

Protektion humaner endothelialer Vorläuferzellen durch die Koapplikation mit Mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biologin, Naima Souidi

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. PD Dr. Martina Seifert
2. Prof. Dr. Kai Matuschewski
3. PD. Dr. Claudia Lange

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Berlin-Brandenburg Zentrum für regenerative Therapien unter der Leitung von PD Dr. Seifert angefertigt.

Die Promotion wurde im Rahmen der DGF Graduierten Schule 203, „Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies“, durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	5
ABSTRACT	6
1	EINLEITUNG..... 7
1.1	DIE HIERARCHIE ENDOTHELIALER (VORLÄUFER)-ZELLEN 7
1.2	MESENCHYMALE STAMM-/VORLÄUFERZELLEN UND PERIZYTEN 11
1.3	VASKULOGENESE UND ANGIOGENESE 13
1.4	EXPERIMENTELLE ZELLBASIERTER THERAPIESTRATEGIEN 14
1.5	ZELLULÄRE REJEKTION VON ALLOGENEN TRANSPLANTATEN..... 16
2	MATERIAL UND METHODEN 20
2.1	MATERIAL 20
2.1.1	Verbrauchsmaterialien 20
2.1.2	Reagenzien..... 21
2.1.3	Lösungen und Puffer..... 23
2.1.4	Reaktionssysteme 24
2.1.5	Pharmazeutika 24
2.1.6	Antikörper..... 24
2.1.7	Antikörper für histologische Immun-Fluoreszenzfärbungen 26
2.1.8	Zellkulturmedien und Zusätze 26
2.1.9	Primäre Zellen und Zelllinien 27
2.1.10	Versuchstiere 27
2.1.11	Geräte 27
2.1.12	Software..... 29
2.2	METHODEN 29
2.2.1	Zellbiologische Arbeiten 29
2.2.2	Histologische Arbeiten..... 42
2.2.3	Tierexperimentelles Arbeiten 43
2.2.4	Statistische Auswertung 46
3	ERGEBNISSE 47
3.1	IMMUNOGENITÄT VON HUMANEN NABELSCHNUR-ABGELEITETEN ECFCs 47
3.1.1	ECFCs exprimieren typische Marker der endothelialen Linie und sind in vitro in der Lage gefäßähnliche Netzwerke auszubilden. 47
3.1.2	Zytokin-stimulierte ECFCs erhöhen die Expression von HLA- und Adhäsions-molekülen.48
3.1.3	ECFCs werden von CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen HLA-abhängig lysiert..... 52
3.1.4	Humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs induzieren IFN γ -abhängig die Immunzell-Proliferation. 53
3.1.5	Die IFN γ -induzierte CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation ist HLA-DR-vermittelt. 55
3.1.6	ECFCs und HUVECs besitzen keine immunsupprimierenden Eigenschaften..... 56
3.2	IMMUNOGENITÄT HUMANER KOKULTUREN AUS NABELSCHNUR-ABGELEITETEN ECFCs UND MSCs..... 57
3.2.1	Nabelschnur-abgeleitete MSCs weisen mesenchymal-phänotypische Marker auf und können dadurch von ECFCs in Kokulturen unterschieden werden. 57
3.2.2	Die Kokultur von ECFCs und MSCs beeinflusst das Proliferationsverhalten der beiden Zelltypen und führt zur Regulation von immunologisch relevanten Markern. 58
3.2.3	HLA-spezifische CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen lysieren ECFC/MSK-Kokulturen signifikant geringer als ECFC-Monokulturen. 63

3.2.4	MSCs supprimieren die ECFC-induzierte Immunzell-Proliferation in IFN γ -stimulierten ECFC/MSC-Kokulturen.	64
3.2.5	Die MSC-vermittelte Suppression der antiCD3/antiCD28-induzierten Immunzell-Proliferation wird nicht durch kokultivierte ECFCs aufgehoben.	71
3.2.6	Analyse der Immunogenität von ECFC/MSC-Zellkonstrukten in NSG Mäusen	73
4	DISKUSSION	82
4.1	HUMANE ECFCs AUS DER NABELSCHNUR INDUZIEREN ALLOGENE IMMUNANTWORTEN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>.	82
4.2	DIE KOKULTUR VON HUMANEN NABELSCHNUR-ABGELEITETEN ECFCs UND MSCs BEEINFLUSST FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN BEIDER ZELLTYPEN.	86
4.3	KOKULTUREN VON HUMANEN NABELSCHNUR-ABGELEITETEN ECFCs UND MSCs ZEIGEN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> EINE REDUZIERT E IMMUNOGENITÄT.	88
4.3.1	Die verringerte HLA-ABC-Expression auf ECFCs in Kokultur mit MSCs führt zur reduzierten Lyse durch HLA-ABC-restringierte zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen	89
4.3.2	Die Reduktion von HLA-DR-Molekülen auf kokultivierten ECFCs und MSCs führt zur verminderten T-Zell-Proliferation und zur reduzierten Infiltration von humanen Leukozyten in ECFC/MSC-haltige Transplantate.	90
4.4	STRATEGIEN ZUR MODULATION DER IMMUNOGENITÄT VON ENDOTHELZELLEN	92
ANHANG	95
	LITERATURVERZEICHNIS	95
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105
	TABELLENVERZEICHNIS	111
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	112

Zusammenfassung

Endothelzell-basierte Therapien vermitteln regenerative Effekte hinsichtlich der Revaskularisierung von ischämischen Geweben. Doch ist die Verfügbarkeit von autologen Endothelzellen aufgrund einer krankheitsbedingt reduzierten Frequenz im peripheren Blut oder einer verminderten Integrität der endogenen Endothelzell-Populationen eingeschränkt. Hingegen ist es möglich, allogene endotheliale Vorläuferzellen aus der Nabelschnur in zelltherapeutisch relevanten Mengen zu isolieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Eigenschaften allogener humaner Nabelschnur (NS)-abgeleiteter sog. Endothelial Colony-Forming Cells (ECFCs) mit denen von venösen NS-abgeleiteten Endothelzellen verglichen. Aufgrund der nachgewiesenen Immunogenität von allogenen ECFCs wurde eine weiterführende Strategie zur Reduktion dieser immunogenen Eigenschaften durch die Koapplikation mit Mesenchymalen Vorläuferzellen (MSCs) verfolgt.

Humane ECFCs wurden mit MSCs desselben Spenders kombiniert und in funktionellen in vitro- und in vivo-Assays untersucht. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass IFN γ -stimulierte ECFC/MSC-Kokulturen eine reduzierte Expression von HLA-Molekülen zeigen. Entsprechend induzierten spezifische CD8⁺ T-Zellen eine reduzierte Lyse der kokultivierten ECFCs und MSCs. Die Kokultur von ECFCs und MSCs mit allogenen Immunzellen führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition der T-Zell-Proliferation. Um die reduzierte Immunogenität von ECFC und MSC in vivo zu verifizieren, wurden die Zellen in immundefiziente Mäuse injiziert, welche nachfolgend mit humanen PBMCs rekonstituiert wurden. So konnte nachgewiesen werden, dass die Koapplikation von ECFCs und MSCs nicht nur die Entstehung von stabilen Gefäßnetzwerken begünstigt, sondern zudem in den Transplantaten zu einer verringerten Immunzell-Infiltration führte. Die Koapplikation von ECFCs mit MSCs könnte daher eine klinische Nutzung dieser allogenen Quelle für die therapeutische Unterstützung der Vaskularisierung ermöglichen.

Abstract

Endothelial cell-based therapies promote tissue regeneration and vascularization after ischemic damage. The availability of autologous endothelial progenitor cells is restricted in diseased patients, however therapeutically relevant numbers of allogeneic Endothelial Progenitor Cells can be isolated from an umbilical cord (UC).

In the present study, the immunogenic properties of these Endothelial Colony Forming Cells (ECFCs) were first compared to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Both cytokine-treated endothelial cells induced CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation after coculture with allogeneic immune cells.

So far, the potential interactions between ECFCs and Mesenchymal Stem/Progenitor Cells (MSCs) concerning their immunological features is poorly understood, but we hypothesize that MSCs might improve the immune compatibility and vessel building characteristics of ECFCs. Therefore, human UC-derived ECFC and MSC cocultures from the same donor were analyzed using various functional in vitro and in vivo assays. Stimulation of these cocultures with IFN γ caused strongly reduced expression levels of HLA-molecules compared to ECFC monocultures. The decreased molecular density on the cocultured ECFCs resulted in reduced cytotoxic CD8⁺ T cell-mediated lysis. Further, during IFN γ stimulation, the combination of ECFCs with MSCs prevented initiation of allogeneic T cell proliferation.

To verify this concept in vivo, ECFCs and MSCs were co-transplanted in a humanized allograft mouse model in immunodeficient mice in order to effectively induce stable microvessels. These experiments demonstrate that when MSCs are co-applied with ECFCs, they not only support the formation of stable blood vessels, but also lead to fewer HLA-DR⁺ human vascular structures and fewer infiltrating human leukocytes. The data presented indicate that crosstalk between UC-derived ECFCs and MSCs might lower the risk of allogeneic ECFC rejection.

1 Einleitung

1.1 Die Hierarchie Endothelialer (Vorläufer)-Zellen

Während der embryonalen Entwicklung kommt es durch mesodermale Differenzierung über endotheliale und hämatopoetische Vorläufer zur Formierung von sogenannten Blutinseln im Dottersack^{1,2}. Aus diesen Aggregationen gehen sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Zellen hervor. Daher wurde ein direkter gemeinsamer Vorläufer (Hämangioblast) postuliert^{1,3,4}. Dieser Hypothese zufolge enthält das extraembryonale Mesoderm eine Hämangioblasten-Population, die als direkte Vorläufer von Blutinseln angesehen wurden und somit befähigt wären sowohl Blut- als auch Endothelzellen hervorzubringen. Studien mit isolierten Zellen aus dem Primitivstreifen der Maus und embryonalen Stammzellen konnten zeigen, dass diese mesodermalen Zellen ein multipotentes Differenzierungspotential aufweisen und *in vitro* in Blut-, Endothel- und Muskelzellen differenziert werden können^{5,6}. Doch konnte *in vivo* die Identität des angenommenen gemeinsamen Vorläufers nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Sogenannte „fate mapping“-Studien zeigen nun, dass die Hämatopoese im Dottersack des Mausembryos über das hämogene Endothel induziert wird⁷. Verschiedene Arbeiten weisen außerdem darauf hin, dass zu diesem frühen Zeitpunkt bereits getrennte Vorläufer für hämatopoetische und endotheliale Zellen im proximalen Epiblasten vorliegen und daher die Anwesenheit eines gemeinsamen Vorläufers, direkt vor der Formierung der Blutinseln, unwahrscheinlich ist⁷⁻¹⁰.

Die weitere Differenzierung von hämatopoetischen und endothelialen Vorläufern führt zur Etablierung eines primitiven vaskulären Plexus¹¹. Dieser Vorgang wird als Vaskulogenese bezeichnet. Die anschließende Expansion des Gefäßnetzwerks erfolgt durch Aussprossung von Gefäßstrukturen ausgehend von bereits existierenden Blutgefäßen¹² und wird durch den Begriff der Angiogenese von dem zuvor beschriebenen Prozess der Vaskulogenese abgegrenzt.

Im adulten Organismus sind differenzierte Endothelzellen in der Wand von Blutgefäßen lokalisiert und nur begrenzt zur Proliferation befähigt. Asahara *et al.* beschrieben 1997 die Anwesenheit von zirkulierenden endothelialen Zellen im adulten peripheren Blut¹³. Die Autoren konnten zeigen, dass diese CD34⁺ Zellen, wenn sie intravenös in Mäuse injiziert wurden, zu ischämischen Gebieten migrieren und die Neo-Vaskularisierung von verletzten

Gefäßen begünstigen. Die Interpretation dieser experimentellen Beobachtung implizierte, dass die Population von zirkulierenden $CD34^+$ Zellen, sogenannte endotheliale Vorläufer (eng. endothelial progenitor cells, EPCs) enthält, die aufgrund ihrer regenerierenden Eigenschaften *in vivo* befähigt waren, in die endotheliale Linie zu differenzieren und daher postnatal die Vaskulogenese induzieren konnten. Damit wurde das Konzept einer ausschließlich auf die embryonale Entwicklung begrenzten Vaskulogenese in Frage gestellt und ein neues Forschungsfeld definiert, das sich mit der Hierarchie und den Eigenschaften von endothelialen Vorläuferzellen beschäftigt.

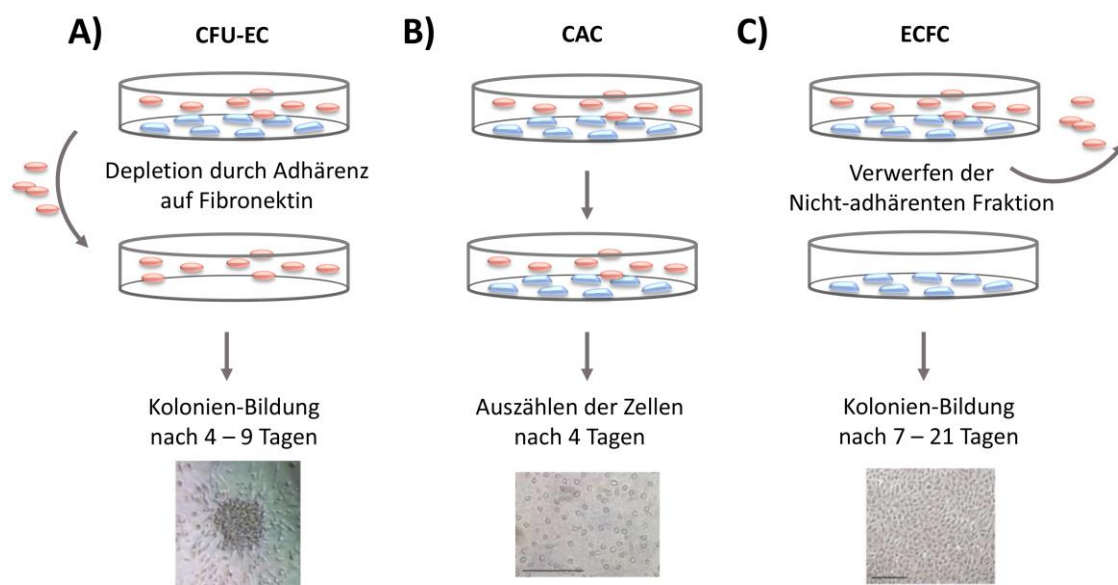


Abbildung 1: Übersicht der Methoden zur Isolation von verschiedenen endothelialen Vorläufer-Populationen aus peripherem Blut. Adhärenz Zellen sind blau und nicht-adhärenz Zellen sind rot schematisch dargestellt. Die Abbildung ist im Text erläutert (adaptiert¹⁶⁹, Hirschi *et al.*, 2008, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology)

Zahlreiche wissenschaftliche Studien haben unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung und Isolation von EPCs angewendet und konnten so verschiedene Subpopulationen aus der sehr heterogenen Population von endothelialen Vorläufern definieren (**Abbildung 1**).

Dabei können verschiedene Ansätze zur Isolation von potentiellen EPC-Populationen unterschieden werden. Die Charakterisierung von zirkulierenden EPCs erforderte die Kultivierung von peripheren mononukleären Zellen des Bluts nach Depletion der adhärenz Zellfraktion auf Fibronektin-beschichteten Zellkulturschalen in endotheliale Wachstumsmittel. Bei dieser Methode konnte nach vier bis neun Tagen das Auswachsen von Kolonien beobachtet werden¹³⁻¹⁵. Diese sogenannten colony-forming unit - endothelial

cells (CFU-ECs/CFU-Hill) zeigen eine charakteristische Anordnung von runden Zellen im Zentrum mit spindelförmig aussprossenden Zellen in der Peripherie der Zellkolonie (**Abbildung 1A**). Es konnte eine inverse Korrelation zwischen der Frequenz von CFU-ECs im peripheren Blut (PB) und der Anhäufung von kardiovaskulären Risikofaktoren (Framingham-Risiko-Score) gezeigt werden¹⁴. Daher dient dieser Assay als diagnostischer Test zur Vorhersage über den Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen¹⁵. Es ist ferner anzumerken, dass bei akutem kardiovaskulärem Stress die Frequenz von CFU-ECs erhöht sein kann¹⁷. Weitere Studien konnten nachweisen, dass CFU-ECs aus einer heterogenen Population verschiedener Immunzelltypen bestehen, darunter hämatopoetische und myeloide Vorläufer sowie T-Zellen, Monozyten und Makrophagen^{18–21}. Diese EPC-Population konnte jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* Gefäßstrukturen induzieren.

Durch die Verwendung eines Isolationsprotokolls ohne Depletion der adhärennten Zellfraktion konnte eine weitere EPC-Subpopulation aus dem adulten PB extrahiert werden (**Abbildung 1B**). Nach viertägiger Kultur der mononukleären Fraktion des Blutes konnten, nach dem Entfernen der Suspension, adhärennte Zellen detektiert werden, die endotheliale Eigenschaften aufwiesen²². Morphologisch können diese Zellen klar von CFU-ECs unterschieden werden, da diese Population nicht zur Kolonie-Bildung in Zellkulturen neigt. Diese Zellpopulation wurde in der Literatur unterschiedlich benannt: eng. circulating angiogenic cells (CACs); circulating endothelial cells (CECs) oder early endothelial progenitor cells (early EPCs).

Ein weiteres Protokoll ist durch die Langzeitkultur der adhärennten mononukleären Fraktion des Blutes auf Kollagen-beschichteten Kulturplatten charakterisiert (**Abbildung 1C**). Nach ein bis drei Wochen kommt es zum Auswachsen von stark proliferativen Endothelzell-Kolonien, sogenannten endothelialen Kolonie-bildenden Zellen (eng. endothelial colony-forming cells, ECFCs), die in ihren Eigenschaften reifen Endothelzellen ähneln²³. Neben der für Endothelzellen charakteristischen Kopfsteinpflaster-Morphologie und Markerexpression sind diese Zellen in der Lage *in vitro* und *in vivo* mikrovaskuläre Strukturen auszubilden^{24–26}.

Während die eben erwähnten Methoden auf dem Adhärenz-Verhalten von verschiedenen im Blut enthaltenden Zellfraktionen basieren, nutzten andere Isolationsstrategien die kombinierte oder einzelne Sortierung der mononukleären Zellfraktion nach Stammzell-spezifischen bzw. hämatopoetischen und endothelialen Markern wie beispielsweise cluster

of differentiation (CD) 34 und CD133. Anschließend erfolgt die Aussaat auf beschichteten Kulturplatten^{13,27}.

Die nähere Charakterisierung der endothelialen Vorläufer-Subpopulationen mit Hilfe von durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Verfahren konnte zeigen, dass es sich bei den beiden zuerst beschriebenen Populationen (CFU-ECs und CACs) um Zellen hämatopoetischen Ursprungs handelt. Beide dieser CD45⁺ Populationen waren in unterschiedlichem Maße positiv für die Marker CD133 und CD34, deren Expression auch mit verschiedenen hämatopoetischen Stammzellpopulationen assoziiert wird²⁸. Nach der Kultur in endotheliale Wachstumsmittel adaptierten die hämatopoetischen Zellen endotheliale Eigenschaften, zeigten jedoch *in vitro* ein geringes Proliferationspotential. CFU-ECs können *in vitro* temporär in HUVEC-abgeleitete mikrovaskuläre Strukturen inkorporieren, doch sind sie alleine nicht in der Lage Gefäße auszubilden^{18,24}.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Subpopulation der CD45⁻ ECFCs die Eigenschaft aufweist, stark proliferative Endothelzellen hervorzubringen und dadurch von beiden hämatopoetischen EPC-Subpopulationen durch die Verwendung von klonogenen Einzelzell-Assays unterschieden werden können^{23,29}. Dieser Assay wurde bereits für die Klassifikation des hämatopoetischen Systems herangezogen und konnte zeigen, dass die gesamte Hierarchie von endothelialen Vorläufern sowohl im PB, in der Nabelschur²⁹ und als auch grundsätzlich in der Gefäßwand existiert²³. Entsprechend der Einteilung von hämatopoetischen Vorläufern wurden die endothelialen Zellen aufgrund ihres klonogenen und proliferativen Potentials in sogenannte „high proliferative potential“ (HPP)-EPCs und „low proliferative potential“ (LPP)-EPCs kategorisiert. Dabei wurde deutlich, dass es sich bei dem EPC-Subtyp der ECFCs um eine heterogene Population von Endothelzellen handelt mit unterschiedlichen klonogenen und proliferativen Kapazitäten²⁹. Der Vergleich von adultem PB mit Nabelschnur-Blut als Zell-Isolationsquelle konnte weiterhin zeigen, dass Nabelschnurblut-abgeleitete ECFCs früher Kolonien bildeten und einen deutlich höheren Anteil an HPP-Zellen aufwiesen. Außerdem konnte bei Nabelschur-abgeleiteten ECFCs eine stark erhöhte Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden, die bisher nur bei Telomerase-überexprimierenden Endothelzellen beobachtet wurde³⁰.

Es wurde vorgeschlagen, die Bezeichnung EPCs auf die ECFC-Population zu beschränken, da diese, im Gegensatz zu den hämatopoetisch-abgeleiteten Populationen (CFU-ECs und CACs),

typische Stammzell-Eigenschaften, wie die Selbsterneuerung und die klonogene Aktivität besitzen²⁸. Zudem sind ausschließlich ECFCs in der Lage sekundäre und tertiäre funktionelle Nachfolge-Populationen zu generieren, die ein nachhaltiges vaskulogenes und zugleich proliferatives Potential aufweisen²⁹.

1.2 Mesenchymale Stamm-/Vorläuferzellen und Perizyten

Mesenchymale Stamm-/Vorläufer Zellen (engl. mesenchymal stem/progenitor cells, MSCs) wurden erstmals aus dem Knochenmark extrahiert und ferner als fibroblastenartige Zellen oder sogenannte fibroblast colony-forming units (fibroblast CFUs) beschrieben^{31,32}. Dabei handelt es sich um die adhärente nicht-hämatopoetische Zellfraktion des Knochenmarks. MSCs sind außerdem an der Regulation der hämatopoetischen Stammzellnische beteiligt³³. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten konnten belegen, dass die Zellen ein multipotentes Differenzierungspotential aufweisen. Unter adäquaten *in vitro*-Kulturbedingungen ist ihre Eigenschaft als Vorläufer von mesodermal-abgeleiteten Zelltypen nachgewiesen worden³⁴. So differenzieren Knochenmark-abgeleitete MSCs in Anwesenheit von spezifischen Wachstumsfaktoren in Osteoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten³⁵⁻³⁸. In präklinischen Modellen wurde weiterhin gezeigt, dass MSCs regenerative Fähigkeiten besitzen^{39,40}. Doch sind MSCs nicht vorrangig durch die Differenzierung in gewebespezifische Zellen an der Regenerierung von geschädigtem Gewebe beteiligt, sondern vielmehr durch die Sekretion von trophischen Faktoren oder dem Transfer von Exosomen⁴¹⁻⁴⁷. So konnte in experimentellen Modellen der myokardialen und peripheren Ischämie gezeigt werden, dass MSC-konditionierte Kulturüberstände eine pro-angiogene und anti-fibrotische Wirkung aufweisen. Außerdem wurde darauf hingewiesen, dass Exosomen, die aus MSC-konditionierten Medien durch Ultrazentrifugation extrahiert wurden, durch mitochondrialen Transfer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitstellen und damit die Regenerierung einer Endotoxin-induzierten Lungenschädigung unterstützen⁴⁵. Darüber hinaus ist die immunmodulierende Wirkung von MSCs auf verschiedene Immunzell-Populationen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden⁴⁸. Weiterhin wurde die therapeutische Anwendung von MSCs bei der allogenen Stammzelltransplantation in klinischen Studien untersucht^{49,50}. Publierte Daten weisen darauf hin, dass MSCs angiogene

Prozesse durch die Sekretion von pro-angiogenen Faktoren als und durch ihre Gefäßstabilisierenden Eigenschaften fördern⁵¹⁻⁵³.

Jedoch können die Eigenschaften von kultivierten MSCs nicht ohne weiteres auf MSCs unter physiologischen Bedingungen übertragen werden. Wenngleich MSCs *ex vivo* weitreichend charakterisiert wurden, ist ihre Ontogenese sowie ihre anatomische Nische nur unzureichend geklärt. Durch variierende Isolationsmethoden sowie durch die unterschiedlichen Eigenschaften der anatomischen Quellen handelt es sich bei MSCs um eine heterogene Zellpopulation. MSCs wurden aus verschiedensten Geweben extrahiert und charakterisiert. Sowohl das Knochenmark, das weiße Fettgewebe als auch fetale bzw. maternale Gewebe, wie die Nabelschnur und die Plazenta, weisen eine starke Vaskularisierung auf und besitzen jeweils eine ausgeprägte perivaskuläre Zone. Neben MSC-typischen Markern weisen MSCs häufig eine variierende Expression des für Endothel- und perivaskuläre Zellen typischen Markers CD146 (eng. Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM)) auf. Perizyten exprimieren hingegen CD146 konstitutiv und besitzen zudem ein multipotentes Differenzierungspotential. Zahlreiche wissenschaftliche Artikel deuten nun auf die perivaskuläre Nische als anatomischen Ort von adulten mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen hin⁵⁴⁻⁵⁶. Demzufolge sind MSCs nativ in der perivaskulären Nische von verschiedenen Gewebetypen lokalisiert, in welcher sie durch Reize aus der Gewebe-Umgebung aktiviert werden können⁵⁷. Ihre unmittelbare Nähe zum Blutgefäßsystem legt außerdem nahe, dass MSCs sowohl mit Endothelzellen als auch mit Immunzellen interagieren können. So wurde bereits mehrfach gezeigt, dass MSCs *in vitro* und *in vivo* die Endothelzell-vermittelte Gefäßbildung unterstützen und zudem als funktionell aktive Perizyten agieren können^{53,58,59}. Die Gefäßstabilisierung erfolgt durch die finale murale Differenzierung nach Kontakt mit Endothelzellen und ist maßgeblich durch TGF- β vermittelt⁶⁰.

Auch die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen des Immunsystems wurde ebenfalls hinreichend dokumentiert⁶¹⁻⁶⁴. So konnte gezeigt werden, dass MSCs sowohl auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem suppressierende Wirkungen ausüben. Zahlreiche Studien belegen die MSC-vermittelte Reduktion der allogenen T-Zell-Proliferation sowie die Modulation weiterer T-Zell-Effektor-Funktionen⁶⁵⁻⁶⁷. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass MSCs in aktivierten Immunzellkulturen die Expansion von CD4⁺

CD25⁺ forkhead box protein P3 (FOXP3)⁺ regulatorischen T-Zellen induzieren⁶⁸. Zusätzliche immunmodulierende Interaktionen wurden bezüglich der dendritischen Reifung⁶⁹, der B-Zell-Differenzierung⁷⁰ und der Polarisierung von Makrophagen^{71,72} beschrieben.

1.3 Vaskulogenese und Angiogenese

Endothelzellen (eng. endothelial cells, ECs) kleiden die Wand von verschiedenen Typen von Blutgefäßen aus. Größere Gefäße sind zudem von einer sogenannten Media umgeben, die aus unterschiedlich zusammengesetzten extrazellulären Matrix (EZM)-Proteinen und glatten Muskelzellen bzw. Perizyten besteht⁷³. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert, kommt es während der embryonalen Entwicklung ausgehend von endothelialen und hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Ausbildung eines primitiven vaskulären Plexus^{11,74}. In **Abbildung 2** wird eine schematische Darstellung der angiogenen und vaskulogenen Prozesse zur Etablierung von Gefäßnetzwerken gezeigt.

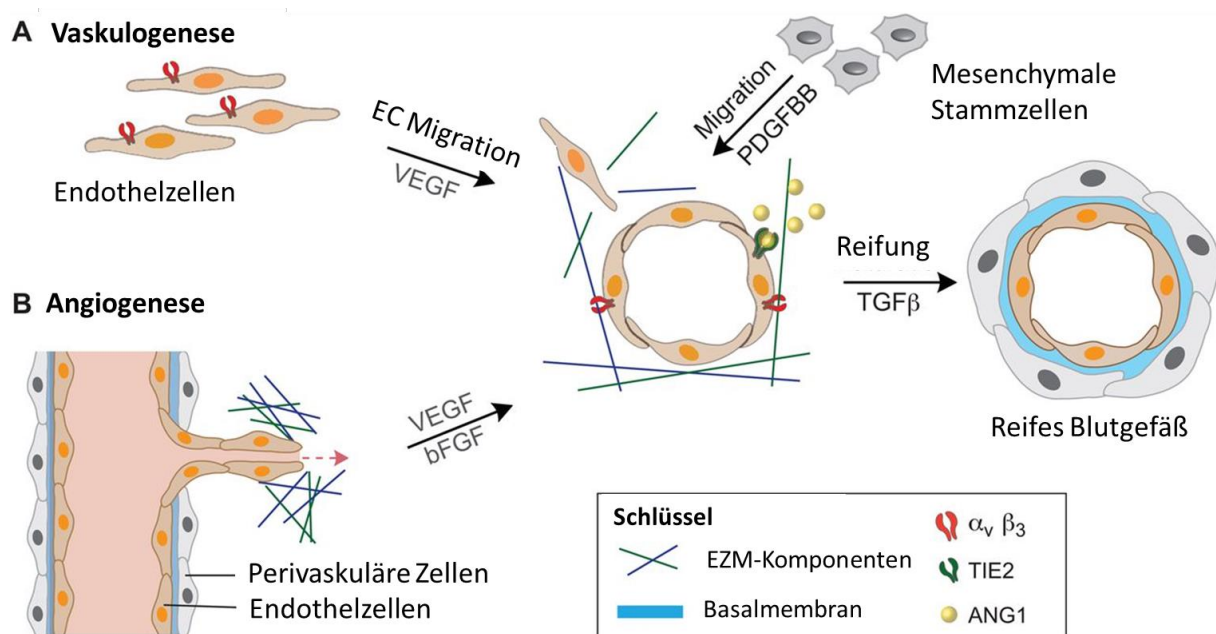


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Reifung von Blutgefäßen

A) Vaskulogenese: Orientierung und Migration von endothelialen Vorläufern zur Induktion der Gefäßbildung. **B)** Angiogenese: Aussprossung von Gefäßen durch Elongation und Proliferation von Endothelzellen mit der anschließenden Rekrutierung von perivaskulären Zellen (PDGF-BB/PDGFR Interaktion; Ang/Tie2 Interaktion). Die Reifung des Gefäßes wird durch TGFβ vermittelt. Eine detailliertere Beschreibung der oben dargestellten Prozesse ist dem Text zu entnehmen. Abbildung, modifiziert¹⁷⁰ nach Park *et al.* 2014, Development.

Die initiale Anordnung von Endothelzellen zur Induktion von Gefäßstrukturen wird klassisch als Vaskulogenese bezeichnet und involviert Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF-Rezeptor (VEGFR) Interaktionen (**Abbildung 2A**). Die anschließende Expansion

dieses primitiven Netzwerks wird als Angiogenese bezeichnet (**Abbildung 2B**). Für die Initiierung der Angiogenese ist zunächst der Übergang der Endothelzelle von einem ruhenden in einen aktivierten Status notwendig. Durch Spezifizierung einer sogenannten „tip“-Zelle, die nachfolgende die Aussprossung des Gefäßes anführen wird, werden benachbarte Endothelzellen (sogenannte „stalk“-Zellen) durch die Wachstumsfaktoren VEGF und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) zur Proliferation, Elongation und Lumen-Bildung angeregt. Diese Zellen bilden nachfolgend die Sprossbasis des Gefäßes. Ferner wird die Spezifikation der Endothelzellen in „tip“- oder „stalk“-Zellen maßgeblich durch die Interaktion der Signalwege Notch und VEGF kontrolliert⁷⁵⁻⁷⁷. Die Endothelzellen im aussprossenden Teil des Gefäßes sekretieren das Platelet-Derived Growth Factor-Homodimer BB (PDGF-BB), Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (eng. Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) und Interleukin 6 (IL-6)⁷⁸ und induzieren die Rekrutierung von MSCs oder anderen perivaskulären Zellen, die ihrerseits PDGF-Rezeptor β (PDGFR- β) exprimieren und Angiopoetin (Ang 1) sekretieren. Die Interaktion des Angiopoetin-Rezeptors (Tie2) mit Ang 1 führt zur Anlagerung von perivaskulären Zellen an das Gefäß und fördert zugleich die Produktion von Basalmembran-Komponenten. Im finalen Schritt kommt es durch die Interaktion von Endothelzellen und MSCs bzw. perivaskulären Zellen zu einer erhöhten TGF- β Freisetzung, so dass es zur Reifung des Gefäßes sowie zur muralen Differenzierung und Inhibition der Endothelzell-Proliferation kommt.

1.4 Experimentelle zellbasierte Therapiestrategien

Die Frequenz von definierten Populationen von endothelialen Vorläufern im peripheren Blut wird bei kardiovaskulären Erkrankungen als diagnostischer Parameter verwendet^{16,79,80}. Andererseits zeigen Studien, dass verschiedene im Blut vorkommende Zellfraktionen proangiogene und regenerative Wirkungen vermitteln. Die Anwendung von hämatopoetischen EPCs zeigte in verschiedenen präklinischen Modellen positive Effekte hinsichtlich der Revaskularisierung ischämischer Gewebe. Hauptsächlich wurden dabei CD34⁺ Zellen aus adultem humanem peripherem Blut oder Nabelschnurblut sortiert und gegebenenfalls zuvor mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) mobilisiert. Diese sogenannten EPC-angereicherten Fraktionen wurden nachfolgend bezüglich ihres regenerativen Potentials untersucht. In murinen Modellen der kritischen Ischämie der Extremitäten konnte

desweiteren durch verschiedene Forschungsgruppen eine verbesserte Blutversorgung des geschädigten Gewebes nachgewiesen werden^{81,82}. Andere Berichte über die Effekte von mobilisierten humanen CD34⁺ EPCs in Kleintiermodellen der myokardialen Ischämie weisen auf eine verbesserte linksventrikuläre Herzfunktion sowie eine reduzierte Infarktgröße nach intravenöser oder intramuskulärer Applikation der Zellfraktion hin⁸³⁻⁸⁶. Grundsätzlich wurden die EPC-vermittelten Effekte auf die Sekretion von parakrinen, proangiogenen Faktoren und die daraus resultierende Rekrutierung von Endothelzellen oder Endothel-ähnlichen Zellen zurückgeführt^{20,87,88}.

ECFCs hingegen unterstützen zusätzlich die Neovaskularisierung von geschädigten Gefäßnetzwerken^{24,89}, indem sie durch Inkorporation in entstehende Gefäßstrukturen aktiv und physisch an der Wiederherstellung der Blutzirkulation beteiligt sind⁹⁰. Die Analyse der *de novo* Vaskulogenese in drei-dimensionalen Fibrin- oder Kollagen-Gelen stellt innerhalb der ECFC-Forschung ein wichtiges Modellsystem dar. Das vaskulogene Potential von humanen PB- und Nabelschnurblut-abgeleiteten ECFCs wurde in präklinischen Modellen unter Anwendung einer subkutanen Injektion von ECFCs in einer EZM-Suspensionen nachgewiesen^{53,91-93}. In einer dieser Studien mit Nabelschnurblut-abgeleiteten ECFCs konnte außerdem gezeigt werden, dass ECFCs, im Gegensatz zu reifen ECs, effektiver die *de novo* Vaskulogenese induzieren und, dass die *in vitro* Expansion der Vorläuferzellen zu einer Verringerung ihres vaskulogenen Potentials führt⁹¹. Dieses reduzierte Potential der expandierten ECFCs wurde von den Autoren auf eine potentielle De-Differenzierung der Zellen während der *ex vivo*-Kultur zurückgeführt. Durch die Anwendung von höheren Zellzahlen für die subkutane Injektion konnte die vaskulogene Kapazität in Transplantaten mit stark expandierten ECFCs kompensiert werden⁹¹. Die Zugabe von humanen MSCs, Fibroblasten oder glatten Muskelzellen in das beschriebene Testsystem, führte bei den ECFC-induzierten Gefäßstrukturen nachhaltig zur Stabilisierung und zu einer verbesserten Architektur des Gefäßnetzwerks^{53,59,93,94}. Ferner konnte beobachtet werden, dass solche mesenchymal-stabilisierten Netzwerke eine Zeitspanne von bis zu 130 Tagen überdauern⁹³.

Ein weiteres wichtiges Forschungsfeld beschäftigt sich mit dem direkten Anschluss eines Gefäßnetzwerks an die zu transplantierenden zellulären Konstrukte zum Ersatz von geschädigtem Gewebe. Die therapeutische Verfügbarkeit von *ex vivo* kultivierten und besiedelten komplexen zellulären Konstrukten ist maßgeblich von der ausreichenden

Vaskularisierung des Transplantats abhängig, da das Empfängergewebe meist krankheitsbedingt ein reduziertes angiogenes Potential aufweist. Beispielsweise zeigte die *in vitro*-Besiedelung von dezellularisiertem Hautgewebe mit Keratinozyten und adulten humanen Blut-abgeleiteten ECFCs bereits drei Wochen nach Implantation in immunkompromittierte Mäuse eine verstärkte Vaskularisierung zum Empfängergewebe verglichen mit Hautersatz, der ausschließlich mit Keratinozyten besiedelt wurde⁹⁵. Unter Verwendung von ECFCs aus humanem Nabelschnurblut konnte eine weitere Studie diese Beobachtungen bestätigen und zudem nachweisen, dass die Verwendung von Nabelschnurblut-abgeleiteten ECFCs der von HUVECs hinsichtlich ihrer vaskularisierenden Eigenschaften überlegen ist⁹⁶.

Ähnlich der *de novo* Vaskulogenese wurden insbesondere synergistische Effekte von EPCs oder ECFCs mit MSCs bei der Regeneration von Knochengewebe beschrieben⁹⁷⁻¹⁰⁰. Ein häufig verwendetes Modell zur Analyse der Knochenregeneration ist die Induktion eines kritischen femuralen Knochendefekts in Ratten und die Anwendung zellbasierter Therapien. So konnte unter Verwendung von Fibronectin-beschichteten β -Tri-Kalziumphosphat Granula, die zunächst entweder nur mit PB-abgeleiteten EPCs, Knochenmark-abgeleiteten MSCs oder mit einer Kombination von beiden Zelltypen assoziiert wurden, eine erhöhte Knochenmasse und eine verbesserte vaskuläre Struktur nach Applikation innerhalb des induzierten Defekts gemessen werden⁹⁹. Zudem zeigte sich, dass humane ECFCs chaotische vaskuläre Strukturen, die bei Hypoxie-induzierten Retinopathien auftreten, signifikant normalisieren und an der Gestaltung des Gefäßnetzwerks aktiv beteiligt sind⁹⁰.

1.5 Zelluläre Rejektion von allogenen Transplantaten

Das Einbringen von allogenen Transplantaten in einen immunkompetenten Empfänger kann je nach dessen Beschaffenheit und zellulärer Komplexität zu unterschiedlichen immunologischen Reaktionen gegen das Transplantat führen. Die Rejektion wird vornehmlich durch die Erkennung von Fremddantigenen vermittelt, die durch sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe (eng. major histocompatibility complex, MHC)-Moleküle präsentiert werden¹⁰¹. MHC Klasse I Moleküle (HLA-ABC) sind konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und werden spezifisch von CD8⁺ T-Zellen erkannt. Dagegen interagieren Klasse II Moleküle (HLA-DR) mit dem T-Zell-Rezeptor auf CD4⁺ T-Zellen, wodurch

es in der Folge zur Zytokinsekretion und Aktivierung von B-Zellen kommen kann. HLA-DR ist konstitutiv auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (eng. antigen presenting cells, APCs) exprimiert und kann auf anderen Zellen, sogenannten semi/non-professionellen APCs wie beispielweise Endothelzellen, durch die Stimulation mit Zytokinen (z.B. IFN γ) induziert werden. Obwohl Endothelzellen im Vergleich zu professionell Antigen-präsentierenden Zellen keine Expression von ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 aufweisen, wurde jedoch beschrieben, dass die Interaktion von allogenen T-Zellen mit den Endothelzellen zur verstärkten Expression von CD86 auf separierten kokultivierten CD4⁺ T- Zellen führt¹⁰². Eine Stimulation von Endothelzellen mit Zytokinen in einem pro-inflammatorischen Milieu verstärkt weiter die Antigen-präsentierenden Eigenschaften von Endothelzellen und führt zur Induktion von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin), die u.a. an der Transmigration von Leukozyten und Monozyten beteiligt sind. Ferner kann es durch die Expression von sogenannten „Minor Histocompatibility Antigens“ (MHAs) zusätzlich zur Aktivierung der Fremderkennung kommen^{103,104}. Hinsichtlich der MHC-vermittelten allogenen Erkennung von Transplantaten werden drei verschiedene Mechanismen vorgeschlagen (**Abbildung 3**).

