

Immunfluoreszenzhistologischer Nachweis der antigenen Magenschleimhautesterase VI A in dem Oberflächenepithel der menschlichen Korpusschleimhaut*

W. D. KUHLMANN, H. FRITSCH und W. RAPP

Mit der technischen Assistenz von
EDDA MÜLLER

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

Eingegangen am 15. Dezember 1969

Immunofluorescent histological Demonstration of the Antigenic Mucosal Esterase VI A in the Superficial Epithelial Cells of the Human Fundic Gastric Mucosa

Summary. Cryostat sections of normal human gastric mucosa from the body were treated with monospecific heteroimmunsera, which were directed against the organspecific esterase-antigen VI A. Using fluorescent antiglobulin immunsera it could be demonstrated according to the gastric histology, that the antigen VI A is localized in the mucus secreting surface epithelial cells. The specificity of the immunohistochemical assay has been proved by absorption studies.

Key-Words: Immunofluorescence — Gastric mucosal antigen — Human gastric mucosa.

Zusammenfassung. Mit monospezifischen Heteroimmunsera, die gegen die organspezifische antigene Esterase VI A gerichtet waren, wurden mit dem indirekten Nachweisverfahren nach Coons unter Verwendung FITC-chromierten Antiglobulinserums Gefrierschnitte der normalen Korpusschleimhaut untersucht. Aus dem Vergleich der histologischen und immunfluoreszenzhistologischen Untersuchungen geht hervor, daß die antigene Esterase in dem schleimbildenden Oberflächenepithel der menschlichen Korpusschleimhaut gebildet wird. Die Spezifität des Nachweisverfahrens wurde mit Geldiffusionsverfahren, mit Absorptionsversuchen und normalen Kontrollsera überprüft.

Schlüsselwörter: Immunfluoreszenz — Magenschleimhautantigen — Menschliche Korpusschleimhaut.

Die antigene Esterase VI A ist ein organspezifisches Antigen der menschlichen Korpusschleimhaut, das mit Heteroimmunsera erstmals 1964 in immunchemischen Geldiffusionsverfahren identifiziert wurde [9]. Dieses Antigen wird normalerweise in das Lumen des Magens sezerniert

* Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

und kann mit immunologischen und enzymelektrophoretischen Methoden in dem normaziden Magensaft nachgewiesen werden [7]. Es handelt sich um ein säurestabiles Glykoprotein, dessen pH-Optimum bei 6,6 liegt, das den synthetischen Carboxylester beta-Naphthylacetat spaltet und darüber hinaus zu einer Vitamin B 12-Bindung in vitro fähig ist [1]. In den Extrakten carcinomatöser Korpusschleimhaut [10] und in den Magensäften von Patienten mit atrophischen Veränderungen der Magenschleimhaut [6] war dieses antigene Enzym vermindert oder abwesend.

Nach der Isolierung dieses organspezifischen Enzymantigens aus Magensaft und Korpusschleimhaut [13] konnten monospezifische Immunsera hergestellt werden, die in der vorliegenden Untersuchung zur histologischen Lokalisierung dieses Antigens in der menschlichen Magenschleimhaut verwendet werden.

Material und Methoden

1. *Magenschleimhaut.* Aus sechs chirurgischen Resektionspräparaten der Blutgruppe 0 Rh+ wurde nach Präparation der Tunica mucosa Korpusschleimhaut entnommen, auf einer Korkplatte aufgespannt und halbiert. Die eine Hälfte ($2 \times 10 \times 5$ mm) wurde zur Herstellung der Kryostatschnitte, die andere Hälfte in neutralem 10%igem Formalin fixiert und zur histologischen Untersuchung verwendet. Der Rest der Korpusschleimhaut wurde nach dem bisherigen Verfahren extrahiert [9].

2. *Histologie.* Nach Formalinfixierung wurden die Schleimhautstückchen in Paraffin eingebettet. An 5 μ dicken Stufenserienschnitten kamen folgende Färbemethoden zur Anwendung: Hämalaun-Eosin, Trichromfärbung nach Masson-Goldner und PAS-Alcianblau-Färbung.

3. *Kryostatschnitte.* Die Korpusschleimhaut wurde parallel zu den Foveolae gastricae auf den Gefrierkopf gelegt und mit diesem in flüssigen Stickstoff getaucht und tiefgefroren. In einem Kryostaten (System Duspiva-Dittes) wurden Schnitte von 4 μ hergestellt, auf alkoholgereinigte Objektträger aufgebracht und während 5 min bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die Hälfte dieser Schnitte wurde mit absolutem Alkohol während 10 min bei 4°C fixiert, mit physiologischer Kochsalzlösung anschließend ausgewaschen und luftgetrocknet. Die andere Hälfte dieser Schnitte bestand in luftgetrockneten Präparaten, die nicht weiter fixiert wurden.

