

Vorkommen und Manipulation von MHC Klasse II Antigenen auf Zellen isolierter Langerhans-Inseln

Von K. ULRICHS, R. KELLER und W. MÜLLER-RUCHHOLZ

Einleitung

Im Zusammenhang mit der Immunogenität von Allotransplantaten erlangen die Charakterisierung und Manipulation von Klasse II Antigenen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. MHC) besondere Bedeutung. Antigene dieser Klasse, auch Ia Antigene genannt kommen regelmäßig auf Antigen-präsentierenden Zellen (engl. APC), den dendritischen Zellen und Makrophagen, vor. Ihr Vorkommen auch auf Zellen des vaskulären Endothels ist für bestimmte menschliche Gewebe zunehmend gesichert, für Rattengewebe nach wie vor umstritten. Für parenchymatöse Zellen gilt, daß diese bei bestimmten funktionellen Reizen Ia Antigene exprimieren können, ansonsten Ia negativ sind. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, MHC Klasse II Antigene auf den unterschiedlichen Zellen der isolierten Ratteninsel mit der Immunfluoreszenz-Methode nachzuweisen und mit Hilfe geeigneter, zytotoxischer monoklonaler Antikörper zu lysieren. So soll ein besseres Verständnis für die Immunogenität des Inseltransplantates und deren Beeinflußbarkeit erlangt werden.

Material und Methode

Es wurden Ratten der Inzuchtstämme CAP (RT1^c), DA (RT1^{av}) und LEW (RT1^l) verwendet. Die Isolierung der Inseln erfolgte nach der Methode von Lacy und Kostianovsky (1): Kollagenase-Verdauung, Ficoll Dichtegradientenzentrifugation, Handverlesen unter dem Stereomikroskop. Frische isolierte Inseln wurden in folgenden käuflichen monoklonalen Antikörpern inkubiert: OX2 (gegen Zelloberflächenstrukturen des vaskulären Endothels), OX6 (gegen Ratten Ia), OX8 und OX19 (gegen Thymozyten), W 3 25 (gegen T Helferzellen, Makrophagen und interdigitierende dendritische Zellen). Zwei polyklonale Antiseren aus eigener Produktion dienten der weiteren Charakterisierung der Zellen: ein Kaninchen-anti-Rattenlymphozyten-Serum (SAL) und ein Kaninchen-anti-Rattendendriten-Serum (SAD). Die Durchführung der Immunfluoreszenz erfolgte nach Standardmethoden. Nach Inkubation mit dem 2. Antikörper (anti-Maus-IgG · FITC) wurden je 10–20 Inseln in 10 µl Veronalpuffer auf Glasobjektträger übertragen, eingedeckelt und versiegelt. Die Mikroskopie erfolgte mit dem Zeiss ICM 405 bei einer Vergrößerung von $\times 250$.

Ergebnisse

Tabelle I quantifiziert MHC Klasse II Antigen-tragende Makrophagen und dendritische Zellen (MØ-DC) sowie Lymphozyten (LY) in der isolierten Langerhans-Insel bei drei unterschiedlichen Rattenstämmen. Neben den morphologisch und serologisch eindeutig charakterisierten MØ-DC und LY wurden auch Zellen des vaskulären Endothels (etwa 10 bis 30 % des gesamten VE) und endokrine Zellen (etwa 20 bis 40 % aller parenchymatösen Zellen) als Träger von Ia Antigenen identifiziert (vergl. auch Abb. a).

