

P-31

## HLA-Typisierung am kultivierten retinalen Pigmentepithel

A.Schüler<sup>1</sup>, S.Bünte<sup>2</sup>, E.Thiel<sup>2</sup>  
Augenklinik und Poliklinik<sup>1</sup> und Medizinische Klinik und Poliklinik  
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie<sup>2</sup>  
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Es wurde eine Methode etabliert, mit der eine postmortale HLA-Typisierung der Klasse II Antigene realisierbar ist<sup>4</sup>.

Retinales Pigmentepithel aus dem Auge kann noch bis ca.48 Stunden post-mortem isoliert und kultiviert werden. Unter physiologischen Bedingungen sind an diesen Zellen nur MHC-Klasse I-Antigene nachweisbar. Unter Stimulation mit Gamma-Interferon wird eine Expression von MHC-Antigenen der Klasse II beobachtet<sup>4</sup>.

**Material und Methoden:** Aus enukleierten Bulbi wird nach steriler Entfernung einer Corneoskleralscheibe die Choroidea freipräpariert. Nach Inkubation in 0,25%-Trypsinlösung für 20 min. bei 37°C wird unter sterilen Bedingungen das anhaftende retinale Pigmentepithel als Zellsuspension isoliert. Die Zahl der gewonnenen Zellen ist für eine HLA-Typisierung zu gering. Es erfolgt eine Zellvermehrung in der Kultur. Als Kulturmedium wird HAM-Flo mit 20% BMS in Falcon 50 ml-Flaschen verwendet. Nach ca.5 Tagen im Brutschrank bei 37°C und 5%-CO<sub>2</sub> wird das erste Zellwachstum beobachtet, nach ca.8 bis 15 Tagen entsteht ein geschlossener Zellrasen. Durch Zugabe

von 200IU/ml  $\gamma$ -Interferon zum Medium erfolgt die Stimulation der Zellen zur Expression der MHC-Klasse II-Antigene. Nach Ablösung des Zellrasens mittels 0,25%-Trypsinlösung wird durch Anreicherung mit immunomagnetic beads (Dyna-Beads) eine Zellsuspension hergestellt, an der die Typisierung vorgenommen wird. Vergleichend wird die Typisierung an Lymphozyten durchgeführt, die durch Dichtegradientenisolation aus peripherem Blut gewonnen werden. Für die Bestimmung der Klasse II-Antigene werden die B-Zellen aus der Lymphozytensuspension mit Dyna-Beads separiert. Die Bestimmung der HLA-Antigene erfolgt mit Mikrozytotoxizitätstest nach Terasaki<sup>5</sup>.

**Vorläufige Ergebnisse:** Es wurden bisher zwei vergleichende Typisierungen an Lymphozytensuspensionen und RPE-Zellen von Multiorganspendern durchgeführt.

Es zeigt sich, daß bei den ersten Vorversuchen identische HLA-Typisierungen unter Verwendung von Lymphozyten und retinalem Pigmentepithel bestimmt wurden. Aufgrund der geringen Fallzahl können noch keine exakteren Aussagen getroffen werden. Die von anderen Autoren<sup>4</sup> vorgelegten Ergebnisse werden vorläufig bestätigt.

**Lit:**a) N.ZavaZava V, W.Müller-Ruchholtz. "Expression of MHC class I and class II molecules by cadaver retinal pigment epithelium cells: optimization of post-mortem HLA-typing" *Clin exp. Immunol.* (1991) 84, 163-166.

b) PL.Terasaki, J.D.McClelland "Microdroplet assay of human serum cytotoxins" *Nature* 1964, 204, 998-1000.

Tabelle: Vergleich der HLA-Typisierung aus Lymphozyten und retinalem Pigmentepithel (RPE)

	Spender 1			Spender 2		
	A	B	DR	A	B	DR
Lymphozyten:	1,11	61 (40), 70	11 (5), 13 (6)	3,25 (10)	18,35	1,3
RPE:	1,11	61 (40), 70	11 (5), 13 (6)	3,25 (10)	18,35	1,3

P-32

## Inhibition der Interleukin-2-Rezeptor (IL2R)-Expression mit "Antisense" Oligonukleotiden (ASON)

C.Barth\*, W.Maslinski, B.Zanker, T.B.Strom, C.A.Baldanus\*  
Beth Israel Hospital, Boston und Universitätsklinik Köln

Der IL2R ist das Markerprotein der aktivierten T-Zelle. Er ist der Angriffspunkt zur selektiven Immunsuppression. Die bisher verwendeten Anti-IL2R-Antikörper antagonisieren die Funktion des Proteins; ASON verhindern bereits dessen Synthese. ASON greifen an zwei Stellen in die Genaktivierungskaskade ein: 1) Blockade der Zielgen-Transkription durch Triplexbildung zwischen ASON und der DNS-Helix, 2) Abbruch der Translation durch Duplexbildung zwischen ASON und m-RNS.