4. *Immunhistologischer Nachweis.* Es wurde das indirekte Verfahren nach Coons [2] unter Verwendung eines chromierten Antiglobulin-Immunsersums von der Ziege verwendet. Die Gefrierschnitte wurden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer während 40 min mit dem monospezifischen Immunsorum vom Kaninchen inkubiert, anschließend viermal 5 min mit jeweiligem Wechsel der Flüssigkeit in einem physiologischen Natrium-Phosphatpuffer (0,01 M + 0,15 M NaCl) bei pH 7,6 gewaschen und anschließend mit dem chromierten Antiglobulinserum während 40 min inkubiert. Die Schnitte wurden dann wie zuvor gewaschen und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Die Schnitte wurden mit einem Gemisch von Glycerin-Phosphatpuffer (9:1; Vol/Vol) eingedeckt, wobei als Puffer der bereits erwähnte physiologische Natrium-Phosphatpuffer verwendet wurde.

5. *Immunsera.* Als monospezifische Immunsera von den Kaninchen wurden die Sera Nr. 411 und Nr. 174 verwendet, die gegen das aus einem Gemisch von normaziden Magensäften auf chromatographischem Wege [13] isolierte Antigen VI A gerichtet waren. Diese Immunsera ergaben in den Geldiffusionsverfahren nach Ouchterlony [4] und Oudin [5] gegen Korpusschleimhaut-Totalextrakte nur eine

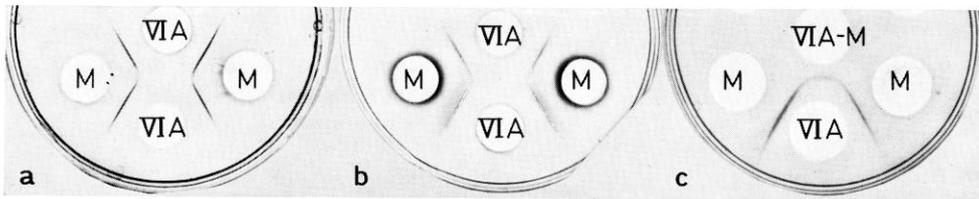


Abb. 1 a—c. Geldiffusion nach Ouchterlony. Überprüfung des monospezifischen Immunsersums auf Spezifität. a Überprüfung des gegen das Antigen VI A gerichteten Immunsersums (VI A) auf Monospezifität unter Verwendung von Magenschleimhaut-Totalextrakt (M) (Proteinkonzentration: 20 mg/ml). Nach der Färbung mit Amidoschwarz zeigt sich nur eine Präcipitationslinie. b Darstellung der enzymatischen Aktivität mit beta-Naphthyl-acetat (pH 7,6). Parallelversuch zu a. Das durch das Immunesum ausgefällte Antigen zeigt eine Esteraseaktivität. Färbung mit beta-Naphthylacetat und Diazoblau. c Inhibitionsversuch mit Magenschleimhaut-Totalextrakten. Das nicht absorbierte Immunesum (VI A) ergibt gegen Magenschleimhaut-Totalextrakt (M) eine Präcipitationslinie mit Esteraseaktivität. Nach Absorption mit Schleimhautextrakten (20 mg Protein/ml Immunesum) (VI A-M) kommt es zu einer Inhibition der Präcipitation. Esterasefärbung mit beta-Naphthylacetat

Präcipitationsbande, die in dem Verfahren nach Ouchterlony mit beta-Naphthylacetat und Diazoblau [6] als Esterase angefärbt werden konnte (Abb. 1 b).

Das Antiglobulinserum von der Ziege (Behringwerke, Op. Nr. 1278) wurde mit 40% neutralisierter Ammoniumsulfatlösung auf das Zweifache konzentriert und durch anschließende Gelfiltration mit Sephadex G 25 (fein) entsalzt und auf das pH 8,9 mit einem NaHCO_3 - NaH_2CO_3 -Puffer von 0,5 M eingestellt. Zur Chromierung wurde Fluorescein-Isothiocyanat (FITC; Baltimore, Biological Lab. Nr. 610 1540) in einer Konzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein verwendet.

Die erforderliche Menge FITC wurde in 0,5 ml Aceton aufgenommen und in die Globulinfraktion (20 mg Protein/ml) bei 4°C während 15 min unter fortlaufender Kontrolle des pH eingerührt. Unter ständigem Rühren erfolgte die Chromierung während 15 Std bei 4°C. Anschließend wurden nicht konjugierte Farbstoffteilchen durch eine Gelfiltration mit Sephadex G 25 (fein; physiologischer Na-Phosphatpuffer, pH 7,6) abgetrennt. Der Färbeindex betrug 4×10^{-3} .

6. Überprüfung der serologischen und fluoreszenzoptischen Spezifität. Zur Überprüfung der serologischen Spezifität wurden die monospezifischen Immunsere mit isoliertem Antigen und lyophilisierten Schleimhauttotalextrakten stufenweise absorbiert, bis in der Geldiffusion nach Ouchterlony keine Präcipitationsreaktion mehr nachzuweisen war. Die absorbierten Immunsere wurden in dem Versuchsansatz nach 4. weiter verwendet.

