der Besiedlung mit einem lentiviralen anti-MHC-I-Intrabody-Konstrukt behandelt wurden. Am Tag 7. und 28. postoperativ wurden zelluläre Infiltrationen, Expression der zellulären Immunmarker und Intimaproliferation der Transplantate untersucht.

## Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Verminderung der Oberflächenexpression von MHC-I im Arterienendothel durch den adenoviralen Gentransfer sowohl die Entwicklung einer inflammatorischen Immunreaktion als auch die Intimaproliferation in einem vaskulären Allotransplantat deutlich reduzieren kann. In den anti-MHC-I-Intrabody-exprimierenden Carotistransplantaten wurde im Vergleich zu den Kontrollgruppen am 28. Tag die Reduktion der zellulären Infiltration und der Intimaproliferation beobachtet. Die mRNA-Analyse zeigte eine reduzierte Expression von *IFN- $\gamma$*  und von T-Zell-Markern, wie  $CD4^+$  und  $CD68^+$ . Die Endothelialisierung der ePTFE-Prothesen mit gentechnisch modifizierten RAEC und deren Einsatz *in vivo* konnte wegen der mangelnden Zelladhärenz nicht beurteilt werden. Es wurde jedoch eine Operationstechnik entwickelt, die eine sichere Interponierung von 2mm-ePTFE-Prothesen in die A.abdominalis der Ratte ermöglicht.

**Schlussfolgerung**

Mittels adenoviralen Gentransfers lässt sich eine selektive Modulation der MHC-I-Oberflächenexpression bei einem weitgehend intakten Immunsystem erreichen. Dies führt bei allogenen Gefäßtransplantaten auch in Abwesenheit einer systemischen Immunsuppression zu einer Reduktion sowohl der akuten Transplantatabstossung als auch der chronischen Transplantatvaskulopathie. Aufgrund zeitlich begrenzter zytoplasmatischer Persistenz des *Ox18scFv*-Intrabody ist es nicht möglich, die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie vollständig zu unterdrücken.

Ob diese Ergebnisse tatsächlich kausal bedingt waren, lässt sich aus der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit sagen. Die Anzahl der Tiere in allen Untersuchungsgruppen war klein, um eine zufallsbedingte Beobachtung der Ergebnisse ausschließen zu können. Weil die verschiedenen Untersuchungsergebnisse in der Intrabody-Gruppe aber korrelierten, die Zytokinexpression also vermindert und sowohl die Intimaproliferation als auch die Zellinfiltration reduziert wurde, kann von einem protektiven Effekt der *Ox18scFv*-Behandlung ausgegangen werden. Wie lange dieser immunmodulatorische Effekt persistiert und ob lentivirale anti-MHC-I-Intrabody-Konstrukte effizienter eine Transplantatabstossung reduzieren, darüber werden spätere Untersuchungen Aufschluss geben. Die hier gewonnen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der virale Intrabody-Genttransfer ein geeigneter Kandidat für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der allogenen Transplantation ist.

Die Endothelialisierung alloplastischer ePTFE-Gefäßprothesen mit gentechnisch modifizierten RAEC und deren Einsatz *in vivo* konnte wegen der mangelnden Zelladhärenz in dieser Arbeit nicht beurteilt werden. Wir haben jedoch eine Anastomosentechnik etabliert, welche trotz einer erheblichen Durchmesserdiskrepanz eine schnelle und sichere Interponierung von 2mm-ePTFE-Prothesen in die A.abdominalis der Ratte ermöglicht. Sollte es gelingen, die Zellhaftung in ePTFE-Prothesen durch den Einsatz anderer Beschichtungssubstanzen zu steigern, steht diese Anastomosentechnik für die Untersuchung gentechnisch modifizierter RAEC in alloplastischen Gefäßprothesen bereits zur Verfügung.

