

Nicht einzeln im Buchhandel!

Überreicht vom Verfasser!

Sonderdruck aus der

Zeitschrift für Immunitätsforschung, Allergie und klinische Immunologie

Band 140, Seite 9–17 (1970)

Gustav Fischer Verlag · Stuttgart

*Medizinische Universitätsklinik
(Ludolf-Krehl-Klinik)
(Direktor: Prof. Dr. G. Schettler)*

Über die Artspezifität der Magenschleimhautesterase VI A des Menschen

I. Vergleichende Untersuchungen über Magenschleimhautextrakte von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Mensch¹⁾

W. D. KUHLMANN und W. RAPP

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 28. November 1969)

Die antigene Magenschleimhautesterase VI A ist ein organspezifisches Antigen der menschlichen Korpuschleimhaut (1), das in den schleimbildenden Zellen des Oberflächenepithels gebildet (2) und normalerweise in das Lumen des Magens sezerniert und im Magenschleim (3) und Magensaft (4) nachweisbar ist. Dieses antigene Enzym läßt sich auf Grund der mangelnden Substratspezifität neben den anderen Magenschleimhautesterasen nur auf elektrophoretischem und immunologischem Wege bestimmen (5). Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Magenschleimhaut und bei malignen Tumoren der Schleimhaut ist dieses Antigen im Gewebe (6) und im Magensaft (5) vermindert oder abwesend. Mit diesem Antigen steht somit eine serologisch spezifische Substanz zur Verfügung, mit der analog zu anderen Antigen-Organsystemen im Tierversuch die Induktion einer Autoimmunerkrankung versucht werden soll. Zuvor ist es jedoch erforderlich, die Artspezifität dieses menschlichen Antigens und seine Beziehungen zu analogen Schleimhautantigenen der in Frage kommenden Versuchstiere zu untersuchen. In der folgenden Mitteilung werden zunächst auf enzym-elektrophoretischem Wege in der Magenschleimhaut der untersuchten Tiere analoge Esterasen nachgewiesen. Unter Verwendung von Heteroimmunsere werden anschließend in Geldiffusionsverfahren die immunologisch feststellbaren Beziehungen zwischen den Esterase-Antigenen untersucht.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Zur Gewinnung der Schleimhautextrakte und zur Immunisierung wurden Kaninchen (K), Meerschweinchen (MS) und Wistar-Ratten (R) ohne Berücksichtigung genetischer Faktoren verwendet. Die Tiere wurden mit einer fleischfreien Standarddiät und Zugabe von Wasser ad libitum ernährt.

2. Magenschleimhautextrakte

Die Mägen wurden nach Entblutung von jeweils 2 Tieren entnommen, mit fließendem Leitungswasser von Nahrungsresten befreit und mit der Schere in toto in Stücke von 0,5 cm³ zerkleinert. Die Schleimhautteilchen wurden bei pH 7.5 in 20 Volumen physiologischem Puffer (Natrium-Phosphatpuffer, 0,01 M + 0,15 M NaCl) unter 2maligem Wechsel des Puffers während 2 × 10 Minuten unter ständigem Rühren von Blutresten ausgewaschen und dann nach einem bewährten Verfahren (1) in dem Puffer 1 : 3 (V/V) suspendiert und mit dem Ultraturrax bei 4° C extrahiert und abschließend bei 15000 g/30 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde verworfen, der Überstand zur Hälfte bei -20° C tiefgefroren, die andere Hälfte wurde lyophilisiert und luftdicht bei 4° C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration nach Biuret betrug 2 g %. Menschliche Magenschleimhaut wurde aus 4 verschiedenen Resektionspräparaten verschiedener Blutgruppen präpariert und extrahiert (1).

3. Menschliches Schleimhautantigen VI A

Das Antigen VI A wurde aus einem Gemisch von Schleimhauttotalextrakten und aus Magensäften verschiedener Spender isoliert (7, 8). Außerdem wurden wasserlösliche Totalextrakte (1), frischer und konzentrierter Magensaft (4, 7) verwendet, die das Antigen VI A in ausreichender Konzentration enthielten.