Zur Beurteilung unspezifischer Proteinbindungen und unspezifischer Färbungen wurden in jedem Versuchsansatz neben dem monospezifischen Immunesum normales Kaninchenserum und das Antiglobulinserum alleine verwendet.

7. Nachweis des Belegzellenantigens. Es wurde Patientenserum mit Autoantikörpern gegen das Belegzellenantigen nach dem Verfahren nach Taylor et al. [14] verwendet. Als Fluoreszenzserum wurde ein Immunesum von der Ziege, gerichtet gegen Ig G-Globuline des Menschen (H-Ketten spezifisch), verwendet, das mit FITC chromiert wurde und einen FI von $3,0 \times 10^{-3}$ besaß [3].

8. Mikroskop. Es wurde das große Leitz-Forschungsmikroskop „Ortholux“ (HBO 200, Erregerstrahlung: Blaulicht, BG 12—3 mm Schichtdicke, Streuscheibe N, Sperrfilter K 530, Objektive 10 und 40) verwendet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde der Trocken-Dunkelfeldkondensator Nr. 84, D 0.80, für die Phasenkontrastmikroskopie der Phaco-Kondensator Nr. 402 verwendet. Die photographischen Aufnahmen erfolgten als Farbaufnahmen auf dem Ektachrom-Tageslichtfilm (Highspeed, 23 DIN). Schwarzweißaufnahmen erfolgten mit dem Adox KB 14-Film. Als Photopapier wurde Agfa RRS 1 (13 × 18 cm) verwendet.

Ergebnisse

1. *Histologische Lokalisierung der antigenen Esterase VI A*

a) *Histologie.* Bei der histologischen Untersuchung der verwendeten Schleimhautabschnitte findet man eine typisch konfigurierte Magenschleimhaut, deren oberflächliche Epithellagen mit einem Schleimfilm bedeckt sind. Der Aufbau der Korpusschleimhaut entspricht dem typischen Bild einer intakten Corpusmucosa. Auch das darunterliegende Bindegewebe und die Muskulatur der Magenwandung zeigt eine regelrechte Anordnung (Abb. 2a).

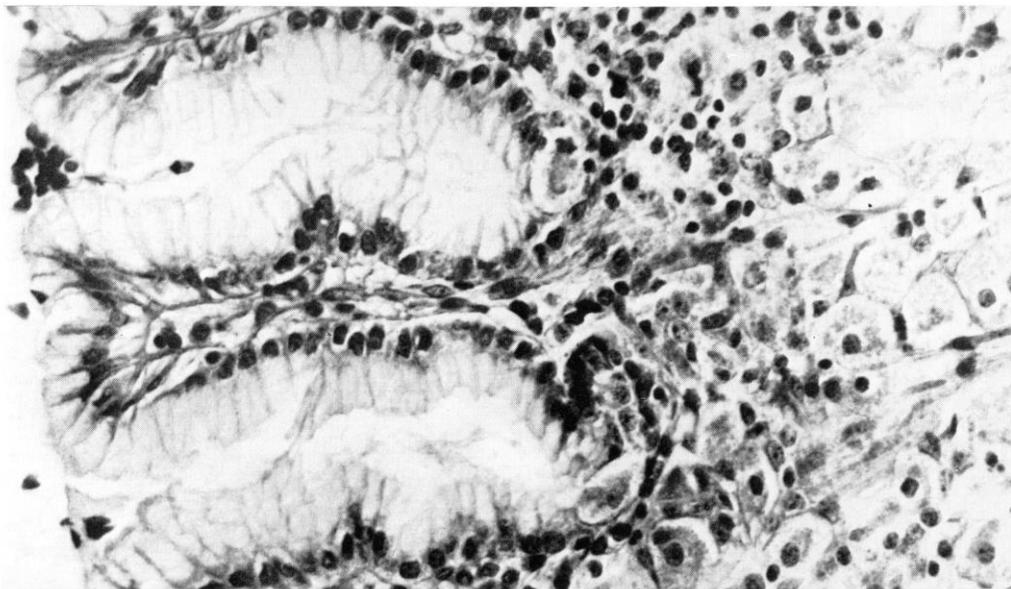
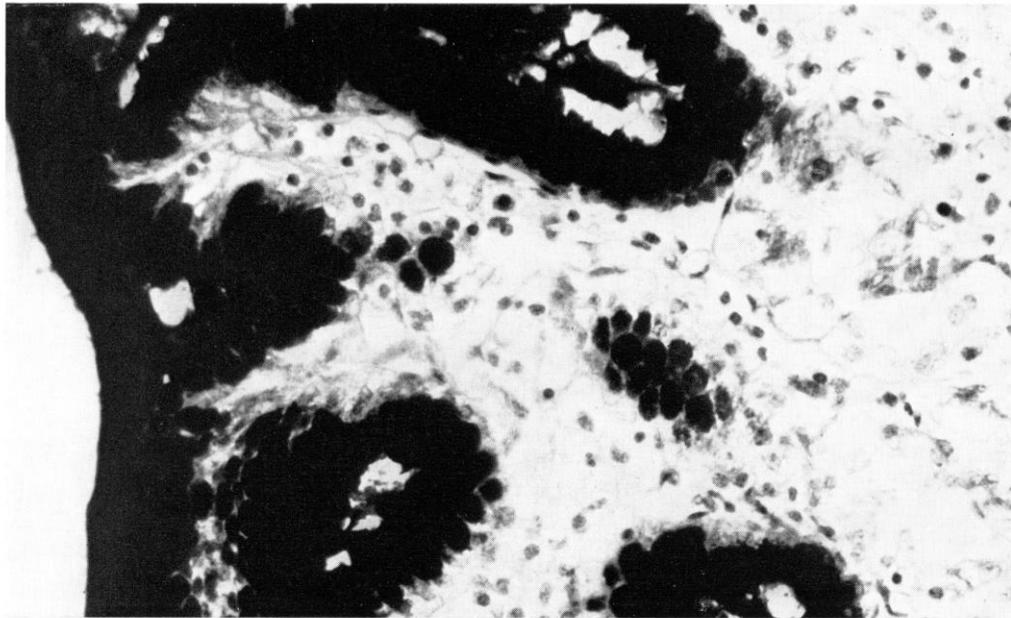
Mittels der PAS-Färbung lassen sich der das Oberflächenepithel bedeckende Schleim sowie die oberen Anteile des zylindrischen Magenschleimhautepithels selektiv anfärben (Abb. 2b). Die PAS-Reaktion in den tiefer gelegenen Drüsenzellen der Korpusschleimhaut ist negativ. Lediglich vereinzelt findet man dort PAS-positive Zellen.