# Literaturverzeichnis

- [1] ZURBRÜGG, H. R. ; KNOLLMANN, F. ; MUSCI, M. ; WIED, M. ; BAUER, M. ; CHAVEZ, T. ; KRUKENBERG, A. ; HETZER, R.: The biocompound method in coronary artery bypass operations: surgical technique and 3-year patency. In: *Ann Thorac Surg* 70 (2000), Nov, Nr. 5, S. 1536–1540
- [2] SEMILETOVA, Natalya V. ; SHEN, Xiu-Da ; BAIBAKOV, Boris ; FELDMAN, Daniel M. ; MUKHERJEE, Kaushik ; FRANK, Jonathan M. ; STEPKOWSKI, Stainslaw M. ; BUSUTTIL, Ronald W. ; KUPIEC-WEGLINSKI, Jerzy W. ; GHOBRIAL, Rafik M.: Inhibition of chronic rejection by antibody induced vascular accommodation in fully allogeneic heart allografts. In: *Transplantation* 80 (2005), Dec, Nr. 11, S. 1535–1540
- [3] KLEMM, Dieter ; HEUBLEIN, Brigitte ; FINK, Hans-Peter ; BOHN, Andreas: Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (2005), May, Nr. 22, S. 3358–3393
- [4] BINNS, R. L. ; KU, D. N. ; STEWART, M. T. ; ANSLEY, J. P. ; COYLE, K. A.: Optimal graft diameter: effect of wall shear stress on vascular healing. In: *J Vasc Surg* 10 (1989), Sep, Nr. 3, S. 326–337
- [5] CLOWES, A. W. ; KIRKMAN, T. R. ; REIDY, M. A.: Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. In: *Am J Pathol* 123 (1986), May, Nr. 2, S. 220–230
- [6] MATTSSON, E. J. ; KOHLER, T. R. ; VERGEL, S. M. ; CLOWES, A. W.: Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997), Oct, Nr. 10, S. 2245–2249
- [7] GRAHAM, L. M. ; BURKEL, W. E. ; FORD, J. W. ; VINTER, D. W. ; KAHN, R. H. ; STANLEY, J. C.: Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells. In: *Surgery* 91 (1982), May, Nr. 5, S. 550–559
- [8] GILLIS-HAEGGERSTRAND, C. ; FREBELIUS, S. ; HAEGGERSTRAND, A. ; SWEDENBORG, J.: Cultured human endothelial cells seeded on expanded polytetrafluoroethylene support thrombin-mediated activation of protein C. In: *J Vasc Surg* 24 (1996), Aug, Nr. 2, S. 226–234
- [9] ZILLA, P. ; FASOL, R. ; DEUTSCH, M. ; FISCHLEIN, T. ; MINAR, E. ; HAMMERLE, A. ; KRUPICKA, O. ; KADLETZ, M.: Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. In: *J Vasc Surg* 6 (1987), Dec, Nr. 6, S. 535–541

- 
- [10] FASOL, R. ; ZILLA, P. ; DEUTSCH, M. ; GRIMM, M. ; FISCHLEIN, T. ; LAUFER, G.: Human endothelial cell seeding: evaluation of its effectiveness by platelet parameters after one year. In: *J Vasc Surg* 9 (1989), Mar, Nr. 3, S. 432–436
- [11] ROSENMAN, J. E. ; KEMPCZINSKI, R. F. ; PEARCE, W. H. ; SILBERSTEIN, E. B.: Kinetics of endothelial cell seeding. In: *J Vasc Surg* 2 (1985), Nov, Nr. 6, S. 778–784
- [12] KESLER, K. A. ; HERRING, M. B. ; ARNOLD, M. P. ; GLOVER, J. L. ; PARK, H. M. ; HELMUS, M. N. ; BENDICK, P. J.: Enhanced strength of endothelial attachment on polyester elastomer and polytetrafluoroethylene graft surfaces with fibronectin substrate. In: *J Vasc Surg* 3 (1986), Jan, Nr. 1, S. 58–64
- [13] SCHRENK, P. ; KOBINIA, G. S. ; BRÜCKE, P. ; SYRE, G. ; EDTSTADLER, A.: Fibrin glue coating of e-PTFE prostheses enhances seeding of human endothelial cells. In: *Thorac Cardiovasc Surg* 35 (1987), Feb, Nr. 1, S. 6–10
- [14] LINDBLAD, B. ; WRIGHT, S. W. ; SELL, R. L. ; BURKEL, W. E. ; GRAHAM, L. M. ; STANLEY, J. C.: Alternative techniques of seeding cultured endothelial cells to ePTFE grafts of different diameters, porosities, and surfaces. In: *J Biomed Mater Res* 21 (1987), Aug, Nr. 8, S. 1013–1022
- [15] ZILLA, P. ; FASOL, R. ; PREISS, P. ; KADLETZ, M. ; DEUTSCH, M. ; SCHIMA, H. ; TSANGARIS, S. ; GROSCURTH, P.: Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. In: *Surgery* 105 (1989), Apr, Nr. 4, S. 515–522
- [16] LEFEBVRE, F. ; DROUILLET, F. ; DE LARCLAUDE, A. M. S. ; APRAHAMIAN, M. ; MIDY, D. ; BORDENAVE, L. ; RABAUD, M.: Repair of experimental arteriotomy in rabbit aorta using a new resorbable elastin-fibrin biomaterial. In: *J Biomed Mater Res* 23 (1989), Dec, Nr. 12, S. 1423–1432
- [17] MEINHART, Johann G. ; SCHENSE, Jason C. ; SCHIMA, Heinrich ; GORLITZER, Michael ; HUBBELL, Jeff A. ; DEUTSCH, Manfred ; ZILLA, Peter: Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. In: *Tissue Eng* 11 (2005), Nr. 5-6, S. 887–895
- [18] LESECHE, G. ; OHAN, J. ; BOUTTIER, S. ; PALOMBI, T. ; BERTRAND, P. ; ANDRÉASSIAN, B.: Above-knee femoropopliteal bypass grafting using endothelial cell seeded PTFE grafts: five-year clinical experience. In: *Ann Vasc Surg* 9 Suppl (1995), S. S15–S23
- [19] LAUBE, H. R. ; DUWE, J. ; RUTSCH, W. ; KONERTZ, W.: Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 (2000), Jul, Nr. 1, S. 134–141
- [20] MOTWANI, J. G. ; TOPOL, E. J.: Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. In: *Circulation* 97 (1998), Mar, Nr. 9, S. 916–931
- [21] ROSS, R.: Atherosclerosis is an inflammatory disease. In: *Am Heart J* 138 (1999), Nov, Nr. 5 Pt 2, S. S419–S420
- [22] DAVIES, M. G. ; HAGEN, P. O.: Pathophysiology of vein graft failure: a review. In: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9 (1995), Jan, Nr. 1, S. 7–18
-