4. Immunsera

Mit isoliertem, menschlichem Schleimhautantigen VI A wurden 8 Kaninchen immunisiert (7, 8). Die Immunsera Nr. 411 und 174 wurden verwendet.

2 Kaninchen wurden mit den Totalextrakten vom Meerschweinchen und 2 Meerschweinchen wurden mit Totalextrakten vom Kaninchen immunisiert. Die Immunisierung erfolgte zunächst mit komplettem Freundschens Adjuvans i.c. bei den Kaninchen, s.c. bei den Meerschweinchen. Die Nachimmunisierung erfolgte 3mal in Abständen von 20 Tagen zusammen mit 1%igem neutralisiertem Alaun s.c. Insgesamt wurde mit 80 mg Protein immunisiert. Nach 52 Tagen erfolgte die Entblutung. Die Immunsera wurden mit 1%igem Natriumazid versetzt und bei 4° C aufbewahrt.

Die gegen tierische Magenextrakte gerichteten Immunsera wurden routinemäßig mit homologem Plasma absorbiert.

5. Geldiffusionsverfahren nach OUCHTERLONY (9)

Sie erfolgten in Plastikdosen von 4 cm Durchmesser unter Verwendung standardisierter Stanzmuster und Stanzen von 6 mm Durchmesser (Fa. Desaga, Heidelberg). Es wurde 1% Agarose (Serva, Heidelberg) mit physiologischem Puffer in 3 mm Schichtdicke ausgegossen. Der Abstand der Gelreservoirs betrug von Mittelpunkt zu Mittelpunkt 10 mm. Die Anfärbungen der Präzipitationslinien erfolgten mit Amidoschwarz. Die Darstellung der Enzymaktivität im Präzipitationskomplex erfolgte nach ausgiebigem Waschen mit dem Enzymsubstrat beta-Naphthylacetat und Diazoblau (10) bei pH 7.6 mit dem physiologischen Natrium-Phosphatpuffer vor Trocknen des Gels (4). Das Präzipitat färbte sich im Falle des Esteraseantigens innerhalb von 30 Minuten rötlich an.

6. Gel-Elektrophoresen

Sie erfolgten nach GRABAR (10) in 1,5% Agargel bei pH 8,2 (Na-Veronal-HCL-Puffer, 0,05 M/0,025 M) unter fortlaufender Kühlung in der UGI-Einheit (Fa. Desaga, Heidelberg) auf Glasplatten von 12×9 cm. Die Bestimmung der relativen Mobilität und die fortlaufende Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte mit farbmarkiertem Albumin und Vitamin B 12 (11). Die Anfärbung der Esterasen erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung (wie unter 5).

7. Absorptionsversuche

Die Immunsere wurden mit steigenden Mengen (3×20 mg/ml) von lyophilisierten Totalextrakten absorbiert und vor jeder erneuten Zugabe des Materials bei 3000 g/10 min zentrifugiert. Die vollständige Absorption der Immunsere wurde in der Geldiffusion unter Verwendung des zur Absorption verwendeten Materials überprüft.

Ergebnisse

1. Elektrophoretischer Nachweis von Schleimhautesterasen

In den wasserlöslichen Schleimhauttotalextrakten aller Versuchstiere konnten mehrere Esterasefraktionen mit unterschiedlicher Konzentration und elektrophoretischer Mobilität nachgewiesen werden (Abb. 1). In Tabelle 1 werden sie mit den bisher bekannten