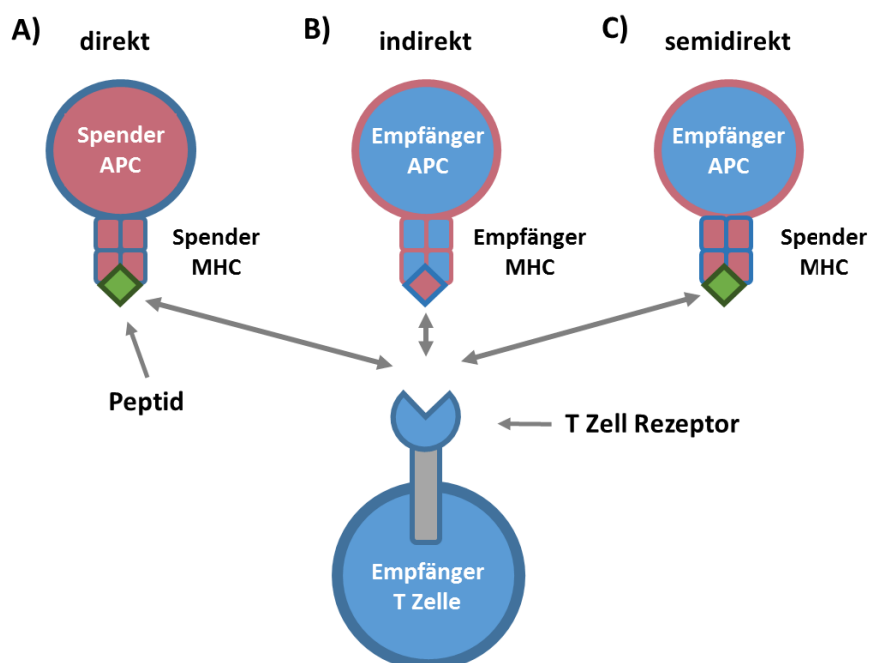


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Fremderkennung

A) Direkte Fremderkennung von Spender-Peptid/MHC-Molekülen durch Empfänger T-Zellen. **B)** Indirekte Fremderkennung von prozessiertem Spender-Antigen präsentiert durch Empfänger APCs und MHC-Molekülen. **C)** Semidirekte Erkennung durch übertragene intakte MHC-Moleküle durch Empfänger-APCs. MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, APC = Antigen-präsentierende Zelle. Die Abbildung ist im Text erläutert.

Der direkte Weg (**Abbildung 3A**) führt über die T-Zell-abhängige Erkennung von Peptiden, die direkt von Spender-APCs über MHC-Moleküle exponiert werden. Der indirekte Weg erfordert zunächst die endosomale Prozessierung von Spender-Antigenen bevor diese durch Empfänger-MHC-Moleküle auf Empfänger-APCs präsentiert werden können (**Abbildung 3B**). Die Fremderkennung kann darüber hinaus durch einen weiteren Mechanismus vermittelt werden – die sogenannte semidirekte Erkennung (**Abbildung 3C**). Hierbei kommt es durch Übertragung von intakten Spender-MHC-Molekülen auf Empfänger-APCs zur Präsentation des gesamten allogenen MHC-Moleküls. Die akute Rejektion kann sowohl durch die direkte als auch durch die indirekte Alloantigen- Erkennung erfolgen. T-Zellen sind in der Lage Fremd-MHC Moleküle in der Peripherie zu erkennen. Die CD4-vermittelte direkte Allo-Erkennung ist von der Anwesenheit Antigen-präsentierender Zellen im Spendergewebe abhängig. Die Reaktion verläuft verglichen zur indirekten Erkennung deutlich schneller¹⁰⁵. Es wurde außerdem berichtet, dass der semidirekte Weg der Antigenerkennung zur MHC Klasse I-vermittelten Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen führen kann, wobei nicht vollständig geklärt ist, in welchem Maß dieser Prozess für die Rejektion von allogenen Transplantaten klinisch relevant ist¹⁰⁶. Weiterführende Studien mit MHC Klasse II-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass nach Implantation von Spender-APC-freiem Gewebeersatz und nach Depletion der CD8⁺ Fraktion im Empfänger dennoch eine Abstoßung des Transplantats durch Empfänger-CD4⁺ T-Zellen induziert wird¹⁰⁷. Damit wurde nachgewiesen, dass der indirekte Weg der Alloantigen-Erkennung hinreichend sein kann, um die Rejektion eines Transplantats zu induzieren.

Da während der akuten Phase der Rejektion ansässige dendritische Zellen mehrheitlich aus dem Spendergewebe entfernt werden¹⁰⁸, ist die chronische Rejektion vermutlich auf die indirekte Aktivierung der Alloantigen-Erkennung beschränkt¹⁰⁶. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Zytokin-abhängig verstärkte Expression von Spender-MHC Klasse II-Molekülen in entzündeten Gebieten zur direkten Aktivierung der Fremderkennung in der chronischen Phase führen könnte.

Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Immunogenität von endothelialen Vorläuferzellen zu untersuchen und gegebenenfalls zu modulieren. Dafür wurde zunächst die Immunogenität von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs analysiert. Die Endothelzellen wurden weiter mit Mesenchymalen Stamm-/Vorläufern kombiniert und der Einfluss der Kokultur auf therapeutische relevante Aspekte wie die Vaskulogenese und die Immunogenität untersucht.

I. Sind humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs immunogen?

Die Fragestellung wurde durch die folgende Untersuchung bearbeitet:

- Charakterisierung der Nabelschnur-abgeleiteten humanen ECFCs
- Funktionelle *in vitro* Versuche zur Analyse des immunogenen Potentials von ECFCs

II. Beeinflussen die immunsupprimierenden Eigenschaften von MSCs die Immunogenität von ECFCs?

Aus der Aufgabenstellung ergaben sich die folgenden Teilbereiche:

- Analyse der Regulation von immunologisch relevanten Molekülen in ECFC/MSC Kokulturen
- Funktionelle Untersuchungen zur Immunogenität von ECFC/MSC-Kokulturen *in vitro*
- Analyse des gefäßbildenden Potentials und der Immunogenität von kombinierten Transplanten in einem humanisierten Allograft-Mausmodell

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Adhäsions-Objektträger (SuperFrost®)	Langenbrinck, Emmendinger (D)
Deckgläser 21 x 26 mm	Langenbrinck, Emmendinger (D)
Deckgläser 24 x 50 mm	Langenbrinck, Emmendinger (D)
Einfrierröhrchen (1,8 mL)	Nunc™, Thermo Scientific, Schwerte (D)
Filteraufsätze (0,2; 0,44 µm Netze)	Falcon®, Corning®, VWR, Darmstadt (D)
Flachboden Transwell-Systeme (6-well; 24-well/ 0,4 µm Porengröße)	Corning® Costar® Life Sciences, Amsterdam, (NL)
Flachboden Zellkulturplatten (6-well; 24-well; 96-well)	Corning® Costar® Life Sciences, Amsterdam, (NL)
Konische Polypropylen-Röhrchen (15 und 50 mL)	BD Falcon™, Heidelberg (D)
Kryo-Boxen	Kisker Biotech, Steinfurt (D)
MACS® Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen, (D)
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific™ Nalgene™, Schwerte (D)
Paraffinkassetten	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Petrischalen	BD Falcon™, Heidelberg (D)
Pipetten-Spitzen (10, 200 und 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg (D)
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (D)
Reaktionsgefäß (1,4 mL)	Micronic, Lelystad (NL)
Reaktionsgefäße, (0,5; 1,5 und 2 mL)	Safe-Lock™, Eppendorf, Hamburg (D)
Rundboden Röhrchen (5 mL)	BD Falcon™, Heidelberg (D)
Rundboden Röhrchen (5 mL) + Zellfilter Kappe (35 µm)	BD Falcon™, Heidelberg (D)
Rundboden Zellkulturplatten (96-well)	Corning® Costar® Life Sciences, Amsterdam, (NL)
Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 mL)	BD Falcon™, Heidelberg (D)

Serologische Pipetten (50 mL)	Corning® Costar® Life Sciences, Amsterdam, (NL)
Spritzen	Omnifix Braun, Meslungen (D)
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Minisart®, Sartorius AG, Göttingen (D)
Feather® Skalpell	pfm medical AG, Köln (D)
Sterican® Einmalkanülen (18,26,30G)	Braun, Melsungen (D)
Steril-Filter Steriflip 0,22µm	Express Plus®, Merck Millipore, Darmstadt (D)
Steril-Filter, Stericup 0,22µm	Express Plus®, Merck Millipore, Darmstadt (D)
Transferpipetten	Sarstedt, Nürmbrecht (D)
Vorfilteraufsatz (30 µm-Netz)	CellTrics®, Partec, Görlitz (D)
Zellkulturflasche (25, 75, 175 cm ²)	Corning® Costar® Life Sciences, Amsterdam, (NL)
Zellschaber	Sarstedt, Nürmbrecht (D)

2.1.2 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco®, Thermo Scientific, Schwerte (D)
1-Methyltryptophan (1-MT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes™, Thermo Scientific, Schwerte (D)
5,6- Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE)	Molecular Probes™, Thermo Scientific, Schwerte (D)
Endotoxin-freies Wasser, Ampuwa	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg (D)
Ascorbinsäure	SingleQuots Clonetics, LONZA, Köln (D)
Biocoll-Separationslösung	Biochrom AG, Berlin (D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Calcein AM	MoBiTec, Göttingen (D)
CD14 Micro Beads, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
CD4 Micro Beads, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
CD8 Micro Beads, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Esel-Serum	Jackson ImmunoResearch, Hamburg (D)
Essigsäure	J.T. Baker über VWR, Darmstadt (D)
Ethanol, 99.8% , denaturiert	Carl Roth, Karlsruhe (D)

Fc-Rezeptorblocker	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrome AG, Berlin, (D)
Fetales Kälberserum (FKS)	HighClone™, GE Healthcare Lifescience (US)
Fluoromount G®	Southern Biotech über Biozol, Eiching (D)
Heparin (5000 U/mL)	Biochrom AG, Berlin (D)
HGF, human	SingleQuots Clonetics™, LONZA, Köln (D)
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Hydrocortison	SingleQuots Clonetics™, LONZA, Köln (D)
IGF, human	SingleQuots Clonetics™, LONZA, Köln (D)
IL-10, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
IL-1β, human	SingleQuots Clonetics™, LONZA, Köln (D)
IL-2, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Interferon gamma (IFNγ)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Kollagen Typ I (Ratte)	BD, Heidelberg (D)
Kollagenase IV	Stem Cell Technology, Vancouver (CA)
L-Glutamin (100x; 200 mM)	Invitrogen™, Thermo Scientific, Schwerte (D)
LPS, Escherichia coli 0127:B8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Matrigel	BD, Heidelberg (D)
MAX-Block	Dianova, Hamburg (D)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt (D)
ODN-2006/CpG Oligonukleotid	InvivoGen, San Diego (US)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S)	Life Technologies, Karlsruhe (D)
Humanes Thrombozytenlysate (pHPL)	Dr. Katharina Schallmoser/Prof. Dr. Dirk Strunk, PMU Salzburg (A)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Prostaglandin E2 (PEG-2)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Tris Base	Calbiochem®, Merck Millipore, Darmstadt (D)
Tris Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Triton X-100	Serva, Heidelberg (D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Xylol	J.T. Baker über VWR, Darmstadt (D)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Gebrauchsfertige Lösungen und Medien	Hersteller
Alpha MEM	PAA, Pasching (A)
Basales Endothelzellmedium (EBM-2)	Clonetics™, LONZA, Köln (D)
Descosept® AF, Flächendesinfektion	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld (D)
Eosin-Lösung	Chroma, Bellows Falls, Vermont (USA)
Erythrozyten-Lyse Puffer	Red blood cells lysis buffer (10X), Biolegend, Fell, (D)
Harris, Hämatoxylin-Lösung	Merck Millipore, Darmstadt (D)
PBS, Dulbecco mit Mg ²⁺ Ca ²⁺	Merck Millipore, Darmstadt (D)
PBS, Dulbecco ohne Mg ²⁺ Ca ²⁺	Biochrom AG, Berlin (D)
Permeabilisierungspuffer	Intracellular staining and permeabilization buffer (10X), Biolegend, Fell, (D)
Sterilium® Desinfektionslösung	Bode Chemie, Hamburg (D)
Target Retrieval Solution S1700	DAKO, Hamburg (D)
TBS	Thermo Scientific, Schwerte (D)
VLE-RPMI	Biochrom AG, Berlin (D)
Angesetzte Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1% FKS, 0,1% NaN ₃ in PBS
Fixierungslösung	1 Teil PFA-Lösung (4 %) + 3 Teil FACS Puffer
Kollagenlösung	3,89 mg/mL Kollagen Typ I (Ratte) Lösung in 0,02 N Essigsäure verdünnt (50 µg/mL)
MACS-Puffer	2 mM EDTA, 1% FKS in PBS
PFA-Lösung (4 %)	0,4 g Paraformaldehyd in 500 µL H ₂ O + 25 µL 1 N NaOH + 9,5 mL PBS
Blockierungspuffer	1% BSA + 5% Esel-Serum in PBS verdünnt
Blockierungspuffer für Paraffinschnitte	2% BSA + 2% Esel-Serum in TBS verdünnt

2.1.4 Reaktionssysteme

Kit	Hersteller
CBA Flex Set Master buffer kit	BD, Heidelberg (D)
CD31 Micro Beads Kit, human	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Human IFN γ CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human IFN γ EliSpot Assay	AID, Strasberg (D)
Human IL-10 CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human IL12p40 CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human IL1- β CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human IL-6 CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human IL-8 CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human sFas-L CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human TGF- β CBA Single Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Human TNF α CBA Flex Set	BD, Heidelberg (D)
Live/Dead [®] Fixable Stain Kit (V405)	Invitrogen [™] , Thermo Scientific, Schwerte (D)
Live/Dead [®] Fixable Stain Kit (V510)	Invitrogen [™] , Thermo Scientific, Schwerte (D)
Matrigel, in vitro-Angiogenesis	Merck Millipore, Darmstadt (D)

2.1.5 Pharmazeutika

Anästhetika	Hersteller
Ketamin	Ketamin, CP-Pharma, Burgdorf, (D)
Xylazin	Xylavet [®] , CP-Pharma, Burgdorf, (D)

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD3 (OKT3) (Maus, anti-human)	Janssen/Ciliag, Neuss (D)	1 : 1000
CD3-APCCy7 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD3-PerCPCy5.5 (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 50
CD4-APC (Maus, anti-human)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)	1 : 50 - 100
CD8-PE (Maus, anti-human)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)	1 : 50

CD19-PE (Maus, anti-human)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)	1 : 50
CD14-APCCy7 (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 100
CD14-PerCPCy55 (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 50
CD25-PerCPCy5.5 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 30
CD27-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD28 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 2000
CD29-PE (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD31-APCCy7 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 1000
CD31-FITC (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 50
CD38-PerCPCy5.5 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD44-PECy7 Maus, anti-human	BioLegend, Fell (D)	1 : 1000
CD45-V450 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD45-PerCP (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 50
CD54-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD54-FITC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD55-PECy7 (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 50
CD56-PECy7 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD73-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD90-PE (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD90-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD105-FITC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
CD106-PE (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 100
CD144-PE (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 100
CD146-PE (Maus, anti-human)	BD, Heidelberg (D)	1 : 100
KDR/CD306-APC (Maus, anti-human)	R&D Systems, Wiesbaden (D)	1 : 20
HLA-ABC-PerCPCy5.5 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
HLA-ABC-PerCP (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 1000
HLA-ABC-V450 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
HLA-DR-LEAF™ (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	15 µg/mL
HLA-DR-FITC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50

HLA-DR-PECy7 (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 400 - 600
HLA-DR-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50
MIC A/B-APC (Maus, anti-human)	BioLegend, Fell (D)	1 : 1000
CD3-PE (Hamster, anti-Maus)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)	1 : 50
CD19-APC (Ratte, anti-Maus)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)	1 : 50
CD45-FITC (Ratte, anti-Maus)	BioLegend, Fell (D)	1 : 50

2.1.7 Antikörper für histologische Immun-Fluoreszenzfärbungen

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD31 (Kaninchen, anti-human)	Abcam, Berlin (D)	1 : 50
CD45 (Maus, anti-human)	DAKO, Hamburg (D)	1 : 50
HLA-DR (Maus, anti-human)	DAKO, Hamburg (D)	1 : 50
α -SMA (Maus, anti-human)	DAKO, Hamburg (D)	1 : 50
CD4 (Kaninchen, anti-human)	Abcam, Berlin (D)	1 : 50
CD45-Biotin (Ratte, anti-Maus)	R&D Systems, Wiesbaden (D)	1 : 50
CD31 (Ratte, anti-Maus)	Dianova, Hamburg (D)	1 : 50
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa 488 (Esel anti-Kaninchen)	Jackson ImmunoResearch, Hamburg (D)	1 : 100 - 400
Alexa 488 (Streptavidin)	Jackson ImmunoResearch, Hamburg (D)	1 : 100 - 400
Alexa 555 (Esel anti-Maus)	Molecular Probes™, Thermo Scientific, Schwerte (D)	1 : 100 - 400
Alexa 594 (Esel anti-Ratte)	Thermo Scientific, Schwerte (D)	1 : 100 - 400

2.1.8 Zellkulturmedien und Zusätze

Wachstumsmedium	Basale Medien und Zusätze
Endothelzellkultur (eng. Endothelial Growth Medium (EGM-2))	EBM-2, 10% pHPL, 1% L-Glutamin (100x); 1% Pen/Strep Lösung; 1000 U Heparin, SingleQuots (Hydrocortison, bFGF, IGF, HGF, VEGF, Ascorbinsäure, Gentamycin)
Kultur von Mesenchymalen Stamm/Vorläuferzellen	α MEM, 10% pHPL, 1% L-Glutamin (100x); 1% Pen/Strep Lösung; 1000 U Heparin
Kultur von Immunzellen	VLE-RPMI, 10% humanes AB Serum, 1% L-Glutamin

(100x); 1% Pen/Strep Lösung

2.1.9 Primäre Zellen und Ziellinien

Zelltyp	Quelle
HUVECs	kommerziell, Nabelschnur, gemischte Spender PromoCELL, Heidelberg, Deutschland
Humane ECFCs/MSCs	Nabelschnur (bereitgestellt durch Prof. Dr. D. Strunk; PMU Salzburg, Österreich)
Humane primäre renale Zellen	Renaler Kortex/Medulla, (bereitgestellt durch B. Roßbach, AG Kurtz, BCRT), <i>Ethikvotum EA1/134/12</i>
Humane PBMCs	Peripheres Blut, Blutkonserven, Deutsches Rotes Kreuz (<i>Ethikvotum EA 1/226/14</i>), freiwillige Spender von Frischblut (<i>Ethikvotum EA 2/140/10</i>)

2.1.10 Versuchstiere

Das Tierversuchsvorhaben wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetz geprüft und genehmigt (#G0160/14).

Versuchstier-Spezies	Hersteller und Eigenschaften
Männliche und weibliche NSG Mäuse (Balb/c Hintergrund)	NOD.Cg-Prkdc SCID Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG), Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bereitgestellt durch Dr. Isabela Schmitt-Knosalla (Jax Laboratory Stock Nr. 0005557)

2.1.11 Geräte

Gerät	Hersteller
AID iSpot FluoroSpot Reader System	AID, Straßberg (D)
Allegra™ X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Allegra™ X-22R Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Aspirationssystem	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Automatische Gewebeeinfiltration, TP1020	Leica, Wetzlar (D)
Biosafe (R) MD (Stickstofftank)	Cryotherm , Kirchen/Sieg (D)

CASY® Cell Counter	Innovatis, Bielefeld (D)
Dewar Transport Gefäße	KGW-Isotherm, Karlsruhe (D)
Durchflusszytometer (FACS Canto II)	BD, San Jose (USA)
Durchflusszytometer (MACSQuant®)	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Eisbad	Hartenstein über VWR
Eismaschine AF80	Scotsman, Mailand (I)
Elektronische 8-Kanal-Pipette, Xplorer®	Eppendorf, Hamburg (D)
Elektronischer Multistepper, Xplorer®	Eppendorf, Hamburg (D)
ELISA-Plattenlesegerät	Bio-Rad Microplate Reader, München (D)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher, Schwerte (D)
Innova CO ₂ -Inkubator (CO-170)	New Brunswick Scientific, Nürtingen (D)
Inverses Mikroskop Axio Observer.Z1	Zeiss, Jena (D)
Kühl/Gefrierschrank (4°C/-20°C)	Liebherr, Hamburg (D)
Kühlplatte, EG1130	Leica, Wetzlar (D)
Lichtmikroskop	Leica, Biberach (D)
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec, Gelsenkirchen (D)
Mikropipetten (2,5 µL/10 µL/20 µL/200 µL/1000 µL)	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikrotom	Leica, Wetzlar (D)
Mini-Impulszentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte (D)
Minikühler ,Bel-art®	SP Scienceware™ über Thermo Scientific, Schwerte (D)
MiniSpin® Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg (D)
Operetta® High Content Imaging System	Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)
Paraffinspender	MEDAX GmbH & Co.KG , Neumünster (D)
Paraffinstrecktisch, HI1020	Leica, Wetzlar (D)
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Langensebold (D)
Sigma 3-12 Laborzentrifuge	Sigma, Osterode (D)
Spektrofluorimeter	GENios, TECAN , Crailsheim (D)
Vortex MS1 Minishaker	IKA-Werke , Staufen (D)

Waage XR 205SM-DR

Precisa Dietikon (CH)

Wasserbad

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (D)

2.1.12 Software

Programm

Hersteller

AID EliSpot Software Version 7.0

AID, Straßberg (D)

Axio Vision Release 4.7.2

Carl Zeiss, Jena (D)

Columbus™ Image Data Storage

Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

FACS Diva Software

BD, Heidelberg (D)

FCAP array v3 Software

BD, San Jose, CA (USA)

FlowJo (Version 8.8.6 und 10)

TreeStar Inc., Ashland, OR (USA)

GraphPad Prism (Version 5.03)

STATCON, Witzenhausen (D)

Harmony® Imaging and Analysis Software

Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

Magellan™ Version 6

Tecan Deutschlang GmbH, Crailsheim (D)

Mendeley Desktop, v1.16.1

Mendeley Ltd., Elsevier, Amsterdam (NL)

Microplate Manager v5.2

Bio-Rad, München (D)

MS® Office System 2007/2010

Microsoft , Unterschleißheim (D)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Arbeiten

Um generell potentielle xenogene Effekte durch die Verwendung von fetalen Kälberserum zu vermeiden wurde die Zellkulturen entweder in Medium mit humanem Thrombozyten-Lysat (eng. pooled Human Platelet Lysate (pHPL)) oder mit humanem AB-Serum durchgeführt.

2.2.1.1 Zellkultur

Konservierte, in gasförmigem Stickstoff gelagerte Ampullen mit Zellkulturen wurden nach der Entnahme im Wasserbad bei 37°C schonend aufgetaut, auf Eis überführt und in das entsprechende Kulturmedium transferiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten bei 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 37°C warmem Kulturmedium aufgenommen.

Zunächst wurden die primären Zellen in 75-cm²- bzw. 175-cm²-Kulturflasche expandiert. Die Konfluenz der Zellkulturen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Beim Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen vom Kulturgefäß enzymatisch gelöst. Dafür wurden die adhärennten Kulturen einmal mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 0,05%iger Trypsin-Lösung behandelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die noch haftenden Zellen durch ruckartige Bewegung von der Oberfläche gelöst und die enzymatische Reaktion mit Serum-haltigem Medium gestoppt. Die Zellzahl und die Vitalität wurden automatisch mit Hilfe eines digitalen Zellzählgeräts (CASY® Cell Counter + Analyzer) bestimmt. Die Kultivierung von Endothelzellen wie ECFCs und HUVECs erfolgte in EGM-2 mit 10% humanen Thrombozyten-Lysat und Penicillin/Streptomycin-Lösung. Kulturen von humanen Nabelschnur-abgeleiteten MSCs hingegen wurden in α MEM mit 10% humanem Thrombozyten-Lysat und 100 nM Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Die humanen ECFCs, HUVECs und MSCs wurden standardmäßig zwischen Passage zwei und sieben verwendet.

2.2.1.2 Kollagen-Beschichtung

Zur Beschichtung von Zellkulturplatten wurde eine Kollagenlösung hergestellt. Dafür wurde eine konzentrierte Kollagen Typ 1-Lösung mit 0,02 N Essigsäure auf eine Konzentration von 50 μ g/mL eingestellt und 1 mL/cm² dieser angesetzten Lösung auf die zu beschichteten Oberflächen aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für die Aussaat verwendet.

2.2.1.3 Direkte und indirekte (Transwell) Kokulturen

Für eine direkte Kokultur wurden ECFCs und MSCs nach einmaligem Passagieren in einem Verhältnis von 4 zu 1 in 24-well-Platten ausgesät und nachfolgend in EGM-2 kultiviert. Die indirekte Kokultur der beiden Zelltypen erfolgte durch eine semipermeable Membran mit der Porengröße von 0,4 μ m in einem Transwell-System. Dafür wurden, nach dem Äquilibrieren der Membran mit 37°C warmen EGM-2 für eine Stunde bei 37°C, die ECFCs im unteren Kompartiment und die MSCs im oberen Kompartiment ausgesät. In **Tabelle 1** sind die HLA-Typen der in dieser Arbeit verwendeten ECFC/MSC-Spender gezeigt. Die Typisierung wurde von Dr. Ursula Posch durchgeführt (Medizinische Universität Graz).

Tabelle 1: HLA-Merkmale der verwendeten ECFC/MSC-Spender

Zelltyp/Spender	HLA-Typ						
ECFC/MSC Spender 1	A02	A24	B15	B44	DRB1*11	DRB1*13	DRB3
ECFC/MSC Spender 2	A26	A32	B35	B56	DRB1*08	DRB1*11	DRB3
ECFC/MSC Spender 3	A26	A68	B38	B44	DRB1*11	DRB1*16*01	DRB5
ECFC/MSC Spender 4	A03	A23	B07	B44	DRB1*04	DRB1*07	DRB4

2.2.1.4 Kryokonservieren von Zellkulturen

Die Zellsuspensionen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und anschließend direkt in eiskalter Einfrierlösung (10% DMSO + 90% FKS) resuspendiert und unverzüglich in gekühlte Kryo-Gefäße transferiert. Zur kontrollierten Kühlung wurden die Zellen in Gefrierbehältern zunächst in den -80°C Eisschrank überführt. Die Langzeitlagerung erfolgte in der gasförmigen Stickstoff-Phase.

2.2.1.5 *In vitro*-Mikrogefäßbildung

Ein Tag vor Beginn des Experiments wurden ECFCs und HUVECs (maximal Passage 2-3) in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ in 25-cm²-Kulturflasche ausgesät. Die Matrigel-Lösung wurde zum schonenden Auftauen aus dem -20°C Gefrierschrank in den Kühlschrank überführt. Nach 24 Stunden wurde das Gefäß mit dem aufgetauten Matrigel sowie eine 96-well Platte unter der Sterilbank auf Eis gestellt. Unter Verwendung von vorgekühlten Pipetten-Spitzen und Pipetten wurden 70 µL Matrigel-Lösung in die jeweiligen Vertiefungen einer 96-well-Platte geschichtet ohne dabei Blasen entstehen zu lassen. Vor dem Auftragen der Matrigel-Lösung auf die Plattenoberfläche wurde das Gefäß mehrmals invertiert. Die beladenen Platten wurden anschließend vorsichtig für eine halbe Stunde im Inkubator platziert. Die 80% konfluenten Endothelzellen wurden geerntet und die Zellzahl auf $1,5 \times 10^5$ /mL in EGM-2 eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µL in die Vertiefungen sternförmig hineingetropt. Nach vier sowie nach 24 Stunden wurden die entstandenen Gefäßnetzwerke lichtmikroskopisch dokumentiert.

2.2.1.6 Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen

Konfluente ECFC/HUVEC- oder MSC-Monokulturen sowie ECFC + MSC Kokulturen wurden mit PBS gewaschen und 24 Stunden mit 1, 10 und 100 ng/mL humanem rekombinantem Interferon gamma (IFN γ), (bzw. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) oder Interleukin 1 beta

(IL-1 β) in EGM-2 stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Kulturen einmal mit PBS gewaschen und anschließend weiter in EGM-2 propagiert. In Tabelle 2 sind die Zellkonzentrationen für die nachfolgenden funktionellen Tests aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen verwendeten Aussaatdichten der Zelltypen in 24-well-Platten für die funktionellen Folgeuntersuchungen

Zelltyp	Aussaatdichte	Experiment
ECFCs, MSCs	5×10^4	Messung von absoluten Zellzahlen in direkten Kokulturen
HUVECs, ECFCs, MSCs	$0,8 - 1 \times 10^5$	Analyse der Regulation von immunologisch relevanten Molekülen
HUVECs, ECFCs, MSCs	1×10^5	Modulation der Mitogen- oder Antikörper-stimulierten T-Zell-Proliferation
HUVECs, ECFCs, MSCs	$2 - 3 \times 10^5$	IFN γ -abhängige Induktion der Immunzellproliferation

2.2.1.7 Isolation humaner PBMCs

Blutkonserven, sogenannte „buffy coats“, oder frisch entnommenes Blut von gesunden Spendern (Citrat-Röhrchen) wurden 1:2 mit ungekühltem PBS verdünnt und über eine 15 mL Biocoll-Trennlösung geschichtet. Anschließend wurden diese bei 800 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund von unterschiedlichen Eigenschaften der im peripheren Blut vorkommenden Zellpopulationen, lässt sich nach Dichte-Zentrifugation, die mononukleäre Zellfraktion des peripheren

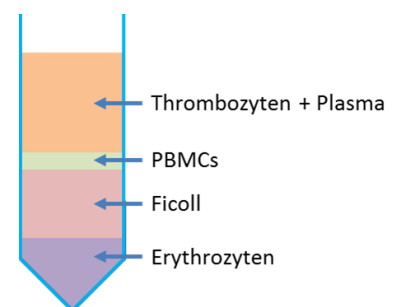


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Biocoll-Gradienten. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Bluts (eng. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) isolieren. In **Abbildung 4** sind schematisch die verschiedenen Phasen im Reagenzgefäß nach der Zentrifugation von Vollblut dargestellt. So sedimentieren Erythrozyten entsprechend ihrer höheren Dichte an den Boden des Gefäßes wohingegen Thrombozyten und Plasmaproteine aufgrund ihrer geringen Dichte in der obersten Phase des Gradienten verbleiben. In der Interphase befindet sich, als milchig weißer Ring, die mononukleäre Zellfraktion (PBMCs) direkt über der abgetrennten Phase der Trennlösung. Ohne die Biocoll-Phase zu verwirbeln, wurde der PBMC-Ring mit einer Pasteur-Pipette direkt in eiskaltes PBS überführt und nachfolgend mit 300 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die isolierten Zellen wurden weitere zwei Male mit PBS gewaschen.

2.2.1.8 Magnetseparation von Immunzell-Populationen und ECFC/MSC-Kokulturen

Frisch isolierte PBMCs wurden in 1 mL eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert. Zuvor geerntete ECFC/MSC-Kokulturen wurden in 1 mL EGM-2 aufgenommen. Für die Separation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden die resuspendierten PBMCs mit 250 µL anti-humanen CD4- bzw. CD8-Micro-Beads für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Für die Separation von CD14⁺ Monozyten aus humanen PBMCs oder CD31⁺ Endothelzellen aus ECFC/MSC-Kokulturen war zusätzlich zur Inkubation mit den CD14- oder CD31- Micro-Beads, die Behandlung mit einem Fc-Rezeptorblocker für 10 Minuten notwendig. Nach der Inkubation wurde die Micro-Bead/Zellsuspension mit PBS gewaschen und die Zellen erneut in MACS-Puffer bzw. EGM-2 aufgenommen. Anschließend wurde eine LS-Säule mit einem 30 µm-Filteraufsatz in einem Magnetfeld platziert und dreimal mit MACS-Puffer bzw. EGM-2 konditioniert bevor die Zellsuspension milliliterweise auf den Filter geträufelt wurde. Die durchgelaufene Negativ-Fraktion wurde durch ein Gefäß direkt unter der Säule aufgefangen. Die Elution der gebundenen Positiv-Fraktion aus der Säule erfolgte durch Hinzufügen von 5 mL MACS-Puffer bzw. EGM-2 und unverzüglichem gleichmäßigem Drücken eines LS-Säulenstempels in die Säule. In den jeweiligen Positiv-Fractionen wurde durch Färbung mit populationsspezifischen Antikörpern die Reinheit der separierten Zellfraktion durchflusszytometrisch überprüft. In **Abbildung 5** sind repräsentative Zebra Pots dargestellt, die die routinemäßige Reinheit der Isolation für CD4⁺ (**Abbildung 5A**), CD8⁺ T-Zellen (**Abbildung 5B**) und CD14⁺ Monozyten (**Abbildung 5C**) aus humanen PBMCs sowie für CD31⁺ ECFCs aus ECFC/MSC-Kokulturen (**Abbildung 5D**) zeigen.

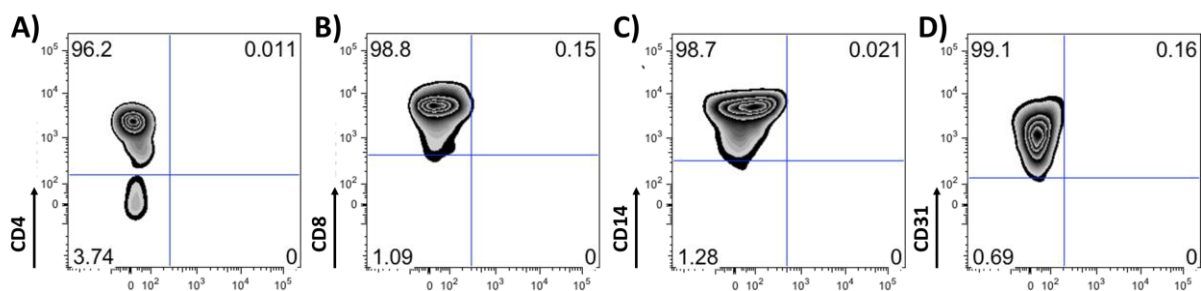


Abbildung 5: Reinheit der magnetisch separierten Populationen aus peripherem Blut oder ECFC/MSC Kokulturen.

Die Reinheit der Positiv-Fraktion nach der Isolation mit CD4- **A**), CD8- **B**), CD14- **C**) oder CD31-Micro-Beads **D**) wurden durch Färbung mit Antikörpern der entsprechenden Spezifität durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative Zebra Plots der jeweiligen extrahierten Fraktionen.

2.2.1.9 Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen mit Hilfe von Durchflusszytometrischen Verfahren

Adhärente Zellkulturen wurden zunächst durch Trypsinierung oder durch Kollagenase IV-Verdau geerntet. Suspensions-Zellkulturen wie PBMCs wurden direkt in 1,4 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Vollblutproben bzw. die vereinzelt Milzzellen aus den Tierversuchen wurden zusätzlich 15 Minuten bei Raumtemperatur mit FC Rezeptorblockern (1:10) behandelt. Die Zellen wurden nachfolgend einmal in kaltem PBS gewaschen und anschließend 50 µL eines mit FACS-Puffer verdünntem, zuvor titriertem Antikörper-Gemischs hinzugefügt (Tabelle 3, 4, 5, 6).

Tabelle 3: Verwendete Antikörper zur Analyse der Zytokin-abhängigen Regulation von immunologisch relevanten Molekülen auf CD31⁺ und CD31⁻ Zellen in ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen sowie in HUVEC-Monokulturen

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
Anti-Human CD31	APCCy7	1:1000
Anti-Human HLA-ABC	PerCP	1:1000
Anti-Human HLA-DR	APC	1:50
Anti-Human ICAM-1	FITC	1:50
Anti-Human VCAM-1 oder CD90	PE	1:50
Vitalmarker	V450	1:8000

Tabelle 4: : Verwendete Antikörper zur Detektion von absoluten Zellzahlen in direkten ECFC/MSC-Kokulturen

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
Anti-Human CD31	FITC	1:50
Anti-Human CD90	APC	1:50
Vitalmarker	V450	1:8000

Tabelle 5: : Verwendete Antikörper zur Detektion von proliferierenden PBMC-Subpopulationen in Immunzellkultur-Experimenten

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
-	CFSE	1:2000
Anti-human CD8	PE	1:50
Anti-human CD25	PerCPCy5.5	1:30
Anti-human HLA-DR	PECy7	1:400 – 1:600
Anti-human CD4	APC	1:50 – 1:100
Anti-human CD14	APCCy7	1:1000
Vitalmarker	V450	1:10000

Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur Detektion von murinen und humanen PBMC-Populationen in peripherem Blut oder der Milz von NSG Mäusen, die mit humanen allogeenen PBMCs rekonstituiert wurden

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
Anti-Maus CD45	FITC	1:50
Anti-human CD19	PE	1:50
Anti-human CD45	PerCP	1:50
Anti-human CD8	PECy7	1:50
Anti-human CD4	APC	1:100
Anti-human CD14	APCCy7	1:100
Vitalmarker	V450	1:10000

Die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper-Gemisch erfolgte bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten. Die Vollblutproben wurden nach der Färbung zusätzlich mit 1 x Erythrozyten-Lyse-Puffer für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen bevor sie in 100 µL einer 1%igen PFA-Fixierungslösung aufgenommen und bei 4 °C bis zur Analyse gelagert wurden. Gefärbte Proben, die MSCs enthielten, wurden vor der Messung filtriert um Zellaggregationen zu vermeiden. Die Proben wurden mit Hilfe eines FACS Canto II-(Bestimmung von relativen Zellzahlen) oder MACSQuant-Durchflusszytometers (Bestimmung von absoluten Zellzahlen) gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte durch Flow Jo Software Version 7 und 10. Nach der Messung der absoluten Zellzahlen in ECFC/MSK-Kokulturen wurden die Populationsverdopplungen der CD31⁺ ECFCs und CD90⁺ MSCs durch Anwendung der folgenden Formel¹⁰⁹ berechnet:

$$\text{Populationsverdopplung} = \frac{\log(\text{Zellzahl bei der Ernte} / \text{Zellzahl bei der Aussaat})}{\log(2)}$$

Die *Gating*-Strategie zur Analyse der Markerregulation auf ECFCs, HUVECs und MSCs ist in **Abbildung 6** dargestellt.