b) *Fluoreszenzhistologie.* Aus dem Vergleich der Übersichtsaufnahmen Abb. 3a (Fluoreszenzfärbung) und Abb. 3b (Phasenkontrast) des gleichen Schleimhautabschnittes geht deutlich hervor, daß sich die Fluoreszenzfärbung im Bereich der Oberfläche und in den Foveolae gastricae vorfindet. Es handelt sich hierbei um einen Bereich, in dem serologisch keine nachweisbaren Belegzellen vorhanden sind (Abb. 4). Eine weitere Differenzierung der fluoreszierenden Stellen geht aus Abb. 5a hervor, wo eine etwas tieferliegende Foveola gastrica getroffen ist. In der dazugehörigen Phasenkontrastaufnahme (Abb. 5b) stellen sich die fluoreszierenden Zellen als kubische, bienenwabenförmige, wasserhelle Zellen dar. Grundsätzlich ergaben die alkoholfixierten Schnitte wesentlich schärfere Kontraste.

2. *Spezifität des Nachweises*

Die Verwendung des chromierten Antiglobulinserums ergab bei den nicht fixierten Schnitten eine leicht diffuse Färbung in den Bindegewebsstrukturen, während die alkoholfixierten Schnitte keinerlei Färbungen ergaben. Die Verwendung eines Kaninchennormalserums an Stelle des monospezifischen Immunsersums ergab nur geringe Fluoreszenzfärbungen in vereinzelt Bereichen der oberflächlichen Schleimlagen (Abb. 6). Bei Verwendung absorbiertes monospezifischer Immunsere zeigte sich in der Geldiffusion eine vollständige Inhibition der Reaktion (Abb. 1c). Gleichzeitig zeigte sich in dem fluoreszenzhistologischen Versuchsansatz eine