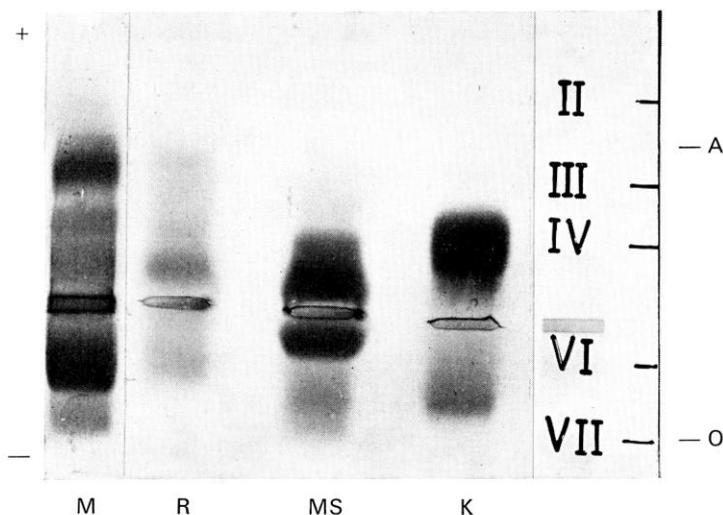


Abb. 1. Elektrophoretischer Nachweis von Magenschleimhautesterasen in den Schleimhautextrakten von Mensch (M), Ratte (R), Meerschweinchen (MS) und Kaninchen (K).

1,5% Agargel, pH 8,2 (Na-Veronal-HCL-Puffer) 12×9 cm, 5 Volt/cm, 90 min Auftrenndauer. Darstellung der Enzymaktivität mit 0,2% beta-Naphthylacetat, pH 7,6.

A = Albumin, 0 = Endosmotischer Nullpunkt (Vit. B 12)

II-VII

Bezeichnung der elektrophoretisch auftrennbaren Esterasen nach Zonen (1).

Esterasefraktionen menschlicher Schleimhautextrakte verglichen. Insgesamt wurden bei der Ratte und dem Meerschweinchen 4, bei den Kaninchen 2 Fraktionen beobachtet. Bei allen Tieren war in dem kathodischen elektrophoretischen Bereich eine der menschlichen Esterase VI A analoge Enzymaktivität nachweisbar.

Tabelle 1

Elektrophoretische Verteilung von Magenschleimhautesterasen in Agargel
(pH 8,2; 0,05 M)

Magenschleimhaut- extrakte von	Elektrophoretische Zonen ¹⁾				
	II	III	IV	VI	VII
Mensch.	+	+	+	+	+
Ratte		+	++	+	
Kaninchen			+	+	
Meerschweinchen . . .		+	+	+	+

¹⁾ Literatur: RAPP, W. (1)

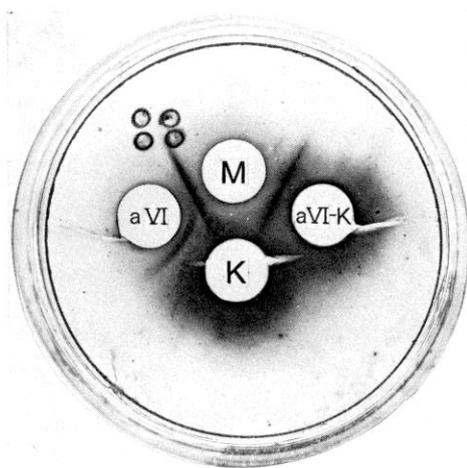


Abb. 2

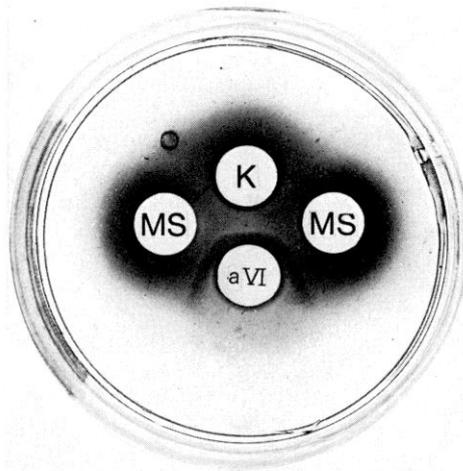


Abb. 3

Abb. 2. Nachweis der immunologischen Verwandtschaft des Esterase-Antigens des Kaninchens (K) mit dem Esterase-Antigen des Menschen (M). Es wurde das gegen isoliertes, menschliches Esterase-Antigen VI A gerichtete Immunsereum vom Kaninchen verwendet (a VI). Das gleiche Immunsereum wurde mit dem homologen Extrakt des Kaninchenmagens absorbiert (a VI-K). Darstellung der Esteraseaktivität mit 0,2% beta-Naphthylacetat bei pH 7,6.