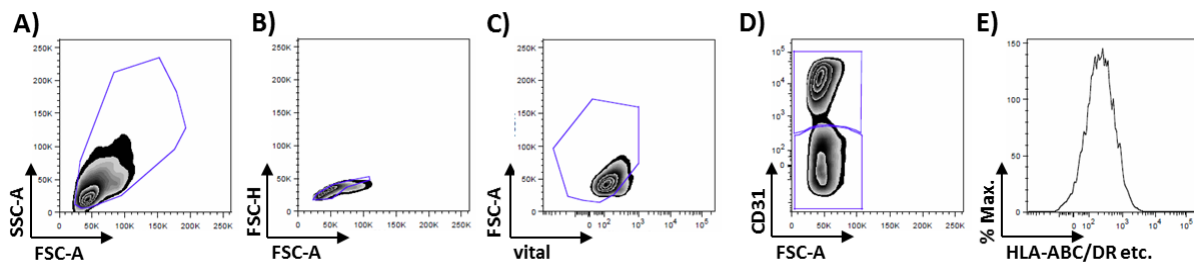


Abbildung 6: Gating-Strategie zur Analyse der Regulation von immunologisch relevanten Molekülen

A) Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichts (Forward scatter- area, FFS-A) gegen das Seitwärtsstreulicht (side scatter-area, SSC-A) wurde die Population zunächst grob eingegrenzt. **B)** Die Betrachtung der Fläche gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichts (FSC-A gegen FSC-H) ermöglichte das Ausgrenzen von Dubletten. **C)** Erneutes Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichts gegen den Vitalmarker (FSC-A gegen vital) führte zu einer definierten vitalen Population. Durch Festlegen der CD31⁺ Zellen und CD31⁻ Zellen (FSC-A gegen CD31) **D)** wurde die Intensität der Expression immunologisch relevanter Marker (HLA-ABC, HLA-DR, ICAM-1 und VCAM-1) auf den jeweiligen Populationen analysiert **E).**

Die *Gating*-Strategie für die Analyse der Immunzell-Proliferation in Kokultur-Experimenten ist in **Abbildung 7** gezeigt und erläutert.

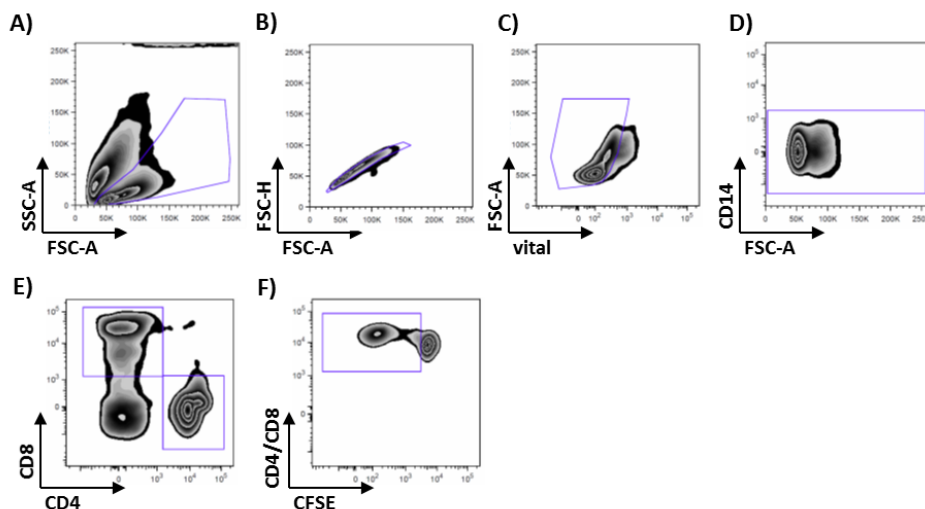


Abbildung 7: Gating-Strategie zur Analyse der Induktion und Modulation der Immunzell-Proliferation.

In **A)** wurde die Fläche des Vorwärtsstreulichts gegen das Seitwärtsstreulicht (FSC-A gegen SSC-A) aufgetragen und somit die Zellpopulation von Zelltrümmern abgegrenzt. Durch die Auftragung von FSC-A gegen FSC-H in **B)** wurden Dubletten ausgegrenzt. **C)** Die Betrachtung des FSC-A gegen den Vitalmarker ermöglichte das Ausschließend von toten Zellen. **D)** Zur spezifischen Analyse der T-Zellen in den Kokulturen wurden die CD14⁻ Zellen durch Auftragung von FSC-A gegen den Marker CD14 definiert. **E)** Durch das Auftragen der T-Zell-Marker CD4 gegen CD8 wurden die T-Zell-Subpopulationen in der Probe spezifiziert. **F)** Der Anteil an proliferierten Zellen wurde in den verschiedenen Subpopulationen durch die Auftragung von CFSE gegen CD4 oder CD8 quantifiziert.

2.2.1.10 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellkulturen

Humane ECFCs und MSCs wurden in Kollagen-beschichteten 24-well-Kulturplatten ausgesät und wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben, kultiviert. Nach dem Erreichen einer 90%igen

Konfluenz wurden die adhärennten Zellkulturen drei Mal mit Mg^{2+} Ca^{2+} -haltigem PBS gewaschen und 10 Minuten mit einer 4%igen PFA-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden zwei weitere Male mit PBS gewaschen bevor sie 15 Minuten mit 1 x Permeabilisierungspuffer behandelt wurden. Anschließend wurden durch Hinzufügen von einem 5%igen Esel-Normalserum-haltigen Blockierungspuffer die unspezifischen Bindungsstellen gesättigt. Die Färbung der adhärennten Zellkulturen erfolgte durch Zugabe der in **Tabelle 7** aufgelisteten Antikörper in 1 x Permeabilisierungspuffer für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Kerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol DAPI gegengefärbt und erneut gewaschen. Die Auswertung erfolgte durch ein inverses Fluoreszenzmikroskop oder durch das Operetta® High Content Imaging System. Die Bildanalyse wurde unter Verwendung des Columbus™ Image Data Storage and Analysis System durchgeführt.

Tabelle 7: Übersicht des titrierten Antikörpergemischs für die Immunfluoreszenz-Färbung von ECFC und MSC Mono- und Ko-kulturen

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
Anti-human CD31	FITC	1:50
Anti-human CD90	APC	1:50

2.2.1.11 Immunzell-Kokulturen in CFSE-basierten Proliferationsexperimenten

ECFCs, HUVECs und MSCs wurden zunächst in 75 cm²-Kulturflaschen in einer Konzentration von 1×10^6 ausgesät und bis zum Erreichen einer 90%igen Konfluenz kultiviert. Nach dem Trypsinieren und Waschen wurden die Zellen auf Kollagen-beschichtete 24-well-Platten in einer Dichte von $2 - 3 \times 10^5$ ausgesät und adhärennten über Nacht. Der experimentelle Aufbau der Immunzell-Kokultur-Versuche ist in **Abbildung 8** schematisch dargestellt. Die konfluenten Zellkulturen wurden für weitere 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen IFN γ (0,1; 1; 10; 100 ng/mL) stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach der Zytokin-Stimulation wurden die Kulturen durch eine Gamma-Bestrahlungsquelle mit 30 Gy bestrahlt. Für die Kokultur mit humanen mononukleären Zellen bzw. magnetisch separierten CD4⁺ T-Zellen wurden zunächst PBMCs aus Frischblut oder Blutkonserven isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.7) und gegebenenfalls CD4⁺ T-Zellen extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.1.8).

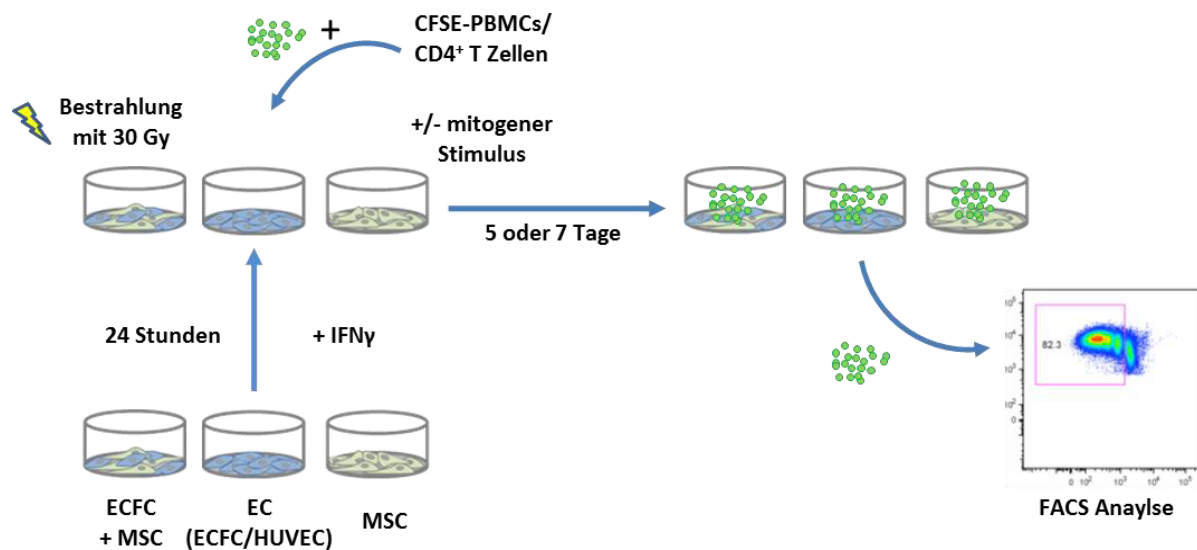


Abbildung 8: Übersicht des experimentellen Aufbaus der Immunzell-Kokultur-Experimente

Nach 24 Stunden Stimulation mit 0,1; 1; 10; 100 ng/mL IFN γ wurden die verschiedenen Zellkulturen (ECFCs, HUVECs, MSCs und ECFCs + MSCs) mit 30 Gy bestrahlt. Die frisch isolierten CFSE-gefärbten PBMCs/CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:1 (Proliferationsinduktion) oder 10:1 (Modulation der T-Zell-Proliferation) mit den bestrahlten Zellkulturen kombiniert. Für den Versuchsansatz zur Analyse des modulativen Verhaltens der verschiedenen Zellkulturen wurden die PBMCs mit 5 μ g/mL PHA oder 0,5/1 μ g/mL CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Versuchsansätze zur Untersuchung der IFN γ -induzierten Immunzell-Proliferation wurden mit unstimulierten PBMCs/CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Die CFSE-markierten PBMCs/CD4⁺ T-Zellen wurden nach fünf (Modulation der T-Zell-Proliferation) bzw. sieben Tagen (Proliferationsinduktion) geerntet und mit human-spezifischen CD4- und CD8-Antikörpern gefärbt. Die Messung der Proliferation erfolgte durchflusszytometrisch.

Die Immunzellen (PBMCs bzw. CD4⁺ T-Zellen) wurden nach der Isolation auf eine Konzentration von 1×10^7 /mL in PBS eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden mit einer 5 mM konzentrierten Ausgangslösung des Färbstoffs Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) auf eine finale Konzentration von 2,5 μ M/mL verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert und durch Hinzufügen des gleichen Volumens an gekühltem fetalem Kälberserum gestoppt. Die CFSE-gefärbten PBMCs/CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend drei Mal in Serum-haltigem Medium gewaschen bevor sie auf eine Konzentration von 6×10^5 /mL in VLE-RPMI eingestellt wurden. Die bereits ausgesäten Zellkulturen wurden einmal mit PBS gewaschen und 500 μ L der gefärbten PBMC-/CD4⁺ T-Zell-Suspension (6×10^5 /mL) vorsichtig, ohne die adhärenente Zellkultur zu beschädigen, hinzugefügt. Zur Untersuchung der T-Zell-Proliferation wurden PBMCs entweder mit dem Mitogen PHA (5 μ g/mL) oder mit einer Antikörper-Kombination von CD3 (0,5 μ g/mL) und CD28 (1 μ g/mL) stimuliert. Die Kokulturdauer betrug hier fünf Tage. Nach der Kokultur wurden die Immunzellen in der Suspensionsphase geerntet und mit populationsspezifischen Antikörpern gefärbt. Die für die Färbung verwendete Antikörper-

Kombination ist in **Tabelle 5** gezeigt. Die Analyse der Immunzell-Proliferation wurde durchflusszytometrisch durchgeführt.

2.2.1.12 Generierung von dendritischen Zellen

Kryokonservierte, zuvor magnetisch separierte, CD14⁺ Zellen aus Blutkonserven („buffy coats“) wurden aufgetaut und in einer Konzentration von 1×10^6 /well in 6-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit 12,5 ng/mL humanem rekombinantem IL-4 (Interleukin 4) und 25 ng/mL G-MCSF (eng Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor) für sieben Tage zu unreifen dendritischen Zellen (eng. dendritic cells; DCs) differenziert. Zur Induktion der Reifung wurden die unreifen DCs geerntet und in einer 24-well-Platte erneut in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/well ausgesät und für weitere 24 Stunden mit 1 µg/mL Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Anschließend wurden diese professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) als Positiv-Kontrollen in den Immunzell-Kokultur-Experimenten verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1.11).

2.2.1.13 Generierung von HLA-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen

1×10^6 magnetisch separierte CD8⁺ T-Zellen (Responder-Zellen) (siehe Abschnitt 2.2.1.8) wurden mit bestrahlten (30 Gy) HLA-differenten PBMCs (Stimulator-Zellen) im Verhältnis 2 zu 1 in Serum-haltigem RPMI in 96-well-Rundbodenplatten kultiviert. Die HLA-Typen der Responder-(Spender 1) und Stimulator-Zellen (Spender 2) sowie die HLA-Typen der für die Zytolyse-Experimente verwendeten ECFC/MSC-Spender (Abschnitt 2.2.1.14) sind in **Tabelle 8** dargestellt. Übereinstimmende HLA-Loci sind grau hinterlegt. Die HLA-Typisierung der PBMC-Spender wurde von Dr. Constanze Schöne durchgeführt (HLA-Labor, Charité).

Tabelle 8: HLA-Merkmale der verwendeten ECFC/MSC- und PBMC-Spender

Zelltyp/Spender	HLA-Typ						
PBMC Spender1	A23	A03	B55	B44	DRB1*07	DRB1*15	DRB4
PBMC Spender2	A01	A11	B08	B35	DRB1*0301	DRB1*04	
ECFC/MSC Spender 1	A23	A03	B07	B44	DRB1*04	DRB1*07	DRB4
ECFC/MSC Spender 2	A02	A03	B18	B44	DRB1*03	DRB1*13	DRB3
ECFC/MSC Spender 3	A26	A32	B35	B56	DRB1*08	DRB1*11	DRB3

Drei Tage nach der Aussaat wurden die Kokulturen mit 20 ng/mL Interleukin 2 (IL-2) stimuliert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und erneut in Rundbodenplatten

ausgesät, mit den HLA-differenten PBMCs kombiniert und wieder mit IL-2 stimuliert. Ein weiterer IL-2-Stimulus erfolgte nach zehn Tagen Kultur. 24 Stunden oder drei Tage später wurden die Zellen geerntet und für einen Calcein-basierten Zytotoxizitätstest verwendet. Der Versuchsablauf der zytotoxischen CD8⁺ T-Zell (eng. cytotoxic T lymphocytes; CTLs) - Generierung ist in **Abbildung 9** schematisch dargestellt. Zusätzlich sind exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen der CD8⁺ T-Zell/PBMC-Kokulturen unter dem Zeitstrahl gezeigt.

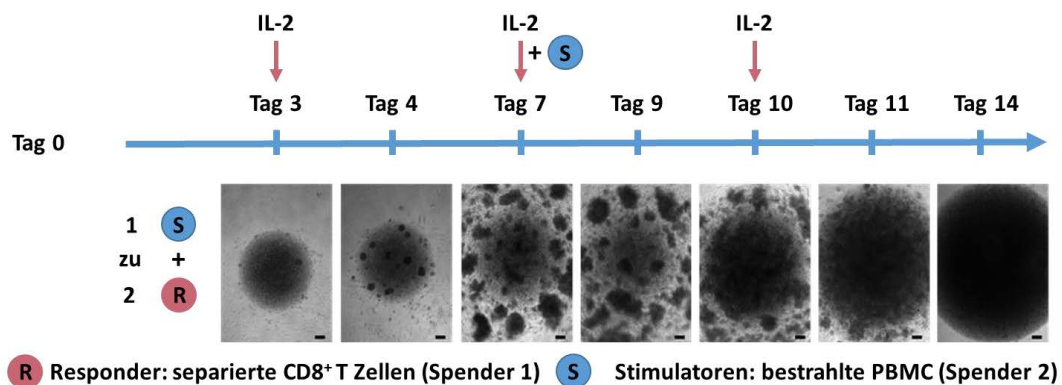


Abbildung 9: Generierung von HLA-spezifischen CTLs

1 x 10⁵ CD8⁺ T-Zellen („Responder“) wurden mit bestrahlten (30 Gy) Stimulator PBMCs („Stimulator“) in 96-well Rundbodenplatten ausgesät. Die Kulturen wurden an Tag drei, sieben und zehn mit 20 ng/mL IL-2 stimuliert. Am siebten Tag wurden die Kokulturen erneut mit den Stimulatorzellen im selben Verhältnis ausgesät. Die „Cluster“-Bildung der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch dokumentiert. Der Größenbalken entspricht 200 µm. Die Zellen wurden an Tag 11 oder 14 geerntet und für den Calcein-Assay verwendet.

2.2.1.14 Generierung von angereicherten B Zellkulturen

Als Kontrollen für den Zytotoxizitäts-Assay wurden professionelle APCs, in diesem Fall B-Zellen, aus derselben Quelle wie die Stimulator- und Responder-Zellen generiert. Für die Induktion von angereicherten B-Zell-Kulturen wurden jeweils 3 x 10⁵ PBMCs der beiden Spender (**Tabelle 8**) ausgesät und die B-Zell-Differenzierung durch ein Gemisch aus 2,5 µg/mL CpG-Dinukleotiden (Cytosin; Phosphodiesterbindung; Guanin), 10 ng/mL IL-10 und 10 ng/mL IL-2 aktiviert. Nach einer fünftägigen Kultur wurden die Zellen geerntet und die induzierte Zelllyse durch die Verwendung eines Calcein-basierten Assays quantifiziert (Abschnitt 2.2.1.15).

2.2.1.15 Calcein-basierte Analyse der Zytolyse

Die 48 Stunden vorkultivierten Zielzellen (ECFC/MSC Mono- und Ko-Kulturen) sowie angereicherte B-Zell-Kulturen wurden geerntet und jeweils auf eine Konzentration von 1 x

10^6 Zellen/mL in serumfreien RPMI eingestellt. Die verschiedenen Zielzellen wurden mit 15 μ M Calcein-AM im Dunkeln bei 37 °C für 30 Minuten im Wasserbad gefärbt. Die generierten HLA-spezifischen CTLs wurden ebenfalls geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von $1,6 \times 10^7$ /mL in serumhaltigen RPMI (5%ig) eingestellt. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurden die folgenden Zellkonzentrationen hergestellt: $8,0 \times 10^6$ /mL, $4,0 \times 10^6$ /mL und $2,0 \times 10^6$ /mL. Die Calcein-Färbung wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt. Die gefärbten Zielzellen wurden anschließend dreimal mit serumhaltigem Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 4×10^5 /mL eingestellt. Die T-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen wurde im Überstand nach einer vierstündigen Inkubation von Zielzellen und HLA-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, in verschiedenen Ratios (40:1, 20:1; 10:1; 5:1), durch die Messung der des freigesetzten Calceins spektrofluorimetrisch bestimmt. Gleichzeitig wurde die maximale Lyse durch die Behandlung mit 0,9%iger Triton-X-Lösung induziert und die spontane Lyse in Kulturen bestimmt, in denen keine CTLs anwesend waren. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte durch die dargestellte Formel:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{Spontane Freisetzung}}{\text{Maximale Freisetzung} - \text{Spontane Freisetzung}} \times 100$$

2.2.1.16 Multiplex-Zytokin-Analyse

Überstände von ECFC-/HUVEC-/MSC-Kulturen oder konditioniertes Medium aus den Immunzell-Kokultur-Experimenten wurden jeweils nach drei Tagen entnommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Durch eine Multiplex-Analyse wurde die Konzentration von verschiedenen humanen Zytokinen (CBA Flex Sets, siehe Abschnitt 2.1.4) in Zellkulturüberständen sowie in Maus-Serum (siehe Abschnitt 2.2.3) quantifiziert. Die Experimente wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Die Proben wurden durchflusszytometrisch gemessen und anschließend durch FCAP Array V3 Software analysiert.

2.2.1.17 Humaner IFN γ -ELISpot

Für die Alloantigen-Re-Stimulation wurden ECFC-Kulturen (Spender HLA-Typ siehe **Tabelle 6**) 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert und nach der Ernte in 100 μ L RPMI + 10% humanem AB-Serum resuspendiert. Nach dem Temperieren der Antikörper-beschichteten Assay-Platte (Raumtemperatur) wurden 4×10^4 IFN γ -stimulierte ECFCs in 100 μ L RPMI

vorsichtig auf die Platte aufgetragen. Die kryokonservierten vereinzelt Milzzellen (Abschnitt 2.2.3.3) wurden schonend aufgetaut und nach dem Waschen mit PBS in 1 x Erythrozyten-Lyse Puffer drei Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Milzzellen auf eine Konzentration von 2×10^6 /mL in RPMI eingestellt und 100 µL dieser Zellsuspension in Kokultur mit den IFN γ -stimulierten ECFCs gegeben oder alleine ausgesät. Die Platte wurde 20 Stunden bei 37°C ohne Erschütterungen inkubiert. Die Entwicklung des Assays wurde entsprechend der Hersteller-Informationen durchgeführt. Die Quantifizierung und Analyse erfolgte durch einen AID iSpot FluoroSpot Reader unter Verwendung der AID Analyse-Software.

2.2.2 Histologische Arbeiten

Die in diesem Abschnitt beschriebenen histologischen Arbeiten wurden, abgesehen von der Analyse und Dokumentation, von Meaghan Stolk durchführt.

2.2.2.1 Paraffin-Einbettung und Schnittpräparation

Die über Nacht in 4%iger PFA-Lösung eingelegten explantierten Matrigel-Transplantate wurden durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (99.8% denaturiertes Ethanol) dehydriert. Anschließend wurden die Transplantate in heißes Paraffin transferiert, in Einbettkassetten mittig platziert bevor sie mit dem heißen Paraffin gleichmäßig übergossen wurden. Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke, wurden am Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträgern aufgebracht.

2.2.2.2 Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung mit den H&E-Lösungen zur Deparaffinierung mit Xylol behandelt und durch eine absteigende Ethanol-Reihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen und die Hämatoxylin-Lösung für acht Minuten hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült. Weiter wurden die Gewebeschnitte für zwei Minuten mit einer 0,2%igen Eosin-Lösung inkubiert bevor sie mit 96%igem und 99%igem Ethanol sowie mit Xylol gespült wurden und mit Eindeckmedium überschichtet. Die so behandelten Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops.

2.2.2.3 Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten

Rehydrierte Paraffinschnitte (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurden mit PBS gewaschen und zur Reduktion der Autofluoreszenz für fünf Minuten mit MAX Block Reagent A behandelt. Nach dem Waschen mit 70%igem und 60%igem Ethanol für eine Minute wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen bevor Antigene bei 95°C für 20 Minuten, durch die Verwendung einer *Target Retrieval*-Lösung, demaskiert wurden. Die Gewebeschnitte wurden anschließend durch eine mit TBS verdünnten 0,025%igen Triton-X-Lösung permeabilisiert. Nachfolgend wurden die unspezifischen Bindestellen durch einen Blockierungspuffer (2% BSA in TBS) für eine Stunde gesättigt. Die primären Antikörper wurden zunächst in dem Blockierungspuffer 1 zu 50 verdünnt, zu den Schnitten hinzugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt (1 zu 100 – 400) und nach erneuter Permeabilisierung für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben mit MAX Block Reagent B behandelt und für 15 Minuten mit DAPI (1 zu 1500) gegengefärbt. In Abschnitt 2.1.7 sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgelistet. Die Schnitte wurde durch Hinzufügen von Fluoromount G eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Die Färbungen wurden durch ein inverses Fluoreszenzmikroskop dokumentiert oder durch das Operetta® High Content Imaging System analysiert. Die Bildanalyse erfolgte durch das Columbus™ Image Data Storage and Analysis System.

2.2.3 Tierexperimentelles Arbeiten

Acht bis 14 Wochen alte männliche und weibliche immundefiziente NOD.Cg-Prkdc SCID Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) Mäuse wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin unter pathogenfreien Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen entsprechend des geltenden Tierschutzgesetzes gehalten. Das experimentelle Vorhaben wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin genehmigt (G0160/14). Eine schematische Übersicht des Versuchsablaufs ist in **Abbildung 10** dargestellt.

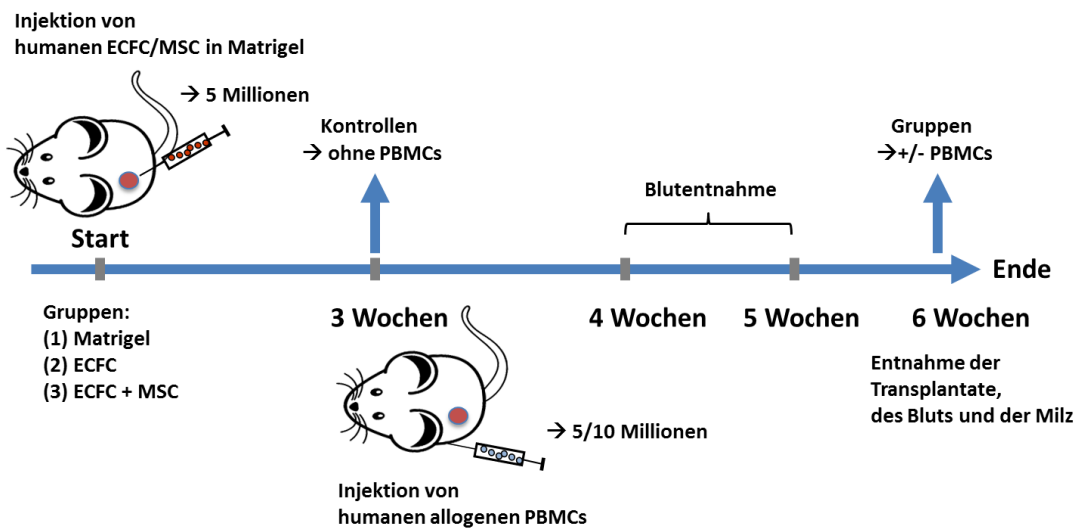


Abbildung 10: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Immunogenität von ECFC/MSChaltigen Transplantaten in NSG Mäusen. Der detaillierte Versuchsablauf ist in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.3.1 Präparation und Injektion von Matrigel/Zell-Implantaten

Haplo-identische humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs und MSCs (Verwendung von Zellen in Passage 4 - 5) wurden 48 Stunden vor der Injektion in NSG Mäuse in einem Verhältnis von 4 zu 1 (ECFC/MSCh) kultiviert. Die Matrigel-Lösung wurde mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer angesetzt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig, ohne eine Blasenbildung zu verursachen, mit jeweils 200 μ L Matrigel vermischt. Diese Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Matrigel/Zell-Suspensionen wurden in vorgekühlten Spritzen aufgezogen und mit einer 26G-Kanüle subkutan in beide Flanken der anästhesierten Versuchstiere (0,08 mg/g Ketamin und 0,012 Xylazin mg/g Körpergewicht) injiziert (5 Millionen Zellen/Transplantat).

2.2.3.2 Präparation und Injektion von allopathen humanen PBMCs für die Injektion in NSG Mäuse

Humane vollständig HLA-differente PBMCs (**Tabelle 9**) wurden zunächst aus frischem Vollblut extrahiert (Abschnitt 2.2.1.7) und anschließend kryokonserviert (Abschnitt 2.2.1.4). Drei Wochen nach der subkutanen Injektion von humanen ECFC/MSCh-Matrigel-Suspensionen erfolgte die intraperitoneale Injektion der humanen allopathen PBMCs in die Versuchstiere. Dafür wurden die kryokonservierten PBMCs schonend aufgetaut und auf eine Dosis von entweder 5 oder 10 Millionen Zellen/Versuchstier in 300 μ L PBS eingestellt und

mit einer 26G-Kanüle in die anästhesierten Mäuse (0,08 mg/g Ketamin und 0,012 Xylazin mg/g Körpergewicht) injiziert.

Tabelle 9: HLA-Merkmale des für die *in vivo* Experimente verwendeten ECFC/MSC- und PBMC-Spenders

Zelltyp/Spender	HLA-Typ						
ECFC/MSC Spender	A02	A24	B15	B44	DRB1*11	DRB1*13	DRB3
PBMC Spender	A01	A11	B08	B35	DRB1*0301	DRB1*04	

2.2.3.3 Entnahme und Verarbeitung von Proben

Nach der Rekonstitution mit den humanen allogenen PBMCs wurden die Tiere wöchentlich gewogen und eine Blutprobe entnommen. Dafür wurden die Mäuse anästhesiert und durch oberflächliches Anschneiden der Schwanzvene einige Tropfen Blut in einem Citrat-Röhrchen aufgenommen (durchgeführt von Meaghan Stolk). Der Anteil an humanen CD45⁺ Zellen im peripheren Blut der Versuchstiere wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt (Abschnitt 2.2.1.9, **Tabelle 6**).

Nach insgesamt sechs Wochen wurden die NSG Mäuse anästhesiert und in tiefer Narkosedurch zervikale Dislokation getötet. Unverzüglich danach wurde durch Öffnen des Thorax und punktieren der Herzkammer mit einer 18G Kanüle so viel Blut wie möglich entnommen und direkt in Citrat-Röhrchen überführt. Aus dem Gefäß wurde ein kleines Volumen entnommen und für die Antikörper-Färbung (Abschnitt 2.2.1.9, **Tabelle 6**) verwendet. Das verbleibende Blut wurde über Nacht bei 4°C sedimentiert und bei 200 g zentrifugiert. Die sich abtrennende flüssige obere Phase wurde, ohne Verwirbelungen zu verursachen, in frische Reaktionsgefäße überführt. Das aus dem peripheren Vollblut gewonnene Serum wurde bis zur Messung der humanen IFN γ -Konzentration (Abschnitt 2.2.1.19) bei -80°C gelagert.

Des Weiteren wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen, in PBS überführt und die Größe mittels Lineal bestimmt. Die im Verbund vorliegenden Milzzellen wurden nachfolgend durch ein 100 μ m Sieb vereinzelt und zweimal mit kalten PBS gewaschen. Ein kleines Volumen der gewonnenen Zellsuspension wurde für die Antikörper-Färbung verwendet (Abschnitt 2.2.1.9, **Tabelle 6**). Die restlichen isolierten Milzzellen wurden kryokonserviert und in der gasförmigen Stickstoff-Phase bis zur Durchführung des humanen IFN γ -EliSpot Assays (Abschnitt 2.2.1.20) gelagert.

Die Matrigel-Transplantate wurden zunächst durch Abtasten der oberen Flanken lokalisiert und unter Zuhilfenahme eines Mikroskops chirurgisch entfernt. Anschließend wurden die Transplantate neben einem Größenmaßstab mikroskopisch dokumentiert und in 4%iger PFA-Lösung fixiert. Die explantierten Matrigel-Transplantate wurden nachfolgend histologisch untersucht (Abschnitt 2.2.2).

Die Explantation der Transplantate, die Entnahme der Milzen sowie die Herzpunktion wurden von PD Dr. Martina Seifert durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch die Statistik-Analyse-Software GraphPad Prism 6.0. Für die erhobenen Daten wurde jeweils der Mittelwert in Kombination mit dem Standardfehler angegeben (eng. standard error of the mean; SEM). Alle gemessenen Daten wurden zunächst einem Normalitätstest unterzogen (D'Agostino-Pearson Test). Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit nur einer Variablen wurden durch T-Tests untersucht. Bei mehr als zwei Gruppen mit nur einer Variablen wurde eine einseitige Varianzanalyse (eng. one way-ANOVA) angewendet mit anschließenden Dunn's oder Bonferroni Post-Tests. Lagen mehr als zwei Gruppen mit mehr als einer Variable vor, so wurde eine zweiseitige Varianzanalyse (eng. two way-ANOVA) in Kombination mit einem Bonferroni Post-Test angewendet. Statistische Unterschiede unter einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,5 % wurden für signifikant befunden.

3 Ergebnisse

3.1 Immunogenität von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs

3.1.1 ECFCs exprimieren typische Marker der endothelialen Linie und sind *in vitro* in der Lage gefäßähnliche Netzwerke auszubilden.

Nabelschnur-abgeleitete Endotheliale Vorläuferzellen (eng. Endothelial Progenitor Cells, EPCs), des Typs Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (eng. Endothelial Colony Forming Cells, ECFCs), zeigten Adhärenz und eine sogenannte „Kopfsteinpflaster“-Morphologie auf Zellkulturplastik (**Abbildung 11A**).

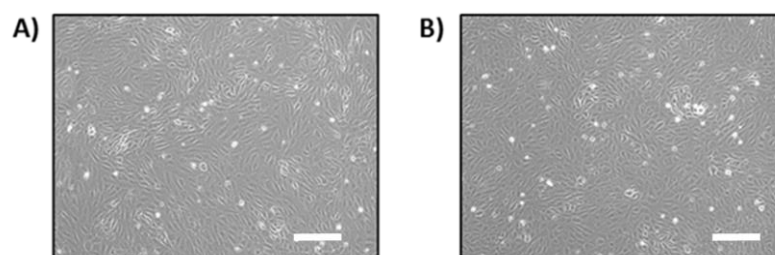


Abbildung 11: ECFCs zeigen *in vitro* eine charakteristische Endothelzell-spezifische Morphologie.

Lichtmikroskopische Dokumentation von konfluenten ECFC-A) und HUVEC-B) Kulturen auf Zellkulturplastik. Der Größenmaßstab entspricht 200 µm.

ECFCs waren mikroskopisch nicht von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (eng. Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) zu unterscheiden (**Abbildung 11A und B**). Auch in der durchflusszytometrischen Analyse exprimierten beide Zelltypen Oberflächenmoleküle wie CD31 (eng. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM), KDR (eng. Kinase Insert Domain Receptor) und CD34 (**Abbildung 12**).

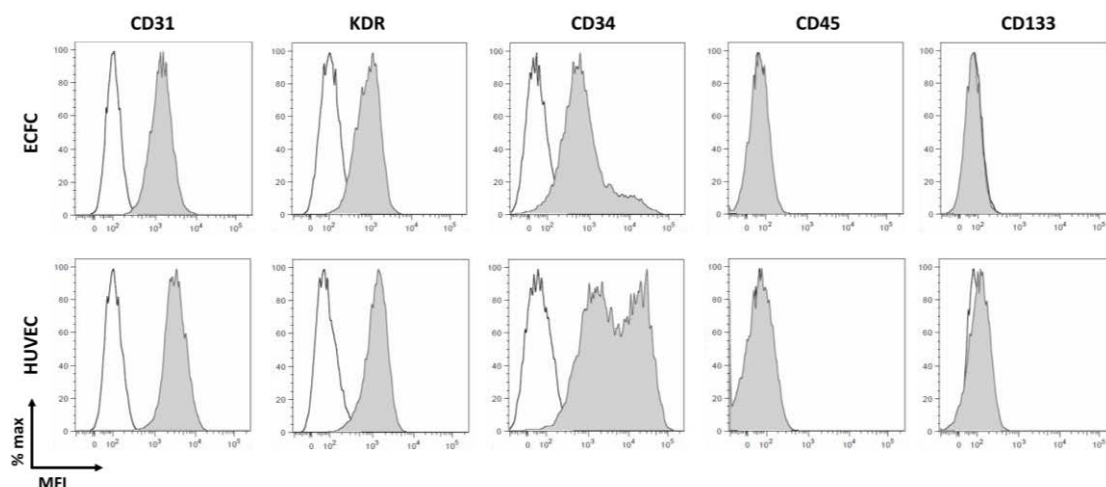


Abbildung 12: ECFCs exprimieren klassische Marker der endothelialen Linie.

ECFCs und HUVECs wurden geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD31, KDR, CD34, CD45 und CD133 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Überlagerungen von repräsentativen FACS-Histogrammen (maximale Zellzahl gegen mittlere Fluoreszenzintensität) für ECFCs (obere Reihe) und HUVECs (untere Reihe). Die ungefärbte Kontrolle ist als schwarze Linie dargestellt und die gefüllte Kurve repräsentiert die gefärbten ECFCs bzw. HUVECs.

ECFCs unterschieden sich aber klar von weiteren EPC-Subtypen (early EPC und Colony Forming Unit (CFU)-Hill) durch das Fehlen des hämatopoetischen Markers CD45. Im Gegensatz zu anderen, unreiferen endothelialen Vorläufern waren ECFCs negativ für den Stammzell-typischen Marker CD133 (**Abbildung 12**).

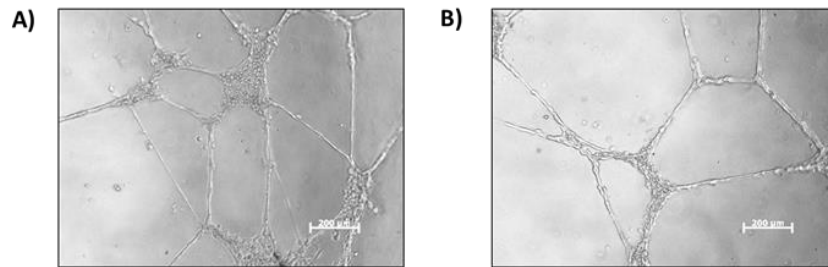


Abbildung 13: ECFCs und HUVECs bilden netzwerkartige Strukturen in EZM-Gelen aus.

Lichtmikroskopische Aufnahmen dokumentieren vier Stunden nach Zugabe der Zellen auf Matrigel das Ausbilden von mikrovaskulären Strukturen. **A)** ECFCs und **B)** HUVECs. Das Größenmaß entspricht 200 µm.

Die netzwerkförmige Anordnung in dreidimensionalen extrazellulären Matrix (EZM)-Gelen ist ein weiteres Merkmal vieler Endothelzelltypen. In niedrigen Passagen (\leq Passage 4) waren auch humane ECFCs in der Lage, gefäßähnliche Strukturen in Matrigel auszubilden (**Abbildung 13A**). Nach vier Stunden ordneten sich sowohl ECFCs als auch HUVECs spontan in Netzwerken an, die über 24 Stunden stabil waren (**Abbildung 13A und B**).

3.1.2 Zytokin-stimulierte ECFCs erhöhen die Expression von HLA- und Adhäsionsmolekülen.

Endothelzellen befinden sich im direkten Kontakt mit der Blutzirkulation und sind daher mit spezifischen Molekülen für die Interaktion mit Immunzellen ausgestattet. Bei einem inflammatorischen Stimulus kann die Expression immunologisch relevanter Moleküle auf Endothelzellen verstärkt oder auch *de novo* induziert werden. Um die Regulation und die Expressionsdichte solcher Moleküle auf humanen ECFCs zu untersuchen, wurden ECFCs und HUVECs nach Stimulation mit drei verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Interferon gamma (IFN γ)) für 24 Stunden inkubiert und anschließend druckflusszytometrisch analysiert. Unter physiologischen Bedingungen, ohne vorhergehende Zytokin-Stimulation, exprimierten ECFCs konstitutiv MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-ABC) und zeigten Intracellulär Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)-Expression, wohingegen keine MHC-Klasse-II (HLA-DR)- und Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)-Expression detektiert werden konnte (**Abbildung 14**).

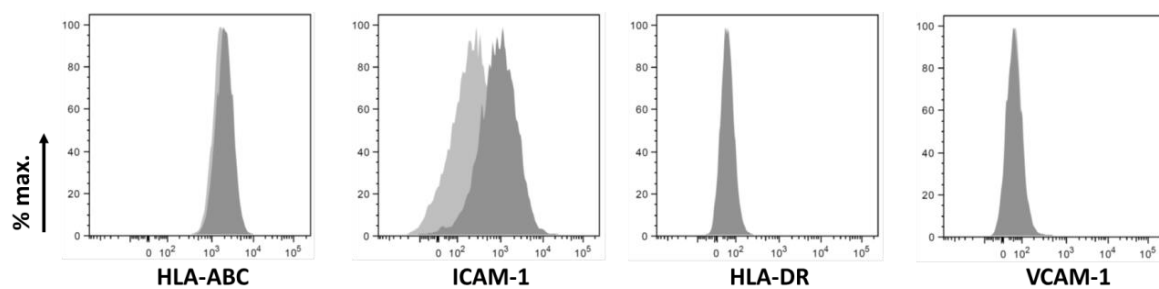


Abbildung 14: Expression immunologisch relevanter Moleküle auf ECFCs und HUVECs

ECFCs und HUVECs wurden geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für HLA-ABC-, ICAM-1-, HLA-DR-, VCAM-1-gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Überlagerungen von repräsentativen FACS-Histogrammen (mittlere Fluoreszenzintensität gegen maximale Zellzahl). Die hellgrau gefüllte Kurve zeigt die ECFCs während HUVECs in gunkelgrau dargestellt wurden.