Die Tabelle II repräsentiert das serologische Muster der vier unterschiedlichen Ia exprimierenden Zellarten. In Abbildung 1 a sind diese vier Zellarten gemäß ihrem Erscheinungsbild in der Immunfluoreszenz schematisch dargestellt. Mit Hilfe des in der hiesigen Abteilung produzierten, serologisch OX6-identischen, aber zusätzlich zytotoxischen Antikörpers 29A1, gelang es, MØ-DC und LY unter Komplement-Einwirkung zu zerstören (schematische Abb. 1 b). Die zunächst noch unvollständige Lyse der Zellen

Tabelle I. Zahlenmäßige fluoreszenz-serologische Bestimmung von Klasse II-Antigen-exprimierenden Makrophagen und dendritischen Zellen (M ϕ -DC) und Lymphocyten (LY) in frisch isolierten Inseln von drei unterschiedlichen Rattenstämmen mittels Antikörper OX6

Rattenstamm Haplotyp	Anzahl der Tiere	Anzahl der Inseln	M ϕ -DC pro Insel	LY pro Insel	M ϕ -DC : LY-Verhältnis
CAP : RT1 ^c	7	1045	19,6	2,22	9 : 1
DA : RT1 ^{av1}	6	820	6,9	0,56	12 : 1
LEW : RT1 ^l	7	940	20,1	0,63	32 : 1

Tabelle II. Evaluation des Antigenmusters der verschiedenen Inselzellen mit 5 monoklonalen Antikörpern und 2 polyklonalen Antiseren

Zelltyp	Serum						
	OX2	OX6	OX8	OX19	W3/25	SAL	SAD
Makrophagen, dendritische Zellen	--	++++	--	--	++	--	++++
Lymphocyten	--	++	++	++	(+)	++++	--
Zellen d. vaskulären Endothels	+++	++	--	--	--	--	+++
endokrine Zellen	--	+	--	--	--	--	--

Fluoreszenz-Intensität: ++++ sehr stark; +++ stark; ++ mittel; + schwach; (+) sehr schwach; -- keine Fluoreszenz. N = 200 Inseln in jedem Antikörper/Antiserum Experiment außer OX6, wo das n 2805 betrug

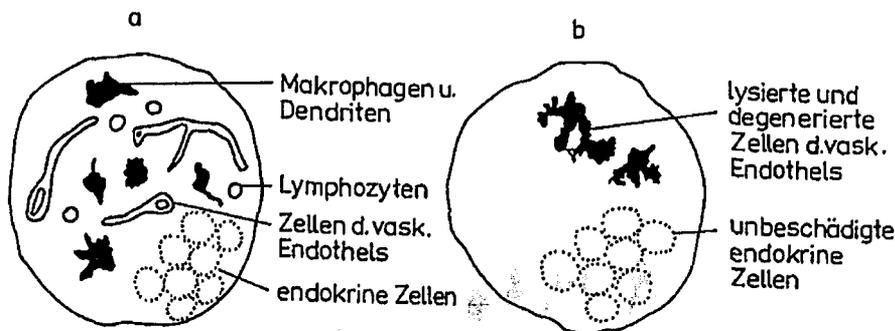


Abb. Schematische Darstellung Ia Antigen-tragender Zellen in isolierten Langerhans-Inseln nach Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern OX6 oder 29A1 (OX6-identisch). Erscheinungsbild der Immunfluoreszenz (a) nach Inkubation mit OX6 oder 29A1 ohne Komplement, (b) nach Inkubation mit 29A1 plus Komplement bei einem Antikörper-Titer unterhalb der Nachweisgrenze Ia positiver endokriner Zellen

des vaskulären Endothels mündet nach einem Tag in vitro Kultur der Inseln in eine vollständige Degeneration dieses Zelltyps. Eine Lyse der vergleichsweise schwach Ia exprimierenden endokrinen Zellen konnte durch geeignete Verdünnungen des Antikörpers 29A1 ausgeschlossen werden. Erste in vivo Versuche haben gezeigt, daß so manipulierte Inseln funktionell intakt bleiben und den Diabetes in einem syngenem Empfänger (LEW) langfristig reversieren können. In einer voll allogenen Stammkombination (CAP auf LEW) wurden solche Inseln ähnlich der unbehandelten Kontrollgruppe nach 4 bis 6 Tagen abgestoßen. Diese Beobachtung wird derzeit weiter analysiert.