Abb. 3. Immunologische Identität der antigenen Esterasen vom Meerschweinchen und vom Kaninchen. Es wurde das gegen das isolierte menschliche Antigen VI A gerichtete monospezifische Immunsereum vom Kaninchen verwendet (a-VI). Esterasefärbung mit 0,2% beta-Naphthylacetat bei pH 7,6.

K = Kaninchenmagen, MS = Meerschweinchenmagen

2. Geldiffusion (Tab. 2)

a) Monospezifisches Immuneserum gegen isoliertes menschliches Antigen (a VI A) gerichtet

Bei Verwendung der gegen das menschliche, isolierte Antigen gerichteten monospezifischen Immunesera von Kaninchen zeigte sich in der Geldiffusion gegen Totalextrakte vom Meerschweinchen und vom Kaninchen (Abb. 2) eine Präzipitationslinie, die sich als Esterase anfärben ließ. Keine Reaktion zeigte sich mit den Extrakten der Ratte. Zwischen den Antigenen vom Meerschweinchen und vom Kaninchen bestand eine vollständige Identität (Abb. 3), während mit dem menschlichen Antigen aus der Magenschleimhaut und aus dem Magensaft nur eine Teilidentität (Spurbildung) nachzuweisen war (Abb. 2).

Bei Absorption des Immuneserums mit menschlichen Totalextrakten oder mit isoliertem Antigen kamen keine Präzipitationsreaktionen mehr zustande.

Tabelle 2

Ergebnisse

der in der Geldiffusion beobachtbaren immunologischen Präzipitationsreaktionen

Immunesera	Mensch Magen/ Magensaft	Esterase-Antigen		Ratte
		Meer- schweinchen	Kaninchen	
Anti VI A (M)	+	(+) T	(+) T	∅
Anti VI A (M) -Meerschweinchen	+	∅	∅	∅
Anti VI A (M) -Kaninchen	+	∅	∅	∅
Anti VI A -Ratte	+	(+) T	(+) T	∅
Anti-Meerschw.	∅	+	∅	
Anti-Meerschw. -Kaninchen	∅	+	∅	
Anti-Meerschw. -Mensch	∅	+	∅	
Anti-Kaninchen	∅	∅	+	
Anti-Kaninchen -Meerschweinchen	∅	∅	+	
Anti-Kaninchen -Mensch	∅	∅	+	

+ = ausgeprägte Präzipitationslinie mit Esteraseaktivität

(+) T = Präzipitation mit Spurbildung als Ausdruck einer partiellen immunologischen Verwandtschaft und Esteraseaktivität

∅ = keine immunologischen Präzipitationsreaktionen

Die Absorptionen mit Extrakten von Meerschweinchen und Kaninchen führten zu einer Inhibition der gegen beide Tiermägen gerichteten Antikörper, während die gegen menschliche Extrakte gerichteten Antikörper unbeeinflusst blieben (Abb. 2). Die Absorptionen mit Extrakten des Rattenmagens ergaben keine Inhibitionen (Abb. 4).

b) Immunsera gegen Meerschweinchen-Magenextrakt gerichtet (aMS)

In der Geldiffusion reagierten diese Immunsera nur mit einem Meerschweinchen-Antigen mit Esterase-Aktivität (Abb. 5). Mit den übrigen Esterase-Antigenen vom Kaninchen, von der Ratte und von den Menschen kam keine Reaktion zustande. Die Präzipitationslinie ließ sich als Esterase charakterisieren. Die Absorption mit dem homologen Material führte zu einer Inhibition, die Absorptionen mit den übrigen Tier- und Humanextrakten blieben ohne Effekte.