Die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen führte zur verstärkten Expression von HLA-ABC. Alle verwendeten Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$) waren in der Lage nach 24 Stunden die HLA-ABC-Moleküldichte auf ECFCs und HUVECs zu erhöhen (**Abbildung 15A und C**).

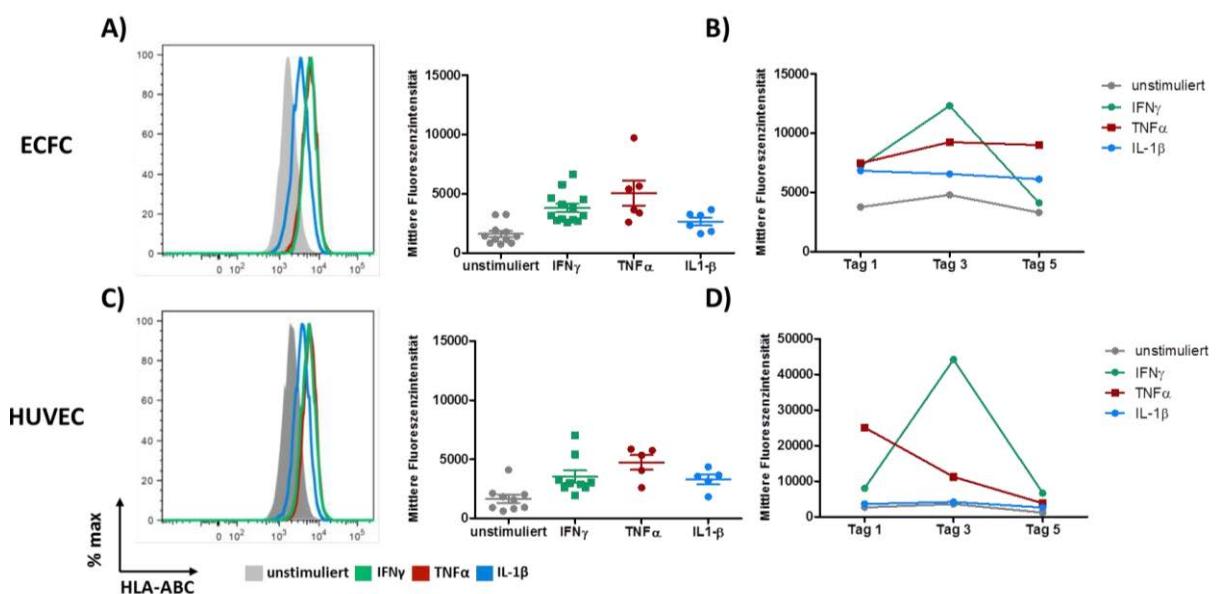


Abbildung 15: Regulation des HLA-ABC-Moleküls nach Zytokin-Stimulation

Konfluente ECFC- und HUVEC-Kulturen wurden mit jeweils 10 ng/mL der Zytokine $\text{IFN}\gamma$ (grün), $\text{TNF}\alpha$ (rot) und $\text{IL-1}\beta$ (blau) stimuliert oder unstimuliert (grau) belassen. Nach 24 Stunden **A, C** sowie nach drei und fünf Tagen **B, D** wurden die Zellen geerntet, mit HLA-ABC-spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative Histogramme (links) und die statistische Zusammenfassung (rechts) in **A** und **C** zeigen die Fluoreszenzintensität der HLA-ABC-Expression nach 24 Stunden ($n = 5 - 7$ Experimenten mit drei verschiedenen ECFC-Spendern). Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM. **B**) und **D**) zeigen die Regulation der HLA-ABC-Expression über die Zeit von fünf Tagen (repräsentatives Experiment).

Die Induktion war bereits ab einer Konzentration von 0,1 ng/mL nachweisbar und zeigte bei höheren Konzentrationen von 1, 10 und 100 ng/mL einen dosisabhängigen Verlauf (Daten nicht gezeigt). Durch die Analyse einer Kinetik über fünf Tage wurde ersichtlich, dass die HLA-ABC-Expression von ECFC- und HUVEC-Kulturen an Tag drei nach der $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation ihr Maximum erreichte (**Abbildung 15B und D**).

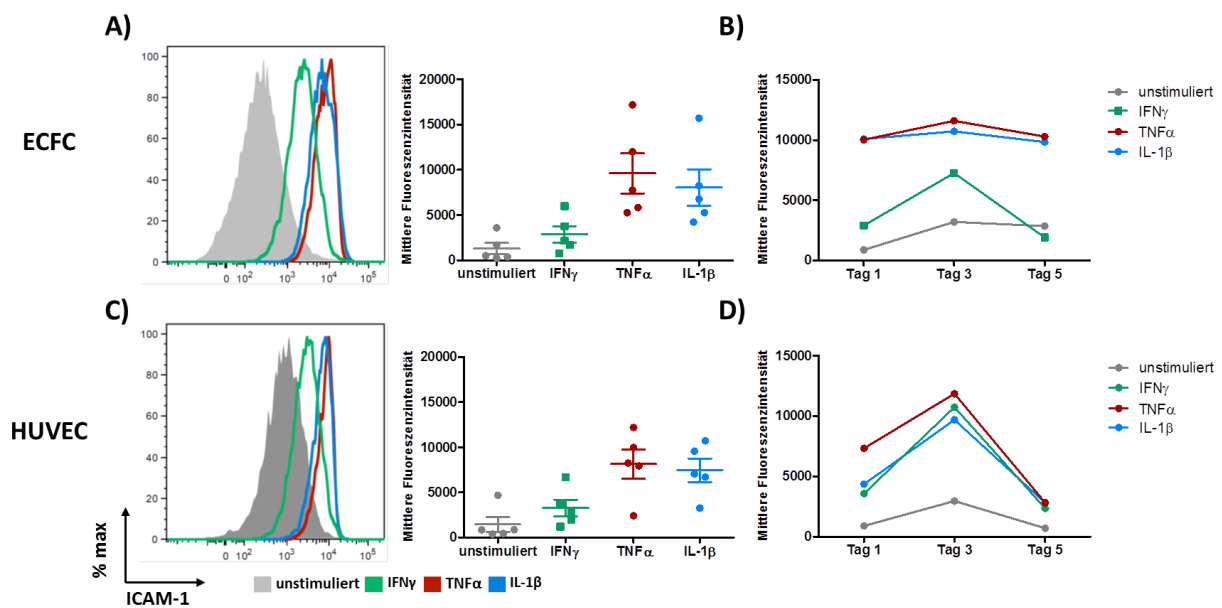


Abbildung 16: Regulation des ICAM-1-Moleküls nach Zytokin-Stimulation

ECFC- und HUVEC-Kulturen wurden mit jeweils 10ng/mL der Zytokine IFN γ (grün), TNF α (rot) und IL- β (blau) stimuliert oder unstimuliert (grau) belassen. Nach 24 Stunden **A, C**) sowie nach drei und fünf Tagen **B, D**) wurden die Zellen geerntet, mit ICAM-1-spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In **A**) und **C**) sind repräsentative Histogramme (links) und die statistische Zusammenfassung (rechts) dargestellt (n = 5 Experimente mit drei verschiedenen ECFC Spendern). Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM. Die Graphen in **B**) und **D**) zeigen die Regulation der ICAM-1-Expression über die Zeit von fünf Tagen (repräsentatives Experiment).

Weiterhin exprimierten ECFCs und HUVECs unter basalen Bedingungen das Adhäsionsmolekül ICAM-1. Auch bei diesem Marker kam es zur Erhöhung der Moleküldichte nach Stimulation mit allen getesteten Zytokinen, wobei die Induktion mit TNF α zur stärksten Expression führte (**Abbildung 16A und C**).

In einer Kinetik über fünf Tage mit drei Zeitpunkten konnte außerdem gezeigt werden, dass bei ECFCs und HUVECs die ICAM-1-Expression an Tag drei nach Zytokin-Stimulation ihr Maximum erreichte (**Abbildung 16B und D**).

Im Gegensatz dazu konnten sowohl bei ECFCs als auch bei HUVECs, ohne proinflammatorischen Stimulus, keine HLA-DR- und VCAM-1-Moleküle detektiert werden (**Abbildung 14**). Die Induktion von HLA-DR war ausschließlich nach der Stimulation mit dem Zytokin IFN γ , nicht aber nach der Behandlung mit TNF α oder IL-1 β nachweisbar (**Abbildung 17**).

Zudem exprimierten ECFCs tendenziell weniger HLA-DR-Moleküle als HUVECs nach IFN γ -Stimulation (**Abbildung 17A und C**). Beide Nabelschnur-abgeleiteten IFN γ -stimulierten Endothelzell-Typen zeigten nach drei Tagen die maximale Expressionsdichte des HLA-DR-Moleküls (**Abbildung 17B und D**).

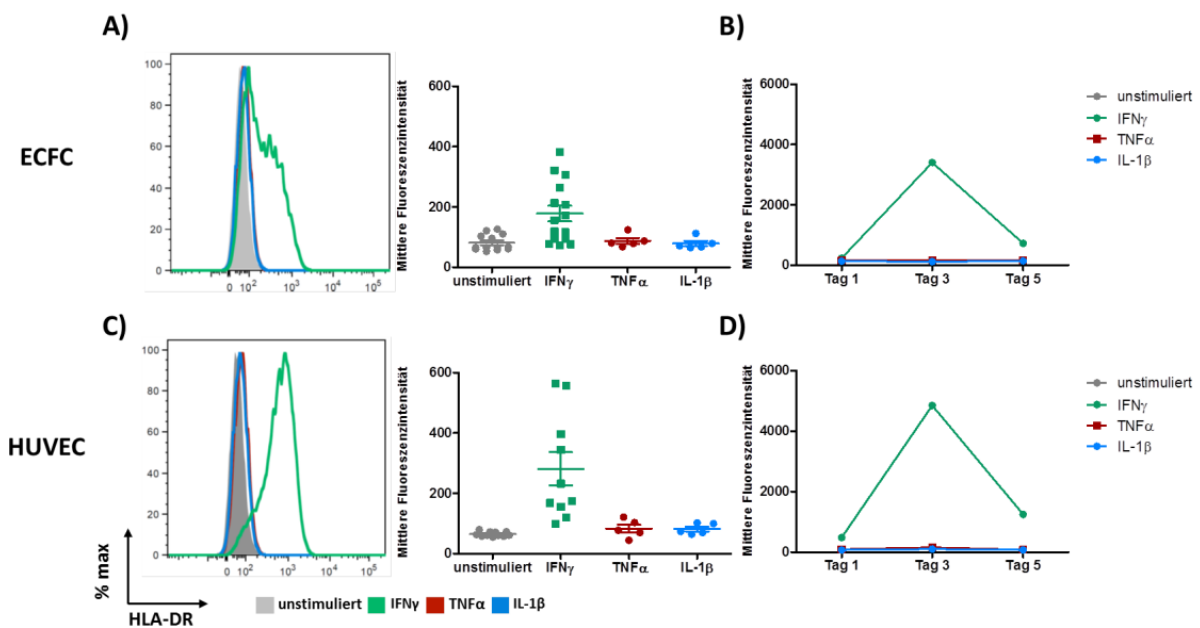


Abbildung 17: Regulation von HLA-DR-Molekülen nach Zytokin-Stimulation

Mit 10 ng/mL IFN γ (grün), TNF α (rot) und IL- β (blau) stimulierte oder unstimulierte (grau) ECFCs und HUVECs wurden nach 24 Stunden **A, C**) sowie nach drei und fünf Tagen **B, D**) geerntet, mit HLA-DR-spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In **A**) und **C**) sind repräsentative Histogramme (links) und die statistische Zusammenfassung (rechts) der HLA-DR-Expression nach 24 Stunden von n = 5 - 7 Experimenten mit drei verschiedenen ECFC-Spendern gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM. In **B**) und **D**) ist die HLA-DR-Expression über fünf Tagen gezeigt (repräsentatives Experiment).

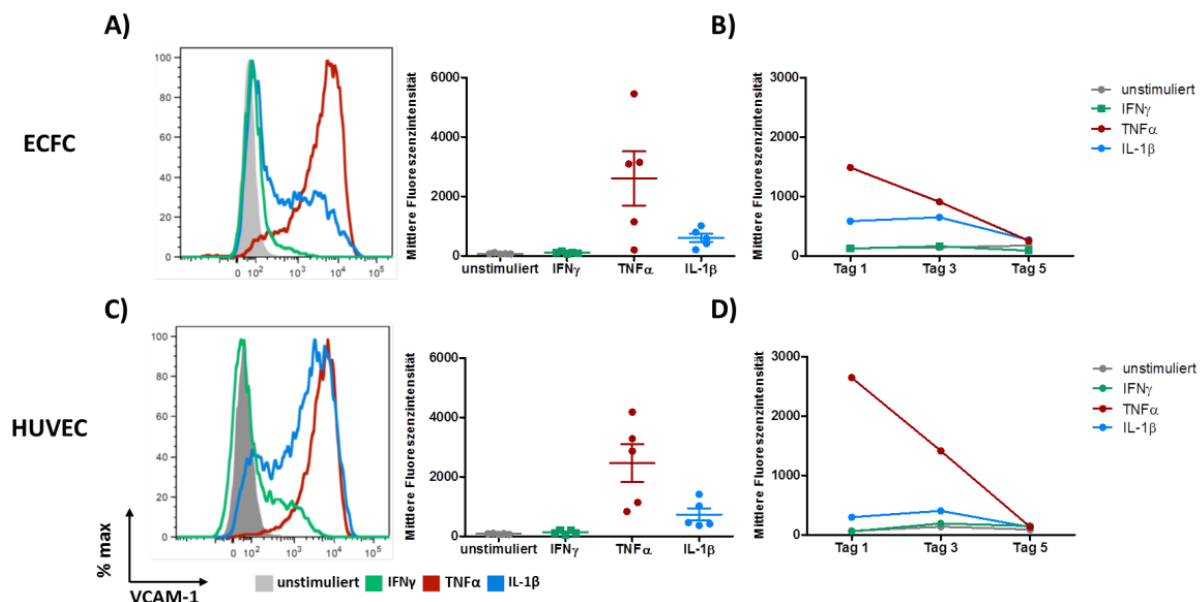


Abbildung 18: Regulation von VCAM-1 nach Zytokin-Stimulation

Beide Zelltypen wurden mit 10 ng/mL der Zytokine IFN γ (grün), TNF α (rot) und IL- β (blau) stimuliert oder unbehandelt belassen (grau). Nach 24 Stunden **A, C**) sowie nach drei und fünf Tagen **B, D**) wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für VCAM-1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative FACS-Histogramme (links) und die statistische Zusammenfassung (rechts) in **A**) und **C**) zeigen die Intensität der VCAM-1-Expression nach 24 Stunden (n = 5 Experimenten mit drei verschiedenen ECFC-Spendern). Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM. **B**) und **D**) zeigen die Regulation der VCAM-1-Moleküldichte auf Zytokin-stimulierten ECFC- und HUVEC-Kulturen im zeitlichen Verlauf von fünf Tagen (repräsentatives Experiment).

Die Induktion des Moleküls VCAM-1 war hauptsächlich durch TNF α und IL-1 β vermittelt (**Abbildung 18**). Die Stimulation mit IFN γ hingegen, führte zu keiner Expression von VCAM-1 auf ECFCs und HUVECs. TNF α -stimulierte Zellen zeigten die höchste VCAM-1-Moleküldichte 24 Stunden nach der Stimulation und eine kontinuierliche Abnahme der Expression im Verlauf von fünf Tagen. (**Abbildung 18B und D**). Neben den bereits genannten Molekülen exprimierten ECFCs und HUVECs weitere immunologisch relevante Strukturen wie zum Beispiel CD55 (Decay Accelerating Factor (DAF)) oder MHC class I polypeptide-related sequence A/B (MIC A/B). Anders als bei den zuvor beschriebenen Markern war die Regulation von CD55 und MIC A/B nicht von TNF α -, IL1 β - oder IFN γ -abhängig. Des Weiteren konnte keine Expression von membrangebundenem HLA-G auf ECFCs und HUVECs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ausschließlich die Stimulation mit dem Zytokin IFN γ führte demnach zur Induktion beider HLA-Moleküle (**Abbildung 15 und 17**). HLA-ABC und HLA-DR sind für die Immunerkennung von essentieller Bedeutung, so dass die Regulation dieser Moleküle zu funktionellen Konsequenzen hinsichtlich der allogenen Erkennung der Zellen führt, die durch Zytotoxizitätstests oder in Immunzell-Kokultur-Experimenten nachgewiesen werden können.

3.1.3 ECFCs werden von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen HLA-abhängig lysiert.

HLA-ABC wird von allen kernhaltigen Zellen im menschlichen Organismus konstitutiv exprimiert. Die Expression des HLA-ABC-Moleküls führt zur Erkennung der Zielzelle durch den T-Zell-Rezeptor/CD8-Komplex. In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden wie sensitiv ECFCs auf die CD8⁺ T-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse reagieren. Zu diesem Zweck wurden aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen zu HLA-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gereift (eng. Cytotoxic T Lymphocytes, CTLs). Für die Stimulation wurden PBMCs eines HLA-differenten Spenders verwendet (Abstimmung gegenüber dem CTL-Spender), die gleichzeitig übereinstimmende HLA-Loci mit den zu analysierenden ECFC-Spendern aufwiesen. Die generierten CTLs zeigten ein starkes Proliferationsverhalten und waren zudem positiv für den T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 (IL-2-Rezeptor) (Daten nicht gezeigt). In **Abbildung 19** ist die prozentuale spezifische Lyse von B-Zell-Blasten und ECFCs nach vierstündiger Inkubation mit HLA-spezifischen CTLs gezeigt.

B-Zell-Blasten aus dem identischen Spender wie die Stimulatorzellen (PBMCs; identischer HLA-Typ) wurden fast vollständig lysiert, wohingegen B-Zell-Blasten ohne übereinstimmende HLA-Loci nur unspezifisch lysiert wurden (**Abbildung 19A**).

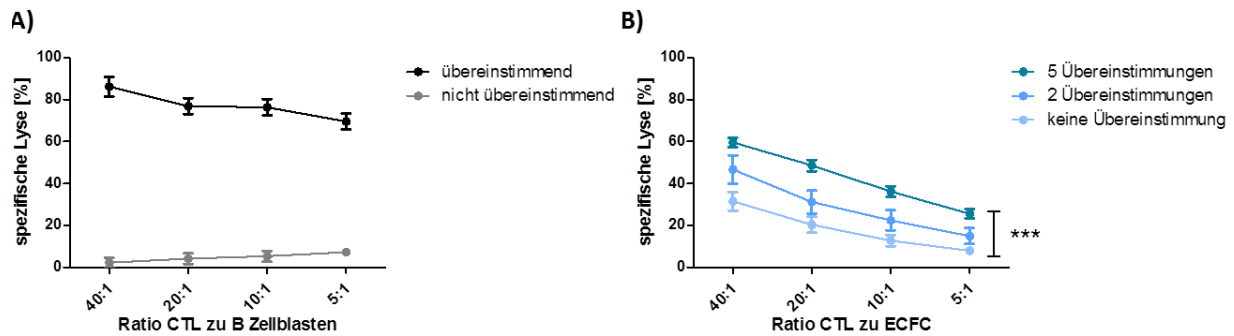


Abbildung 19: CD8-T-Zell-vermittelte HLA-spezifische Lyse

HLA-spezifische CD8-positive zytotoxische Zellen (CTLs) wurden in verschiedenen Ratios (40:1 bis 5:1) mit Calcein-gefärbten Zielzellen für vier Stunden inkubiert. Die Calcein-Freisetzung in den Überstand wurde spektrofluorimetrisch ermittelt und daraus die spezifische Lyse [%] berechnet. **A)** Als Kontrollen wurden HLA-übereinstimmende sowie komplett HLA-differente angereicherte B-Zell-Kulturen generiert. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen spezifischen Lyse \pm SEM ($n = 2 - 3$). **B)** Drei ECFC-Spender mit verschiedener Anzahl an HLA-Übereinstimmungen mit den Stimulatorzellen (5, 2 und 0 Loci), wurden mit HLA-restringierten CD8⁺ zytotoxische Zellen inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen spezifischen Lyse \pm SEM von $n = 4 - 8$ Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, *** $p < 0,001$. Die Signifikanz ist bezogen auf die Werte für ECFCs ohne HLA-Übereinstimmungen.

In **Abbildung 19B** ist die spezifische Lyse von ECFCs mit unterschiedlicher Anzahl an übereinstimmenden HLA-Loci mit den für die CTL-Generierung verwendeten PBMCs gezeigt. Verglichen mit ECFCs ohne Übereinstimmung, wurden ECFCs nur dann signifikant spezifisch lysiert, wenn sie mindestens fünf HLA-Übereinstimmungen aufwiesen.

3.1.4 Humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs induzieren IFN γ -abhängig die Immunzell-Proliferation.

Um zu untersuchen, ob die verstärkte Expression von HLA-Molekülen nach IFN γ -Stimulation, zur Induktion der Immunzell-Proliferation führt, wurden IFN γ -stimulierte ECFCs und HUVECs mit isolierten CFSE-gefärbten CD4⁺ T-Zellen kokultiviert (**Abbildung 20**).

Nach sieben Tagen wurden die T-Zellen geerntet und durchflusszytometrisch analysiert. In **Abbildung 20A** zeigen Punktdiagramme die Reduktion des CFSE-Signals als Maß der induzierten CD4⁺ T-Zell-Proliferation.

Die mit dem Mitogen Phythämagglutinin (PHA)-stimulierten CD4⁺ T-Zellen erreichten nach sieben Tagen eine Proliferation von $71,95 \pm 5,34\%$. Die professionell Antigen-präsentierenden reifen dendritischen Zellen (eng. Dendritic Cells, DCs) waren in der Lage, ohne vorhergehenden IFN γ -Stimulus, signifikant die T-Zell-Proliferation zu induzieren

(Abbildung 20A und B). Im Gegensatz zu PHA-stimulierten $CD4^+$ T-Zellen oder Kokulturen mit reifen DCs mit $CD4^+$ T-Zellen, wurde die T-Zell-Proliferation in ECFC- und HUVEC-T-Zell-Kokulturen ohne Zytokin-Stimulation nicht aktiviert. Erst nach Stimulation der ECFC- oder HUVEC-Kulturen mit $IFN\gamma$ konnte die $CD4^+$ T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden (Abbildung 20A und B).

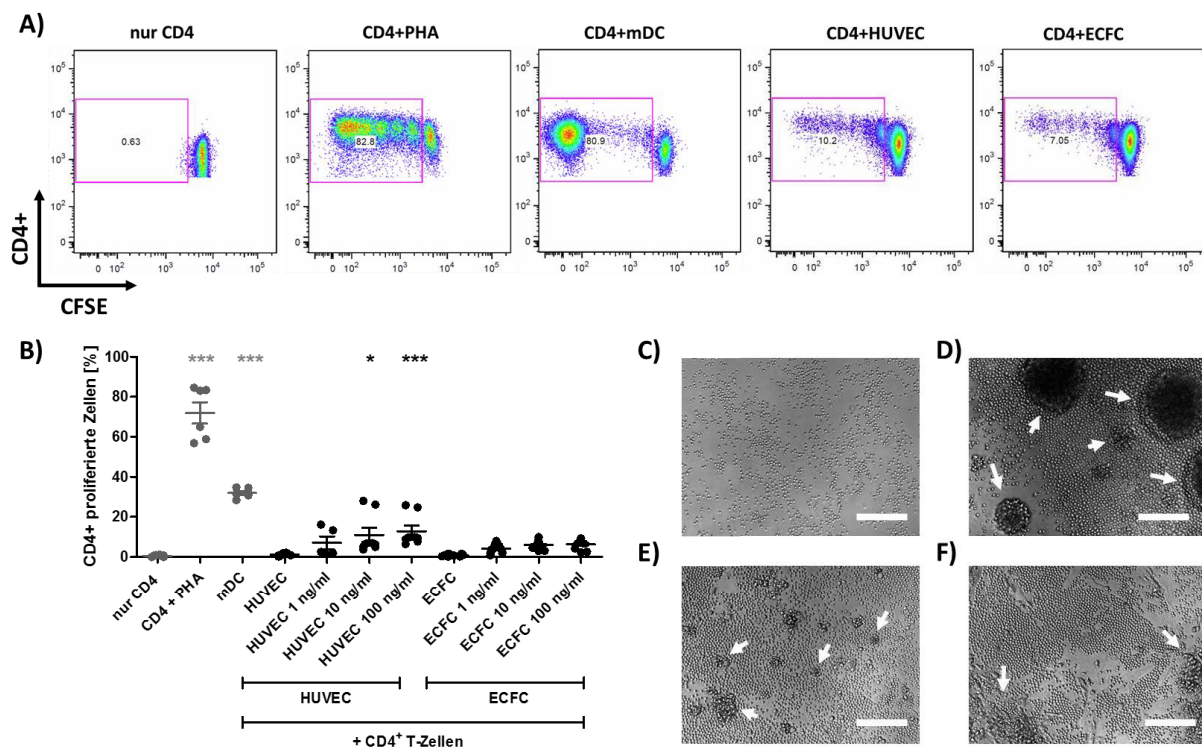


Abbildung 20: $IFN\gamma$ -stimulierte ECFCs und HUVECs induzieren dosisabhängig die $CD4^+$ T-Zell-Proliferation

Nach 24-stündiger Stimulation mit 10 ng/mL $IFN\gamma$ wurden die konfluenten Zellkulturen mit 30 Gy bestrahlt. Nachfolgend wurden, im Verhältnis von 1:1, CFSE-gefärbte $CD4^+$ T-Zellen hinzugefügt. Nach sieben-tägiger Kokultur wurden die T-Zellen geerntet und mit anti-human $CD4$ -Antikörpern gefärbt. **A)** Repräsentative „Dot-Plot“-Diagramme zeigen die Auftragung von $CD4$ gegen die CFSE-Fluoreszenzintensität. Als Kontrollen dienen unstimulierte (nur $CD4$), mit Phythämagglutinin (PHA)-stimulierte $CD4$ -T-Zellen (PHA) und Kokulturen von reifen Dendritischen Zellen (eng. mature Dendritic Cells (mDCs)) mit $CD4$ -T-Zellen (mDCs). Die Reduktion der CFSE-Fluoreszenzintensität ist jeweils in den roten Quadranten gezeigt und entspricht dem Anteil an proliferierten $CD4^+$ T-Zellen in der jeweiligen Probe. **B)** Statistische Auswertung und Darstellung von $n = 2$ Experimenten mit drei verschiedenen ECFC-Spendern. Gezeigt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils an $CD4^+$ proliferierten Zellen \pm SEM. Die Signifikanz wurde durch die Verwendung einer einseitigen Varianzanalyse ermittelt (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Die lichtmikroskopische Dokumentation der $CD4^+$ T-Zell-Kokulturen ist unter **C-F)** dargestellt: nur $CD4^+$ T-Zellen **C)**; PHA-stimulierte T-Zellen **D)**; $IFN\gamma$ -stimulierte HUVECs + $CD4^+$ T-Zellen **E)** und $IFN\gamma$ -stimulierte ECFCs + $CD4^+$ T-Zellen **F)**. Der Größenmaßstab entspricht 100 μm .

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Analysen wurde die Entstehung von stark proliferativen Zell-„Clustern“ innerhalb der T-Zellkultur mikroskopisch dokumentiert. Ohne vorhergehenden Stimulus unterblieb die Proliferationsinduktion in $CD4^+$ T-Zell-Kulturen. Die unstimulierten T-Zellen lagen als kleine, runde und vereinzelte Zellen in der Kultur vor (**Abbildung 20C**). Hingegen wiesen $CD4^+$ T-Zellen, die zu Beginn der Kultivierung mit 5 μg des Mitogens PHA stimuliert wurden, stark proliferierende „Cluster“ neben dicht gedrängten

kleinen Zellen auf (**Abbildung 20D**). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der CD4⁺ T-Zell-Kokulturen mit IFN γ -stimulierten HUVECs (**Abbildung 20E**) und ECFCs (**Abbildung 20F**) zeigten sowohl kleine, runde dichtgedrängte Zellen als auch Zell-„Cluster“, die, verglichen mit der PHA-stimulierten Probe, jedoch einen kleineren Durchmesser aufwiesen (**Abbildung 20D**).

3.1.5 Die IFN γ -induzierte CD4⁺ T-Zell-Proliferation ist HLA-DR-vermittelt.

Wie in **Abbildung 15** und **17** gezeigt, sind ECFCs ohne vorhergehenden proinflammatorischen Stimulus HLA-DR-negativ, zeigen aber eine Expression, wenn sie mit IFN γ stimuliert werden. Entsprechend wurde die T-Zell-Proliferation nur in Kulturen mit IFN γ -stimulierten ECFCs induziert. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob das Niveau der HLA-DR-Expression die T-Zell-Proliferation beeinflusst. In dem folgenden Experiment sollte dieser Zusammenhang untersucht werden. Dafür wurden ECFCs mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert und nach 24 Stunden durch Zugabe von HLA-DR-spezifischen Antikörpern inhibiert. Diese Kulturen wurden im Folgenden mit PBMCs kokultiviert. Nach siebentägiger Kulturdauer konnte in der IFN γ -stimulierten Probe eine deutliche CD4⁺ T-Zell-Proliferation detektiert werden (**Abbildung 21A und C**). Die Behandlung von IFN γ -stimulierten ECFCs mit dem inhibierenden HLA-DR-Antikörper hingegen führte zu einer signifikant reduzierten Proliferationsantwort (**Abbildung 21B und C**).

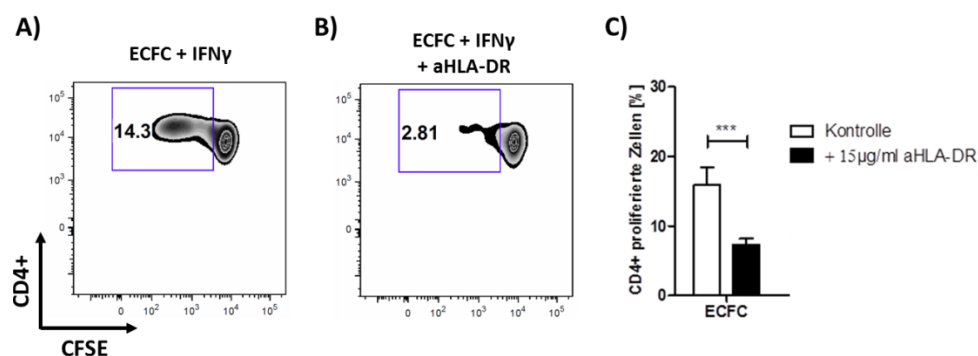


Abbildung 21: Die Induktion der CD4⁺ T-Zell-Proliferation durch IFN γ -stimulierte ECFCs ist HLA-DR-abhängig.

Konfluente ECFC-Zellkulturen wurden 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert und entweder unbehandelt belassen oder mit 15 μ g/mL eines human-spezifischen HLA-DR-Antikörpers für zwei Stunden inkubiert. Nach der Bestrahlung mit 30 Gy wurden die Zellen für sieben Tage mit CFSE-markierten PBMCs kokultiviert. Nachfolgend wurden die PBMCs geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 gefärbt. Repräsentative „Zebra-Plot“-Diagramme zeigen den Anteil proliferierter CFSE-markierter kokultivierter CD4-T-Zellen (blauer Quadrant) von **A**) unbehandelten ECFC-Kokulturen (ECFC + IFN γ) und **B**) mit anti-HLA-DR-Antikörpern behandelten ECFC-Kokulturen (ECFC + IFN γ + aHLA-DR). In **C**) ist die statistische Auswertung von n = 3 - 4 Experimenten mit zwei bis drei verschiedenen ECFC-Spendern gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert der CD4⁺ proliferierten T-Zellen \pm SEM. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten T-Tests ermittelt (***p < 0,001).

3.1.6 ECFCs und HUVECs besitzen keine immunsupprimierenden Eigenschaften.

Liegt bereits ein inflammatorisches Milieu vor, können bestimmte Stammzelltypen eine zuvor aktivierte Immunzell-Proliferation modulieren. In diesem Experiment sollte quantifiziert werden ob und in welchem Maße die Kokultur mit Endothelzellen das Niveau der PHA-stimulierten T-Zell-Proliferation beeinflusst. Um einen potentiellen modulativen Einfluss auf polyklonal aktivierten PBMCs zu testen, wurden ECFCs und HUVECs mit PHA-stimulierten CFSE-markierten Immunzellen für fünf Tage kokultiviert und anschließend die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. PBMC-Kulturen, die mit dem Mitogen PHA stimuliert wurden, zeigten mikroskopisch stark proliferierende Zellansammlungen, die durch die CFSE-Markierung durchflusszytometrisch nachweisbar waren (**Abbildung 20A und C**).

Die Stimulation mit PHA führte in allen getesteten Proben zur Proliferationsinduktion (**Abbildung 22**). Dabei wurde die CD4⁺ (**Abbildung 22A**) und die CD8⁺ T-Zell-Population (**Abbildung 22B**) gleichermaßen zur Proliferation angeregt. Das aus der PHA-Aktivierung resultierende Proliferationsniveau wurde jedoch nicht durch die Kokultivierung mit ECFCs oder HUVECs beeinflusst. Beide Kokulturen zeigten ein ähnlich hohes Proliferationsniveau, vergleichbar mit dem der PHA-stimulierten Kontrolle. Folglich sind ECFCs und HUVECs nicht in der Lage immun-modulativ in einer polyklonal aktivierten T-Zell-Kultur zu agieren.

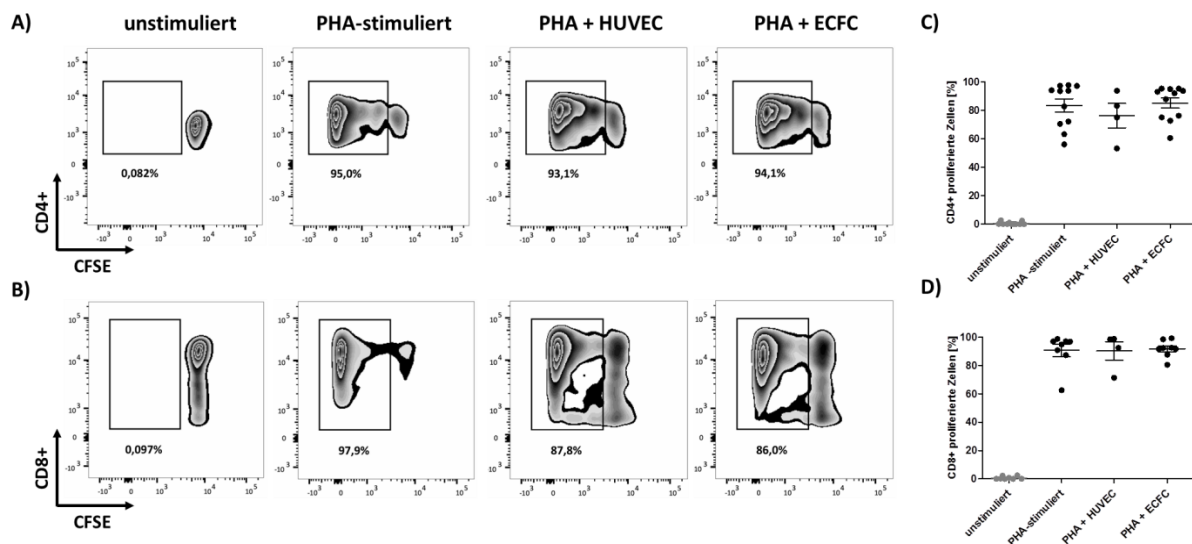


Abbildung 22: Die Mitogen-induzierte T-Zell-Proliferation wird nicht durch ECFCs und HUVECs moduliert.

ECFCs und HUVECs wurden mit CFSE-gefärbten PBMCs für fünf Tage kokultiviert und anschließend geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. Repräsentative „Zebra-Plot“-Diagramme zeigen die Auftragung der CFSE-Fluoreszenzintensität gegen die Marker CD4 **A**) bzw. CD8 **B**). Die statistische Auswertung von $n = 2 - 4$ Experimenten mit zwei bis drei verschiedenen ECFC-Spendern ist in **C**) und **D**) aufgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz zwischen den PHA-stimulierten Gruppen wurde durch eine einseitige Varianzanalyse getestet.

3.2 Immunogenität humaner Kokulturen aus Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSCs

Die Kombination von humanen Mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen (MSCs) mit ECFCs als zelltherapeutisches Mittel zur Unterstützung des endogenen Vaskularisierungspotentials wurde in der Literatur für verschiedene experimentelle und präklinische Modelle beschrieben. Die Isolation von Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSCs, ermöglicht die therapeutische Nutzung von Zellen der gleichen Quelle und schränkt dadurch die immunologische Variabilität eines kombinierten Zellpräparats ein.

3.2.1 Nabelschnur-abgeleitete MSCs weisen mesenchymal-phänotypische Marker auf und können dadurch von ECFCs in Kokulturen unterschieden werden.

Die aus der Nabelschnur extrahierten MSCs zeigten in Kultur eine charakteristische spindelförmige Morphologie (Daten nicht gezeigt) und exprimierten typische Marker der mesenchymalen Linie (**Abbildung 23**). ECFCs und MSCs waren positiv für CD146 (MCAM) und CD73 (NT5E) und negativ für den Stammzell-typischen Marker CD133, sowie für die hämatopoetischen Marker CD14 und CD45. Nabelschnur-abgeleitete MSCs exprimierten keine Endothelzell-spezifischen Marker (CD31, CD144 und KDR), waren aber positiv für den Marker CD90 (Thy-1) (**Abbildung 23**).

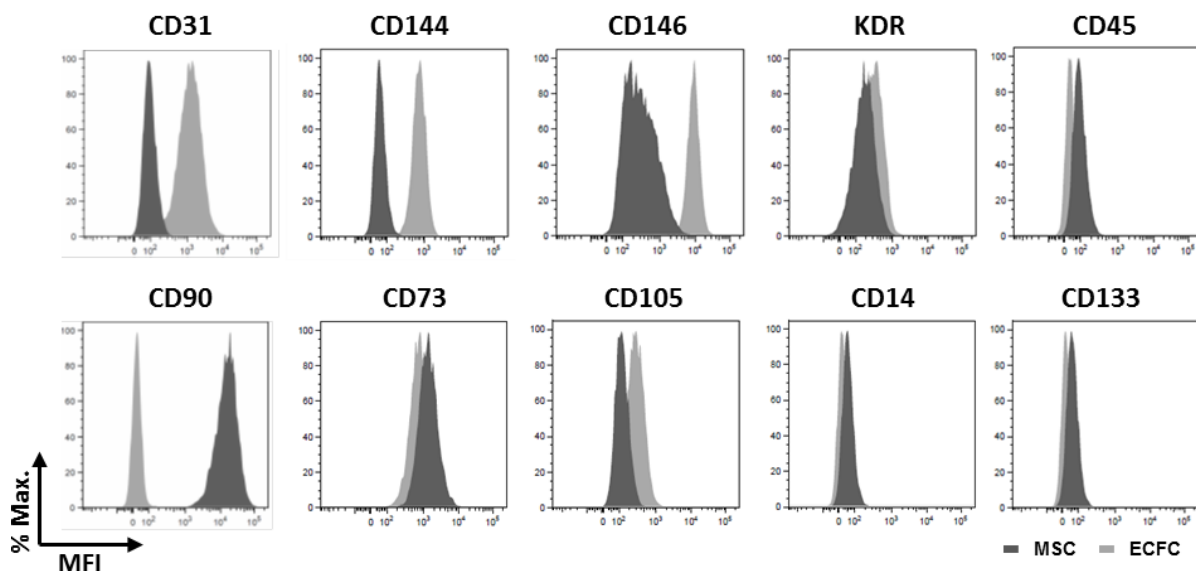


Abbildung 23: Vergleich der Expression phänotypischer Marker von Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSC:

Beide Zelltypen wurden gernte, mit human-spezifischen Antikörpern für CD31, CD144, CD146, KDR, CD45, CD90, CD73, CD105, CD14 und CD133 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Überlagerungen von repräsentativen FACS-Histogrammen (mittlere Fluoreszenzintensität gegen maximale Zellzahl). ECFCs sind in hellgrau und MSCs sind in dunkelgrau gezeigt.