Die von uns verwendeten ASON waren gegen Exon 1 (E1) und Exon 3 (E3) des IL2R gerichtet. Das "sense" (S)-ON diente zur Kontrolle der unspezifischen Toxizität. Beide ASON verringerten die maximale Proliferation signifikant, E1 auf 14 %, E3 auf 22 % im Vergleich zu 42 % (E1) und 44 % (E3) bei SON. E3 reduzierte die Anzahl der m-RNS-Stränge des IL2R auf 35 % gegenüber der Positivkontrolle (semiquantitative PCR). ASON wurden bisher erfolgreich zur Blockade von Genen mit früher, aber kurzer Genaktivierung eingesetzt. Die Expression des IL2R folgt einer verzögerten und anhaltenden Genaktivierung. So erstaunt es nicht, daß die Proteinexpression des IL2R auf der Zelloberfläche nicht vermindert wurde (Fluözytometrie). Ein verkürzter, in seiner Funktion defekter IL2R wurde nicht

nachgewiesen (Epitopen-Mapping, Crosslinking mit Rezeptorpräzipitation). Um den gezeigten spezifischen Effekt der ASON auf die IL2R-Genexpression zu vergrößern, sind bei der Kurzlebigkeit der ASON modifizierte Nuklease-resistente ASON erforderlich. Erst dann könnten gegen den IL2R gerichtete ASON eine neue immunsuppressive Strategie eröffnen.

P-33

## Erste Kieler Erfahrungen mit 45 Isolierungen von Langerhansinseln aus Schweinepankreas

A.Heiser, K.Ulrichs, S.Winoto-Morbach, A.Vanuchli<sup>1</sup>, H.Jäger<sup>2</sup>,  
W.Müller-Ruchholtz  
Instituta für Immunologie, Kliniken für \*Herz- und Gefäßchirurgie  
und <sup>2</sup>Anästhesiologie der Universität Kiel

Das zunehmende Interesse an der klinischen Pankreasinsel-Transplantation zur Therapie des Typ I Diabetes und der weltweite Mangel an menschlichen Spenderorganen zwingen zu alternativen Lösungen. Unbegrenzte Verfügbarkeit, physiologische Ähnlichkeit und vergleichbare Organgröße rücken das Schwein als potentielle Spenderspezies zunehmend in den Mittelpunkt der Xenotransplantationsforschung. Hauptziel unserer Untersuchungen ist die klinische Transplantation von Pankreasinseln. Nahziel die Isolierung von viablen und funktionsfähigen Pankreasinseln aus Schweinepankreas. Dazu wurde die halbautomatische Isolierungstechnik nach

C. Ricordi et al. (Surgery 107, 688-694, 1990) vor ca. 6 Monaten etabliert. Sie wird zur Verbesserung der Isolierungsleistung derzeit von uns weiterentwickelt. Bis heute wurden damit 45 Isolierungen durchgeführt, 36 an Schlachthauspankreaten (ca. 30 min warme Ischämie) und 9 an Pankreaten nach Explantation im Labor (keine warme Ischämie). Abhängig vom Alter der Spendertiere und der Dauer der warmen Ischämie lassen sich zwischen 300 und 2.500 Inseln/g Pankreas mit > 90% Viabilität regelmäßig isolieren. Unsere methodischen Anstrengungen konzentrieren sich auf die 2-Stufen-Reinigung der enzymatisch verdauten Inseln: Dichtegradientenzentrifugation gefolgt von der im hiesigen Institut entwickelten elektromagnetischen Zelltrenntechnik. Erste Ergebnisse mit diesem Verfahren signalisieren > 99% Inselreinheit. Dieser hohe Reinheitsgrad der Inseln erscheint auch für die klinische Transplantation dringend erwünscht, da wir in früheren Untersuchungen nachweisen konnten, daß von dem exokrinen Gewebe ein hohes Maß an Immunogenität ausgeht.

P-34

### Die zellvermittelte Immunantwort des menschlichen Transplantatempfängers gegen xenogenes Antigen (Schwein) ist abhängig vom Spenderkompartiment

K. Ulrichs, V. Eckstein, A. Heiser, W. Müller-Ruchholtz  
Institut für Immunologie an der Universität Kiel

Trotz erster klinischer Erfahrungen mit der Xeno-Transplantation ist noch sehr wenig bekannt über die zellvermittelte Immunantwort des menschlichen Transplantat-Empfängers gegen das xenogene Antigen, z.B. isolierte Pankreasinseln des Schweines. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb, die zellvermittelte In-vitro-Immunantwort menschlicher Blutlymphozyten gegen Stimulatorlymphozyten des Schweines aus unterschiedlichen lymphatischen Kompartimenten in der "Gemischten-Lymphozyten-Kultur" (MLC) und gegen isolierte Pankreasinseln des Schweines in der "Gemischten-Lymphozyten-Insel-Kultur" (MLIC) zu testen.