c) Immunsera gegen Kaninchen-Magenextrakt gerichtet (aK)

Diese Immunsera reagierten nur mit dem Kaninchenextrakt, nicht mit den übrigen Tier- und Humanextrakten. Die Präzi-

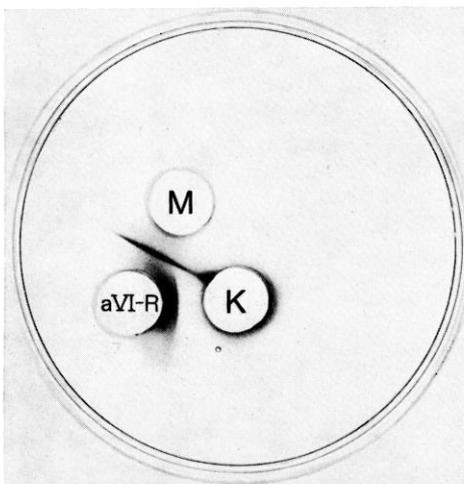


Abb. 4

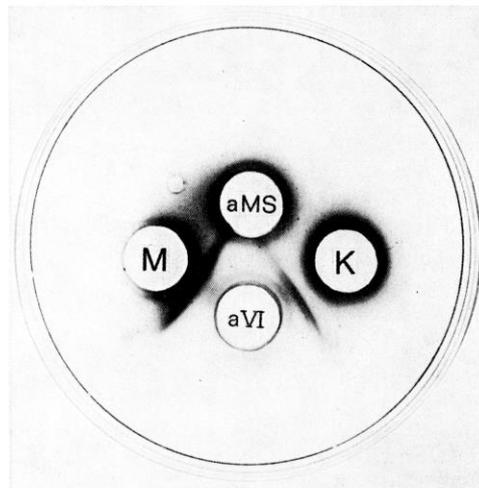


Abb. 5

Abb. 4. Absorptionsversuch mit Extrakt des Rattenmagens. Das gegen das menschliche Antigen VI A gerichtete und mit dem Kaninchen-Antigen (K) präzipitierende Immunsereum wurde mit Extrakt des Rattenmagens absorbiert (a VI-R). Es kommt zu keiner Beeinträchtigung der immunologischen Reaktionen.

M = Menschliche Magenschleimhaut

Abb. 5. Immunologische Reaktion der Esterase vom Menschen (M) und vom Kaninchen (K) mit dem gegen das menschliche Esterase-Antigen gerichtete Immunsereum vom Kaninchen (a VI). Das gegen die Esterase vom Meerschweinchen gerichtete Immunsereum ergibt keine Reaktion mit den beiden Antigenen

tationslinie ließ sich als Esterase anfärben. Die Absorption mit homologem Kaninchenextrakt führte zu einer Inhibition. Die Absorptionen mit den übrigen Human- und Tierextrakten blieben ohne Effekt.

Diskussion

In den Magenschleimhautextrakten der untersuchten Kaninchen, Meerschweinchen und der Ratten ließen sich mehrere Carboxyl-Esterasen nachweisen, die nach dem elektrophoretischen Verteilungsbild differenziert werden konnten. In dem kathodischen Auftrennungsbereich konnte analog zu der menschlichen Esterase VI A (1) bei allen Tieren eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, die sich nur geringfügig durch ihre elektrophoretischen Mobilitäten und jeweiligen relativen Konzentrationen unterschieden. Aus den immunologischen Untersuchungen geht hervor, daß zwischen dem menschlichen Esterase-Antigen VI A und jeweils einer Schleimhautesterase des Meerschweinchen- und des Kaninchenmagens eine schwache immunologische Verwandtschaft besteht, während mit den Esterasen des Rattenmagens keine Verwandtschaftsbeziehungen nachgewiesen werden konnten.