Beide Marker, CD31 auf ECFCs sowie CD90 auf MSCs, wurden jeweils von der gesamten Population exklusiv exprimiert (**Abbildung 24A und B**), so dass sie im Folgenden für die Diskriminierung der beiden Zelltypen in den Kokulturen herangezogen werden konnten.

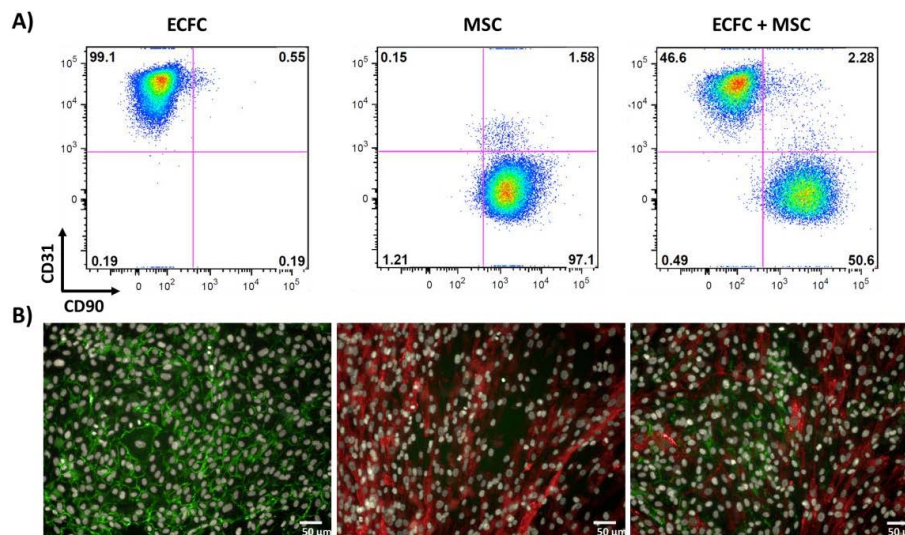


Abbildung 24: Diskriminierung von ECFCs und MSCs in Kokultur durch die differentielle Expression der Marker CD31 und CD90

Konfluente ECFCs und MSCs wurden mit human-spezifischen CD31- und CD90-Antikörper gefärbt und **A)** durchflusszytometrisch sowie **B)** mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gezeigt sind in **A)** repräsentative Punktdiagramme (CD31 gegen CD90) von ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen (ECFC + MSC). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder in **B)** zeigen die Expression von CD31 (grün) und CD90 (rot) in ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und sind in weiß dargestellt. Der Größenmaßstab entspricht 50 µm.

3.2.2 Die Kokultur von ECFCs und MSCs beeinflusst das Proliferationsverhalten der beiden Zelltypen und führt zur Regulation von immunologisch relevanten Markern.

Die in der Literatur beschriebene Eigenschaft von ECFCs und MSCs hinsichtlich der *in vivo*-Gefäßbildung synergistisch zu interagieren, wirft die Frage auf, ob sich diese beiden Zelltypen auch auf immunologischer Ebene beeinflussen können. In **Abbildung 25** ist der grundsätzliche Versuchsaufbau der ECFC/MSC-Kokultur-Experimente gezeigt. Die Kokulturen wurden mit IFN γ -stimuliert und für die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen und des Proliferationsverhaltens (Abschnitt 3.2.2) oder für Immunzell-Kokultur-Experimente (Abschnitt 3.2.2 - 3.2.4) verwendet.

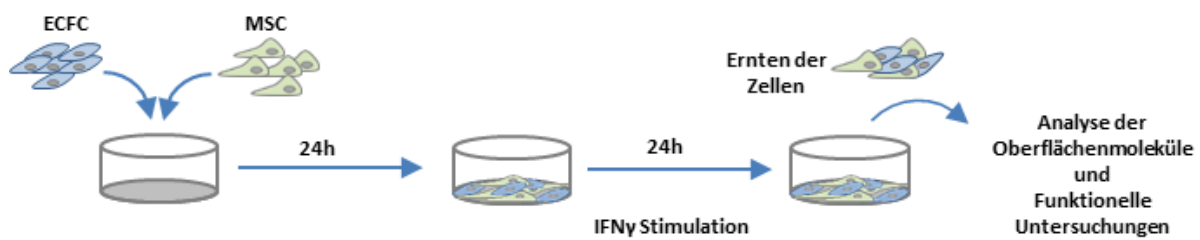


Abbildung 25: Schema der experimentellen Durchführung der ECFC/MSC-Kokultur-Experimente

ECFCs und MSCs wurden in einer Ratio von 4 zu 1 in Zellkultur-Platten (24-well-Format) ausgesät und nach 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ für weitere 24 Stunden stimuliert. Die so behandelten Kokulturen wurden dann für Folgeversuche verwendet.

Um das Proliferationsverhalten der beiden Zelltypen in Kokultur zu untersuchen wurden die Kulturen gemäß des dargestellten Schemas (**Abbildung 25**) behandelt und nachfolgend durchflusszytometrisch die Zellzahl quantifiziert (**Abbildung 26**).

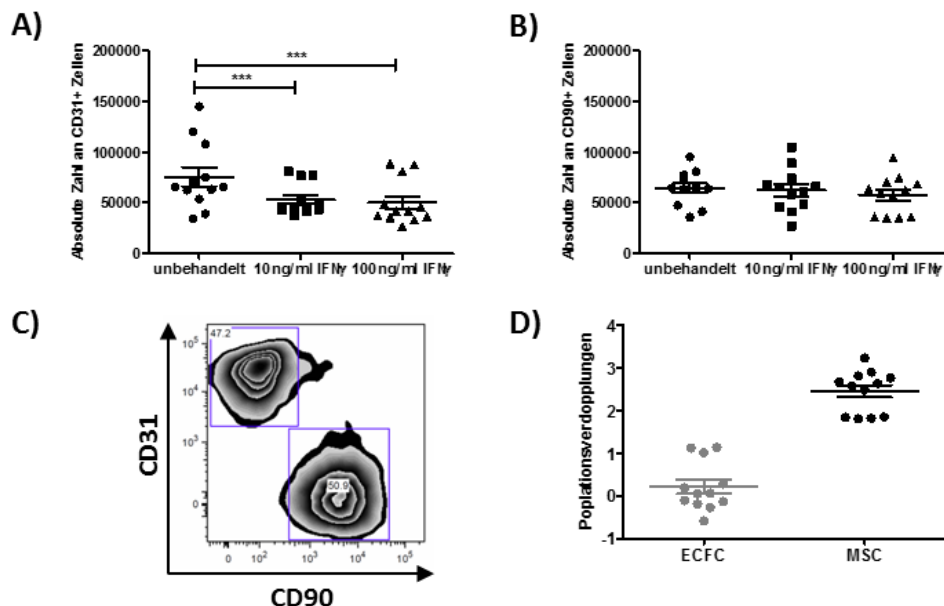


Abbildung 26: CD31⁺ ECFCs nicht aber CD90⁺ MSCs zeigen in IFN γ -stimulierten Kokulturen eine Verringerung der Zellzahl.

ECFC/MSC-Kokulturen wurden in Triplikaten in einer Dichte von 4×10^4 ECFCs + 1×10^4 MSCs ausgesät und entweder mit 10 oder 100 ng/mL IFN γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit CD31- und CD90-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die absolute Zellzahl der CD31⁺ ECFCs **A)** und CD90⁺ MSCs **B)** wurde durchflusszytometrisch bestimmt ($n = 2$; zwei verschiedene Spender). Dargestellt ist in **C)** ein repräsentativer Zebra-Plot der durchflusszytometrischen Analyse von ECFC/MSC-Kokulturen, die mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert wurden und in **D)** die Populationsverdopplung der beiden Populationen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM präsentiert. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse mit nachfolgenden Dunn's Test (***) ($p < 0,001$) ermittelt.

Die CD31⁺ Zell-Fraktion (ECFCs) zeigte eine signifikante Verringerung der Zellzahl nach der Stimulation mit IFN γ , wohingegen die CD90⁺ MSCs durch die Zytokin-Stimulation in ihrem Proliferationsverhalten nicht beeinflusst wurden (**Abbildung 26A und B**).

Die zuvor in einer Ratio von 4:1 ausgesäten IFN γ -stimulierten Kokulturen hatten nach drei Tagen ein Verhältnis von annähernd 1:1 angenommen (**Abbildung 26C**). In der höchsten

getesteten IFN γ -Konzentration von 100 ng/mL zeigten MSCs (CD90⁺) 2,45 \pm 0,14 Verdopplungen. Demgegenüber waren keine Populationsverdopplungen von ECFCs in Kokultur nachweisbar (0,22 \pm 0,16) (**Abbildung 26D**).

Außerdem wurde im Überstand der Kulturen nach drei Tagen die Konzentration der folgenden Zytokine bestimmt: Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und aktiver Transforming Growth Factor beta (TGF- β) (**Abbildung 27**).

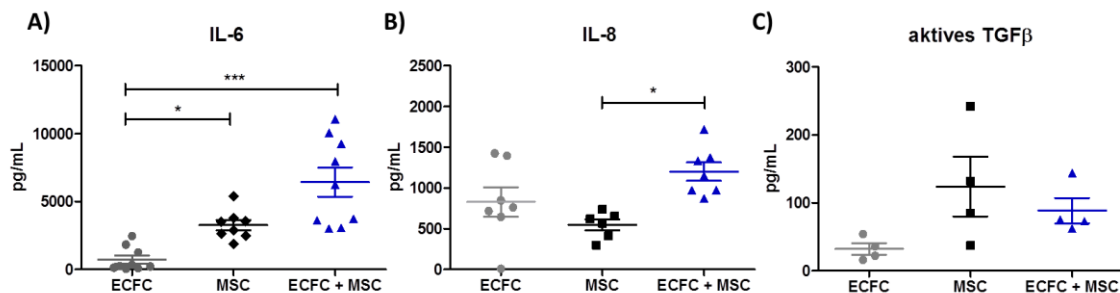


Abbildung 27: Zytokin-Freisetzung aus ECFCs und MSCs in Mono- und Kokultur

ECFC/MS-C-Mono- und Kokulturen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ -stimuliert und drei weitere Tage kultiviert. In den Kulturüberständen wurden die gelösten Zytokine IL-6 **A**), IL-8 **B**) und aktives TGF- β **C**) mit Hilfe einer Multiplexanalyse bestimmt (n = 2 - 3, zwei verschiedene ECFC/MS-C-Spender). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt und die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse mit anschließenden Dunn's bzw. Bonferroni Tests bestimmt (**p < 0,001; *p < 0,01; *p < 0,05).

Die Messung mittels Multiplexanalyse ergab eine signifikant erhöhte Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8, wenn sowohl ECFCs als auch MSCs in der Kultur anwesend waren. Hingegen zeigten die jeweiligen Monokulturen geringere Konzentrationen von IL-6 im Überstand (**Abbildung 27A und B**). Eine signifikante Erhöhung der IL-8-Freisetzung war nur im Vergleich zu MSC-Monokulturen nicht aber bezüglich der ECFC-Monokultur nachweisbar. Außerdem waren in Kokulturen, im Vergleich zu ECFC-Monokulturen, tendenziell höhere Mengen an aktivem TGF- β im Überstand nachweisbar (**Abbildung 27C**).

Des Weiteren führte die Kokultur zu einer signifikanten Veränderung der Expression von immunologisch relevanten Oberflächenstrukturen wie HLA-ABC, HLA-DR und ICAM-1 (**Abbildung 28-30**). Die IFN γ -stimulierten Kokulturen wurden dabei mit analog behandelten ECFC- und MSC-Monokulturen verglichen. Zur Diskriminierung der beiden Zelltypen in Kokultur wurde hier ausschließlich der Marker CD31 verwendet. Die Regulation der Moleküldichte wurde zusätzlich zur gesamten Kokultur separat für die CD31⁺ Fraktion (ECFC) und die CD31⁻ Fraktion (MSCs) analysiert. Die Kontaktabhängigkeit der beobachteten Effekte wurde durch Transwell-Experimente untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ECFC/MSC-Kokulturen bei Betrachtung der Gesamtheit der Zellen nach drei Tagen eine signifikant geringere Expressionsdichte des HLA-ABC-Moleküls aufwiesen (**Abbildung 28A**). Die separate Betrachtung der Expression auf der CD31⁺ Population (ECFCs) und der CD31⁻ Population (MSCs) zeigte (**Abbildung 28B**), dass sich die Erniedrigung der HLA-Moleküldichte signifikant nur auf den CD31⁺ ECFCs ereignete (**Abbildung 28C**).

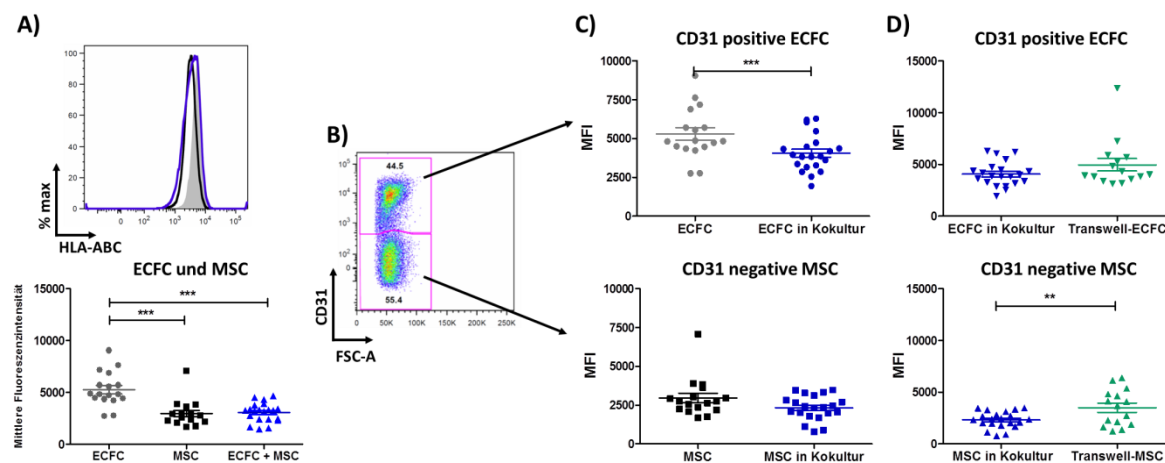


Abbildung 28: Einfluss der Kokultur auf die IFN γ -stimulierte HLA-ABC-Expression

Beide Zelltypen wurden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und HLA-ABC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative Überlagerungen von FACS-Histogrammen (oben) und die statistische Zusammenfassung der Daten (unten) zeigen die Intensität der **A**) HLA-ABC-Expression auf allen vitalen Zellen. **B**) Für die separate Betrachtung der HLA-ABC-Expression auf CD31⁺ und CD31⁻ Zellen wurde in einem Dot-Plot das Vorwärtsstreulicht (FSC-A) gegen den Marker CD31 aufgetragen. In **C**) sind ECFC-Monokulturen im Vergleich zu direkten ECFC/MSC-Kokulturen dargestellt. In **D**) sind direkte Kokulturen und Transwell-Kokulturen vergleichend dargestellt. Gezeigt ist jeweils die Intensität der HLA-ABC-Expression der CD31⁺ und CD31⁻ Population als Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM dargestellt (n = 5 - 7 Experimente; zwei bis drei verschiedene ECFC/MSC-Spender). Die Signifikanz wurde mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse oder durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Test ermittelt (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Dieser beobachtete Effekt war jedoch nicht kontaktabhängig, da die Trennung der beiden Zelltypen durch eine Transwellmembran (0,4 μ m Porengröße) zu einer identischen Reduktion der HLA-ABC-Moleküldichte auf ECFCs führte. MSCs in Transwell-Kokulturen hingegen zeigten ein signifikant höheres HLA-ABC-Expressionsniveau verglichen mit MSCs in direkter ECFC-Kokultur (**Abbildung 28D**). Zudem wurde in den Kokulturen das IFN γ -induzierbare Molekül HLA-DR signifikant reduziert exprimiert. Die Moleküldichte in den Kokulturen wurde auf ein Niveau unterhalb der ECFC- und der MSC-Monokultur verringert (**Abbildung 29A**).

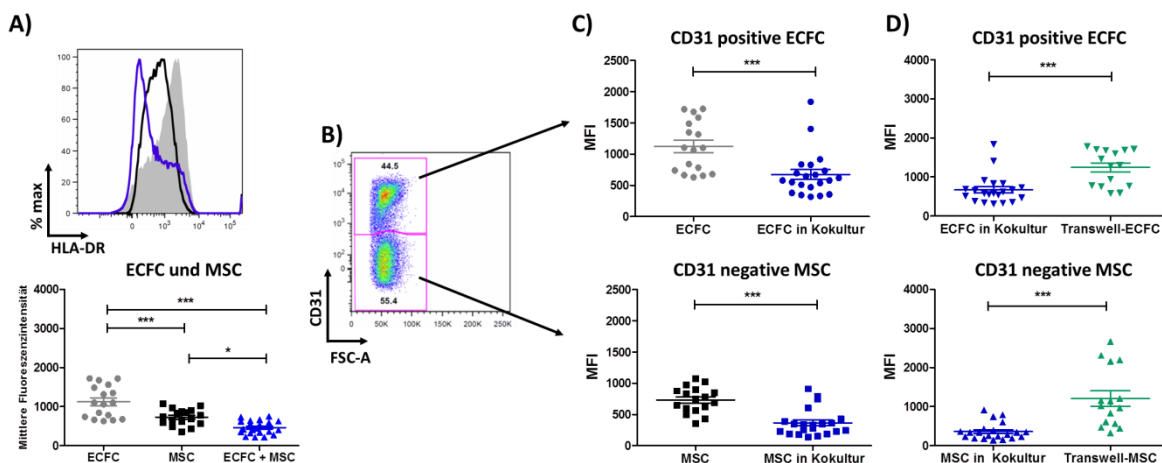


Abbildung 29: Einfluss der Kokultur auf die IFN γ -induzierte HLA-DR-Expression

ECFCs und MSCs wurden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert und nach drei Tagen geerntet. Die Zellen wurden anschließend mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und HLA-DR gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Überlagerungen von FACS-Histogrammen (oben) und die statistische Zusammenfassung der Daten (unten) zeigen die Intensität der **A)** HLA-DR-Expression auf allen vitalen Zellen. **B)** Für die separate Betrachtung der Expression auf CD31⁺ und CD31⁻ Zellen wurde das Vorwärtsstreulicht (FSC-A) gegen den Marker CD31 aufgetragen. In **C)** sind ECFC-Monokulturen im Vergleich zu direkten ECFC/MSK-Kokulturen dargestellt. In **D)** sind direkte Kokulturen und Transwell-Kokulturen aufgeführt. Gezeigt ist jeweils die Intensität der HLA-DR-Expression der CD31⁺ und CD31⁻ Population als Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM dargestellt (n = 5 - 7 Experimente; zwei bis drei verschiedene von ECFC/MSK-Spender). Die Signifikanz wurde mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse oder durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Test ermittelt (**p < 0,001; *p < 0,05).

Die Reduktion der Expressionsdichte des HLA-DR-Moleküls war sowohl auf den CD31⁺ ECFCs als auch auf den CD31⁻ MSCs in Kokultur nachweisbar (**Abbildung 29B und C**). Eine reduzierte Expression des Moleküls konnte nicht mehr beobachtet werden, wenn die Kulturen durch eine semipermeable Membran getrennt vorlagen (**Abbildung 29D**). Somit handelte es sich bei der Reduktion der HLA-DR-Moleküldichte sowohl auf ECFC- als auch auf MSC-Seite um einen kontaktabhängigen Prozess.

Verglichen mit IFN γ -stimulierten ECFC-Monokulturen, ist das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf MSCs deutlich stärker induziert (**Abbildung 30A**). Liegen MSCs und ECFCs in Kokultur gemeinsam vor, so findet eine signifikante Reduktion der ICAM-1-Moleküldichte statt. Außerdem war die Regulation ausschließlich auf den CD31⁻ MSCs nachweisbar (**Abbildung 30B und C**). Weiterhin konnte mit Hilfe von Transwell-Experimenten, in denen beide Zelltypen räumlich voneinander getrennt waren, gezeigt werden, dass die Reduktion der ICAM-1-Expression auf den CD31⁻ MSCs nicht kontaktabhängig ist (**Abbildung 30D**).

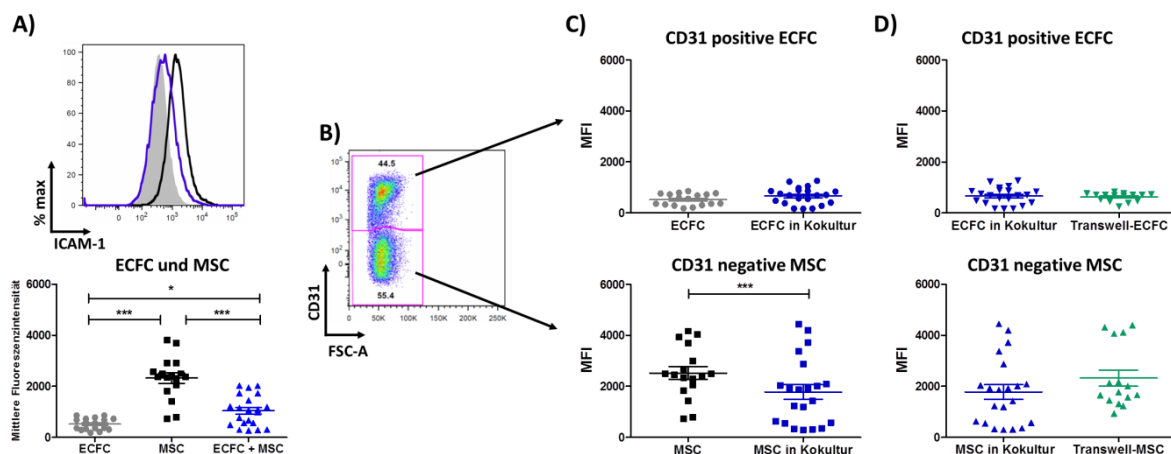


Abbildung 30: Einfluss der Kokultur auf ICAM-1-Expression.

Mit 100 ng/mL IFN γ stimulierte ECFCs und MSCs wurden nach drei Tagen Kultur geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und ICAM-1 gefärbt. Nachfolgend wurden die verschiedenen Gruppen durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Überlagerungen von FACS-Histogrammen (oben) und die statistische Zusammenfassung der Daten (unten) zeigen die Intensität der **A**) ICAM-1-Expression auf allen vitalen Zellen. **B**) Für die separate Betrachtung der Expression auf CD31⁺ und CD31⁻ Zellen wurde das Vorwärtsstreulicht (FSC-A) gegen den Marker CD31 aufgetragen. In **C**) sind ECFC-Monokulturen im Vergleich zu direkten ECFC/MSC-Kokulturen dargestellt. In **D**) sind direkte Kokulturen und Transwell-Kokulturen aufgeführt. Gezeigt ist jeweils die Intensität der ICAM-1-Expression der CD31⁺ und CD31⁻ Population als Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM dargestellt (n = 5 - 7 Experimente; zwei bis drei verschiedene von ECFC/MSC-Donor). Die Daten sind als Mittelwert der Fluoreszenzintensität \pm SEM aufgeführt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse oder durch den Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Test ermittelt (*p < 0,05; ***p < 0,001).

Aus den beobachteten Regulationen der Oberflächenmoleküle ergibt sich die Frage nach der funktionellen Konsequenz einer Reduktion der HLA-Moleküle auf ECFC/MSC-Kokulturen. Zu diesem Zweck wurden ECFC- und MSC-Monokulturen und Kokulturen beider Zelltypen vergleichend in funktionellen Assays analysiert. Zunächst wurde der Einfluss der HLA-ABC-Regulation in einem Zytotoxizitätstest mit Verwendung HLA-spezifischer CTLs untersucht (Abschnitt 3.2.3). Die Effekte der reduzierten HLA-DR-Expression wurden in Immunzell-Kokultur-Experimenten mit Detektion einer induzierten Immunzell-Proliferation analysiert (Abschnitt 3.2.4).

3.2.3 HLA-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen lysieren ECFC/MSC-Kokulturen signifikant geringer als ECFC-Monokulturen.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, kommt es in ECFC/CTL-Kulturen zu einer T-Zell-vermittelten HLA-abhängigen Lyse der ECFCs. Durch die nachfolgend beschriebenen Experimente sollte analysiert werden, ob die Kokultur von ECFCs und MSCs Einfluss auf ihre Sensitivität gegenüber der Lyse durch zytotoxische T-Zellen (CTLs) nimmt. In **Abbildung 31** ist die CTL-vermittelte spezifische Lyse von ECFC- und MSC- Mono- und Kokulturen gezeigt.

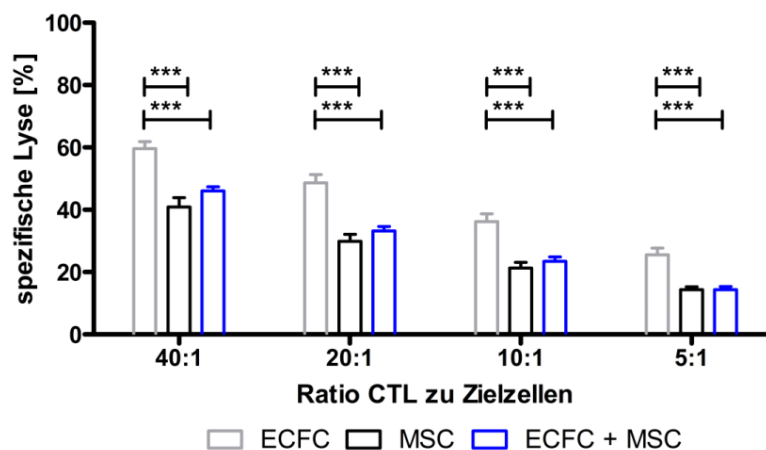


Abbildung 31: Reduzierte CD8⁺ T-Zell-vermittelte HLA-spezifische Lyse von ECFC/MSC-Kokulturen

Angereicherte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTLs) wurden in verschiedenen Ratios (40:1 bis 5:1) mit Calcein-gefärbten Zielzellen (ECFCs, MSCs oder ECFCs + MSCs) für vier Stunden inkubiert. Die Calcein-Freisetzung in den Überstand wurde spektrofluorimetrisch ermittelt und daraus die spezifische Lyse [%] errechnet. ECFCs und MSCs desselben Spenders mit fünf HLA-Übereinstimmungen bezüglich der Stimulatorzellen, wurden mit HLA-restringierten CD8⁺ zytotoxischen Zellen inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen spezifischen Lyse \pm SEM von $n = 4 - 8$ Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (***) und die Signifikanz ist bezogen auf die Daten der ECFC-Gruppe dargestellt.

In Versuchsansätzen mit ECFC-Monokulturen und CTLs konnte eine deutlich zytolytische Aktivität detektiert werden, die mit sinkender CTL zu Zielzell-Ratio abnahm. Im Gegensatz dazu wurden HLA-identische MSCs im Vergleich zur ECFC-Monokultur signifikant geringer durch die HLA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen lysiert. Auch für Kokulturen von ECFCs und MSCs konnte ein gegenüber der ECFC-Monokultur signifikant reduzierter prozentualer Anteil von lysierten Zellen detektiert werden. Des Weiteren war die MSC-vermittelte Reduktion der zytolytischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen in allen getesteten CTL zu Zielzell-Ratios nachweisbar (**Abbildung 31**).

3.2.4 MSCs supprimieren die ECFC-induzierte Immunzell-Proliferation in IFN γ -stimulierten ECFC/MSC-Kokulturen.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ECFCs die Immunzell-Proliferation IFN γ -abhängig induzieren (Abschnitt 3.1.4). In den folgenden Experimenten sollte analysiert werden inwiefern die Kokultur mit HLA-identischen MSCs die ECFC-getriggerte Induktion der T-Zell-Proliferation beeinflusst. Die Ergebnisse des CFSE-basierten Proliferations-Assays sind in **Abbildung 32** dargestellt.

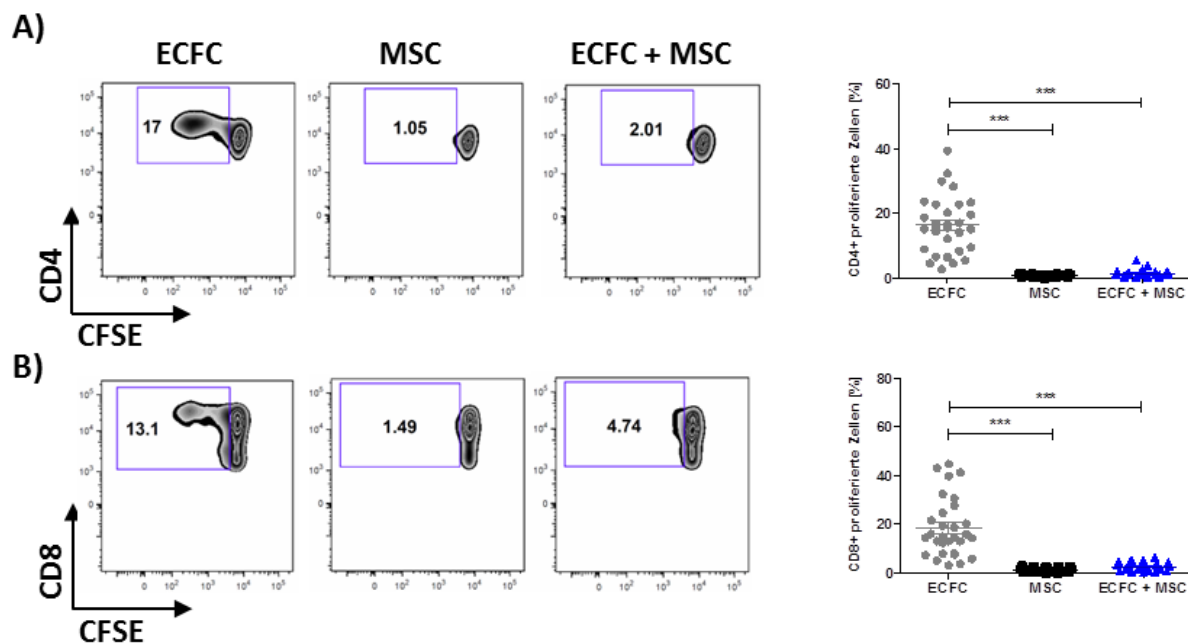


Abbildung 32: MSCs unterdrücken die ECFC-induzierte T-Zell-Proliferation in IFN γ -stimulierten Kokulturen.

Nach 24-stündiger Stimulation mit 100 ng/mL IFN γ wurden die konfluenten Zellkulturen mit 30 Gy bestrahlt. Die CFSE-gefärbten PBMCs wurden nachfolgend im Verhältnis 1:1 mit den bestrahlten Zellkulturen kombiniert. Die kokultierten PBMCs wurden nach sieben Tagen geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. Repräsentative Zebraplots zeigen die Auftragung der CFSE-Fluoreszenzintensität gegen die Marker CD4 **A)** und CD8 **B)**. Die Reduktion der CFSE-Fluoreszenzintensität ist in den jeweiligen blauen Quadranten gezeigt und entspricht dem Anteil an proliferierten Zellen in der entsprechenden Probe. Gezeigt ist der Mittelwert der proliferierten Zellen \pm SEM von $n = 5 - 8$ Experimenten mit zwei bis drei verschiedenen ECFC/MS- Spendern. Die Signifikanz wurde mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse ermittelt (***) $p < 0,001$.

Nach sieben Tagen Kultur mit PBMCs, stimulierten ECFCs deutlich die Proliferation von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen. IFN γ -stimulierte MSC-Monokulturen dagegen induzierten in demselben Zeitraum keine Proliferation beider T-Zell-Subpopulationen. Die Anwesenheit von MSCs in den ECFC/MS-Kokulturen führte zu einer gegenüber der ECFC-Monokultur signifikant supprimierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation (**Abbildung 32A und B**).

Um zu klären, ob der beobachtete und in der Literatur beschriebene hohe Nährstoffumsatz in MSCs *in vitro*-Kulturen mit der Suppression der T-Zell-Proliferation zusammenhängt, wurden im nachfolgenden Experiment IFN γ -stimulierte ECFCs entweder mit MSCs oder mit einem weiteren primären, stark proliferativen Zelltyp (humane renale Epithelzellen) kokultiert. Diese Kulturen wurden anschließend mit CFSE-markierten PBMCs kombiniert und die induzierte Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert (**Abbildung 33**).

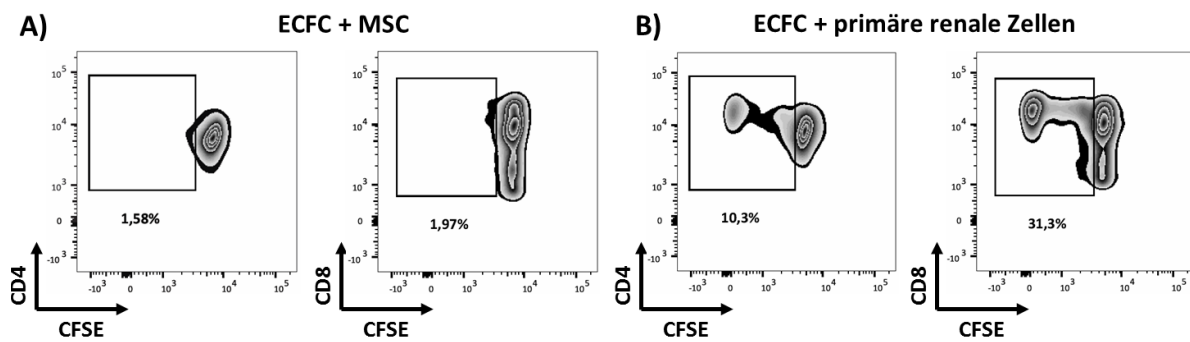


Abbildung 33: ECFC/MSC-Kokulturen, nicht aber Kokulturen von ECFCs und primären renalen epithelialen Zellen, supprimieren die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation.

Die Kokulturen wurden mit 100 ng/mL IFN γ für 24 Stunden stimuliert, bestrahlt (30 Gy) und mit CFSE-markierten PBMCs kokultiviert. An Tag sieben, wurden die PBMCs geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. Repräsentative Zentrifugation (ZFC) Plots zeigen die Reduktion der CFSE-Intensität von PBMC-Kulturen mit **A)** ECFCs und MSCs oder von **B)** ECFCs und primären renalen Zellen. Die Reduktion der CFSE-Fluoreszenzintensität ist in den jeweiligen schwarz umrandeten Quadranten gezeigt und entspricht dem Anteil an proliferierten Zellen in der entsprechenden Probe.

ECFC/MSC-Kokulturen aber auch Kulturen von MSCs mit primären renalen Zellen und PBMCs zeigten während der siebentägigen Kulturphase einen verstärkten Nährstoffverbrauch verglichen mit ECFC-Monokulturen, der durch den Farbumschlag im Medium sichtbar wurde (Daten nicht gezeigt). Während die T-Zell-Proliferation in ECFC/MSC-Kokulturen unterdrückt blieb (**Abbildung 33A**), induzierten hingegen ECFCs in Kokultur mit humanen primären renalen Zellen eine deutliche Proliferationsantwort (**Abbildung 33B**). Zusätzlich wurde die Freisetzung von Zytokinen in den PBMC-Kokulturen bestimmt (**Abbildung 34**). Mittels Multiplexanalyse wurde der Gehalt der Zytokine IL-10 (Interleukin-10, **Abbildung 34A**), IL-1 β (**Abbildung 34B**), sFasL (soluble Fas-Ligand, **Abbildung 34C**), IL-8 (**Abbildung 34D**) und IL-6 (**Abbildung 34E**) in den jeweiligen Überständen gemessen. IFN γ -stimulierte ECFCs induzierten in Kokultur mit PBMCs erhöhte Level der Faktoren IL-10 und sFasL sowie IL-6 und IL-8 verglichen mit dem Niveau der PBMCs alleine. Sowohl MSC-Monokulturen als auch Kokulturen von ECFCs und MSCs wiesen gegenüber der PBMC Kontrollkultur keine erhöhten IL-10- und sFasL-Werte auf (**Abbildung 34A und C**). Im Gegensatz dazu zeigten alle Kulturen in Kombination mit humanen allogenen PBMCs eine erhöhte Freisetzung der Zytokine IL-8 und IL-6, wobei die Konzentration dieser Zytokine in ECFC/MSC- und MSC-Kulturen im Vergleich zur ECFC-Monokultur deutlich höhere Werte erreichte (**Abbildung 34D und E**).

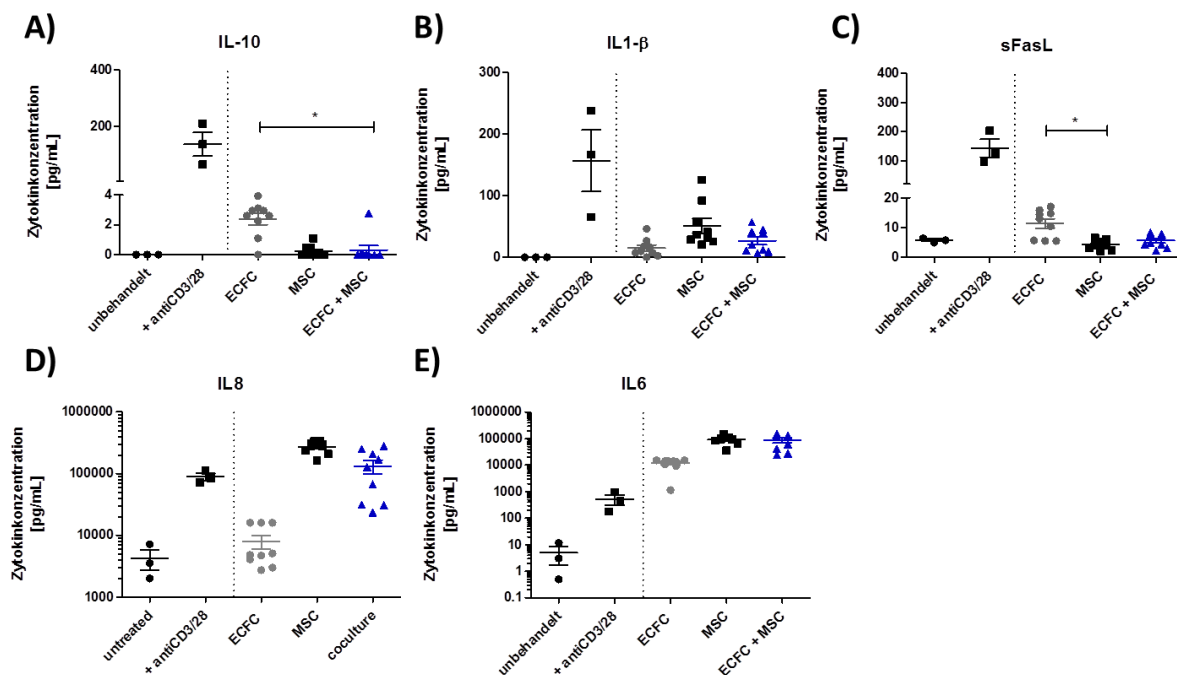


Abbildung 34: Zytokin-Profile von Kokulturen humanen allogenen PBMCs mit ECFCs, MSCs und einer Kombination aus beiden Zelltypen

ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert, mit 30 Gy bestrahlt und drei Tage mit PBMCs kultiviert. Mit Hilfe einer Multiplexanalyse wurden folgende Zytokine in den entnommenen Überständen quantifiziert: **A)** IL-10, **B)** IL-1 β , **C)** sFasL, **D)** IL-6 und **E)** IL-8 (n = 3, zwei verschiedene ECFC/MSC-Spender, zwei unterschiedliche PBMC-Spender). Die Konzentration der sekretierten Zytokine sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse mit anschließendem Dunn's Tests bestimmt (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

3.2.4.1 MSCs in Kokultur mit ECFCs fördern das Überleben von Monozyten/Makrophagen-Populationen

Gleichzeitig wurde in den Immunzell-Kokultur-Experimenten das Überleben von Monozyten bzw. Makrophagen-Populationen untersucht (**Abbildung 35**). Kokulturen mit ECFCs und PBMCs zeigten nach einer Kulturphase von sieben Tagen keine CD14 $^{+}$ Monozyten/Makrophagen. Hingegen wiesen PBMCs, die zusammen mit MSCs kultiviert wurden, eine deutlich höhere Expression des Monozyten/Makrophagen-assoziierten Moleküls CD14 auf. Auch wenn sowohl ECFCs als auch MSCs in der Kultur anwesend waren, konnten CD14 $^{+}$ Zellen nachgewiesen werden. Doch war die Anzahl der überlebenden Monozyten/Makrophagen verringert, verglichen mit MSC/PBMC-Kokulturen (**Abbildung 35**).