- 
- [23] SCHWARTZ, R. S. ; TOPOL, E. J. ; SERRUYS, P. W. ; SANGIORGI, G. ; HOLMES, D. R.: Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. In: *J Am Coll Cardiol* 32 (1998), Dec, Nr. 7, S. 2087–2094
- [24] PASTERKAMP, G. ; DE KLEIJN, D. P. ; BORST, C.: Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. In: *Cardiovasc Res* 45 (2000), Mar, Nr. 4, S. 843–852
- [25] NEWBY, A. C. ; ZALTSMAN, A. B.: Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. In: *J Pathol* 190 (2000), Feb, Nr. 3, S. 300–309
- [26] MEKONTSO-DESSAP, Armand ; KIRSCH, Matthias ; GUIGNAMBERT, Christophe ; ZADIGUE, Patricia ; ADNOT, Serge ; LOISANCE, Daniel ; EDDAHIBI, Saadia: Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties. In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (2006), Mar, Nr. 3, S. 651–658
- [27] MELICHAR, Volker O. ; BEHR-ROUSSEL, Delphine ; ZABEL, Ulrike ; UTTENTHAL, L. O. ; RODRIGO, José ; RUPIN, Alain ; VERBEUREN, Tony J. ; S, Arun Kumar H. ; SCHMIDT, Harald H H W.: Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Nov, Nr. 47, S. 16671–16676
- [28] DAVIES, M. G. ; BERKOWITZ, D. E. ; HAGEN, P. O.: Constitutive nitric oxide synthase is expressed and nitric oxide-mediated relaxation is preserved in retrieved human aortocoronary vein grafts. In: *J Surg Res* 58 (1995), Jun, Nr. 6, S. 732–738
- [29] TOMAS, Jeffrey J. ; STARK, V. E. ; KIM, Jimmy L. ; WOLFF, Randal A. ; HULLETT, Debra A. ; WARNER, Thomas F. ; HOCH, John R.: Beta-galactosidase-tagged adventitial myofibroblasts tracked to the neointima in healing rat vein grafts. In: *J Vasc Res* 40 (2003), Nr. 3, S. 266–275
- [30] THYBERG, J. ; BLOMGREN, K. ; HEDIN, U. ; DRYJSKI, M.: Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. In: *Cell Tissue Res* 281 (1995), Sep, Nr. 3, S. 421–433
- [31] CAMPBELL, J. H. ; TACHAS, G. ; BLACK, M. J. ; COCKERILL, G. ; CAMPBELL, G. R.: Molecular biology of vascular hypertrophy. In: *Basic Res Cardiol* 86 Suppl 1 (1991), S. 3–11
- [32] BENDITT, E. P. ; BENDITT, J. M.: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973), Jun, Nr. 6, S. 1753–1756
- [33] PEARSON, T. A. ; DILLMAN, J. M. ; SOLEZ, K. ; HEPTINSTALL, R. H.: Clonal characteristics in layers of human atherosclerotic plaques. A study of the selection hypothesis of monoclonality. In: *Am J Pathol* 93 (1978), Oct, Nr. 1, S. 93–116
- [34] SCHWARTZ, S. M. ; MURRY, C. E.: Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. In: *Annu Rev Med* 49 (1998), S. 437–460
- [35] ZALEWSKI, Andrew ; SHI, Yi ; JOHNSON, Anthony G.: Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? In: *Circ Res* 91 (2002), Oct, Nr. 8, S. 652–655
-