Von besonderem methodischem Vorteil bei den immunologischen Nachweisverfahren erwies sich die in „situ-Charakterisierung“ (10) der Enzymaktivität des in dem Präzipitationskomplex vorhandenen Enzym-Antigens, so daß trotz der Verwendung von 2 polyvalenten gegen die Mägen von Kaninchen und Meerschweinchen gerichteten Immunsera eine eindeutige Zuordnung der Präzipitationslinien erfolgen konnte. Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß die enzymatische Esterase-Aktivität in den Präzipitationskomplexen weder auf die Immunglobuline noch auf das Komplementsystem zurückgeführt werden kann (1).

Zwischen dem menschlichen Antigen VI A und den Antigenen von Kaninchen und Meerschweinchen konnte unter Verwendung der gegen VI A gerichteten Immunsera vom Kaninchen eine Präzipitationsreaktion nachgewiesen werden, die nach OUCHTERLONY als Typ III bezeichnet werden kann (9), und die für eine gemeinsame antigene Determinante bei den 3 untersuchten Esterase-Antigenen vom Mensch, vom Meerschweinchen und Kaninchen spricht. Da die gegen Meerschweinchen und Kaninchenmagen-Extrakte gerichteten Immunsera keine Reaktion mit dem menschlichen Antigen ergaben, kann angenommen werden, daß diese gemeinsame antigene Determinante nur in dem menschlichen Antigen gegenüber dem Kaninchen eine immunogene Wirkung entfaltete und zur Bildung von präzipitierenden Antikörpern führte. Darüber hinaus zeigte sich, daß die antigenen Esterasen vom Menschen, Meerschweinchen und Kaninchen artspezifische

Determinanten besitzen, deren genaue Zusammensetzung und Anzahl erst nach Isolierung und immunchemischer Analyse der beteiligten Komponenten beschrieben werden kann.

Erwähnenswert ist die Tatsache, daß das menschliche Antigen bei dem Kaninchen einen Antikörper induzierte, der in der Geldiffusion mit dem homologen und autologen Esterase-Antigen des Kaninchens reagierte. Mit Einschränkung kann in diesem Zusammenhang von einem „Autoantikörper“ gesprochen werden.

Zusammenfassung

Die antigene Magenschleimhautesterase VI A vom Menschen wurde unter Verwendung von Agargelelektrophoresen und Heteroimmunsera mit den Magenschleimhautextrakten vom Kaninchen, Meerschweinchen und der Ratte verglichen. In der Gelelektrophorese wurden in allen Extrakten mehrere Esterasefraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität beobachtet. In den tierischen Extrakten war eine im kathodischen Bereich liegende Esterasefraktion vorhanden, deren elektrophoretische Mobilität jener der menschlichen Esterase VI A entsprach. Mit den Heteroimmunsera, die gegen das isolierte menschliche Antigen und gegen die Extrakte von Meerschweinchen und Kaninchen gerichtet waren, konnte in den Geldiffusionsverfahren eine gemeinsame antigene Determinante in dem Antigen VI A und in einer antigenen Esterase vom Kaninchen und vom Meerschweinchen beobachtet werden. Diese antigene Determinante zeigte nur im menschlichen Antigen eine immunogene Wirkung. Die antigenen Esterasen von Mensch, Meerschweinchen und Kaninchen besaßen darüber hinaus artspezifische Komponenten. Keine immunologischen Beziehungen konnten zu den Magenschleimhautextrakten der Ratte erstellt werden.