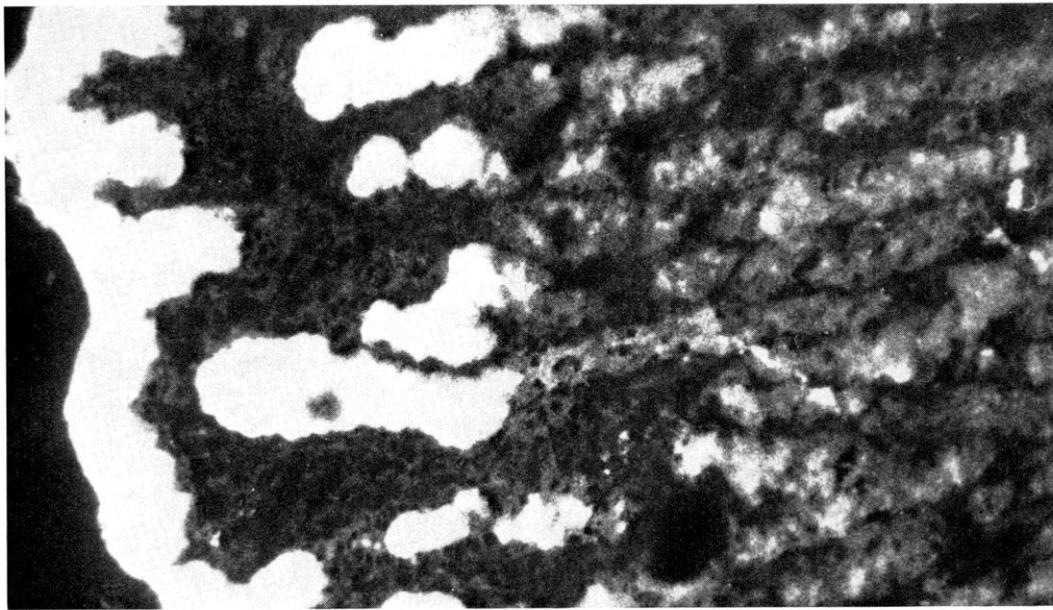
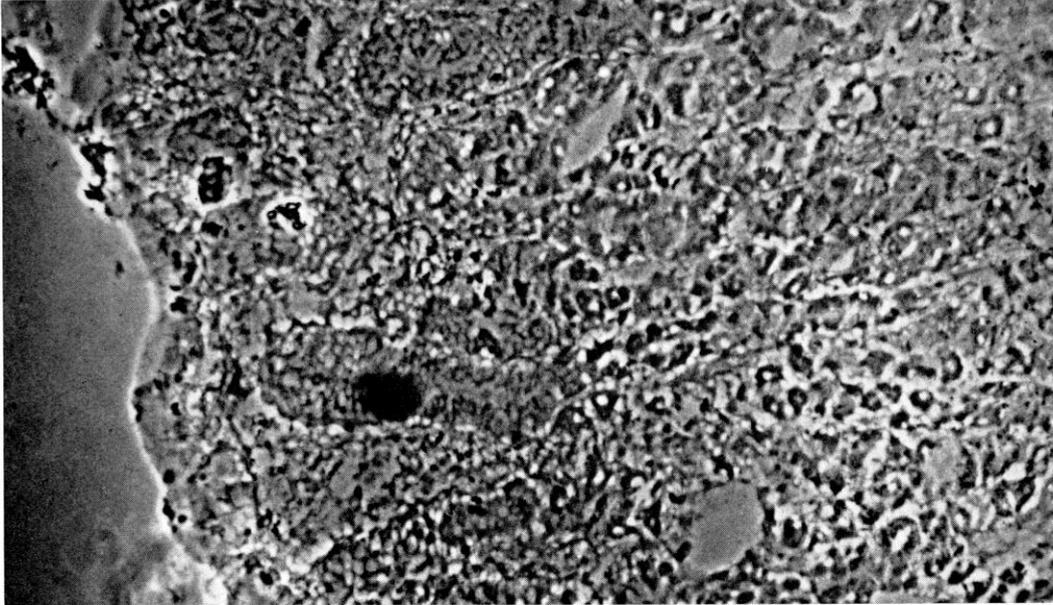
Abb. 2. a Korpus-
schleimhaut. Zwei
Foveolae gastricae
mit dem typischen
zylindrischen Epi-
thel, darunter die
kubisch gestalteten
Fundusdrüsen-
zellen. Trichrom-
färbung nach
Masson-Goldner
($\times 590$). b PAS-
Alcianblau-Fär-
bung der Korpus-
schleimhaut. PAS-
positiv (in der Ab-
bildung schwarz)
reagieren die das
Oberflächenepithel
bedeckende
Schleimschicht und
die zylindrischen
Drüsenzellen der
Foveolae gastricae
($\times 90$)



b

a

Abb. 3. a Korpus-
schleimhaut,
alkoholfixierter
Kryostatatschnitt
von 4 μ . Immun-
fluoreszenzhisto-
logischer Nachweis
der antigenen
Esterase VI A.
Inkubation mit
monospezifischem
Immuns serum vom
Kaninchen, an-
schließend Anti-
globulins erum mit
FITC chromiert
($\times 50$). b Phasen-
kontrastaufnahme
der Korpus schleim-
haut in Abb. 3a
($\times 50$)