- 
- [36] TAKAGI, Atsushi ; NISHIYAMA, Chiharu ; KANADA, Shunsuke ; NIWA, Yusuke ; FUKUYAMA, Kanako ; IKEDA, Shigaku ; OKUMURA, Ko ; OGAWA, Hideoki: Prolonged MHC class II expression and CIITA transcription in human keratinocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* (2006), Jun
- [37] KOH, Kian P. ; WANG, Yinong ; YI, Tai ; SHIAO, Stephen L. ; LORBER, Marc I. ; SESSA, William C. ; TELLIDES, George ; POBER, Jordan S.: T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from IFN-gamma dysregulation of NO synthase. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Sep, Nr. 6, S. 846–856
- [38] TURESSON, Carl: Endothelial expression of MHC class II molecules in autoimmune disease. In: *Curr Pharm Des* 10 (2004), Nr. 2, S. 129–143
- [39] NORMENT, A. M. ; SALTER, R. D. ; PARHAM, P. ; ENGELHARD, V. H. ; LITTMAN, D. R.: Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. In: *Nature* 336 (1988), Nov, Nr. 6194, S. 79–81
- [40] DENTON, M. D. ; GEEHAN, C. S. ; ALEXANDER, S. I. ; SAYEGH, M. H. ; BRISCOE, D. M.: Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. In: *J Exp Med* 190 (1999), Aug, Nr. 4, S. 555–566
- [41] KOOPMANS, Marije ; HOVINGA, Idske C L K. ; BAELDE, Hans J. ; DE HEER, Emile ; BRUIJN, Jan A. ; BAJEMA, Ingeborg M.: Endothelial chimerism in transplantation: Looking for needles in a haystack. In: *Transplantation* 82 (2006), Jul, Nr. 1 Suppl, S. S25–S29
- [42] KANKI-HORIMOTO, Sachiko ; HORIMOTO, Hitoshi ; MIENO, Shigetoshi ; KISHIDA, Kenji ; WATANABE, Fusao ; FURUYA, Eisuke ; KATSUMATA, Takahiro: Synthetic vascular prosthesis impregnated with genetically modified bone marrow cells produced recombinant proteins. In: *Artif Organs* 29 (2005), Oct, Nr. 10, S. 815–819
- [43] KANKI-HORIMOTO, Sachiko ; HORIMOTO, Hitoshi ; MIENO, Shigetoshi ; KISHIDA, Kenji ; WATANABE, Fusao ; FURUYA, Eisuke ; KATSUMATA, Takahiro: Synthetic vascular prosthesis impregnated with mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase. In: *Circulation* 114 (2006), Jul, Nr. 1 Suppl, S. I327–I330
- [44] SKERRA, A. ; PLÜCKTHUN, A.: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. In: *Science* 240 (1988), May, Nr. 4855, S. 1038–1041
- [45] PLÜCKTHUN, A. ; GLOCKSHUBER, R. ; SKERRA, A. ; STADMÜLLER, J.: Properties of FV and Fab fragments of the antibody McPC603 expressed in *E. coli*. In: *Behring Inst Mitt* (1990), Dec, Nr. 87, S. 48–55
- [46] LOBATO, M. N. ; RABBITTS, Terence H.: Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. In: *Trends Mol Med* 9 (2003), Sep, Nr. 9, S. 390–396
- [47] BUSCH, Annette ; MARASCO, Wayne A. ; DOEBIS, Cornelia ; VOLK, Hans-Dieter ; SEIFERT, Martina: MHC class I manipulation on cell surfaces by gene transfer of anti-MHC class I intrabodies—a tool for decreased immunogenicity of allogeneic tissue and cell transplants. In: *Methods* 34 (2004), Oct, Nr. 2, S. 240–249
-

- 
- [48] BEYER, Florian ; DOEBIS, Cornelia ; BUSCH, Annette ; RITTER, Thomas ; MHASHILKAR, Abner ; MARASCO, Wayne M. ; LAUBE, Horst ; VOLK, Hans-Dieter ; SEIFERT, Martina: Decline of surface MHC I by adenoviral gene transfer of anti-MHC I intrabodies in human endothelial cells-new perspectives for the generation of universal donor cells for tissue transplantation. In: *J Gene Med* 6 (2004), Jun, Nr. 6, S. 616–623
- [49] MÜLLER-GLAUSER, W. ; ZILLA, P. ; LACHAT, M. ; BISANG, B. ; RIESER, F. ; VON SEGESSER, L. ; TURINA, M.: Immediate shear stress resistance of endothelial cell monolayers seeded in vitro on fibrin glue-coated ePTFE prostheses. In: *Eur J Vasc Surg* 7 (1993), May, Nr. 3, S. 324–328
- [50] NICOSIA, R. F. ; VILLASCHI, S. ; SMITH, M.: Isolation and characterization of vasoformative endothelial cells from the rat aorta. In: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A (1994), Jun, Nr. 6, S. 394–399
- [51] MCWHINNIE, D. L. ; THOMPSON, J. F. ; TAYLOR, H. M. ; CHAPMAN, J. R. ; BOLTON, E. M. ; CARTER, N. P. ; WOOD, R. F. ; MORRIS, P. J.: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. In: *Transplantation* 42 (1986), Oct, Nr. 4, S. 352–358
- [52] DOEBIS, Cornelia ; SCHU, Sabine ; LADHOFF, Juliane ; BUSCH, Annette ; BEYER, Florian ; REISER, Jakob ; NICOSIA, Roberto F. ; BROESEL, Sabine ; VOLK, Hans-Dieter ; SEIFERT, Martina: An anti-major histocompatibility complex class I intrabody protects endothelial cells from an attack by immune mediators. In: *Cardiovasc Res* 72 (2006), Nov, Nr. 2, S. 331–338
- [53] KOHLER, T. R. ; STRATTON, J. R. ; KIRKMAN, T. R. ; JOHANSEN, K. H. ; ZIERLER, B. K. ; CLOWES, A. W.: Conventional versus high-porosity polytetrafluoroethylene grafts: clinical evaluation. In: *Surgery* 112 (1992), Nov, Nr. 5, S. 901–907
- [54] BULL, D. A. ; HUNTER, G. C. ; HOLUBEC, H. ; AGUIRRE, M. L. ; RAPPAPORT, W. D. ; PUTNAM, C. W.: Cellular origin and rate of endothelial cell coverage of PTFE grafts. In: *J Surg Res* 58 (1995), Jan, Nr. 1, S. 58–68
- [55] VINARD, E. ; LESÈCHE, G. ; ANDREASSIAN, B. ; COSTAGLIOLA, D.: In vitro endothelialization of PTFE vascular grafts: A comparison of various substrates, cell densities, and incubation times. In: *Ann Vasc Surg* 13 (1999), Mar, Nr. 2, S. 141–150
- [56] DEUTSCH, M. ; MEINHART, J. ; FISCHLEIN, T. ; PREISS, P. ; ZILLA, P.: Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. In: *Surgery* 126 (1999), Nov, Nr. 5, S. 847–855
- [57] YU, Hong ; DAI, Wangde ; YANG, Zhe ; KIRKMAN, Paul ; WEAVER, Fred A. ; ETON, Darwin ; ROWE, Vincent L.: Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. In: *J Vasc Surg* 38 (2003), Sep, Nr. 3, S. 557–563
- [58] FALK, J. ; TOWNSEND, L. E. ; VOGEL, L. M. ; BOYER, M. ; OLT, S. ; WEASE, G. L. ; TREVOR, K. T. ; SEYMOUR, M. ; GLOVER, J. L. ; BENDICK, P. J.: Improved adherence of genetically modified endothelial cells to small-diameter expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine model. In: *J Vasc Surg* 27 (1998), May, Nr. 5, S. 902–8; discussion 908–9
-