Diskussion

In der vorliegenden Studie werden Klasse II Antigene auf unterschiedlichen Zellen der isolierten Langerhans-Insel der Ratte serologisch charakterisiert, quantifiziert und

manipuliert. Die hier erhobenen Daten für die Ia⁺ MØ-DC und LY sind qualitativ gut vergleichbar mit jenen für Hunde- und Mäuse-Inseln (2, 3), quantitativ jedoch von jenen verschieden. Ia Antigene auf Zellen des vaskulären Endothels und auf endokrinen Zellen werden hier für die Ratte erstmalig beschrieben. Über die Quantität ihrer Funktion als Immunogenitätsträger ist bislang wenig bekannt. Es existieren lediglich erste Hinweise vornehmlich aus in vitro Untersuchungen, wonach vaskulär-endotheliale Zellen von Hund und Mensch zur Antigen-Präsentation befähigt sind (4, 5). Wichtig erscheint uns, daß insgesamt aufgrund unserer Untersuchungen festgestellt werden darf, daß es möglich ist, alle diese verschiedenen Ia positiven und insoweit immunogenen Zellen aus Inseln zu eliminieren, ohne die endokrine Inselfunktion zu zerstören. Wann und in welchem Ausmaß auch die Ia positiven endokrinen Zellen funktionell an der Immunogenität des Inseltransplantates beteiligt sind, bedarf der weiteren und bereits laufenden Untersuchung. Die Sichtbarkeit der vergleichsweise schwächer exprimierten Ia Antigene auf diesen Zellen ist vor allem ein Titer-abhängiges Phänomen. Dies erklärt auch, warum die Insulin-produzierenden Zellen durch geeignete Antikörper-Verdünnungen von lytischen Prozessen ausgespart werden können. Unser neuer hochtitriger, zytotoxischer Antikörper 29A1 stellt in diesem Zusammenhang ein diagnostisch interessantes und manipulativ wichtiges Reagens dar. Wenn damit behandelte Inseltransplantate bisher immer noch abgestoßen werden, gilt es zu prüfen, ob die Ia Expression auf den endokrinen Zellen bei Transplantation zunimmt. Daß dies bereits durch den operativen Eingriff und durch Kohlenhydratstoffwechsel-Reize bewirkt werden kann, haben jüngste eigene Untersuchungen gezeigt (6). Damit ist die weitere Entwicklungsarbeit zur erfolgreichen Inseltransplantation auch bei größeren Histoinkompatibilitäten vorgezeichnet.

Literatur

1. Lacy, P. E., Kostianovsky, M.: *Diabetes* 16, 35-39 (1967).
2. Gebel, H. M., Yasunami, Y., Diekgraefe, B., Davie, J. M., Lacy, P. E.: *Transplantation* 36, 346-347 (1983).
3. Faustman, D. L., Steinman, R. M., Gebel, H. M., Hauptfeld, V., Davie, J. M., Lacy, P. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81, 3864-3868 (1984).
4. Groenewegen, G., Buurman, W. A.: *Scand. J. Immunol.* 19, 269-273 (1984).
5. Wagner, C. R., Vetto, R. M., Burger, D. R.: *Immunobiol.* 168, 453-469 (1984).
6. Ulrichs, K., Müller-Ruchholtz, W.: *Diag. Immunol.* 3, 47-55 (1985).

Anschrift des Verfassers: K. Ulrichs, Abteilung Immunologie der Universität Kiel, Brunswiker Straße 2-6, D - 2300 Kiel (BRD)

Zentralinstitut für Diabetes „Gerhardt Katsch“, Karlsburg

Verlängerung der Überlebenszeit von Inselallotransplantaten im Lewis-Ratten-System durch Kultivierung oder PUVA-Vorbehandlung der isolierten Inseln

Von B. WILKE, K. REIHER, S. SCHMIDT und I. KLÖTING

Die Transplantation von fremdem Gewebe über eine Haupthistokompatibilitätsbarriere ohne Immunsuppression führt in der Regel zu einer akuten Abstoßung des Transplantats. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß durch Manipulation des