b

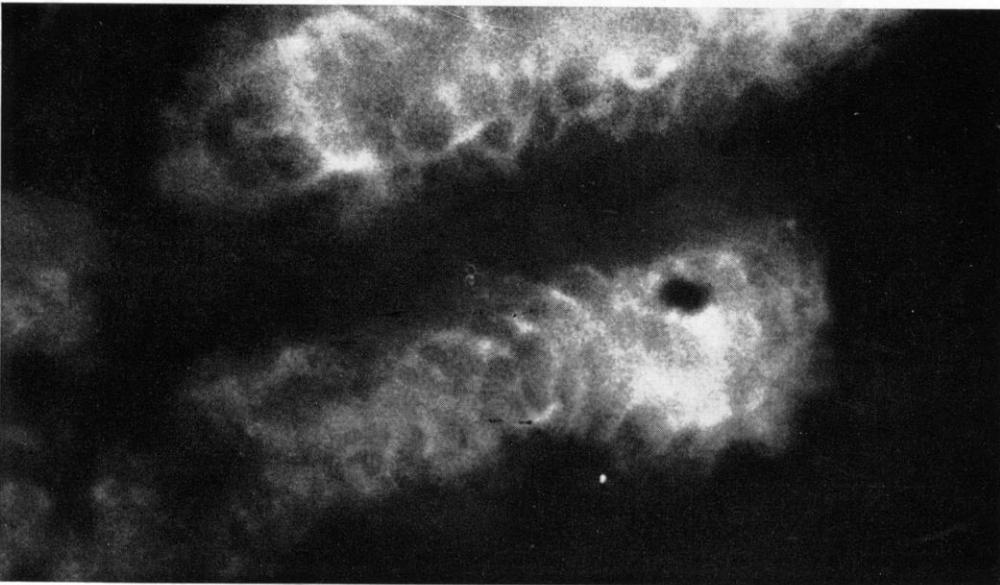
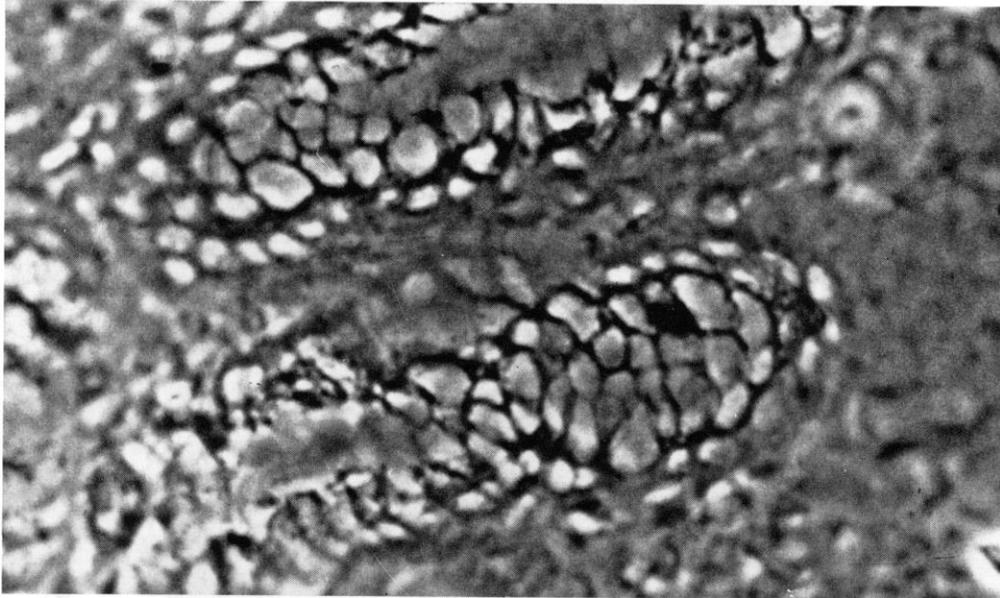
a



Abb. 4. Korpusschleimhaut, alkoholfixierter Kryostatschnitt von 4 μ . Immunfluoreszenzhistologischer Nachweis von Belegzellen mit Hilfe eines Patientenserums (chronisch atrophische Gastritis), das Autoantikörper gegen das Belegzellenantigen enthielt. Anschließend Inkubation mit FITC chromiertem, gegen Human Ig G (H-Ketten-spezifisch) gerichtetem Immunsorum von der Ziege. Die Belegzellen sind in der vorliegenden Aufnahme in der distalen Hälfte der abgebildeten Korpusschleimhaut nachzuweisen

vollständige Hemmung der zuvor ausgeprägten Fluoreszenz. Diese Hemmung der Fluoreszenzreaktion kam allerdings nur bei Absorption mit den autologen Schleimhautextrakten zustande, während die verwendeten homologen Extrakte bzw. isolierten Antigene nur zu einer allerdings deutlichen Abschwächung der Fluoreszenz führten. In der Geldiffusion wurde jedoch in all diesen Fällen eine vollständige Inhibition beobachtet.

Abb. 5. a Korpus-schleimhaut (Ausschnitt aus Abb. 3a), alkoholfixierter Kryostat-schnitt von 4 μ . Darstellung zweier Foveolae gastricae, immunfluoreszenz-histologischer Nachweis der anti-genen Esterase VI A ($\times 200$).
 b Phasenkontrast-aufnahme des Ausschnittes der Korpus-schleimhaut in Abb. 5a. Darstellung zweier Foveolae gastricae. Bei den fluorescierenden Zellen in Abb. 5a handelt es sich somit um kubische, bienen-wabenförmige, wasserhelle Zellen ($\times 200$)