- 
- [59] SUGAWARA, Y. ; SAKATA, Y. ; MINOWADA, S. ; HAMADA, H. ; YOSHIDA, Y. ; SATO, O. ; DEGUCHI, J. ; KIMURA, H. ; NAMBA, T. ; MAKUUCHI, M. ; MIYATA, T.: Adenovirus-mediated transfer of tissue-type plasminogen activator gene to human endothelial cells. In: *Surgery* 122 (1997), Jul, Nr. 1, S. 91–100
- [60] RADEMACHER, A. ; PAULITSCHKE, M. ; MEYER, R. ; HETZER, R.: Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. In: *Int J Artif Organs* 24 (2001), Apr, Nr. 4, S. 235–242
- [61] AHLWEDE, K. M. ; WILLIAMS, S. K.: Microvascular endothelial cell sodding of 1-mm expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. In: *Arterioscler Thromb* 14 (1994), Jan, Nr. 1, S. 25–31
- [62] KON, N. D. ; MARTIN, M. B. ; MEREDITH, J. W. ; MEREDITH, J. H.: Comparison of suture technique on patency of polytetrafluoroethylene-microarterial anastomoses. In: *Microsurgery* 5 (1984), Nr. 1, S. 12–14
- [63] BARRY, K. J. ; SCOTT, R. M. ; KEOUGH, E. M.: Heparin and small caliber polytetrafluoroethylene grafts in the carotid arteries of rats. In: *J Microsurg* 3 (1981), Nr. 2, S. 72–76
- [64] CUADROS, C. L.: One hundred percent patency of one-millimeter polytetrafluoroethylene (Gore-tex) grafts in the carotid arteries of rats. In: *Microsurgery* 5 (1984), Nr. 1, S. 1–11
- [65] ZDANOWSKI, Z. ; RIBBE, E. ; BENGMARK, S.: Endothelialization of microporous polytetrafluoroethylene grafts in the infrarenal aorta and caval vein of the rat. In: *Microsurgery* 13 (1992), Nr. 5, S. 277–286
- [66] REILLY, L. M. ; EHRENFELD, W. K. ; GOLDSTONE, J. ; STONEY, R. J.: Gastrointestinal tract involvement by prosthetic graft infection. The significance of gastrointestinal hemorrhage. In: *Ann Surg* 202 (1985), Sep, Nr. 3, S. 342–348
- [67] TULLIUS, S. G. ; GRASER, E. ; NIEMINEN, M. ; REUTZEL-SELKE, A. ; JONAS, S. ; BECHSTEIN, W. O. ; VOLK, H. D. ; NEUHAUS, P.: Complete reversal of acute rejection episodes after syngeneic retransplantation is associated with a TH1/TH2 shift. In: *Transplant Proc* 31 (1999), Nr. 1-2, S. 340–341
- [68] SHIRWAN, H.: Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? In: *Transplantation* 68 (1999), Sep, Nr. 6, S. 715–726
- [69] TULLIUS, S. G. ; HANCOCK, W. W. ; HEEMANN, U. ; AZUMA, H. ; TILNEY, N. L.: Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. In: *Transplantation* 58 (1994), Jul, Nr. 1, S. 93–99
- [70] WALSH, K. ; SATA, M.: Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium. In: *Trends Cardiovasc Med* 9 (1999), Nr. 1-2, S. 34–41
- [71] CHOO, J. K. ; SEEBACH, J. D. ; NICKELEIT, V. ; SHIMIZU, A. ; LEI, H. ; SACHS, D. H. ; MADSEN, J. C.: Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity. In: *Transplantation* 64 (1997), Nov, Nr. 9, S. 1315–1322
-