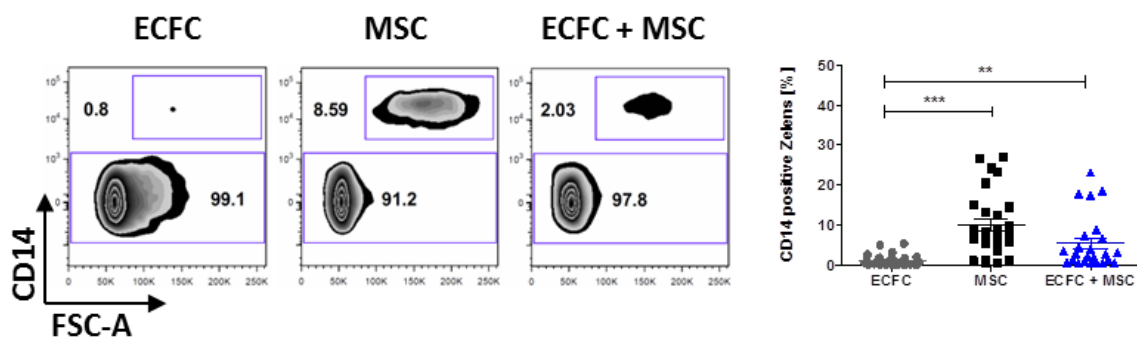


Abbildung 35: Die Anwesenheit von MSCs unterstützt das Überleben von Monozyten bzw. Markrophagen in PBMC-Kulturen.

Nach 24-stündiger Stimulation mit 100 ng/mL IFN γ wurden die konfluenten Zellkulturen mit 30 Gy bestrahlt. Im Verhältnis 1:1 wurden CFSE-gefärbte PBMCs hinzugefügt. Die Zellen wurden für sieben Tage kokultiviert, anschließend wurden die PBMCs geerntet und mit human-spezifischen CD14-Antikörpern gefärbt. Repräsentative „Zebra Plot“-Diagramme zeigen die Auftragung der Expressionsdichte von CD14 gegen das Vorwärtsstreulicht FSC-A. Rechts ist die statistische Auswertung und Darstellung von n = 5 - 8 Experimenten mit zwei bis drei verschiedenen ECFC-Spendern gezeigt. Die Signifikanz wurde mittels einseitiger Varianzanalyse ermittelt (**p < 0,001; *p < 0,01).

3.2.4.2 Die Suppression der Immunzell-Proliferation in ECFC/MSC-Kokulturen ist IDO-abhängig.

Weiter wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen durch welche Signalwege die in Abschnitt 3.4.2 beschriebene Suppression der T-Zell-Proliferation in ECFC/MSC-Kokulturen vermittelt wird. In diesem Zusammenhang wurde die Bedeutung des IDO-Signalwegs analysiert und der Einfluss des Inhibitors 1-Methyltryptophan (1-MT) auf die IFN γ -induzierte T-Zell-Proliferation getestet (**Abbildung 36**). Als Kontrollgruppen wurden IFN γ -stimulierte, aber unbehandelte (ohne 1-MT) ECFC/MSC-Ko- und Monokulturen mitgeführt. Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 gezeigt, führte die Kokultur von ECFCs mit PBMCs zur Induktion der T-Zell-Proliferation. Im Gegensatz dazu unterblieb die T-Zell-Proliferation in MSCs sowie in ECFC/MSC-Kulturen mit PBMCs ohne die Behandlung mit dem Inhibitor 1-MT. IFN γ -stimulierte ECFC/MSC-PBMC-Kokulturen, die mit dem IDO-Inhibitor 1-MT behandelt wurden, waren hingegen nicht in der Lage, die CD8⁺ T-Zell-Proliferation signifikant zu supprimieren (**Abbildung 36A**). Die Suppression der CD4⁺ T-Zell-Proliferation war hingegen weniger stark von der Behandlung mit dem Inhibitor beeinflusst. Sowohl MSC/PBMC- also auch ECFC/MSC/PBMC-Kulturen zeigten nach der Behandlung weiterhin eine signifikant gehemmte CD4⁺ T-Zell-Proliferation (**Abbildung 36B**). Jedoch ist anzumerken, dass die CD4⁺ T-Zell-Proliferation in ECFC/MSC/PBMC-Kulturen partiell wieder hergestellt werden konnte.

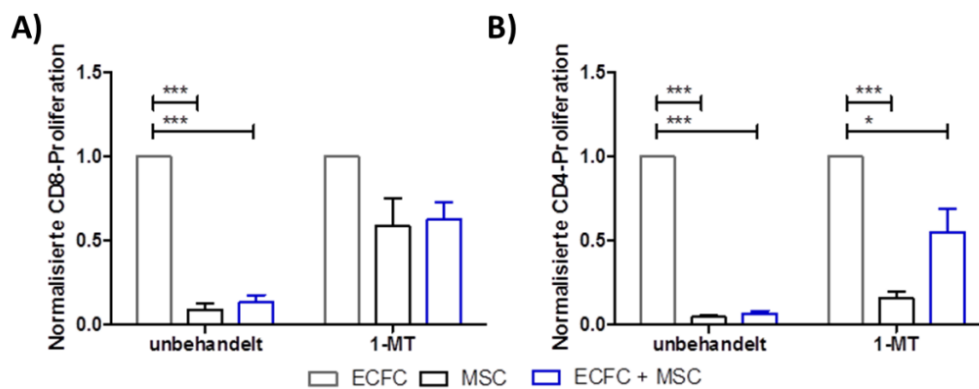


Abbildung 36: Der IDO-Inhibitor 1-MT ist in der Lage die MSC-supprimierte Immunzell-Proliferation partiell wiederherzustellen.

ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ vorstimuliert. Nach der Zugabe der CFSE-markierten PBMCs wurden die Kulturen mit 1 mM 1-Methyltryptophan (1-MT) behandelt. Gleichzeitig wurden Kulturen ohne 1-MT propagiert. Die Graphen zeigen die normalisierte CD8⁺ (A) und CD4⁺ (B) T-Zell-Proliferation sowohl für die unbehandelte als auch für die 1-MT behandelten Testansätze mit ECFCs, MSCs und ECFCs + MSCs (n = 4 unabhängige Experimente). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM für zwei verschiedene ECFC/MSC-Spender dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test ermittelt (***p < 0,001; **p < 0,001; *p < 0,05).

Eine parallel getestete Blockierung des Prostaglandin E2 (PEG2)-Signalweges mit Indometacin, einem PEG2-Inhibitor, wies eine unverändert signifikante Hemmung der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Proliferation in den MSC/PBMC- und MSC + ECFC/PBMC-Kulturen auf (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.3 Eine effektive Suppression der Immunzell-Proliferation erfordert die Anwesenheit von MSCs sowohl während der Vorkultur als auch in der PBMC-Effektor-Phase

Durch die nachfolgend beschriebenen Experimente sollte analysiert werden, ob die Interaktion mit den MSCs sowohl während der Vorkultur, als auch während der anschließenden Induktionsphase, für den in ECFC/MSC-Kulturen nachgewiesenen immunsuppressiven Effekt notwendig ist. Der entsprechende Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der Vorkultur bzw. PBMC-Effektor-Phase auf die Induktion der Immunzell-Proliferation ist in **Abbildung 37** schematisch dargestellt. ECFCs und MSCs wurden zunächst separat kultiviert und IFN γ -stimuliert (**Abbildung 37A**). Anschließend wurden die MSCs geerntet und zu einer ECFC-Monokultur hinzugefügt. Diese Kokulturen wurden dann mit PBMCs, analog des in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Versuchsaufbaus, kokultiviert und die Induktion der T-Zell-Proliferation analysiert. IFN γ -stimulierte ECFCs induzierten nach der siebentägigen Kulturphase mit PBMCs sowohl die CD4- als auch die

CD8-T-Zell-Proliferation. Dagegen zeigten Kokulturen von PBMCs mit IFN γ -stimulierten MSCs keine Induktion der T-Zell-Proliferation (**Abbildung 37C**).

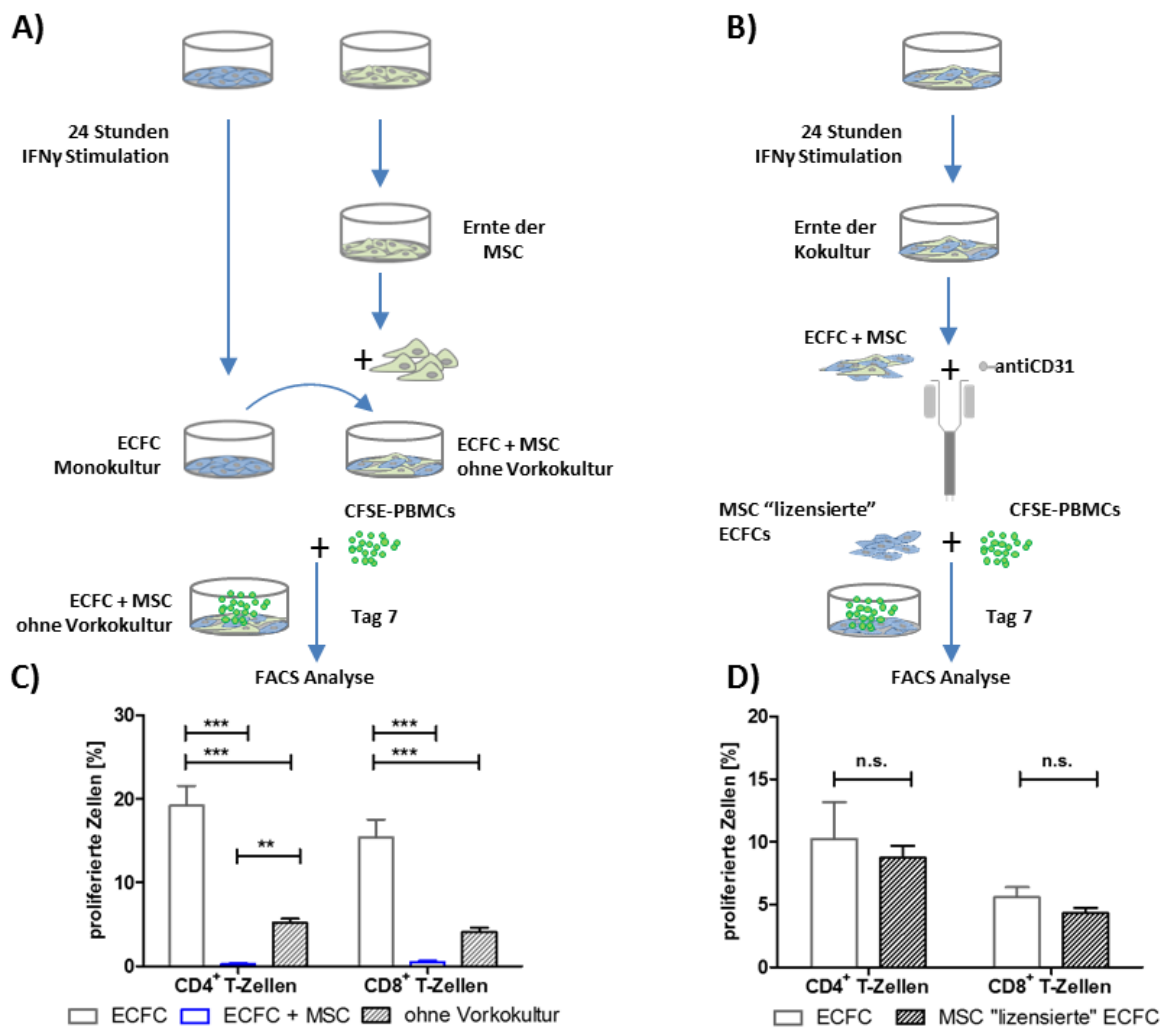


Abbildung 37: Eine effektive Inhibition der ECFC-induzierten T-Zell-Proliferation bedarf der Anwesenheit von MSCs während der IFN γ -Stimulationsphase und während der T-Zell-Kokultur-Phase.

A) Wie in dem Schema dargestellt, wurden ECFCs und MSCs separat kultiviert und IFN γ -stimuliert. Anschließend wurden MSCs geerntet und zu der ECFC-Monokultur gegeben. Nach sieben Tagen wurde die T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch analysiert. Der unten aufgeführte Graph zeigt die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit (blau) und ohne (schraffiert) Vorkultur. Gezeigt ist der Mittelwert des Anteils an proliferierten Zellen [%] \pm SEM. **C)** Die Signifikanz wurde durch eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test ermittelt (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). Entsprechend des Schemas in **B)** wurden ECFC- und ECFC/MSC-Kulturen mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert. Dann nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit anti-CD31⁺ „Beads“ inkubiert und durch eine Säule aufgereinigt. Die CD31⁺ separierten ECFCs aus den Kokulturen (MSC-„lizenzierte“ ECFCs) wurden erneut ausgesät und mit CFSE-markierten PBMCs kokultiviert. Die PBMCs wurden nach sieben Tagen geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt. **D)** Die statistische Zusammenfassung zeigt den prozentualen Anteil an proliferierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die mit ECFCs (grau) oder mit MSC-„lizenzierte“ ECFCs (schraffiert) kokultiviert wurden ($n = 3$ unabhängige Experimente). Gezeigt ist der Mittelwert des Anteils an proliferierten Zellen [%] \pm SEM). Die Signifikanz wurde durch eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test ermittelt.

ECFC/MSC-Kokulturen, ohne gemeinsame 48-stündige Vorkultur, wiesen ein geringeres immunsuppressives Potential auf, als Kokulturen in denen die MSCs über die gesamte

Kulturdauer anwesend waren. Die separate Vorkultur der ECFCs und MSCs führte insbesondere bei der CD4⁺ T-Zell- Subpopulation zu einem signifikant geringer supprimierten Proliferationslevel verglichen mit Kokulturen, die zuvor gemeinsam in einer Kokultur waren (**Abbildung 37C**). Um einen potentiellen MSC-abhängigen Lizenzierungseffekt auf die ECFCs zu untersuchen (**Abbildung 37B**), wurden IFN γ -stimulierte ECFC- und ECFC/MSC-Kulturen nach 24 Stunden mit CD31⁺ „Beads“ durch eine magnetische Säule separiert. Die aus der Kokultur isolierten CD31⁺ ECFCs (MSC-„lizenzierte“ ECFCs) wurden nachfolgend hinsichtlich ihres Potentials zur Induktion einer T-Zell-Proliferation analysiert. Auf diese Weise sortierte CD31⁺ ECFCs, sowohl aus ECFC-Monokulturen als auch aus ECFC/MSC-Kokulturen, induzierten eine klare CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation (**Abbildung 37D**). Es konnte daher kein MSC-vermittelter Lizenzierungseffekt nachgewiesen werden.

3.2.5 Die MSC-vermittelte Suppression der antiCD3/antiCD28-induzierten Immunzell-Proliferation wird nicht durch kokultivierte ECFCs aufgehoben.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente beschäftigen sich mit dem Einfluss von ECFCs auf die immun-modulativen Eigenschaften von MSCs in polyklonal aktivierten PBMC-Kulturen. Wie bereits in Abschnitt 3.1.6 gezeigt sind ECFCs nicht in der Lage eine mittels PHA induzierte T-Zell-Proliferation zu supprimieren. In den hier dargestellten Experimenten wurden ECFC-/MSC-Mono und Kokulturen mit antiCD3/CD28-aktivierten PBMCs kombiniert und die Modulation der angeregten Immunzell-Proliferation durch die eben erwähnten Zellkultur-Gruppen analysiert. Nach fünf Tagen zeigten ECFC-Monokulturen keinen immunmodulierenden Einfluss auf die aktivierten T-Zellen. Doch sowohl MSC-Monokulturen als auch ECFC/MSC-Kokulturen waren in der Lage, die CD4⁺ (**Abbildung 38A und B**) und CD8⁺ (**Abbildung 38C und D**) T-Zell-Proliferation signifikant zu unterdrücken. Dabei konnte festgestellt werden, dass die ECFC/MSC-Kokulturen im Vergleich zu den MSC-Monokulturen ein tendenziell geringeres immunsupprimierendes Potential aufweisen (**Abbildung 38B und D**). Zusätzlich wurde in diesen Experimenten ersichtlich, dass die Vorbehandlung von MSC-Monokulturen und ECFC/MSC-Kokulturen mit 100 ng/mL IFN γ zu einer Verstärkung des immunsuppressiven Effekts sowohl bei MSC- als auch bei ECFC/MSC-Kulturen führte (**Abbildung 38B und D**).

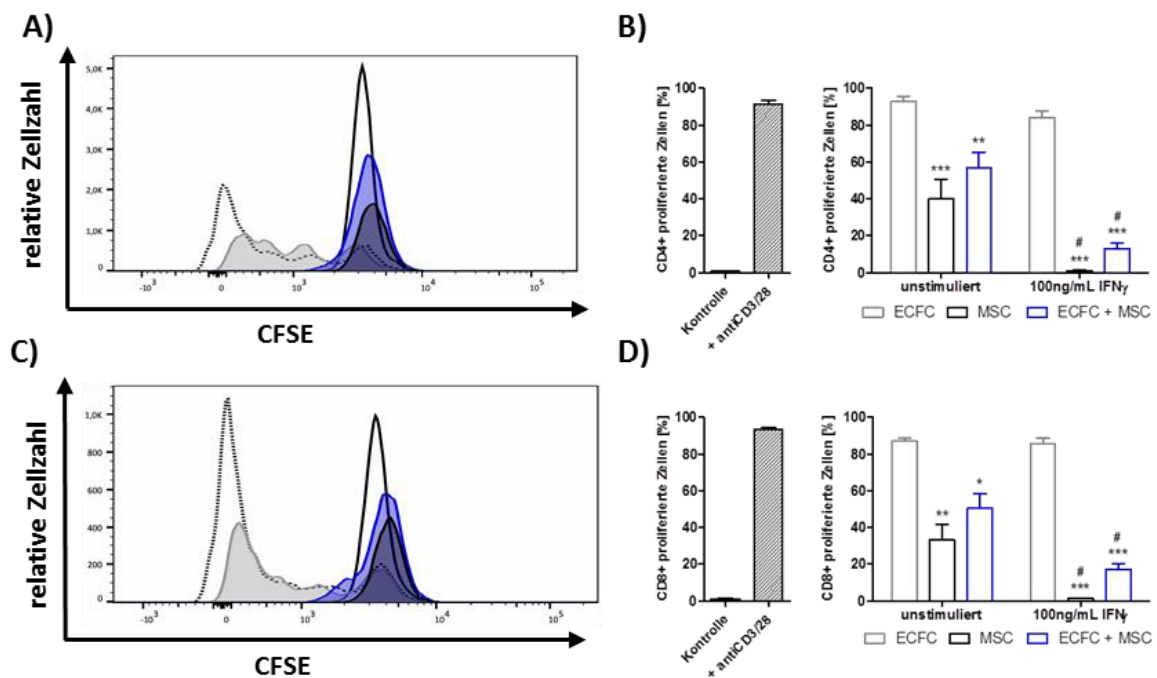


Abbildung 38: Die antiCD3/CD28 -induzierte Immunzell-Proliferation ist in ECFC/MSC-Kokulturen weiterhin supprimiert
Gezeigt ist der prozentuale Anteil an proliferierten CD4⁺T-Zellen (A-B) und CD8⁺ T-Zellen (C-D) in unbehandelten (Kontrolle) oder in antiCD3/CD28-behandelten Kontroll-Kulturen (+antiCD3/28) sowie in unstimulierten und IFN γ -stimulierten ECFC-, MSC- oder ECFC/MSC-Kokulturen. Representative FACS-Histogramme in A) und C) zeigen die Intensität der CFSE-Fluoreszenz in unbehandelten PBMCs (scharze Linie), antiCD3/CD28-induzierten (gepunktete Linie) PBMCs sowie mit ECFC- (graue ausgefüllte Kurve), MSC- (schwarze ausgefüllte Kurve) und ECFC/MSC- (blaue ausgefüllte Kurve) kokultivierten PBMCs. ECFC/MSC-Kokulturen und Monokulturen wurden entweder mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die konfluenten Kulturen mit CFSE-markierten PBMCs kokultiviert und mit 0,5 μ g human-spezifischen Antikörpern für CD3 und mit 1 μ g human-spezifischen Antikörpern für CD28 induziert. Nach fünf Tagen wurden die PBMC geerntet und mit human-spezifischen Antikörpern für CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (n = 3; zwei verschiedene ECFC/MSC-Spender und zwei verschiedene PBMC-Spender). Die Werte sind als Mittelwert des Anteils an proliferierten Zellen [%] + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitiger Varianzanalyse mit Bonferroni-Test ermittelt. * Signifikanz bezüglich der ECFC-Gruppe; # zeigt die Signifikanz bezüglich der korrespondierenden unstimulierten Gruppe (***p < 0,001; *p < 0,05; #p < 0,05).

3.2.5.1 Die Modulation der aktivierten Immunzell-Proliferation in MSC- und ECFC/MSC-Kulturen ist vollständig IDO-vermittelt.

In Abschnitt 3.2.4.2 konnte gezeigt werden, dass die MSC-vermittelte Suppression der ECFC-induzierten T-Zell-Proliferation nur partiell IDO-abhängig ist. Die nachfolgenden Experimente sollten Aufschluss darüber geben ob, die MSC-abhängige Suppression von polyklonal-aktivierten T-Zell-Kokulturen (antiCD3/CD28 Stimulation) durch denselben Signalweg vermittelt wird wie die Suppression der ECFC-induzierten T-Zell-Proliferation (Abbildung 39).

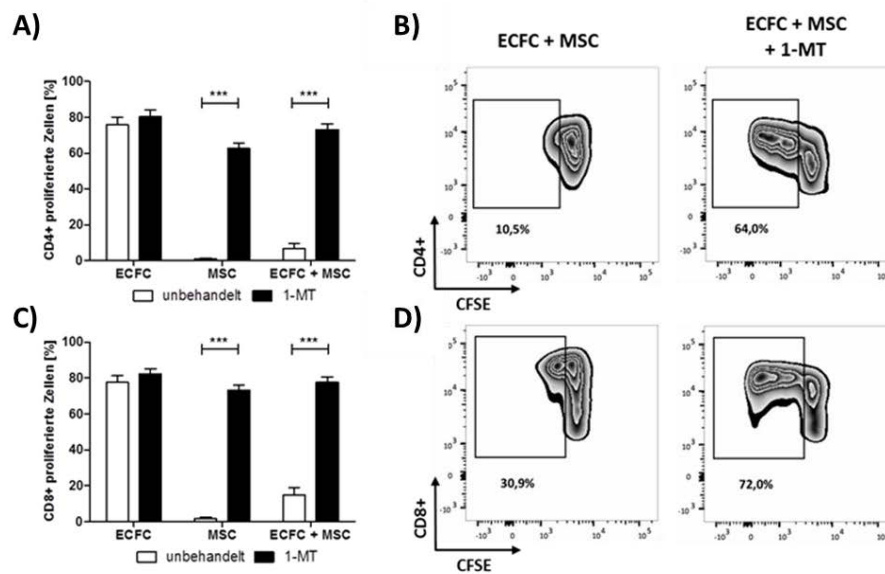


Abbildung 39: Der IDO-Inhibitor 1-MT ist in der Lage die MSC-supprimierte Immunzell-Proliferation vollständig wiederherzustellen.

ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/mL IFN γ stimuliert. Anschließend wurden die konfluenten Kulturen mit CFSE-markierten PBMCs kokultiviert und mit 0,5 μ g human-spezifischen Antikörpern für CD3 und mit 1 μ g human-spezifischen Antikörpern für CD28 stimuliert. Nach dem Hinzufügen der PBMCs wurden die Kulturen mit 1 mM/mL 1-Methyltryptophan (1-MT) behandelt oder unbehandelt belassen. Die Graphen zeigen die statistische Zusammenfassung von $n = 4$ Experimenten zur Bestimmung von CD4 $^+$ T-Zell-Proliferation **A)** und CD8 $^+$ T-Zell-Proliferation **C)**. Repräsentative „Zebra“-Plots zeigen die CD4 $^+$ **B)** und CD8 $^+$ **D)** T-Zell-Proliferation in ECFC/MSC-Kokulturen (ohne und mit 1-MT-Behandlung). Die Ergebnisse sind als Mittelwert des Anteils an proliferierten Zellen [%] + SEM für zwei verschiedene ECFC/MSC-Donoren dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test ermittelt (** $p < 0,001$).

Wie in Abschnitt 3.1.6 gezeigt, waren ECFC-Monokulturen selbst nicht befähigt die Proliferation zu supprimieren. Jedoch konnte das Hinzufügen von ECFCs in MSC/PBMC-Kokulturen die MSC-vermittelte Suppression der CD4 $^+$ (**Abbildung 39A**) und CD8 $^+$ T-Zell-Proliferation (**Abbildung 39C**) nur geringfügig vermindern. Die Behandlung von MSC-Monokulturen und ECFC/MSC-PBMC-Kokulturen mit dem IDO-Inhibitor 1-MT hingegen resultierte in einer vollständigen Aufhebung des MSC-vermittelten suppressiven Effekts bei beiden T-Zell-Subpopulationen (**Abbildung 39B und C**). Damit ist die nachgewiesene Suppression von polyklonal-aktivierten T-Zellen durch IFN γ -stimulierte MSCs in dem vorliegenden Testsystem vollständig IDO-vermittelt.

3.2.6 Analyse der Immunogenität von ECFC/MSC-Zellkonstrukten in NSG Mäusen

In vitro induzierten kokultivierten ECFCs und MSCs eine reduzierte Immunzell-Antwort und wurden weniger stark von zytotoxischen T-Zellen lysiert (Abschnitt 3.2.2 - 3.2.5). Das Ziel der nachfolgenden Experimente war es zu untersuchen, ob sich diese Beobachtungen auch *in vivo* verifizieren lassen. Durch die Kombination von zwei verschiedenen Maus-Modellen 1.)

einem humanen „*de novo*-Vaskulogenese“-Modell und 2.) einem humanisierten „Allograft“-Modell, sollten die gefäßbildenden Eigenschaften und das potentielle Rejektionsverhalten von ECFC/MSC-Kombination-Transplantaten untersucht werden (**Abbildung 40**).

Immun-defizienten NOD.Cg-Prkdc Scid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG)-Mäusen wurde eine Matrigel-ECFC/MSC-Suspension subkutan in beide Flanken injiziert. Nach drei Wochen wurden die Mäuse mit humanen allogenen PBMCs durch eine intraperitoneale Applikation rekonstituiert. Die Induktion von vaskulären Strukturen in den Transplantaten wurde histologisch überprüft.

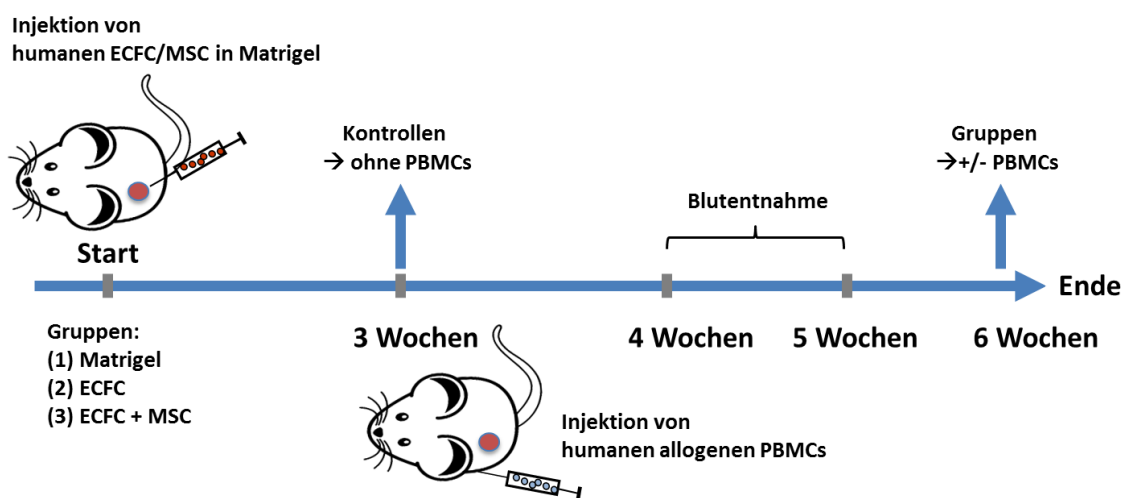


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Ablaufs der *in vivo* Experimente

Die Versuchstiere erhielten eine Matrigel-Suspension ohne Zellen, mit ECFCs oder einer Kombination von beiden Zelltypen (ECFC+ MSC). Nach drei Wochen wurden die NSG Mäuse mit humanen allogenen PBMCs rekonstituiert. Der Anteil an humanen CD45⁺ Zellen im peripheren Blut wurde wöchentlich bestimmt. Nach insgesamt drei Wochen wurden die Tiere finalisiert und Blut, Serum, Milz sowie die Transplantate entnommen.

Eine potentielle Immunantwort gegenüber den transplantierten Zellen wurde durch die Bestimmung von infiltrierenden humanen CD45⁺ Immunzellen sowie durch die Detektion der IFN γ -Sekretion alloreaktiver T-Zellen aus der Milz untersucht. Der Aktivierungsstatus der induzierten humanen Gefäßstrukturen in den Transplantaten wurde durch eine Färbung mit HLA-DR Antikörpern analysiert.

3.2.6.1 *De novo*-Vaskulogenese in NSG Mäusen

Zunächst wurde die Gefäßbildung in NSG Mäusen nach Koapplikation von ECFCs und MSCs in einem Matrigel-Transplantat ohne die Rekonstitution mit humanen PBMCs etabliert (**Abbildung 41A**). Der Anteil an CD31⁺ ECFCs und CD90⁺ MSCs von 48 Stunden

vorkultivierten Kokulturen direkt vor der Injektion in die Versuchstiere ist in **Abbildung 41B** exemplarisch dargestellt.

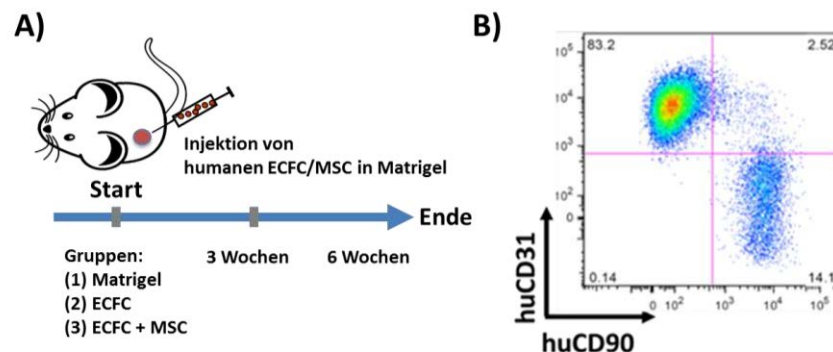


Abbildung 41: Untersuchungen zu den gefäßbildenden Eigenschaften von ECFC/MSC-Transplantaten in NSG Mäusen

A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Untersuchung der *de novo*-Vaskulogenese in NSG Mäusen. Als Negativ-Kontrolle wurde eine zellfreie Matrigel-Lösung in beide Flanken der Versuchstiere injiziert. Humane ECFCs sowie eine Kombination aus zuvor im Verhältnis 4 zu 1 kokultivierten humanen ECFCs und MSCs wurden jeweils in Matrigel resuspendiert und den Versuchstieren injiziert. **B)** Das repräsentative Punktdiagramm zeigt die Verteilung von 48 Stunden kultivierten CD31⁺ ECFCs (83,2%) und CD90⁺ MSCs (14,1%) direkt vor der Injektion in NSG Mäuse. Eine Probe der ECFC/MSC-Suspension wurde dafür mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und CD90 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Als Kontrolle wurden einige Transplantate bereits nach drei Wochen entnommen um die Gefäßbildung direkt vor der Gabe der humanen PBMCs zu untersuchen (**Abbildung 42**).

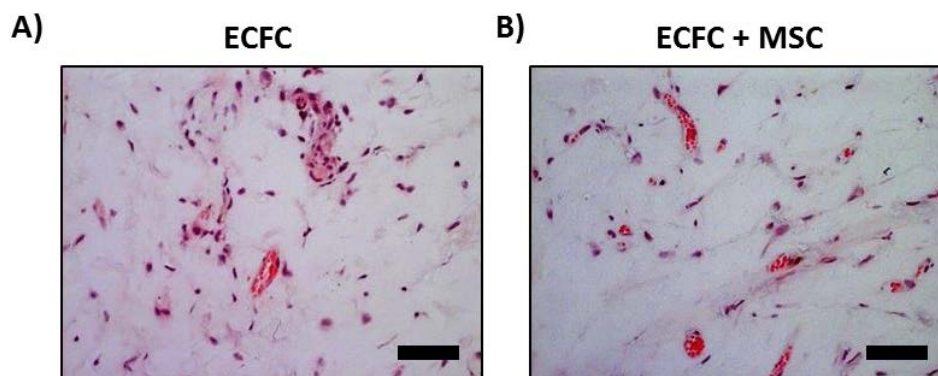


Abbildung 42: Induktion der Gefäßbildung drei Wochen nach Injektion der zellhaltigen Matrigel-Transplantate in NSG Mäuse.

H&E Färbungen von Paraffin-Schnitten der explantierten Matrigel-Transplantate zeigen die Induktion der Gefäßbildung nach drei Wochen für die ECFC- **A)** und für die ECFC/MSC- Versuchsgruppe **B)**. Der Größenmaßstab entspricht 50 µm.

Bilder von H&E Färbung dieser Transplantate zeigten die Induktion von Mikrogefäßstrukturen nach drei Wochen, sowohl in der ECFC- als auch in der ECFC/MSC-Gruppe.

Transplantate, die eine Kombination von ECFCs und MSCs enthielten, aber auch solche mit nur ECFCs, induzierten nach sechs Wochen mikrovaskuläre Strukturen, die makroskopisch

durch eine deutliche Rotfärbung des Transplantats sichtbar wurden und daher aktiv an die Maus-Blutzirkulation angeschlossen wurden (**Abbildung 43A**, makroskopische Bilder). Durch H&E Färbungen konnte weiter gezeigt werden, dass Transplantate mit ECFCs und MSCs eine höhere Anzahl und einen größeren Querschnitt der induzierten Mikrogefäße aufwiesen (**Abbildung 43A**).

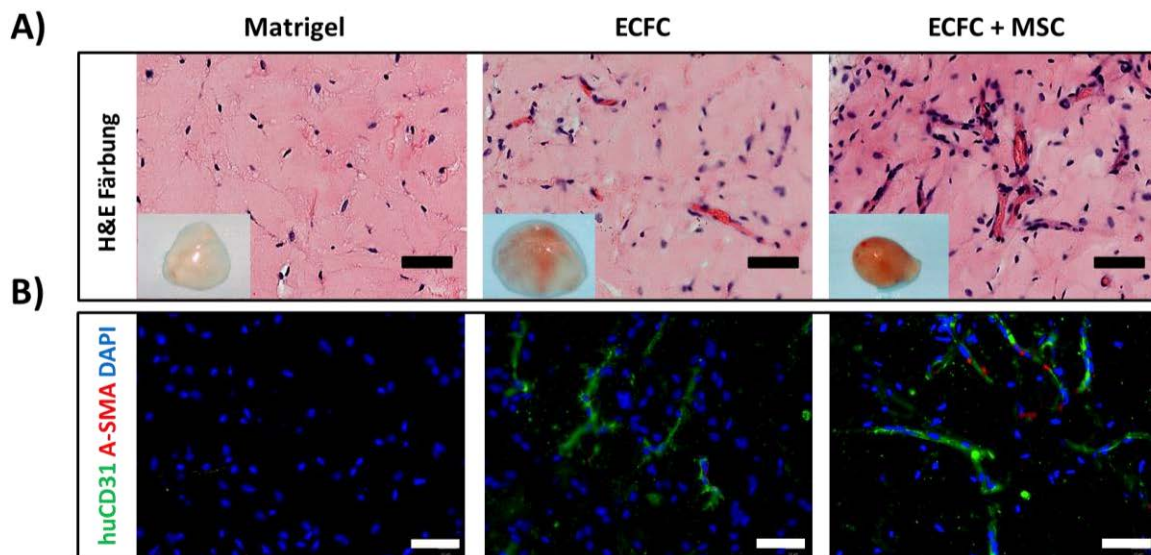


Abbildung 43: ECFC/MSC-Konstrukte führen zu stabileren vaskulären Netzwerken als ECFC-haltige Konstrukte

In **A**) sind repräsentative Bilder von H&E Färbungen der Transplantate aus den verschiedenen Versuchsgruppen (nur Matrigel, ECFCs, ECFCs + MSCs) sechs Wochen nach Injektion in NSG Mäuse dargestellt. **B**) Zur näheren Charakterisierung der induzierten Gefäßstrukturen wurden Paraffinschnitte mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und α -SMA gefärbt und anschließend durch einen High Content Screener analysiert. Der Größenmaßstab entspricht 50 μ m.

Um den Ursprung der *in vivo* generierten Gefäße zu untersuchen wurden die Gewebeschnitte mit human-spezifischen CD31-Antikörpern gefärbt. Zur detaillierteren Analyse der Gefäßstruktur wurde gleichzeitig eine Färbung mit α -smooth muscle actin (α -SMA)-Antikörpern durchgeführt (**Abbildung 43B**). So konnte nachgewiesen werden, dass die histologisch detektierten Gefäße in ECFC/MSC- und ECFC-enthaltenden Transplantaten humanen Ursprungs waren. Verglichen mit ausschließlich ECFC-haltigen Transplantaten, zeigte die Kombination von ECFCs und MSCs zudem ausgeprägtere humane Gefäßnetzwerke, die durch α -SMA-exprimierende MSCs abluminal stabilisiert wurden (**Abbildung 43B**). Hingegen waren ECFC-induzierte Gefäßnetzwerke weniger komplex organisiert. Zellfreie Transplantate zeigten keine *de novo* Vaskularisierung, jedoch waren infiltrierende Zellen durch positive Kernfärbung nachweisbar (**Abbildung 43**). Folglich kommt es zur Migration von murinen Zellen in das zunächst zellfreie Implantat. Die infiltrierten

Zellen waren vornehmlich positiv für murines CD31 und CD45 (**Abbildung 44A**), was für Zellen myeloiden Ursprungs wie beispielsweise Granulozyten charakteristisch ist.

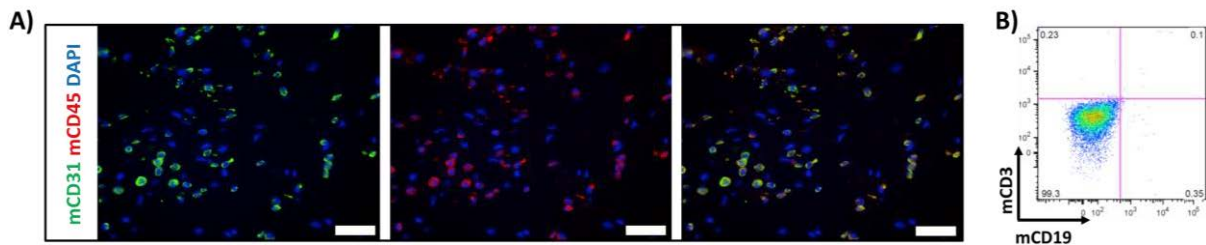


Abbildung 44: Infiltrierende Zellen in Matrigel-Transplantaten zeigen eine Ko-Expression von murinem CD45 und CD31.