**Ergebnisse:** (1) Im Gegensatz zu wiederholten Äußerungen in der Literatur ist eine erhebliche Immunantwort im System "Mensch gegen Schwein" in der MLC/MLIC erkennbar. (2) Die Stärke der Immunantwort ist nicht nur abhängig vom untersuchten Stimulator-Kompartiment: Blut > Milz > Lymphknoten > Pankreasinsel sondern auch vom jeweiligen menschlichen Responder. (3) Die Immunantwort in der MLC/MLIC ist mit der Anzahl der Antigen-präsentierenden Zellen korreliert, d.h. wahrscheinlich mit den MHC-Klasse-II-positiven Makrophagen innerhalb der xenogenen Stimulatorzell-Population (FACS-Analyse). (4) Der Reinheitsgrad der Stimulator-Pankreasinseln bestimmt ebenfalls das Ausmaß der Immunantwort (ungereinigte Inseln >> handverlesene Inseln).

**Schlußfolgerungen:** (I) Die Wahl des Stimulator-Kompartimentes bestimmt die Stärke der zellvermittelten Immunantwort in der MLC/MLIC. (II) Transplantation isolierter Pankreasinseln des Schweines erfordert eine sorgfältige Vor-Reinigung der Inseln zur Verminderung der unerwünschten Transplantat-Immunogenität.

P-35

### Immunsuppressive Effekte von Verapamil auf allogenen und mitogen stimulierten humanen T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen

B. Zanker, S. Marx, K.H. Meyer zum Büschelfelde, H. Köhler  
I. Medizinische Klinik, Mainz

Verapamil (Vera), ein Calciumantagonist vom Typ des Diphenylalkylamins, hemmt das Wachstum mitogen aktivierter Lymphozyten, obwohl bei T-Lymphozyten bisher keine calciumselektiven Ionenkanäle nachzuweisen sind. Offensichtlich sind die immunsuppressiven Effekte von den  $Ca^{++}$ - antagonistischen Wirkungen des Verapamil unabhängig.

Verapamil hemmt dosisabhängig im Bereich von 12  $\mu$ M - 100  $\mu$ M das mitogen induzierte Wachstum humaner Lymphozyten. Der anti-proliferative Effekt kann nicht durch exogen zugeführtes rIL-2 antagonisiert werden, und Vera supprimiert nicht die Expression aktivierungsinduzierter IL-2-Rezeptoren (CD 25). Die Wachstumshemmung durch Vera ist reversibel und kann aus den Zellen ausgewaschen werden. Vera hemmt dosisabhängig die Sekretion von Interleukin-2 sowohl in Blutlymphozyten als auch in JURKART T-Zellen. Im Gegensatz zu Cyclosporin A supprimiert Vera auch die zytotoxische Funktion reifer T-Zellen (CTL). Die Hemmung von alloantigenaktivierten CTL durch Vera ist dosis- und zeitabhängig und kann nicht durch exogenes IL-2 antagonisiert werden. Northernblot-Analysen zeigen, daß Vera die mRNA für IL-2 und die T-zellspezifische Esterase, nicht aber Transkripte des c-myc proto-Onkogens supprimiert. Möglicherweise beruht die immunsuppressive Wirkung von Vera auf der Hemmung T-zellspezifischer Aktivierungsgene. Die inhibierende Wirkung von Vera auf reife CTL ist eine neue und möglicherweise für die Klinik relevante immunsuppressive Eigenschaft.

P-36

### Anti-HLA-Antikörper nach Herztransplantation

H. Böttcher, N. Zavazava, J. Steinmann, W. Müller-Ruchholtz  
Institut für Immunologie, Universität Kiel

Anti-HLA-Antikörper wurden bei 30 Patienten nach allogener Herztransplantation bestimmt, 13% von 46 Seren waren im Standardlymphozytotoxizitätstest gegen ein Testpanel von 50 Zellen positiv. Nach Hitzeinaktivierung bei 56°C erhöhte sich die Zahl positiver Seren auf 43%. Dieses Ergebnis konnte anhand einer größeren Zahl inaktivierter Seren (N=90) bestätigt werden und läßt eine thermische Dissoziation von komplexierten anti-HLA-Antikörpern vermuten. 80% der getesteten Patienten hatten im Untersuchungszeitraum therapiebedürftige Rejektionskrisen. Von diesen hatten 71% anti-HLA-Antikörper gebildet. Unter Vorbehalt der geringen Probenzahl läßt sich die Zunahme von antikörperpositiven Seren im Verlauf von biopsisch gesicherten zellulären Abstoßungskrisen als eine vermehrte humorale Reaktion deuten. In einem Fall wurde während einer Rejektionskrise ein vorher positiver Zytotoxizitätstest negativ. Die 1-Jahresüberlebensrate lag bei 80%, wobei zwei der untersuchten Patienten eine Retransplantation wegen rejektionsbedingter Herzinsuffizienz benötigten. Bei beiden konnten Antikörper gegen Donor-HLA-Spezifitäten nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeigen zum erstenmal, daß die Sensitivität des Standardlymphozytotoxizitätstest in Seren von Patienten nach allogener Herztransplantation durch einfache Hitzeinaktivierung wesentlich erhöht wird.