Summary

On the species-specificity of the antigenic esterase VI A of the human gastric mucous membrane
I. Comparative studies on extracts of the gastric mucous membrane of rabbit, guinea-pig, rat and man

The antigenic esterase VI A of the human gastromucosa was compared with extracts of the gastromucosa of rabbit, guinea pig and rat by means of gelelectrophoresis and immunological methods. By gelelectrophoresis in all of the extracts we observed several carboxyl esterases with different mobilities. In animal extracts we found one esterase with cathodal mobility which could be compared with the human esterase VI A. We detected a common antigenic determinant in the human esterase VI A and the esterases of guinea pig and rabbit. This was done by using heteroimmune sera against,

1. the isolated human esterase VI A,
2. extracts of gastromucosa of guinea pig and
3. extracts of gastromucosa of rabbit.

The antigenic esterases of man, guinea pig and rabbit also had antigenic components particular to each individual species. No immunological relationship with extracts of the gastromucosa of rat could be elaborated.

Résumé

Au sujet de la spécificité de l'esterase antigénique VI A de la muqueuse gastrique de l'homme

- I. Examens comparatifs d'extraits de muqueuse gastrique de lapins, cobayes, rats et humains

L'esterase antigénique VI A de la muqueuse gastrique de l'homme a été comparée, en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agar et des sera hétéroimmuns, avec des extraits de muqueuse gastrique de lapins, cobayes et rats. On a observé

avec l'électrophorèse sur gel dans tous les extraits de muqueuse gastrique plusieurs fractions d'estérase à mobilité électrophorétique différente. Dans les extraits d'origine animale, il se manifesta dans la sphère cathodique une fraction d'estérase, dont la mobilité électrophorétique correspond à celle de l'estérase VI A humaine. La technique à diffusion sur gel avec des séra hétéroimmuns, dirigés contre l'antigène humain isolé et contre les extraits de cobaye et lapin, fit observer une déterminante antigénique commune dans l'antigène VI A et dans une estérase antigénique du lapin et du cobaye. Cette déterminante antigénique ne manifesta une action immunogène que dans l'antigène humain. Les esterases antigéniques de l'homme, du cobaye et du lapin possédèrent en outre des composantes de nature spécifique. Aucun rapport immunologique n'a pu être établi dans les extraits de muqueuse gastrique du rat.

Перевод заглавия

К видоспецифичности антигенной эстеразы VI A слизистой оболочки желудка человека

I. Сравнительные исследования на экстрактах слизистой оболочки желудка кроликов, морских свинок, крыс и человека

Literatur

1. RAPP, W., S. B. ARONSON, P. BURTIN und P. GRABAR: *J. Immunol.* **92**, 579 (1964).
2. KUHLMANN, W. D., H. FRITSCH und W. RAPP: In Vorbereitung.
3. RAPP, W. und P. BURTIN: *Gastroenterologia (Basel)* **102**, 355 (1964).
4. RAPP, W.: *Klin. Wschr.* **45**, 533 (1967).
5. RAPP, W.: *Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med.* **73**, 284 (1967).
6. RAPP, W., S. B. ARONSON, I. KUSHNER, P. BURTIN und P. GRABAR: In: *Immunopathology, IVth International Symposium*, Ed. GRABAR und P. A. MIESCHER, Schwabe u. Co. Publishers Basel/Stuttgart **77** (1966).
7. RAPP, W. und H. E. LEHMANN: *Proteins and Related Subjects*, **16**, 441 (1969), Pergamon Press, London.
8. RAPP, W. und H. E. LEHMANN: In Vorbereitung.
9. OUCHTERLONY, Ö.: In: „Progress in Allergy“, Hsg.: P. KALLOS, S. Karger, Basel, New York, **5**, 1 (1958).
10. GRABAR, P. und P. BURTIN: *Immuno-Elektrophoretische Analyse*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1964.
11. RAPP, W.: *Clin. Chim. Acta* **15**, 177 (1967).

Dr. W. D. Kuhlmann, z. Z. Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif/Seine (Frankreich)

PD Dr. W. Rapp, z. Zt. Stanford University School of Medicine, Division of Gastroenterology, Stanford, California 94305

Sonderdruckanforderungen an: PD Dr. W. Rapp, Med. Univ. Klinik, 69 Heidelberg