Zur Analyse der Zell-Infiltrate in Matrigel Transplantaten ohne Rekonstitution mit humanen allogenen PBMCs wurden Paraffin Schnitte von Transplantaten angefertigt. In **A**) sind Aufnahmen einer Färbung mit Maus-spezifischen Antikörpern für CD31 (grün) und CD45 (rot) sowie eine Überlagerung beider Färbungen dargestellt. Der Größenmaßstab entspricht jeweils 50 μm . In **B**) ist eine durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut einer NSG Maus ohne die Rekonstitution mit humanen PBMCs gezeigt. Durch die Färbung mit Maus-spezifischen CD3 und CD19 Antikörpern konnte die Abwesenheit dieser beiden Immunzellpopulationen im untersuchten NSG Mausmodell bestätigt werden.

Weiter konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den $\text{CD45}^+/\text{CD31}^+$ Infiltraten um murine T- oder B- Zellen handelte, da bei der durchflusszytometrischen Analyse des peripheren Blutes von nicht-rekonstituierten NSG Mäusen keine CD3^+ und CD19^+ Zellen (**Abbildung 44B**), aber eine deutliche gr1-positive Zell-Fraktion detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

3.2.6.2 Titration von humanen allogenen PBMCs zur Rekonstitution der NSG Mäuse

Nachdem die Induktion von humanen ECFC/MSC-abgeleiteten Gefäßnetzwerken in NSG Mäusen erfolgreich etabliert wurde, erfolgte die Testung optimaler Zellzahlen von humanen HLA-differenten (bezüglich der ECFC/MSC Spender) PBMCs für die Rekonstitution der Versuchstiere (**Abbildung 45**). Um in dem vorliegenden Modell eine spezifische humane Abstoßungsreaktion untersuchen zu können, wurden zwei verschiedenen PBMC-Dosen (5 und 10 Millionen) drei Wochen nach der Implantation der Zellkonstrukten verabreicht. Versuchstiere, die mit der niedrigeren Dosis von 5 Millionen humanen PBMCs rekonstituiert wurden, zeigten eine geringere $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration im Serum ($57,01 \pm 20,19 \text{ pg/mL}$) (**Abbildung 45C**).

Gleichzeitig konnte in diesen Tieren ein ausreichender Anteil humaner CD45^+ Zellen sowohl in der Peripherie ($13,15 \pm 2,42\%$) (**Abbildung 45A und E**) als auch in der Milz ($29,39 \pm 2,93\%$) (**Abbildung 45B und F**) detektiert werden.

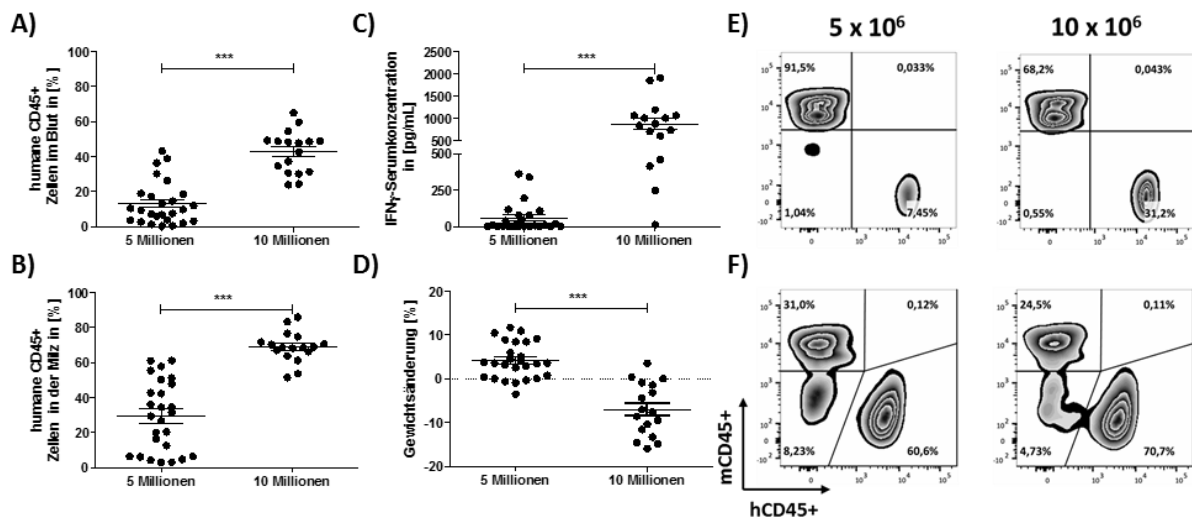


Abbildung 45: Rekonstitution der NSG Mäuse mit 5 und 10 Millionen humanen allogenen PBMCs

Drei Wochen nach Rekonstitution der NSG-Mäuse mit 5 oder 10 Millionen humanen allogenen PBMC wurden Blut- und Milzproben entnommen und bezüglich ihres Anteils an humanen CD45⁺ Zellen durchflusszytometrisch analysiert. In **A**) ist der Anteil an humanen CD45⁺ im peripheren Blut und in **B**) der Anteil in der Milz als prozentualen Mittelwert \pm SEM dargestellt. Im Serum der Versuchstiere wurde die Konzentration von humanem IFN γ durch eine Multiplexanalyse quantifiziert. Der Graph in **C**) zeigt den Mittelwert der IFN γ Konzentration in pg/mL \pm SEM. **D**) zeigt die Veränderung des Gewichts der NSG Mäuse nach der Rekonstitution mit den verschiedenen PBMC Dosen als prozentualen Mittelwert \pm SEM (5 Millionen n = 25; 10 Millionen n = 16). Repräsentative Zebra-Plots zeigen den Anteil an humanen CD45⁺ aufgetragen gegen den Anteil an murinen CD45⁺ Zellen im peripheren Blut **E**) und in der Milz **F**).

Die höhere PBMC-Dosis von 10 Millionen PBMCs führte zu einem deutlichen Gewichtsverlust bei den Versuchstieren (**Abbildung 45D**), so dass nachfolgend eine Dosis von 5 Millionen PBMCs für die Rekonstitution der NSG Mäuse verwendet wurde.

3.2.6.3 ECFC/MSC-enhaltende Transplantate zeigen in NSG Mäusen weniger HLA-DR⁺

humane vaskuläre Strukturen und weniger humane Leukozyten-Infiltrate

Um das Rejektionsverhalten in den experimentellen Gruppen (Matrigel, ECFC, ECFC/MSC) nach Rekonstitution mit 5 Millionen humanen allogenen PBMCs zu untersuchen, wurde zunächst der Anteil an humanen CD45⁺ Zellen in der Milz durchflusszytometrisch analysiert (**Abbildung 46A und B**). Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils an humanen CD45⁺ Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Ferner zeigten Versuchstiere, die erfolgreich mit humanen PBMCs rekonstituiert wurden nach sechs Wochen vergrößerte Milzen (**Abbildung 46C**).

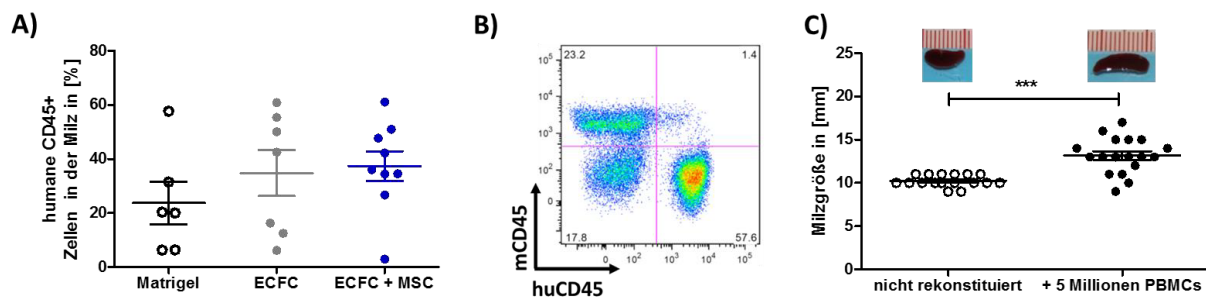


Abbildung 46: Rekonstitution von NSG Mäusen mit 5 Millionen humanen allo genen PBMC

Gezeigt ist in **A)** der Anteil von humanen CD45⁺ Zellen in der Milz drei Wochen nach Rekonstitution von NSG-Mäusen mit 5 Millionen humanen allo genen PBMCs in den verschiedenen Versuchsgruppen (Matrigel, ECFC, ECFC + MSC). Ein repräsentatives Punktdiagramm in **B)** zeigt die Färbung von Milzzellen mit human- und Maus-spezifischen CD45-Antikörpern. In **C)** dargestellt ist die Milzgröße in mm von nicht rekonstituierten (n = 17) und von rekonstituierten (5 Millionen humane allo gene PBMCs) Mäusen (n =18).

Die Rekonstitution mit humanen allo genen PBMCs führte in ECFC/MSChaltigen Transplantaten zu keiner strukturellen Beeinträchtigung der induzierten Gefäßnetzwerke (**Abbildung 47A**), viel mehr war eine Gefäßstabilisierung durch perivaskulär rekrutierte α SMA⁺ Zellen detektierbar (**Abbildung 47B und C**).

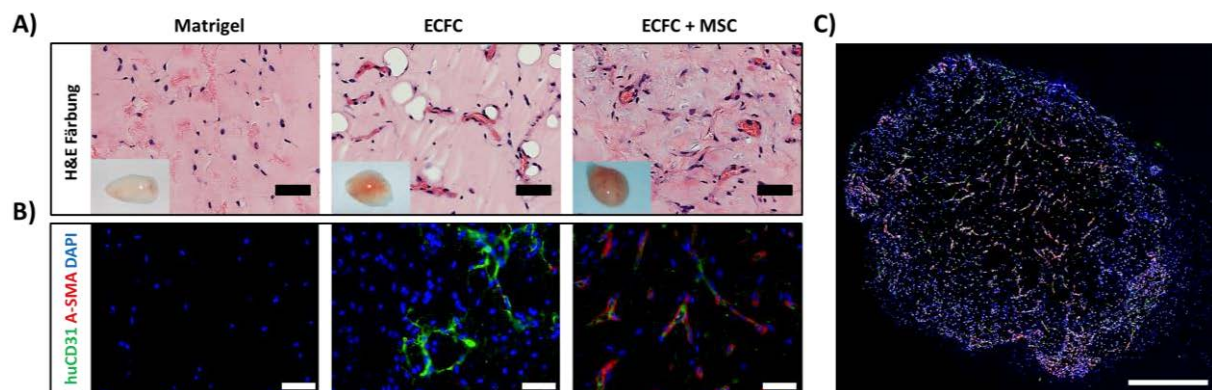


Abbildung 47: α SMA stabilisierte humane Gefäßnetzwerke in ECFC/MSCTransplantaten.

Gezeigt sind repräsentative gefärbte Paraffin-Schnitte von explantierten Matrigel Transplantat sechs Wochen nach Injektion in NSG Mäuse und drei Wochen nach Rekonstitution mit 5×10^6 humanen allo genen PBMCs. Die lichtmikroskopischen Bilder der H&E Färbungen in **A)** zeigen die induzierte Vaskularisierung für die einzelnen Versuchsgruppen. **B)** Zur näheren Charakterisierung der Gefäßstrukturen wurden die Paraffin-Schnitte mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und α SMA gefärbt. Der Größenmaßstab entspricht jeweils 50 μ m. In **C)** ist exemplarisch für die ECFC + MSC Versuchsgruppe eine Übersicht des gesamten Implantats gezeigt. Humane CD31⁺ Strukturen sind grün und α SMA⁺ Strukturen in Rot dargestellt. Der Größenmaßstab entspricht 500 μ m.

Zum Nachweis von gegen die transplantierten ECFCs und MSCs gerichteten Alloantigenreaktiven humanen Gedächtniszellen in der Milz wurde ein humaner IFN γ -enzyme linked immuno spot (EliSpot) Assay durchgeführt (**Abbildung 48**). Die Analyse der Frequenz von IFN γ -produzierenden humanen Gedächtniszellen ergab relativ geringe Werte sowohl für die mit dem Antigen (ECFC) restimulierten als auch die unstimulierten Proben im Vergleich zu

einer Mitogen-stimulierten Positivkontrolle. Des Weiteren waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen nachweisbar.

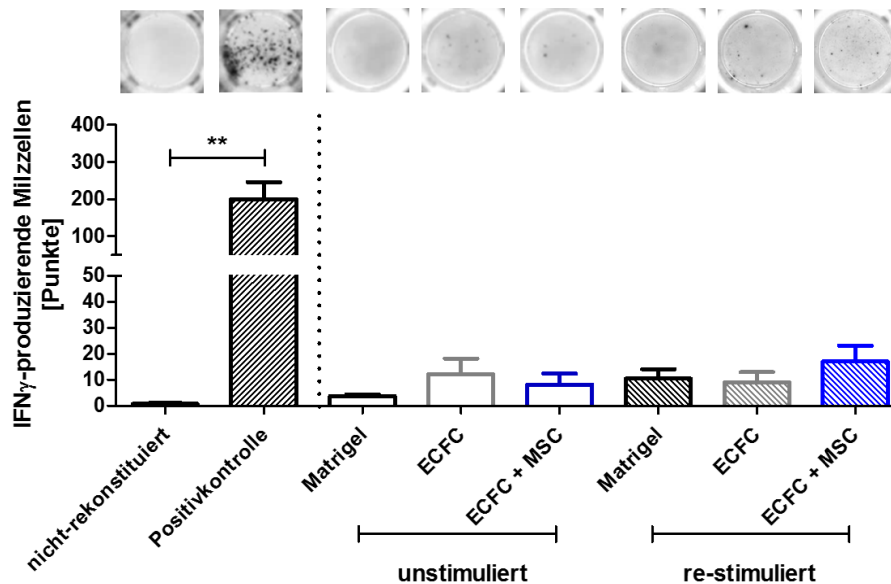


Abbildung 48: Nachweis von humanen IFN γ -produzierenden Gedächtniszellen in der Milz von rekonstituierten NSG Mäuse

Humane IFN γ -produzierende Zellen aus der Milz von NSG Mäusen wurden mit Hilfe eines human-spezifischen EliSpot-Assay untersucht. Der Graph zeigt die Quantifizierung der IFN γ produzierenden Zellen für alle experimentellen Gruppen entweder ohne (Matrigel, n = 2; ECFC, n = 4; ECFC + MSC n = 7) oder mit vorhergehender Restimulation mit ECFCs (Matrigel, n = 5; ECFC, n = 5; ECFC + MSC, n = 7). Als Negativkontrolle wurden Milzzellen von Versuchstieren ohne PBMC Rekonstitution verwendet (n = 2). Als Positivkontrolle wurden ebenfalls Milzzellen von nicht-rekonstituierten Tieren verwendet und nachfolgend mit einem Mitogen stimuliert (n = 3). Die Anzahl der IFN γ -produzierenden Zellen (Punkte) sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine einseitige Varianzanalyse (**p < 0,01).

Zusätzlich wurde in den Transplantaten der Aktivierungsstatus der human-abgeleiteten Gefäßstrukturen durch die Färbung mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und HLA-DR bestimmt. Weiterhin wurden die Transplantate hinsichtlich einer Infiltration humaner CD45⁺ Zellen untersucht (**Abbildung 49**).

Transplantate, die nur ECFCs enthielten zeigten mehr HLA-DR⁺ Gefäße verglichen mit Transplantaten mit einer Kombination von ECFCs und MSCs (**Abbildung 49**, obere Reihe). Im Vergleich zur ECFC-Gruppe waren in Transplantaten, in denen sowohl ECFCs als auch MSCs anwesend waren, weniger humane Leukozyten-Infiltrate nachweisbar (**Abbildung 49**, untere Reihe). Die infiltrierte humanen CD45⁺ Zellen waren in ECFC-Transplantaten häufig assoziiert an humane CD31⁺ Gefäßstrukturen. Auch in Transplantaten mit ECFCs und MSCs konnten vereinzelt humane CD45⁺ Zellen nachgewiesen werden, die jedoch seltener in der Nähe von humanen CD31⁺ vaskulären Strukturen lokalisiert waren.

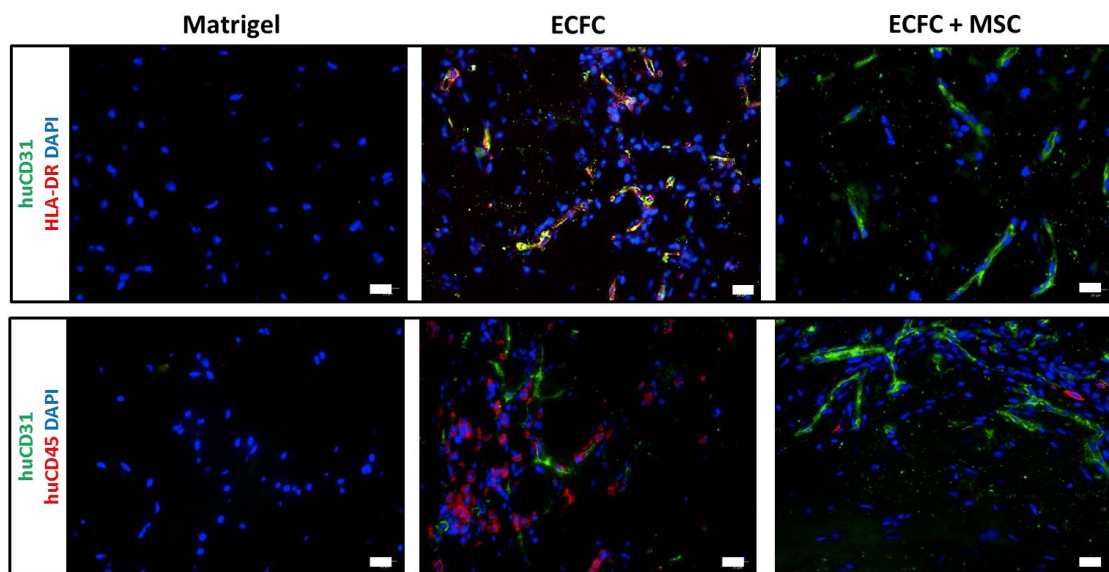


Abbildung 49: Die reduzierte Expression von HLA-DR auf humanen ECFC/MSC-abgeleiteten vaskulären Strukturen führt zu einer verringerten Infiltration von humanen Leukozyten in diese Transplantaten.

Gezeigt sind repräsentative Schnitte von explantierten Matrigel-Transplantaten sechs Wochen nach Injektion in NSG Mäuse und nach der Rekonstitution mit 5×10^6 humanen allopathen PBMCs. Paraffin-Schnitte wurden mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und HLA-DR gefärbt (**obere Reihe**). Die Infiltration von humanen Leukozyten wurde durch die Färbung mit human-spezifischen Antikörpern für CD31 und CD45 analysiert (**untere Reihe**). Der Größenmaßstab entspricht jeweils 20 μm .

4 Diskussion

Endotheliale Vorläuferzellen des Subtyps ECFCs unterstützen die Regeneration und Vaskularisierung von geschädigtem Gewebe. Diese Subpopulation ist jedoch nur in geringer Frequenz in peripherem Blut vertreten und möglicherweise durch chronische Erkrankungen funktionell kompromittiert^{110,111}. Aus der Nabelschnur abgeleitete *ex vivo* kultivierte ECFCs zeigen höhere Proliferationsraten und können, im Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus peripherem Blut, ohne Anzeichen von Seneszenz mehrfach passagiert werden^{19,29,112}. Jedoch handelt es sich bei der Nabelschnur in den meisten Fällen um eine allogene Quelle. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst der Fokus auf die Immunogenität von Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs gelegt. Hinsichtlich der Stabilisierung von mikrovaskulären Netzwerken, profitieren ECFCs von der Koapplikation mit MSCs. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit außerdem funktionelle und immunologische Interaktionen zwischen ECFCs und MSCs unter proinflammatorischen und allogenen Konditionen in *in vitro* und *in vivo* Testsystemen analysiert.

4.1 Humane ECFCs aus der Nabelschnur induzieren allogene Immunantworten *in vitro* und *in vivo*.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs von humanen allogenen PBMCs erkannt werden und T-Zell-Effektor-Funktionen auslösen. Somit zeigen humane ECFCs eine vergleichbare Immunogenität zu bereits charakterisierten Endothelzelltypen wie HUVECs.

Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass ECFCs aus der Nabelschnur in einer signifikant höheren Ausbeute extrahiert werden können und zudem *in vitro* bessere Expansionsraten erzielen als ECFCs, die aus peripherem Blut isoliert wurden²⁹. Jedoch ist die Nabelschnur eine allogene Zellquelle, so dass die Analyse der Immunogenität dieser allogenen ECFCs von therapeutischer Relevanz ist.

In der Literatur wird ausführlich beschrieben, dass HUVECs oder mikrovaskuläre Endothelzellen durch die Interaktion mit Immunzellen regulative bzw. aktivierende Funktionen ausüben. Im Gegensatz zu murinen Endothelzellen können humane Endothelzellen MHC Klasse II Moleküle induzieren. Humane Endothelzellen zeigen keine Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 (und CD86), welches konstitutiv von

professionellen APCs und murinen Endothelzellen exprimiert wird¹¹³. Die Zellen weisen jedoch ein anderes ko-stimulatorisches Molekül auf, nämlich LFA-3 (eng. Lymphocyte function-associated antigen 3), wodurch sie in der Lage sind Gedächtnis T-Zell-Antworten auszulösen, nicht aber naive T-Zellen zu aktivieren^{114,115}. Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , TNF α und IL- β durch verschiedene Immunzellen sowie die Interaktion von T-Zellen mit den von Endothelzellen exprimierten MHC- und Adhäsionsmolekülen ist für die nachfolgend initiierte Immunreaktion von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs in einem experimentell induzierten proinflammatorischen Milieu (nach Stimulation mit den Zytokinen IFN γ , TNF α und IL-1 β) das Adhäsionsmolekül ICAM-1 hochregulieren. ICAM-1 interagiert mit dem Integrin LFA-1, welches von T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und B-Zellen exprimiert wird. Die Interaktion der Moleküle führt zur Adhäsion von verschiedenen Immunzellen an Endothelzellen und initiiert so die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel. Die Stimulation mit TNF α und IL-1 β , nicht aber eine Stimulation mit IFN γ , führte in ECFC-Kulturen zur Induktion des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Wechselwirkungen von VCAM-1 mit VLA-4 (eng. Very Late Antigen-4) sind maßgeblich an der Rekrutierung von Immunzellen aus der Blutzirkulation beteiligt¹¹⁶. Demzufolge wurde nachgewiesen, dass eine Inhibition von ICAM-1 und VCAM-1 zu einer unzureichenden Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom und damit zu einer reduzierten Immunantwort führt¹¹⁷. Daraus kann geschlossen werden, dass ECFCs unter inflammatorischen Konditionen durch die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen die Transmigration von Lymphozyten in das Gewebe fördern. Andererseits wurde gezeigt, dass die Expression von ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen für die Expansion von regulatorischen T-Zellen entscheidend ist, so dass ICAM-1 neben proinflammatorischen Funktionen auch an regulativen Prozessen beteiligt sein kann¹¹⁸. Des Weiteren wurde durch d'Audigier *et al.* belegt, dass humane ECFCs nach TNF α -Stimulation das Oberflächenmolekül Faktor III (eng. Tissue factor, TF) hochregulieren und damit die Thrombinfreisetzung induzieren¹¹⁹, so dass es zur Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors und in der Folge zur Rekrutierung von Leukozyten in ischämische Gebiete kommt¹²⁰.

Humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs sowie reife Endothelzellen exprimieren konstitutiv MHC-Klasse I Moleküle (HLA-ABC) und erhöhen die Expression des Moleküls nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen. Die Kombination von ECFCs mit *in vitro* generierten HLA-ABC-restringierten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) demonstrierte, dass ECFCs bereits ohne Zytokin-Stimulation durch CTLs attackiert und lysiert werden können. Diese experimentellen Daten werden durch Studien mit reifen Endothelzellen gestützt, die zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen allogene Endothelzellen über die konstitutive Expression von HLA-ABC Molekülen erkennen und infolgedessen IL-2 und IFN γ sekretieren¹¹⁵. Im Vergleich zur Lyse von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (B-Zell-Blasten) wurden ECFCs durch HLA-ABC spezifische CD8⁺ T-Zellen weniger stark lysiert. Dieser Effekt ist vermutlich u.a. auf eine geringere HLA Moleküldichte und die Abwesenheit von ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 auf ECFCs im Vergleich zu professionellen APCs zurückzuführen.

Neben der CTL-vermittelten Apoptose kann die Lyse von Endothelzellen außerdem durch Fas-Rezeptor/Fas-Ligand-Interaktionen oder durch NK-Zell-vermittelte Effekte induziert werden. Verglichen mit unstimulierten PBMCs, wurde in Überständen von PBMC-Kokulturen mit IFN γ -stimulierten ECFCs, eine erhöhte Konzentration des löslichen Fas-Liganden nachgewiesen. Außerdem zeigten IFN γ -stimulierte ECFCs im Vergleich zu unstimulierten ECFCs eine erhöhte FAS-Rezeptor-Moleküldichte (Daten nicht gezeigt). Fas-Ligand wird von aktivierten T-Zellen exprimiert oder kann als verkürztes Produkt in seiner löslichen Form abgespalten werden^{121,122}. In der Literatur wird beschrieben, dass für die FAS-vermittelte Apoptose durch T-Zellen die vorherige Behandlung der Endothelzellen mit IFN γ erforderlich ist, um die FAS-Rezeptor- und Procaspase 8-Expression sowie die MHC Klasse I-Moleküldichte auf den Zielzellen effektiv zu erhöhen¹²³. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene verstärkte Expression von FAS-Rezeptormolekülen auf IFN γ -stimulierten ECFCs sowie die nachgewiesene erhöhte Konzentration des löslichen FAS-Liganden in Überständen von PBMC-Kokulturen, deuten darauf hin, dass ECFCs unter inflammatorischen Bedingungen von T-Zellen FAS-abhängig lysiert werden. Studien mit CD34⁺ abgeleiteten humanen ECFCs belegen außerdem, dass nach der Stimulation mit IFN γ und TNF α die Expression des Chemokins Fraktalkin auf ECFCs induziert wird und die Zellen somit zum Ziel von NK-Zellen werden¹²⁴. Eigene experimentelle Daten zeigten weiter, dass ECFCs konstitutiv MHC class I polypeptide-related sequence A/B (MIC A/B) exprimieren (Daten nicht gezeigt), so dass es

naheliegender ist, dass diese durch den von NK-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen exprimierten NKG2D-Rezeptor erkannt werden können.

Im Gegensatz zum murinen System exprimieren Endothelzellen im humanen Organismus unter physiologischen Bedingungen konstitutiv MHC Klasse II-Moleküle^{125–127}. *Ex vivo* kultivierte Endothelzellen sind hingegen MHC Klasse II (HLA-DR)-negativ, können jedoch durch Stimulation mit IFN γ die Expression re-induzieren¹²⁸. Die hier untersuchten ECFC-Kulturen zeigten ebenfalls nach Zugabe von IFN γ eine dosisabhängige Induktion des HLA-DR-Moleküls. Es wurde in dieser Arbeit zudem bestätigt, dass die HLA-DR-Expression in direktem Zusammenhang mit CD4⁺ T-Zell-Effektor-Funktionen wie Proliferation und Zytokinsekretion steht. So konnte durch Immunzellkultur-Experimente mit ECFCs und HUVECs eindeutig nachgewiesen werden, dass ausschließlich IFN γ -stimulierte Endothelzellen eine Immunzell-Proliferation induzieren und dass das Ausmaß der Proliferationsinduktion von der verwendeten IFN γ -Konzentration abhängig ist. Die Korrelation der HLA-DR-Moleküldichte auf den ECFCs mit der CD4⁺ T-Zell-Proliferationsinduktion wurde durch Verwendung von neutralisierenden HLA-DR-spezifischen Antikörpern bewiesen. So führte die Ligandierung mit dem Azid-freien HLA-DR-Antikörper in der vorliegenden Arbeit zur signifikanten Suppression der CD4⁺ T-Zell-Proliferation. Studien einer anderen Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass ECFCs und HUVECs desselben Spenders gleichermaßen die Proliferation von separierten CD4⁺ T-Zellen induzieren und in allogenen rekonstituierten Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Mäusen vollständig rekonstituiert werden¹²⁹. Kritisch ist jedoch anzumerken, dass die Verwendung einer Dosis von 1×10^8 humanen allogenen PBMCs für die Rekonstitution der Versuchstiere in der genannten Studie zu einer massiven xenogenen Graft versus Host Disease (GvHD) geführt haben muss und damit die Beobachtung von spezifischen allogenen Reaktionen vermutlich erschwert waren. Andere Arbeiten verwendeten eine entsprechend geringere Konzentration von 1×10^7 allogenen Immunzellen, um den Einfluss von regulatorischen T-Zell-Populationen auf eine induzierte GvHD in NSG-Mäusen zu untersuchen^{130,131}. In dem von uns etablierten humanisierten ECFC-Allograft-Modell wurde die in der Literatur beschriebene Dosis von 1×10^7 humanen allogenen PBMCs auf 5×10^6 herabgesetzt, so dass GvHD-vermittelte Effekte minimiert werden konnten. Nach Rekonstitution der Mäuse mit dieser Dosis konnten in ECFC-haltigen Transplantaten humane Leukozyten detektiert werden, die zu den implantierten ECFCs migrierten und sich an die

induzierten humanen Gefäßstrukturen lagerten. Weiter wurde beobachtet, dass die verstärkte Migration von humanen Leukozyten vornehmlich bei gleichzeitiger Expression von HLA-DR im Transplantat erfolgte. Andere publizierte Daten zeigen zudem, dass sowohl ECFCs als auch HUVECs relevante ko-stimulatorische Moleküle, wie beispielsweise LFA-3 und CD40, exprimieren und damit in der Lage sind Gedächtnis T-Zellantworten effektiv zu induzieren^{129,132}. Somit konnten diese und andere Studien^{129,133} belegen, dass ECFCs von allogenen Immunzellen erkannt werden und *in vitro* sowie *in vivo* ähnliche Charakteristika wie HUVECs bezüglich der Immunogenität und Fremderkennung aufweisen.

4.2 Die Kokultur von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSCs beeinflusst funktionelle Eigenschaften beider Zelltypen.

Humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs besitzen Stammzell-typische Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und eine hohe klonale Proliferationskapazität. Außerdem zeigen die Zellen therapeutisch relevante proangiogene Effekte^{134,135}. Interessanterweise kann die Kombination von Endothelzellen mit Perizyten, glatten Muskelzellen oder MSCs zur Verstärkung dieser therapeutischen Effekte führen und zudem eine neue funktionelle Eigenschaft induzieren – nämlich die Vaskulogenese. Neben der Koapplikation von ECFCs und MSCs für die therapeutische Induktion der Angiogenese, welche zu einer verbesserten Durchblutung innerhalb ischämischer Regionen führt¹³⁶, konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Kombination von Endothelzellen mit mesenchymalen Zellen vaskulogene Prozesse fördert^{53,137,138}. In dem von uns verwendeten *in vivo*-Vaskulogenese-Modell konnte gezeigt werden, dass sowohl ECFC/MSC-haltige Transplantate als auch ECFC-Transplantate ohne MSCs humane Gefäßnetzwerke induzieren, welche erfolgreich an die Blutzirkulation der NSG-Mäuse angeschlossen werden. Diese humanen, für den Endothel-spezifischen Marker CD31 positiven, Gefäßstrukturen waren drei Wochen nach Injektion der Zellsuspensionen in den Transplantaten etabliert und mindestens für sechs Wochen stabil. *Au et al.* zeigen außerdem, dass Nabelschnurblut abgeleitete ECFCs in Kombination mit MSCs in subkutanen Transplantaten Gefäßnetzwerke induzieren, die über vier Monate stabil waren. In der gleichen Studie wurden Gefäßnetzwerke unter Verwendung von PB-abgeleiteten ECFCs mit MSCs induziert und nachgewiesen, dass es bereits nach drei Wochen zur Regression der humanen Gefäßnetzwerke kam¹³⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Transplantate mit einer Kombination von ECFCs und MSCs effektiv humane Gefäßnetzwerke induzieren und dass diese humanen CD31⁺ Gefäßstrukturen abluminal durch α SMA⁺ perivaskuläre Zellen stabilisiert werden. Damit wurden publizierte experimentelle Daten bestätigt, die belegen, dass MSCs nach dem Kontakt mit Endothelzellen in einen Perizyten-ähnlichen Phänotyp differenzieren, der u.a. durch die Expression des Markers α SMA und die Fähigkeit zur perivaskulären Stabilisierung von Blutgefäßen *in vivo* gekennzeichnet ist¹⁴⁰.

Weiterhin wurde in der Literatur beschrieben, dass die Inhibition der Endothelzell-Proliferation durch mesenchymale Zellen oder Perizyten einen notwendigen Schritt innerhalb des Prozesses der Reifung und Stabilisierung von Gefäßstrukturen darstellt¹⁴¹. In Übereinstimmung damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *in vitro*-Kokultur von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSCs die Proliferation der Endothelzellen unterbindet. Andererseits belegen Studien, dass humane ECFCs ihrerseits die Proliferationsrate von MSCs erhöhen¹⁴² und trophische Faktoren sekretieren, die das Überleben und die Rekrutierung von MSCs in Transplantaten fördern⁵².

In dem hier beschriebenen *in vivo* Vaskulogenese-Modell wurde zusätzlich gezeigt, dass humane Gefäßnetzwerke, die ausschließlich von ECFCs induziert wurden, weniger komplex organisierte Blutgefäße entwickelten, die seltener mit α SMA⁺ perivaskulären Zellen assoziiert waren. Die vereinzelte Detektion von α SMA⁺ Zellen (Daten nicht gezeigt) in ECFC-Transplantaten könnte durch endotheliale-mesenchymale Transition (EndoMT)¹⁴³ und einer damit einhergehenden TGF β -induzierten α SMA-Expression auf den Endothelzellen erklärt werden^{144,145}.

Die Kokultur von MSCs und ECFCs führte außerdem zu einer veränderten Zytokinsekretion gegenüber den Monokulturen beider Zelltypen. So wurde in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich zu MSC-Monokulturen, eine signifikant erhöhte IL-8-Konzentration in Zellkulturüberständen der ECFC/MSC-Kulturen nachgewiesen. In Relation zu ECFC- und MSC-Monokulturen konnten außerdem signifikant höhere Konzentrationen des Zytokins IL-6 in den Überständen von Kokulturen detektiert werden. Die Zytokine IL-6 und IL-8 vermitteln u.a. proangiogene Effekte und induzieren die endotheliale Proliferation sowie die Rekrutierung von EPCs zu ischämischen Gebieten^{146,147}. Daraus kann geschlossen werden, dass ECFC/MSC-Kokulturen ein proangiogenes Milieu fördern. Des Weiteren konnte

eine erhöhte Konzentration des Wachstumsfaktors TGF- β detektiert werden. Die Anwesenheit von aktivem TGF- β im Überstand von ECFC/MSC-Kokulturen deutet auf vaskulogene und gefäß-stabilisierende funktionelle Eigenschaften einer solchen Kokultur hin. Insgesamt weisen die hier diskutierten experimentellen Daten darauf hin, dass angiogene und vaskulogene Effekte durch interaktive Prozesse zwischen ECFCs und MSCs von klinischem Interesse für die Therapie von unzureichender Vaskularisierung in ischämischen Regionen oder für die Etablierung von prä-vaskularisierten Implantaten sein können.

4.3 Kokulturen von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSCs zeigen *in vitro* und *in vivo* eine reduzierte Immunogenität.

Während synergistische Effekte hinsichtlich der Unterstützung von angiogenen und vaskulogenen Prozessen durch eine ECFC/MSC-Koapplikation in der Literatur sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Testsysteme ausführlich dokumentiert wurden (siehe Abschnitt 4.2), ist die immunologische Interaktion der beiden Zelltypen nur selten adressiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Immunogenität von ECFC/MSC-Kokulturen untersucht und erstmals gezeigt, dass mit MSCs kokultivierte ECFCs durch die Regulation von immunologisch relevanten Molekülen sowie durch MSC-vermittelte immunsupprimierende Effekte eine deutlich reduzierte Immunogenität aufweisen. Wie bereits diskutiert wurde, ist die therapeutische Nutzung von allogenen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs wünschenswert, doch ist die Verwendung dieses proliferativen und regenerativen Zelltyps durch die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Immunogenität eingeschränkt. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit weiterführend die Hypothese formuliert, dass MSCs nicht nur durch die direkte Interaktion mit Immunzellen oder durch lösliche Faktoren immunsuppressiv agieren, sondern zusätzlich die Immunogenität von kokultivierten Endothelzellen modulieren können. Überraschenderweise wurde dabei nicht nur die Immunogenität von ECFCs maßgeblich reduziert sondern auch immunologische Eigenschaften von kokultivierten MSCs beeinflusst.

4.3.1 Die verringerte HLA-ABC-Expression auf ECFCs in Kokultur mit MSCs führt zur reduzierten Lyse durch HLA-ABC-restringierte zytotoxische CD8⁺ T-Zellen

Humane Nabelschnur-abgeleitete ECFCs und MSCs exprimieren konstitutiv HLA-ABC und verstärken die Expression des Moleküls nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (hier TNF α , IL-1 β und IFN γ).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Kokulturen beider Zelltypen eine reduzierte HLA-ABC-Moleküldichte auf kokultivierten ECFCs, nicht aber auf kokultivierten MSCs im Vergleich zu ECFC-Monokulturen nachgewiesen werden. Es ist anzumerken, dass die reduzierte Expression des MHC Klasse I Moleküls sowohl ohne proinflammatorischen Stimulus als auch nach Zytokinstimulation auf ECFCs in Kokultur nachweisbar war. Außerdem konnte durch Transwell-Experimente belegt werden, dass es sich bei der Reduktion der HLA-ABC-Expression um einen kontaktabhängigen Prozess handelt. Wurden solche kokultivierten ECFCs und MSCs mit HLA-ABC-spezifischen CTLs kombiniert und die induzierte spezifische Lyse bestimmt, so konnte gezeigt werden, dass 48 Stunden vorkultivierte ECFC/MSC-Kokulturen im Vergleich zu der entsprechenden ECFC-Monokultur signifikant weniger lysiert wurden. Frühere experimentelle Daten aus dieser Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die Verwendung von intrazellulär exprimierten anti-MHC Klasse I Antikörpern (Intrabodies) erfolgreich die endotheliale HLA-ABC-Oberflächenexpression supprimiert und infolgedessen die zytotoxische Lyse durch CD8⁺ T-Zellen reduziert¹⁴⁸. Studien von Montesinos *et al.* mit MSCs, die aus kanzerogenem, zervikalem Gewebe isoliert wurden und mit einer epithelialen Tumorzelllinie kokultiviert wurden, zeigten ebenfalls eine verminderte HLA-ABC-Expression auf dem epithelialen Zelltyp. Die Autoren weisen in der Studie zudem nach, dass es dadurch zu einer signifikant reduzierten CD8⁺ T-Zell-vermittelten zytotoxischen Lyse kam¹⁴⁹. Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten, beschreiben die Autoren eine IL-10 vermittelte Herunterregulation der MHC Klasse I-Expression. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch Neutralisation von IL-10 im Zellkulturüberstand die zytoprotektiven Effekte wieder aufgehoben werden. Entsprechend konnten in der gleichen Studie durch Hinzufügen von rekombinantem IL-10 in Abwesenheit von MSCs eine reduzierte zytotoxische Lyse von epithelialen Tumorzellen nachgewiesen werden¹⁴⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen beobachtet, dass die Konditionierung von Kulturüberständen durch MSCs die zytotoxische Lyse von ECFCs nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), wodurch die

Kontaktabhängigkeit dieses zytoprotektiven Effekts weiter untermauert wird. Auch wurde in ECFC/MSC- und MSC-konditionierten Überständen kein IL-10 detektiert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Reduktion der HLA-ABC-Expression auf ECFCs in Kokultur mit MSCs, sowie die damit verbundene verminderte zytotoxische Lyse, nicht durch IL-10 vermittelt wird und dass es sich hierbei um einen kontaktabhängigen Effekt handelt.