- [72] KAPESSIDOU, Yota ; HABRAN, Claude ; BUONOCORE, Sofia ; FLAMAND, Véronique ; BARVAIS, Luc ; GOLDMAN, Michel ; BRAUN, Michel Y.: The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4(+) T cells. In: *Transplantation* 81 (2006), Mar, Nr. 5, S. 726–735
- [73] VELLA, J. P. ; SPADAFORA-FERREIRA, M. ; MURPHY, B. ; ALEXANDER, S. I. ; HARMON, W. ; CARPENTER, C. B. ; SAYEGH, M. H.: Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. In: *Transplantation* 64 (1997), Sep, Nr. 6, S. 795–800
- [74] HORNICK, P. I. ; MASON, P. D. ; BAKER, R. J. ; HERNANDEZ-FUENTES, M. ; FRASCA, L. ; LOMBARDI, G. ; TAYLOR, K. ; WENG, L. ; ROSE, M. L. ; YACOB, M. H. ; BATCHELOR, R. ; LECHLER, R. I.: Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. In: *Circulation* 101 (2000), May, Nr. 20, S. 2405–2410
- [75] GRAU, V. ; SCRIBA, A. ; STEHLING, O. ; STEINIGER, B.: Monocytes in the rat. In: *Immunobiology* 202 (2000), May, Nr. 1, S. 94–103
- [76] STEINIGER, B. ; STEHLING, O. ; SCRIBA, A. ; GRAU, V.: Monocytes in the rat: phenotype and function during acute allograft rejection. In: *Immunol Rev* 184 (2001), Dec, S. 38–44
- [77] SHIMIZU, Koichi ; SHICHIRI, Masayoshi ; LIBBY, Peter ; LEE, Richard T. ; MITCHELL, Richard N.: Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Jul, Nr. 2, S. 300–308
- [78] BERGESE, S. D. ; HUANG, E. H. ; PELLETIER, R. P. ; WIDMER, M. B. ; FERGUSON, R. M. ; OROSZ, C. G.: Regulation of endothelial VCAM-1 expression in murine cardiac grafts. Expression of allograft endothelial VCAM-1 can be manipulated with antagonist of IFN-alpha or IL-4 and is not required for allograft rejection. In: *Am J Pathol* 147 (1995), Jul, Nr. 1, S. 166–175
- [79] ANDRIAMBELOSON, E. ; BIGAUD, M. ; SCHRAA, E. O. ; KOBEL, T. ; LOBSTEIN, V. ; PALLY, C. ; ZERWES, H. G.: Endothelial dysfunction and denudation in rat aortic allografts. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2001), Jan, Nr. 1, S. 67–73
- [80] WU, Gordon D. ; JIN, Yang-Sun ; SALAZAR, Roberto ; DAI, Wang-De ; BARTENEVA, Natasha ; BARR, Mark L. ; BARSKY, Lura W. ; STARNES, Vaughn A. ; CRAMER, Donald V.: Vascular endothelial cell apoptosis induced by anti-donor non-MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection. In: *J Heart Lung Transplant* 21 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1174–1187
- [81] BIAN, H. ; REED, E. F.: Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. In: *J Immunol* 163 (1999), Jul, Nr. 2, S. 1010–1018
- [82] NAJI, A. ; DESCHASEAUX, F. ; RACADOT, E. ; FERRAND, C. ; JUSTRABO, E. ; GUIGNIER, F. ; MOUSSON, C. ; RIFLE, G.: Induction of tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by cell-specific HLA class I antibody: preliminary data. In: *Transplant Proc* 37 (2005), Nr. 6, S. 2892–2893