b

a

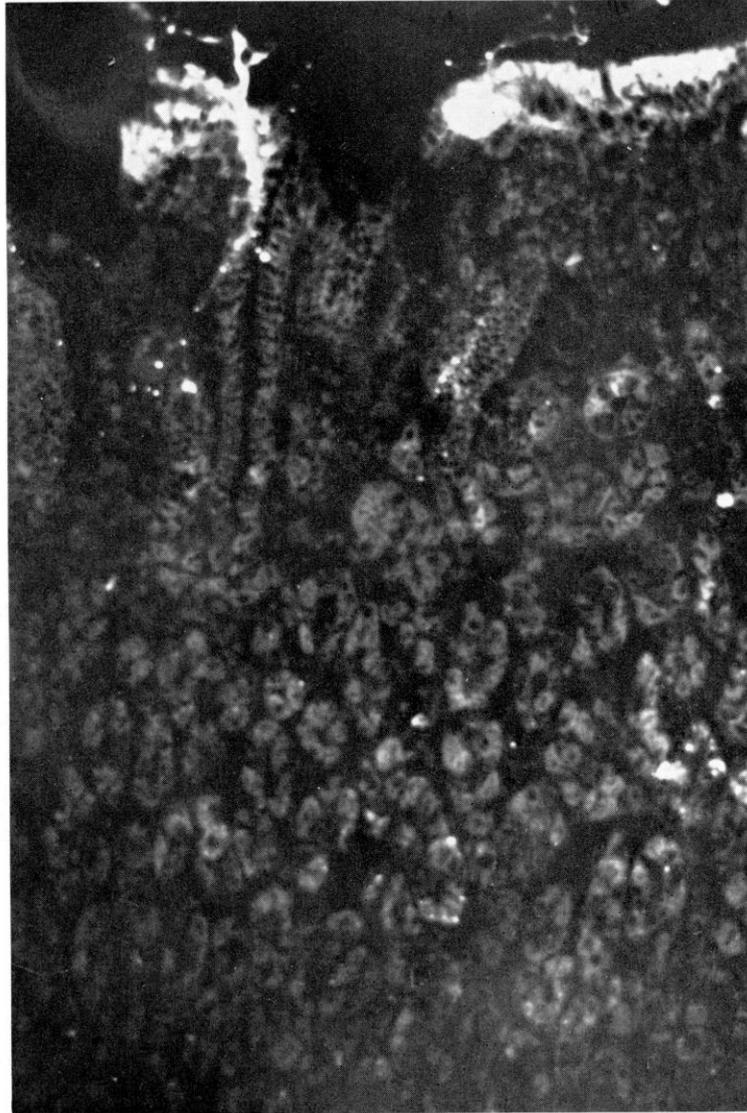


Abb. 6. Überprüfung der Spezifität. Korpusschleimhaut, alkoholfixierter Kryostat-schnitt $4\ \mu$. Verwendung eines normalen Kaninchenserums an Stelle des monospezifischen Immunsersums. Anschließend mit FITC chromiertes Antiglobulinserum ($\times 400$). Im Vergleich zu Abb. 3a zeigt sich nur eine geringfügige unspezifische Fluoreszenz im oberen Teil des der Oberfläche aufliegenden Schleimes

Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wird nachgewiesen, daß die organspezifische antigene Esterase VI A der menschlichen Korpusschleimhaut im Bereich des Oberflächenepithels vorhanden ist. In der Übersichtsaufnahme Abb. 3a fällt ein breiter fluoreszierender Saum auf, der auf Grund der zugehörigen Phasenkontrastaufnahme in Abb. 3b und der Schleim-

färbung mit der PAS-Alcianblau-Färbung (Abb. 2 b) sowohl auf das Oberflächenepithel als auch auf die darüberliegende Schleimschicht zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus fluorescieren die in den tieferliegenden Foveolae vorhandenen Epithelzellen. Aus dem Vergleich der fluoreszenzimmunologischen und histologischen Untersuchungen geht hervor, daß die antigene Esterase in jenen Schleimhautbereichen vorhanden ist, die mit PAS-Alcianblau-Färbung anfärbbar sind.

In den bisherigen immunologischen Untersuchungen konnte die antigene Esterase VI A in der Korpusschleimhaut [9], in dem postoperativ gewonnenen Schleim der Schleimhautoberfläche [11] und in relativ hoher Konzentration in dem Magensaft [7] nachgewiesen werden. Es handelt sich auf Grund der bisher bekannten spezifischen serologischen Eigenschaften um eine Substanz, die nur im Bereich des Magens nachzuweisen war und somit als organspezifisches Antigen bezeichnet werden kann. Die Untersuchung subcellulärer Bestandteile der menschlichen Korpusschleimhaut ergab darüber hinaus, daß eine überwiegende Konzentration dieses Antigens in der Mikrosomenfraktion vorhanden war [12]. Nach dem Abschluß der vorliegenden Untersuchungen ist somit der Schluß gerechtfertigt, daß die antigene Esterase VI A der Korpusschleimhaut in dem endoplasmatischen Reticulum der schleimbildenden Oberflächenzelle der Korpusschleimhaut gebildet und mit dem Schleim in das Lumen des Magens sezerniert wird und im Magensaft nachweisbar ist. Die Beziehungen dieses Enzymentigens zu dem Magenschleim, der noch eine Reihe weiterer Substanzen enthält [7], sind noch unbekannt. Da dieses antigene Enzym bisher als Glykoprotein charakterisiert werden konnte [7], ist seine Anfärbbarkeit durch PAS-Färbung anzunehmen.