4.3.2 Die Reduktion von HLA-DR-Molekülen auf kokultivierten ECFCs und MSCs führt zur verminderten T-Zell-Proliferation und zur reduzierten Infiltration von humanen Leukozyten in ECFC/MSC-haltige Transplantate.

In dieser Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass IFN γ -stimulierte ECFCs und MSCs die Expression von MHC Klasse II-Molekülen signifikant reduzieren. Anders als bei der MHC Klasse I-Expression konnte eine Reduktion der HLA-DR-Moleküldichte sowohl auf ECFCs als auch auf MSCs innerhalb der Kokultur detektiert werden. Es wurde berichtet, dass Endothelzellen nach der Rekrutierung von perivaskulären Zellen die Produktion von Basalmembran-Komponenten wie Kollagen (I und IV), Laminin, Nidogen 1, Perlecan und Fibronectin anregen^{150,151}. Methe *et al.* zeigten weiter, dass in Matrix eingebettete Endothelzellen eine signifikant geringere HLA-DR-Expression aufweisen und infolgedessen eine reduzierte allogene Immunantwort *in vitro* und *in vivo* induzieren^{152,153}. Es ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit nach einer insgesamt fünftägigen Kultur von ECFCs mit MSCs die enzymatische Dissoziation durch Trypsin nicht mehr erfolgreich war und daher zur Vereinzelung Kollagenase IV verwendet werden musste. Die Produktion von Matrix-Komponenten durch ECFC/MSC-Kokulturen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail experimentell analysiert. Dennoch deutet diese Beobachtung darauf hin, dass die Synthese von EZM-Komponenten in den ECFC/MSC-Kokulturen eine potentielle Ursache für die detektierte reduzierte HLA-DR-Expression in ECFC/MSC-Kokulturen darstellen könnte. Durch die Verwendung von Transwell-Kokulturen mit ECFCs und MSCs wurde ferner bewiesen, dass die Verminderung der HLA-DR-Moleküldichte sowohl auf ECFCs als auch MSCs ebenfalls kontaktabhängig ist. Die Korrelation des endothelialen HLA-DR-Expressionsniveaus mit dem Ausmaß der induzierten CD4⁺ T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion wurde bereits in vorherigen Abschnitten diskutiert. Im Gegensatz zu den von uns beobachteten und in der Literatur beschriebenen Effekten bezüglich der endothelialen HLA-DR-abhängigen Induktion der CD4⁺ T-Zell-Proliferation, führt die erhöhte

HLA-DR-Moleküldichte in IFN γ -stimulierten MSC-Monokulturen nicht zu einer Proliferationsinduktion in Immunzell-Kokultur-Experimenten. Aus welchem Grund MSCs trotz Anwesenheit von IFN γ -induzierten HLA-DR-Molekülen auf der Zelloberfläche nicht in der Lage sind CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren, ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Studien zeigen jedoch, dass MHC Klasse II-Moleküle auf z.B. Monozyten oder dendritischen Zellen neben ihrer Antigen-präsentierenden Funktion immunmodulierende Effekte vermitteln können^{154,155}. So ist beschrieben worden, dass Monozyten nach HLA-DR-Bindung eine Anergie von T-Zellen induzieren können¹⁵⁴. Andere regulative Funktionen des HLA-DR Moleküls wurden bezüglich der Apoptose von APCs beschrieben. Die Induktion der Apoptose von reifen DCs wird demzufolge nicht durch Fas-Rezeptor/-Ligand-Interaktionen vermittelt, sondern erfolgt durch einen alternativen MHC Klasse II-vermittelten Signalweg^{155–157}.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem beobachtet, dass die Kokultur von IFN γ -stimulierten MSCs mit PBMCs im Vergleich zu PBMC-Monokulturen einen signifikant höheren Anteil an CD14⁺ Monozyten bzw. Makrophagen aufweisen. In solchen MSC/PBMC-Kokulturen war darüber hinaus verglichen mit ECFC/PBMC-Kokulturen eine erhöhte IL-1 β -Konzentration im Überstand nachweisbar. Interessanterweise wurde in der Literatur IL-1 β als notwendiger Faktor für die Aktivierung der immunmodulativen Eigenschaften von MSCs beschrieben. Die Autoren weisen in dieser Studie nach, dass für die effektive MSC-vermittelte Suppression der T-Zell-Proliferation zunächst die Aktivierung der MSCs durch IL-1 β sowie die Anwesenheit von CD14⁺ Zellen erforderlich ist¹⁵⁸.

Weiterführende Experimente zur Charakterisierung dieser immunologisch relevanten interaktiven Prozesse zwischen ECFCs und MSCs konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass für eine effektive Vermittlung der immunsuppressiven Effekte die Anwesenheit von MSCs während der IFN γ Stimulations-Phase und während der PBMC-Kokultur-Phase essentiell ist. Es wurde außerdem belegt, dass die Suppression der Immunzellproliferation in ECFC/MSK-Kokulturen IDO-abhängig ist. So führte die Behandlung von ECFC/MSK-Kokulturen mit dem Inhibitor 1-Methyltryptophan zur Wiederherstellung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation in den untersuchten Kokulturen. Ferner konnte keine veränderte Immunzellproliferation in ECFC/MSK-Immunzell-Kokulturen nach der Behandlung mit dem Inhibitor des Prostaglandin-Signalweges Indometacin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die in der Literatur beschriebene Bedeutung von PEG-2 für die Vermittlung der

Immunsuppression von Nabelschnur-abgeleiteten MSCs¹⁵⁹ konnte in dieser Arbeit daher experimentell nicht bestätigt werden. Eine Beteiligung des Enzyms IDO an IFN γ -induzierten immunsuppressiven MSC-vermittelten Effekten wurde bereits durch Wang *et al.* beschrieben. Die Autoren konnten in ihrer Studie überzeugend belegen, dass MSCs für die erfolgreiche Vermittlung von immunsuppressiven Effekten auf die Aktivität von IDO und die IFN γ -Sekretion durch CD8⁺ T-Zellen angewiesen sind¹⁶⁰.

Um die funktionelle Konsequenz der detektierten stark reduzierten HLA-DR-Expression in IFN γ -stimulierten ECFC/MSC Kokulturen *in vitro* zu analysieren, wurden Immunzell-Kokultur-Experimente durchgeführt und eine nahezu vollständig supprimierte T-Zellantwort nachgewiesen. Analog dazu wurden *in vivo* bei einer subkutanen Koapplikation beider Zelltypen, gefolgt von einer Rekonstitution mit humanen allogenen PBMCs, weniger HLA-DR⁺ Gefäßstrukturen und weniger infiltrierende CD45⁺ humane Leukozyten detektiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die Kokultur von humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs mit MSCs desselben Spenders die Expression von HLA-Molekülen signifikant reduziert und infolgedessen die Aktivierung von allogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen supprimiert. Es ist weiterhin anzumerken, dass die Reduktion der HLA-Moleküldichte auch dann nachweisbar war, wenn ECFCs und MSCs von verschiedenen Spendern verwendet wurden, nicht aber, wenn MSCs einer anderen Quelle, beispielweise dem Knochenmark, für die Experimente herangezogen wurden. Nach der Ko-Transplantation beider Zelltypen (aus der Nabelschnur) in einem humanisierten Allograft-Mausmodell wurde ein entsprechend verminderter Aktivierungsstatus (HLA-DR-Expression) auf den induzierten humanen Gefäßstrukturen detektiert, welcher vermutlich für die reduzierte Infiltration von humanen Leukozyten in die Transplantate verantwortlich war.

4.4 Strategien zur Modulation der Immunogenität von Endothelzellen

In der vorliegenden Studie konnte erfolgreich das Konzept einer potentiellen therapeutischen Nutzung von allogenen humanen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs in Kombination mit immunsuppressiven MSCs zur Reduktion der Allo-Immunogenität der ko-applizierten ECFCs etabliert werden. Außerdem wurde hier erstmals gezeigt, dass die wechselseitige Regulation von HLA-DR-Molekülen auf beiden Kokultur-Partnern für die Verminderung der Immunogenität der ECFCs von entscheidender Bedeutung ist.

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass endotheliale Vorläuferzellen aus der Ratte, die von embryonalen Stammzellen (eng. Embryonic Stem Cells, ESCs) abgeleitet wurden und kein MHC Klasse II exprimierten, eine stark verminderte Immunantwort induzieren und *in vivo* nicht rejiziert wurden^{161,162}. Eine aktuelle Studie stellte außerdem überzeugende Daten vor, die belegen, dass die Blockierung der HLA-DR-Expression entweder durch siRNA-Knockdown oder durch ein spezifisches CRSPR/cas9-System zur Reduktion einer akuten Rejektion von Endothelzellhaltigen Transplantaten führt. Weiterhin wird in dieser Studie beschrieben, dass die endotheliale HLA-DR-Expression Einfluss auf die Differenzierung von CTLs aus CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nimmt und dass die experimentelle Inhibition des HLA-DR-Moleküls, CTL-vermittelte endotheliale Schäden im Transplantat reduziert¹⁶³. Andere Ansätze zur Modulation der Immunogenität fokussieren auf die Blockierung von kostimulatorischen Signalen oder wie bereits beschrieben auf die Reduktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen¹⁶⁴. Weitere Strategien beinhalten die Gewinnung von autologen Endothelzellen unter Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (eng. induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) zur Vermeidung einer unerwünschten Allo-Immunogenität^{165,166}. Kürzlich wurde ein Protokoll publiziert, dass die Generierung von iPSC-abgeleiteten stark proliferativen ECFCs über den Marker Neuropelin-1 ermöglicht⁹⁰. Eine weitere Methode beschreibt die simultane Differenzierung von Endothelzellen und Perizyten aus iPSCs¹⁶⁷. Es muss jedoch grundsätzlich angemerkt werden, dass die Stabilität des induzierten Phänotyps häufig unzureichend und problematisch ist (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist durch eine potentiell verminderte Integrität der Ausgangspopulation in erkrankten Individuen die therapeutische Nutzung von autologen Quellen kritisch zu betrachten. Zudem kann es je nach verwendeter Reprogrammierungsstrategie zu Chromosomen-Aberrationen kommen, die ihrerseits zu therapeutisch unerwünschten Effekten führen können.^{165,168}

Insgesamt stellt das in der vorliegenden Arbeit präsentierte Konzept zur Reduktion der Immunogenität von allogenen Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs durch die Koapplikation mit immunsuppressiven MSCs eine vielversprechende Strategie zur Nutzung dieser allogenen Zellquelle dar. Die in der Literatur beschriebene Manipulation von immunologisch wichtigen Molekülen zeigt, dass die Immunogenität von allogenen Endothelzellen in Transplantations-relevanten Umgebungen beeinflussbar ist. In dieser Arbeit konnten eindeutig interaktive

Prozesse zwischen ECFCs und MSCs nachgewiesen werden, die sich *in vitro* in einer deutlichen Suppression von T-Zell-Effektor-Funktionen manifestierten und in kombinierten Zell-Transplantaten *in vivo* zu einer verbesserten Akzeptanz der koapplizierten Zellen sowie zu einer verbesserten Vaskularisierung führten.

Anhang

Literaturverzeichnis

1. Sabin FR. Studies on Blood: the Vitrally Stainable Granules As a Specific Criterion for Erythro- Blasts and the Differentiation of ,the Three Strains of the White Blood-Cells As Seen in the Living Chick'S Yolk-Sac. *John Hopkins Hosp Bull.* 1921;(368):314-321.
2. Ferkowicz MJ, Yoder MC. Blood island formation: Longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol.* 2005;33(9):1041-1047.
3. Maximow AA. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev.* 1924;IV(4):533-563.
4. Murray PDF. The Development in vitro of the Blood of the Early Chick Embryo. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1932;111(773):497-521.
5. Choi K, Kennedy M, Kazarov a, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125(4):725-732.
6. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature.* 2004;432(7017):625-630.
7. Padron-Barthe L, Temino S, Villa del Campo C, et al. Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo. *Blood.* 2014;124(16):2523-2532.
8. Kinder SJ, Loebel DA, Tam PP. Allocation and early differentiation of cardiovascular progenitors in the mouse embryo. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11(5):177-184.
9. Ueno H, Weissman IL. Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell.* 2006;11(4):519-533.
10. Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy a, Tam PP. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development.* 1999;126(21):4691-4701.
11. Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997;173(2):206-210.
12. Skalak TC. Angiogenesis and microvascular remodeling: a brief history and future roadmap. *Microcirculation.* 12(1):47-58.
13. Asahara T, Murohara T, Sullivan a, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(1997):964-967.
14. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
15. Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi A a. Endothelial Progenitor Cells as Putative Targets for Angiostatin Advances in Brief Endothelial Progenitor Cells as Putative Targets for Angiostatin. *Cancer Res.* 1999:5875-5877.
16. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111(22):2981-2987.
17. Prater DN, Case J, Ingram D a, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia.* 2007;21(6):1141-1149.
18. Rohde E, Malischnik C, Thaler D, et al. Blood monocytes mimic endothelial progenitor

-
- cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):357-367.
19. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-1809.
 20. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107(8):1164-1169.
 21. Zhang SJ, Zhang H, Wei YJ, et al. Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture. *Cell Res*. 2006;16(6):577-584.
 22. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase / Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108(3):365-366.
 23. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, et al. Vessel wall – derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;105(7):2783-2786.
 24. Hur J, Yoon C-HH, Kim H-SS, et al. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):288-293.
 25. Kim H, Prasain N, Vemula S, et al. Human platelet lysate improves human cord blood derived ECFC survival and vasculogenesis in three dimensional (3D) collagen matrices. *Microvasc Res*. 2015;101:72-81.
 26. Critser PJ, Voytik-Harbin SL, Yoder MC. Isolating and defining cells to engineer human blood vessels. *Cell Prolif*. 2011;44(November 2009):15-21.
 27. Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res*. 2003;92(9):1049-1055.
 28. Richardson MR, Yoder MC. Endothelial progenitor cells: Quo Vadis? *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(2):266-272.
 29. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-2760.
 30. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;106(9):1133-1139.
 31. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif*. 1970;3(4):393-403.
 32. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik N V, Panasyuk AF, Keiliss-Borok I V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-340.
 33. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal Cell Contributions to the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):239-253.
 34. Caplan A. Mesenchymal stem cells. In: *Regenerative Nephrology*. ; 1991:153-166.
 35. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.
 36. Blocki A, Wang Y, Koch M, et al. Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis.

-
- Stem Cells Dev.* 2013;22(17):2347-2355.
37. Bosch J, Houben AP, Radke TF, et al. Distinct differentiation potential of “MSC” derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells? *Stem Cells Dev.* 2012;21(11):1977-1988.
 38. Crisan M, Huard J, Zheng B, et al. Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2008;Chapter 2:Unit 2B.2.1-2B.2.13.
 39. Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation.* 2005;112(2):214-223.
 40. Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, et al. Preconditioning of Stem Cells by Oxytocin to Improve Their Therapeutic Potential. *Endocrinology.* 2012;153(11):5361-5372.
 41. Kinzebach S, Dietz L, Klüter H, Thierse H-J, Bieback K. Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2013;14:48.
 42. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008;3(4):e1886.
 43. Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, Tonak M, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(17-18):2199-2212.
 44. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076-1084.
 45. Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med.* 2012;18(5):759-765.
 46. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3037-3042.
 47. Bruno S, Grange C, Collino F, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33115.
 48. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-1822.
 49. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2007;21(8):1733-1738.
 50. Remberger M, Ackefors M, Berglund S, et al. Improved survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in recent years. A single-center study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1688-1697.
 51. Schweizer R, Kamat P, Schweizer D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner. *Cytotherapy.* 2014;16(10):1345-1360.
 52. Lin R-Z, Moreno-Luna R, Li D, Jaminet S-C, Greene AK, Melero-Martin JM. Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2014;111(28):10137-10142.
53. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang S-YY, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res*. 2008;103(2):194-202.
 54. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-313.
 55. Murray IR, West CC, Hardy WR, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(8):1353-1374.
 56. Zebardast N, Lickorish D, Davies JE. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. *Organogenesis*. 2010;6(4):197-203.
 57. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-2299.
 58. Allen P, Kang K-T, Bischoff J. Rapid onset of perfused blood vessels after implantation of ECFCs and MPCs in collagen, PuraMatrix and fibrin provisional matrices. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(5):632-636.
 59. Lin R-ZZ, Moreno-Luna R, Muñoz-Hernandez R, et al. Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis*. 2013;16(4):735-744.
 60. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(5):630-638.
 61. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):2.
 62. English K, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells: Agents of immune modulation. *J Cell Biochem*. 2011;112(8):1963-1968.
 63. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667-679.
 64. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: What do we know so far? *Biomed Res Int*. 2014;2014:216806.
 65. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-3729.
 66. Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4+ T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(2):333-348.
 67. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, et al. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):34.
 68. Tasso R, Ilengo C, Quarto R, Cancedda R, Caspi RR, Pennesi G. Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):786-793.
 69. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(8):795-806.

70. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu C, Kuroda Y, Mullen Y. Mesenchymal stem cells suppress B cell terminal differentiation. *Exp Hematol*. 2009;37(5):604-615.
71. Zheng G, Ge M, Qiu G, Shu Q, Xu J. Mesenchymal Stromal Cells Affect Disease Outcomes via Macrophage Polarization. *Stem Cells Int*. 2015;2015:989473.
72. Gao S, Mao F, Zhang B, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(3):366-375.
73. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*. 2011;138:4569-4583.
74. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-674.
75. Pedrosa A-R, Trindade A, Fernandes A-C, et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(5):1134-1146.
76. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a006569.
77. Benedito R, Roca C, Sørensen I, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 2009;137(6):1124-1135.
78. Ricard N, Tu L, Le Hiress M, et al. Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2014;129(15):1586-1597.
79. Aragona CO, Imbalzano E, Mamone F, et al. Endothelial Progenitor Cells for Diagnosis and Prognosis in Cardiovascular Disease. *Stem Cells Int*. 2016;2016:8043792.
80. Grisar JC, Haddad F, Gomari FA, Wu JC. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark Med*. 2011;5(6):731-744.
81. Masuda H, Kalka C, Asahara T. Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell*. 2000;13(1):153-160.
82. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1527-1536.
83. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(10):1311-1325.
84. Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Radiat Med*. 2002;3(2002):221-225.
85. Kawamoto A, Gwon H, Iwaguro H, et al. Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circulation*. 2001.
86. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*. 2006;114(20):2163-2169.
87. Kushner E, Van Guilder G, MacEneaney O, et al. Ageing and endothelial progenitor cell release of proangiogenic cytokines. *Age Ageing*. 2010;39(2):268-272.
88. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-1219.
89. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MKC. Strikingly different angiogenic

- properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(6):660-668.
90. Prasain N, Lee MR, Vemula S, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1151-1157.
 91. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007;109(11):4761-4768.
 92. Au P, Daheron L, Duda D, Cohen K. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*. 2008;111(3):1302-1305.
 93. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*. 2008;111(9):4551-4558.
 94. Reinisch A, Hofmann NA, Obenauf AC, et al. Humanized large-scale expanded endothelial colony – forming cells function in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;113(26):6716-6725.
 95. Kung EF, Wang F, Schechner JS. In vivo perfusion of human skin substitutes with microvessels formed by adult circulating endothelial progenitor cells. *Dermatologic Surg*. 2008;34(2):137-146.
 96. Shepherd BR, Enis DR, Wang F, Suarez Y, Pober JS, Schechner JS. Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB J*. 2006;20(10):1739-1741.
 97. Liu Y, Teoh S-H, Chong MSK, et al. Vasculogenic and osteogenesis-enhancing potential of human umbilical cord blood endothelial colony-forming cells. *Stem Cells*. 2012;30(9):1911-1924.
 98. Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1667-1677.
 99. Seebach C, Henrich D, Kähling C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1961-1970.
 100. Seebach C, Henrich D, Schaible A, et al. Cell-based therapy by implanted human bone marrow-derived mononuclear cells improved bone healing of large bone defects in rats. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(9-10):1565-1578.
 101. Alexander I, Edelman E, Methe H. Function and mode of regulation of endothelial major histocompatibility complex class II. *Cell Transplant*. 2009;18(8):255-259.
 102. Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, Briscoe DM. Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *J Exp Med*. 1999;190(4):555-566.
 103. Spencer CT, Gilchuk P, Dragovic SM, Joyce S. Minor histocompatibility antigens: presentation principles, recognition logic and the potential for a healing hand. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:512-525.
 104. Gratwohl A, Döhler B, Stern M, Opelz G. H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9632):49-53.

105. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(1):61-74.
106. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation*. 2013;96(8):681-688.
107. Auchincloss H, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3373-3377.
108. Laffont S, Coudert JD, Garidou L, et al. CD8+ T-cell-mediated killing of donor dendritic cells prevents alloreactive T helper type-2 responses in vivo. *Blood*. 2006;108(7):2257-2264.
109. Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP GS. Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen*. 2004;43(1):36-44.
110. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, et al. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2005;97(11):1142-1151.
111. Sen S, McDonald SP, Coates PTH, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(7):263-283.
112. Nuzzolo ER, Capodimonti S, Martini M, et al. Adult and cord blood endothelial progenitor cells have different gene expression profiles and immunogenic potential. *Blood Transfus*. 2014;12 Suppl 1:s367-s374.
113. Taflin C, Charron D, Glotz D, Mooney N. Immunological function of the endothelial cell within the setting of organ transplantation. *Immunol Lett*. 2011;139(1-2):1-6.
114. Hughes CC, Savage CO, Pober JS. Endothelial cells augment T cell interleukin 2 production by a contact-dependent mechanism involving CD2/LFA-3 interaction. *J Exp Med*. 1990.
115. Epperson DE, Pober JS. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol*. 1994;153(12):5402-5412.
116. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):683-709.
117. Manes TD, Pober JS. Antigen presentation by human microvascular endothelial cells triggers ICAM-1-dependent transendothelial protrusion by, and fractalkine-dependent transendothelial migration of, effector memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2008;180(12):8386-8392.
118. Taflin C, Favier B, Baudhuin J, et al. Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2891-2896.
119. Schmidt D, Breymann C, Weber A, et al. Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Ann Thorac Surg*. 2004;78(6):2094-2098.
120. d'Audigier C, Cochain C, Rossi E, et al. Thrombin receptor PAR-1 activation on endothelial progenitor cells enhances chemotaxis-associated genes expression and leukocyte recruitment by a COX-2-dependent mechanism. *Angiogenesis*. 2015;18(3):347-359.

121. Huang DC, Hahne M, Schroeter M, et al. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14871-14876.
122. Martínez-Lorenzo MJ, Anel a, Gamen S, et al. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*. 1999;163:1274-1281.
123. Li JH, Kluger MS, Madge LA, Zheng L, Bothwell ALM, Pober JS. Interferon-gamma augments CD95(APO-1/Fas) and pro-caspase-8 expression and sensitizes human vascular endothelial cells to CD95-mediated apoptosis. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1485-1495.
124. Todorova D, Sabatier F, Doria E, et al. Fractalkine expression induces endothelial progenitor cell lysis by natural killer cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26663.
125. Pober JS. Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res*. 1999;19(2-3):225-232.
126. Natali PG, De Martino C, Quaranta V, et al. Expression of Ia-like antigens in normal human nonlymphoid tissues. *Transplantation*. 1981;31(1):75-78.
127. Choo JK, Seebach JD, Nicleleit V, et al. Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity. *Transplantation*. 1997;64(9):1315-1322.
128. Pober JS, Gimbrone MA, Cotran RS, et al. Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon. *J Exp Med*. 1983;157(4):1339-1353.
129. Suárez Y, Shepherd BR, Rao DA, Pober JS. Alloimmunity to human endothelial cells derived from cord blood progenitors. *J Immunol*. 2007;179:7488-7496.
130. Issa F, Hester J, Goto R, Nadig SN, Goodacre TE, Wood K. Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation*. 2010;90(12):1321-1327.
131. Nadig SN, Wieckiewicz J, Wu DC, et al. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med*. 2010;16(7):809-813.
132. Taflin C, Charron D, Glotz D, Mooney N. Regulation of the CD4+ T cell allo-immune response by endothelial cells. *Hum Immunol*. 2012;73(12):1269-1274.
133. Egorova AD, DeRuiter MC, De Boer HC, et al. Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2012;48(1):21-29.
134. Decaris ML, Lee CI, Yoder MC, Tarantal AF, Leach JK. Influence of the oxygen microenvironment on the proangiogenic potential of human endothelial colony forming cells. *Angiogenesis*. 2009;12(4):303-311.
135. Heo SC. WKYMVm-Induced Activation of Formyl Peptide Receptor 2 Stimulates Ischemic Neovasculation by Promoting Homing of Endothelial Colony-Forming Cells. *Stem Cells*. 2013:779-790.
136. Schwarz TM, Leicht SF, Radic T, et al. Vascular incorporation of endothelial colony-forming cells is essential for functional recovery of murine ischemic tissue following cell therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):e13-e21.
137. Lin R-Z, Melero-Martin JM. Bioengineering human microvascular networks in immunodeficient mice. *J Vis Exp*. 2011;(53):e3065.
138. Rohban R, Reinisch A, Etchart N, et al. Identification of an effective early signaling signature during neo-vasculogenesis in vivo by ex vivo proteomic profiling. *PLoS One*.

- 2013;8(6):e66909.
139. Au P, Daheron LM, Duda DG, et al. umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels Brief report Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting . *In Vivo (Brooklyn)*. 2012;111(3):1302-1305.
 140. Goerke SM, Plaha J, Hager S, et al. Human Endothelial Progenitor Cells Induce Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Smooth Muscle Cells upon Cocultivation. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(23-24):120914061009005.
 141. Pedersen TO, Blois AL, Xue Y, et al. Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):23.
 142. Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa M a, Soares R, Amédée J, Granja PL. Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res*. 2011;7(3):186-197.
 143. Krenning G, Moonen J-RAJ, van Luyn MJA, Harmsen MC. Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials*. 2008;29(27):3703-3711.
 144. Moonen J-RR a J, Krenning G, Brinker MGL, Koerts J a., van Luyn MJ a, Harmsen MC. Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovasc Res*. 2010;86(3):506-515.
 145. de Jonge N, Muylaert DEP, Fioretta ES, et al. Matrix production and organization by endothelial colony forming cells in mechanically strained engineered tissue constructs. *PLoS One*. 2013;8(9):e73161.
 146. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003.
 147. Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, et al. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2136-2144.
 148. Beyer F, Doebis C, Busch A, et al. Decline of surface MHC I by adenoviral gene transfer of anti-MHC I intrabodies in human endothelial cells-new perspectives for the generation of universal donor cells for tissue transplantation. *J Gene Med*. 2004;6(October 2003):616-623.
 149. Montesinos JJ, Mora-García MDL, Mayani H, et al. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev*. 2013;22(18):2508-2519.
 150. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*. 2009;114(24):5091-5101.
 151. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97(11):1093-1107.
 152. Methe H, Nugent HM, Groothuis A, Seifert P, Sayegh MH, Edelman ER. Matrix embedding alters the immune response against endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 2005;112(9 SUPPL.):89-96.
 153. Methe H, Edelman ER. Cell-matrix contact prevents recognition and damage of

- endothelial cells in states of heightened immunity. *Circulation*. 2006;114(SUPPL. 1):233-239.
154. Kriegel M a, Adam-Klages S, Gabler C, et al. Anti-HLA-DR-triggered monocytes mediate in vitro T cell anergy. *Int Immunol*. 2008;20(4):601-613.
155. Al-Daccak R, Mooney N, Charron D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):108-113.
156. Bertho N, Blancheteau VM, Setterblad N, et al. MHC class II-mediated apoptosis of mature dendritic cells proceeds by activation of the protein kinase C-delta isoenzyme. *Int Immunol*. 2002;14(8):935-942.
157. Bertho N, Drénou B, Laupeze B, et al. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol*. 2000;164(5):2379-2385.
158. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005;33(8):928-934.
159. Chen K, Wang D, Du WT, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol*. 2010;135(3):448-458.
160. Wang D, Feng X, Lu LL, et al. A CD8 T cell-IDO axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human SLE. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2014;66(8):2234-2245.
161. Ladhoff J, Bader M, Brösel S, et al. Low immunogenicity of endothelial derivatives from rat embryonic stem cell-like cells. *Cell Res*. 2009;19:507-518.
162. Ladhoff J, Fleischer B, Hara Y, Volk H-D, Seifert M. Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2010;88(1):121-129.
163. Parwiz Abrahimi, Lingfeng Qin, William G. Chang, Alfred L.M. Bothwell¹, George Tellides, W. Mark Saltzman and JSP, Abrahimi P, Qin L, et al. Blocking MHC class II on human endothelium mitigates acute rejection. *J Clin Investig insights*. 2016;1(1):1-25.
164. Beyer F. Gentherapeutische Modifikation der MHC I - Oberflächenexpression humaner Endothelzellen zur Reduktion der allogenen Immunogenität. 2004.
165. Sackett SD, Brown ME, Tremmel DM, Ellis T, Burlingham WJ, Odorico JS. Modulation of human allogeneic and syngeneic pluripotent stem cells and immunological implications for transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2016;30(2):61-70.
166. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible im1. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-104. immunogenicity of terminally differentiated cells derived fr. *Nature*. 2013;494(7435):100-104.
167. Orlova V V, Drabsch Y, Freund C, et al. Functionality of endothelial cells and pericytes from human pluripotent stem cells demonstrated in cultured vascular plexus and zebrafish xenografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):177-186.
168. Herberts C a, Kwa MSG, Hermsen HPH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*. 2011;9(1):29.
169. Hirschi KK, Ingram D a., Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(9):1584-1595.
170. Park KM, Gerecht S. Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. *Development*. 2014;141(14):2760-2769.

Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyltryptophan
Ang 1	Angiotensin 1
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zelle (eng. antigen presenting cells)
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (eng. basic fibroblast growth factor)
BSA	Bovines Serum Albumin
CACs	Zirkulierende angiogene Zellen (eng. circulating angiogenic cells)
CD	Differenzierungscluster (eng. cluster of differentiation)
CECs	Zirkulierende Endothelzellen (eng. circulating endothelial cells)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
CFU	Colony Forming Unit
CFU-Hill	Hill-Kolonie-bildende Einheit (eng. colony-forming Hill unit)
CpG	Dinukleotid aus Cytosin-Phosphat und Guanin
CTLs	Zytotoxischer T-Lymphozyt (eng. cytotoxic T-Lymphocyte)
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ECFCs	Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (eng. endothelial colony forming cells)
ECs	Endothelzellen (eng. endothelial cells)
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen (eng. endothelial progenitor cells)
FACS	Durchflusszytometrie (eng. fluorescence-activated cell sorting)
FKS	Fetales Kälberserum
FOX P3	Forkhead-Box-Protein P3
G-SCF	eng. Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GvHD	Transplantat gegen Empfänger-Reaktion (eng. graft versus host disease)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPP	eng. high proliferative potential
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsions-Molekül-1 (eng. intercellular adhesion molecule 1)

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
KDR	eng. Kinase Insert Domain Receptor
LFA	Leukozyten Funktion-assoziiertes Antigen (eng. leukocyte function-associated antigen)
LPP	eng. low proliferative potential
LPS	Lipopolysacchrid
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MHA	Eng. Minor Histocompatibility Antigens
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (eng. major histocompatibility complex (MHC))
MIC A/B	Major histocompatibility complex class I-related chains A/B
MSCs	Mesenchymale Stromazellen (enlg. „mesenchymal stromal cells“)
NSG	NOD.Cg-Prkdc Scid Il2rgtm1Wjl/SzJ
PB	Peripheres Blut
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. “peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF-BB	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor BB (eng. platelet-derived growth factor BB)
PDGFR- β	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor-Rezeptor- β (eng. platelet-derived growth factor receptor- β)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEG2	Prostaglandin E2
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phythämagglutinin
pHPL	gemischtes humanes Thrombozytenlysate (engl. „pooled human platelet lysate“)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SEM	Standardfehler (eng. standard error of the mean)
sFasL	Löslicher Fas Ligand (eng. soluble fas ligand)
siRNA	eng. small interfering Ribonucleic acid
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsions-Molekül-1 (eng. vascular adhesion molecule-1)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (eng. vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2 (eng. vascular endothelial growth factor receptor 2)
α SMA	eng. alpha smooth muscle actin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Methoden zur Isolation von verschiedenen endothelialen Vorläufer-Populationen aus peripherem Blut.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Reifung von Blutgefäßen.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Fremderkennung.....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Biocoll-Gradienten.	32
Abbildung 5: Reinheit der magnetisch separierten Populationen aus peripherem Blut oder ECFC/MSC Kokulturen.....	33
Abbildung 6: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Regulation von immunologisch relevanten Molekülen.....	36
Abbildung 7: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Induktion und Modulation der Immunzell-Proliferation.	36
Abbildung 8: Übersicht des experimentellen Aufbaus der Immunzell-Kokultur-Experimente	38
Abbildung 9: Generierung von HLA-spezifischen CTLs.....	40
Abbildung 10: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Immunogenität von ECFC/MSChaltigen Transplantaten in NSG Mäusen.	44
Abbildung 11: ECFCs zeigen <i>in vitro</i> eine charakteristische Endothelzell-spezifische Morphologie.	47
Abbildung 12: ECFCs exprimieren klassische Marker der endothelialen Linie.....	47
Abbildung 13: ECFCs und HUVECs bilden netzwerkartigen Strukturen in EZM-Gelen aus.	48
Abbildung 14: Expression immunologisch relevanter Moleküle auf ECFCs und HUVECs	49
Abbildung 15: Regulation des HLA-ABC-Moleküls nach Zytokin-Stimulation	49
Abbildung 16: Regulation des ICAM-1-Moleküls nach Zytokin-Stimulation	50
Abbildung 17: Regulation von HLA-DR-Molekülen nach Zytokin-Stimulation	51
Abbildung 18: Regulation von VCAM-1 nach Zytokin-Stimulation.....	51

Abbildung 19: CD8-T-Zell-vermittelte HLA-spezifische Lyse	53
Abbildung 20: IFN γ -stimulierte ECFCs und HUVECs induzieren dosisabhängig die CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation	54
Abbildung 21: Die Induktion der CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation durch IFN γ -stimulierte ECFCs ist HLA-DR-abhängig.	55
Abbildung 22: Die Mitogen-induzierte T-Zell-Proliferation wird nicht durch ECFCs und HUVECs moduliert.	56
Abbildung 23: Vergleich der Expression phänotypischer Marker von Nabelschnur-abgeleiteten ECFCs und MSC:	57
Abbildung 24: Diskriminierung von ECFCs und MSCs in Kokultur durch die differentielle Expression der Marker CD31 und CD90.....	58
Abbildung 25: Schema der experimentellen Durchführung der ECFC/MSC-Kokultur-Experimente.....	59
Abbildung 26: CD31 ⁺ ECFCs nicht aber CD90 ⁺ MSCs zeigen in IFN γ -stimulierten Kokulturen eine Verringerung der Zellzahl.....	59
Abbildung 27: Zytokin-Freisetzung aus ECFCs und MSCs in Mono- und Kokultur.....	60
Abbildung 28: Einfluss der Kokultur auf die IFN γ -stimulierte HLA-ABC-Expression.....	61
Abbildung 29: Einfluss der Kokultur auf die IFN γ -induzierte HLA-DR-Expression.....	62
Abbildung 30: Einfluss der Kokultur auf ICAM-1-Expression.....	63
Abbildung 31: Reduzierte CD8 ⁺ T-Zell-vermittelte HLA-spezifische Lyse von ECFC/MSC-Kokulturen.....	64
Abbildung 32: MSCs unterdrücken die ECFC-induzierte T-Zell-Proliferation in IFN γ -stimulierten Kokulturen.	65
Abbildung 33: ECFC/MSC-Kokulturen, nicht aber Kokulturen von ECFCs und primären renalen epithelialen Zellen, supprimieren die CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Proliferation.....	66
Abbildung 34: Zytokin-Profile von Kokulturen humanen allogenen PBMCs mit ECFCs, MSCs und einer Kombination aus beiden Zelltypen.....	67

Abbildung 35: Die Anwesenheit von MSCs unterstützt das Überleben von Monozyten bzw. Makrophagen in PBMC-Kokulturen.....	68
Abbildung 36: DerIDO-Inhibitor 1-MT ist in der Lage die MSC-supprimierte Immunzell-Proliferation partiell wiederherzustellen.....	69
Abbildung 37: Eine effektive Inhibition der ECFC-induzierten T-Zell-Proliferation bedarf der Anwesenheit von MSCs während der IFN γ -Stimulationsphase und während der T-Zell-Kokultur-Phase.....	70
Abbildung 38: Die antiCD3/CD28 -induzierte Immunzell-Proliferation ist in ECFC/MSC-Kokulturen weiterhin supprimiert	72
Abbildung 39: DerIDO-Inhibitor 1-MT ist in der Lage die MSC-supprimierte Immunzell-Proliferation vollständig wiederherzustellen.....	73
Abbildung 40: Schematische Darstellung des Ablaufs der <i>in vivo</i> Experimente	74
Abbildung 41: Untersuchungen zu den gefäßbildenden Eigenschaften von ECFC/MSC-Transplantaten in NSG Mäusen	75
Abbildung 42: Induktion der Gefäßbildung drei Wochen nach Injektion der zellhaltigen Matrigel-Transplantate in NSG Mäuse.....	75
Abbildung 43: ECFC/MSC-Konstrukte führen zu stabileren vaskulären Netzwerken als ECFC-haltige Konstrukte.....	76
Abbildung 44: Infiltrierende Zellen in Matrigel-Transplantaten zeigen eine Ko-Expression von murinem CD45 und CD31.	77
Abbildung 45: Rekonstitution der NSG Mäuse mit 5 und 10 Millionen humanen allogenen PBMCs	78
Abbildung 46: Rekonstitution von NSG Mäusen mit 5 Millionen humanen allogenen PBMC	79
Abbildung 47: α -SMA stabilisierte humane Gefäßnetzwerke in ECFC/MSC-Transplantaten. .	79
Abbildung 48: Nachweis von humanen IFN γ -produzierenden Gedächtniszellen in der Milz von rekonstituierten NSG Mäuse.....	80
Abbildung 49: Die reduzierte Expression von HLA-DR auf humanen ECFC/MSC-abgeleiteten vaskulären Strukturen führt zu einer verringerten Infiltration von humanen Leukozyten in diese Transplantaten.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	HLA-Merkmale der verwendeten ECFC/MSC-Spender	31
Tabelle 2:	Übersicht der verschiedenen verwendeten Aussaatdichten der Zelltypen in 24-well-Platten für die funktionellen Folgeuntersuchungen.....	32
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper zur Analyse der Zytokin-abhängigen Regulation von immunologisch relevanten Molekülen auf CD31 ⁺ und CD31 ⁻ Zellen in ECFC/MSC-Mono- und Kokulturen sowie in HUVEC-Monokulturen	34
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper zur Detektion von absoluten Zellzahlen in direkten ECFC/MSC-Kokulturen	34
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper zur Detektion von proliferierenden PBMC-Subpopulationen in Immunzellkokultur-Experimenten	34
Tabelle 6:	Verwendete Antikörper zur Detektion von murinen und humanen PBMC-Populationen in peripherem Blut oder der Milz von NSG Mäusen, die mit humanen allogenen PBMCs rekonstituiert wurden	35
Tabelle 7:	Übersicht des titrierten Antikörpergemischs für die Immunfluoreszenz-Färbung von ECFC und MSC Mono- und Ko-kulturen	37
Tabelle 8:	HLA-Merkmale der verwendeten ECFC/MSC- und PBMC-Spender	39
Tabelle 9:	HLA-Merkmale des für die <i>in vivo</i> Experimente verwendeten ECFC/MSC- und PBMC-Spenders.....	45

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und eigenhändig sowie nur unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin, den _____
(Naima Souidi)