- 
- [83] JIN, Yi-Ping ; JINDRA, Peter T. ; GONG, Ke W. ; LEPIN, Eric J. ; REED, Elaine F.: Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. In: *Transplantation* 79 (2005), Feb, Nr. 3 Suppl, S. S19–S21
- [84] ROSE, M. L.: Role of antibodies in transplant-associated cardiac allograft vasculopathy. In: *Z Kardiol* 89 Suppl 9 (2000), S. IX/11–IX/15
- [85] PARKS, R. J. ; CHEN, L. ; ANTON, M. ; SANKAR, U. ; RUDNICKI, M. A. ; GRAHAM, F. L.: A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nov, Nr. 24, S. 13565–13570
- [86] MURUVE, Daniel A.: The innate immune response to adenovirus vectors. In: *Hum Gene Ther* 15 (2004), Dec, Nr. 12, S. 1157–1166
- [87] HERRING, M. ; SMITH, J. ; DALSING, M. ; GLOVER, J. ; COMPTON, R. ; ETCHBERGER, K. ; ZOLLINGER, T.: Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency. In: *J Vasc Surg* 20 (1994), Oct, Nr. 4, S. 650–655
- [88] TIWARI, Alok ; SALACINSKI, Henryk ; SEIFALIAN, Alexander M. ; HAMILTON, George: New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. In: *Cardiovasc Surg* 10 (2002), Jun, Nr. 3, S. 191–197
- [89] TEEBKEN, O. E. ; BADER, A. ; STEINHOFF, G. ; HAVERICH, A.: Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. In: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 19 (2000), Apr, Nr. 4, S. 381–386
- [90] GOMES, D. ; LOUEDEC, L. ; PLISSONNIER, D. ; DAUGE, M. C. ; HENIN, D. ; OSBORNE-PELLEGRIN, M. ; MICHEL, J. B.: Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. In: *J Vasc Surg* 34 (2001), Oct, Nr. 4, S. 707–715
- [91] WEINBERG, C. B. ; BELL, E.: A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. In: *Science* 231 (1986), Jan, Nr. 4736, S. 397–400
- [92] L'HEUREUX, Nicolas ; DUSSERRE, Nathalie ; KONIG, Gerhardt ; VICTOR, Braden ; KEIRE, Paul ; WIGHT, Thomas N. ; CHRONOS, Nicolas A F. ; KYLES, Andrew E. ; GREGORY, Clare R. ; HOYT, Grant ; ROBBINS, Robert C. ; MCALLISTER, Todd N.: Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. In: *Nat Med* 12 (2006), Mar, Nr. 3, S. 361–365
- [93] SHIN'OKA, T. ; IMAI, Y. ; IKADA, Y.: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. In: *N Engl J Med* 344 (2001), Feb, Nr. 7, S. 532–533
- [94] MATSUMURA, Goki ; MIYAGAWA-TOMITA, Sachiko ; SHIN'OKA, Toshiharu ; IKADA, Yoshito ; KUROSAWA, Hiromi: First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. In: *Circulation* 108 (2003), Oct, Nr. 14, S. 1729–1734
-

# Abkürzungsverzeichnis

3-APT-Silane	....	3-Aminopropyltriethoxy-silane
A. dest.	.....	Aqua destillata
A.abdominalis	...	Aorta abdominalis
A.renalis	.....	Aorta renalis
ACC	.....	Arteria carotis communis
ADH	.....	Adenosine diphosphate
AIF	.....	apoptosis-inducing factor
AP	.....	alkalische Phosphatase
APC	.....	antigen presenting cell
atRA	.....	all-trans-retinoic acid (aktive Form)
atROH	.....	all-trans retinol (inaktive Form)
CDR	.....	complementary determining region
cGMP	.....	cyclic guanosine monophosphate
ct	.....	threshold cycle
DA	.....	Dark Agouti (Ratten)
dATP	.....	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	.....	Desoxycytidintriphosphat
DEAE-Dextran	..	Diethylaminoethyl-dextran
DEPC	.....	Diethylpyrocarbonat
dGTP	.....	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	.....	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	.....	Dithriothreitol
dTTP	.....	Desoxythymidintriphosphat
EBM	.....	endothelial basal medium
ECGS	.....	endothelial cell growth supplement
ECS	.....	endothelial cell seeding
EDTA	.....	ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	.....	endothelial nitric oxide synthase
ePTFE	.....	expanded polytetrafluorethylene
ERK	.....	extracellular signal-regulated kinases
FACS	.....	fluorescence activated cell scanner
FGF	.....	fibroblast growth factor
FKS	.....	fetales Kälberserum
FSC	.....	forward scatter
HE	.....	Hämatoxylin-Eosin
HLA	.....	human leukocyte antigen
HSP	.....	Hitze Schock Proteine
HUVEC	.....	human umbilical vein endothelial cells

i.m. ....	intramuskulär
IBRAB .....	indirect bridged avidin-biotin technique
IFN- $\gamma$ .....	Interferon- $\gamma$
kDa .....	Kilodalton
KHK .....	koronare Herzkrankheit
kpb .....	kilobase pair
LEW .....	Lewis (Ratte)
M. ....	Musculus
mAb .....	monoclonal antibody
mAK .....	monoklonale Antikörper
MCAP-1 .....	monocyte chemoattractant protein-1
MFI .....	mean fluorescence intensity
MHC .....	Major Histocompatibility Complex
MIF .....	migration inhibitory factor
MOI .....	multiplicity of infection
MSC .....	medullary stem cells
MVEC .....	microvascular endothelial cells
PARP .....	peroxynitrite-poly-adenosine diphosphate-ribose-polymerase
pAVK .....	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS .....	phosphate buffered saline
PCR .....	polymerase chain reaction
PDE .....	Phosphodiesterase
PDGF .....	platelet-derived growth factor
pfu .....	plaque forming unit
PTCA .....	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
RAEC .....	Endothelzellen der Ratten
RNS .....	Ribonukleinsäure
ROS .....	reactive oxygen species
rpm .....	rotation per minute
RT .....	Raumtemperatur
scFv .....	Single Chain Variable Fragment
SEM .....	standard error of the mean
SMC .....	smooth muscle cells
SNP .....	sodium nitroprusside
SSC .....	side scatter
TBS .....	tris buffered saline
TCR .....	T cell receptor
TNF- $\alpha$ .....	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
Tx .....	Transplantation
VCAM-1 .....	vascular cell adhesion molecule-1
WF .....	Wistar-Furth (Ratte)

# Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Prof. Hans-Dieter Volk und Dr. Martina Seifert vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin. Ohne die konstruktive Kritik und die kompetenten Ratschläge sowohl in fachlichen Belangen als auch hinsichtlich des Aufbaus und der praktischen Durchführung, wäre die vorliegende Dissertation nicht zustande gekommen.

Ein spezielles Dankeschön geht an PD Dr. Horst Laube vom deutschen Herzzentrum, der mich bei meinen ersten mikrochirurgischen Operationen begleitete und mit dessen Hilfe ich meine Operationsmodelle entwickelt habe.

Besonders möchte ich mich bei Elke Effenberger, Sabine Brösel und Heinz Tanzmann für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken, auf die ich in allen Phasen meiner Arbeit zählen konnte. Auch unsere privaten Tischgespräche bei einer Tasse Tee werde ich nie vergessen.

Bei Isabela Schmitt-Knosalla bedanke ich mich für die fachliche Hilfe bei den mikrochirurgischen Eingriffen. Isabela gelang es immer wieder, mich mit ihrer optimistischen Art aufzumuntern, wofür ich mich an dieser Stelle noch speziell bedanken möchte.

Cornelia Doebis, Sabine Schu danke ich für tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Zelltransfektionen und Ana Zenclussen für die Hilfe bei den mikroskopischen Fotoaufnahmen.

Frau Denise Buffat danke ich für das geduldige Korrigieren und Lektorieren meines Manuskripts. Ihre orthographischen und stilistischen Korrekturvorschläge waren mir sehr hilfreich.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Neffen für die unschätzbare Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Meiner lieben Frau Irène gebührt mein Dank für ihre Geduld und ihren Beistand auch an den schwierigsten Tagen, für ihre aufmunternde Worte, für den Süßigkeitennachschub und für ihre Sonntagsfrühstücke.

Ausserdem danke ich all den Menschen, die hier namentlich nicht erwähnt wurden, mich aber ebenso bei der Durchführung meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

## Originalarbeit

A. Zdoroveac, C. Doebis, H. Laube, S. Brösel, I. Schmitt-Knosalla, H.D. Volk, M. Seifert.  
Modulation of graft arteriosclerosis in a rat carotid transplantation model.  
*The Journal of surgical research*. 2008 Mar; 145(1):161-9.

## Ausgewählte Abstracts

Doebis C, Schu S, Brösel S, Laube H, Zdoroveac A, Reiser J and Volk HD, Seifert M.  
*Strategies for the protection of allogeneic endothelial cells against immune response for vascular tissue engineering approaches*. Transplantationsmedizin Supplement II 2005, S.90  
14. Jahrestagung Deutsche Transplantationsgesellschaft in Rostock

Martina Seifert, Andrei Zdoroveac, Cornelia Doebis, Sabine Brösel, Elke Effenberger, Isabela Schmitt-Knosalla, Thomas Ritter, Horst Laube, Hans-Dieter Volk.  
*MHC deficiency on rat endothelial cells prevents immune attacks in vitro and in vascular grafts in vivo*.  
Frühjahrstreffen des Arbeitskreises Transplantation, Würzburg 2006

Martina Seifert, Andrei Zdoroveac, Cornelia Doebis, Sabine Brösel, Elke Effenberger, Isabela Schmitt-Knosalla, Horst Laube, Jakob Reiser, Hans-Dieter Volk.  
*MHC deficiency on rat endothelial cells prevents immune attacks in vitro and in vascular grafts in vivo*.  
16th European Congress of Immunology, Paris 2006

Seifert M, Ladhoff J, Doebis C, Brösel S, Zdoroveac A, Laube H, Schmitt-Knosalla I, Volk HD.  
*Vascular grafts seeded with endothelial cells and their immunogenicity in a rat transplantation model*. *Cytotherapy* 2006; 8: 12.  
International Conference „Strategies in Tissue Engineering“, Würzburg 2006

# Erklärung

Ich, Andrei Zdoroveac, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der Modulation der allogenen Immunogenität auf das Rejektionsverhalten von Gefäßtransplantaten in vivo am Rattenmodell“ 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.

Berlin, den 11.01.2009