Wesentliche methodische Voraussetzungen immunhistologischer Nachweisverfahren beruhen auf der Spezifität der verwendeten Immunsere und des fluoreszenzhistologischen Nachweises. Aus diesem Grunde sind bei derartigen Untersuchungen eine Reihe von Kriterien besonders zu beachten. Die serologische Spezifität des mit dem isolierten Antigen hergestellten Heteroimmunserums ist auf Grund der Untersuchungen in den beiden Geldiffusionsverfahren nach Ouchterlony und Oudin unter Verwendung von hochkonzentrierten Totalextrakten gewährleistet. Unspezifisch absorbierte Immunglobuline konnten ausgeschlossen werden. Es hat sich deutlich gezeigt, daß durch die Verwendung von alkoholfixierten Kryostatschnitten eine schwache Eigenfluoreszenz der Bindegewebsstrukturen der Magenschleimhaut und eine schwache unspezifische Fluoreszenz durch das Antiglobulinserum völlig vermieden werden kann.

Die Tatsache, daß eine vollständige Inhibition der Immunfluoreszenzreaktion nur mit Absorptionen von autologen Magenextrakt zustande kam, stellt einen Hinweis auf eine mögliche Individualspezifität des Antigens VI A dar.

Ein wesentlicher Vorteil immunfluoreszenzhistologischer Nachweisverfahren besteht darin, daß antigene Proteinindividuen auf Grund ihrer immunologischen Spezifität — spezifische Immunsera vorausgesetzt — im histologischen Gewebsverband nachgewiesen werden können. In dem vorliegenden Fall handelt es sich um ein antigenes Enzym, das auf Grund anderer substratähnlicher Esterasen der menschlichen Schleimhaut [9] mit den klassischen Verfahren der Enzymhistochemie nicht nachgewiesen werden kann. Ohne Zweifel besteht hier eine methodische Möglichkeit, die Grundfragen der funktionellen Histologie unter Berücksichtigung biochemischer und immunchemischer Bezugssysteme [8] zu bearbeiten.

In dem vorliegenden Fall der antigenen, Vitamin B 12-bindenden Esterase handelt es sich um eine organspezifische Substanz, die in der carcinomatös veränderten Magenschleimhaut vermindert oder abwesend war [10]. Aus den bisherigen semiquantitativen Untersuchungen normaler und pathologischer Magensäfte geht hervor [6], daß dieses Antigen in Fällen von Schleimhautatrophie vermindert war. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem quantifizierbaren Antigen im Magensaft und der morphologisch-funktionellen Beschaffenheit des schleimbildenden Oberflächenepithels der Korpuschleimhaut zu beweisen.

Literatur

1. Burtin, P., Vendrely, C., Rapp, W.: Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 12th Colloquium, Bruges 1964, p. 213. Amsterdam: Elsevier 1965.
2. Coons, A. H.: Fed. Proc. **10**, 558 (1951).
3. Kuhlmann, W. D., Rapp, W.: In Vorbereitung.
4. Ouchterlony, Ö.: Progr. Allergy **5**, 1 (1958).
5. Oudin, J.: C. R. Acad. Sci. (Paris) **222**, 115 (1946).
6. Rapp, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **73**, 284 (1967).
7. — Klin. Wschr. **45**, 533 (1967).
8. — Wiederbelebung und Organersatz **5**, 32 (1968).
9. — Aronson, S. B., Burtin, P., Grabar, P.: J. Immunol. **92**, 579 (1964).
10. — — Kushner, I., Burtin, P., Grabar, P.: Immunopathology, IVth International Symposium, Ed. P. Grabar and P. A. Miescher, p. 77. Basel-Stuttgart: Schwabe 1966.
11. — Burtin, P.: Gastroenterologia (Basel) **102**, 355 (1964).
12. — — Z. ges. exp. Med. **150**, 260 (1969).
13. — Lehmann, H. E.: In Vorbereitung.
14. Taylor, K. B., Roitt, I. M., Doniach, D., Couchman, K. G., Shapland, C.: Brit. med. J. **1962**, 1347.

Dr. W. D. Kuhlmann
z. Z. Institut de Recherches
Scientifiques sur le Cancer
94 Villejuif / Seine, France

Dr. H. Fritsch
Medizinische Universitätsklinik
D-6900 Heidelberg, Bergheimer Straße

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

Sonderdruckanforderungen an
PD Dr. W. Rapp
Medizinische Universitätsklinik
D-6900 Heidelberg, Bergheimer Straße