

7. UMFANGREICHE ZUSAMMENFASSUNG

IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KREUZREAGIERENDEN ANTIGENEN VON MYCOPLASMA ARTHRITIDIS UND RATTENZELLEN

Hong-Bum Koh

7.1. Zielsetzung

Mycoplasma (M.) arthritidis ist der Erreger einer Polyarthrititis der Ratte. Die Ratten entwickeln Arthritis in den Gelenken aller Gliedmaßen und hohe Titer von Antikörpern gegen *M. arthritidis*. In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß die gegen *M. arthritidis* gerichteten Antikörper auch mit Rattenzellen reagieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung der mit diesen Antikörpern reagierenden Antigene auf der Membran von Rattenchondrozyten mittels immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen unter Verwendung von goldmarkierten Antikörpern.

7.2. MATERIAL UND METHODEN

7.2.1. ANZUCHT VON M. ARTHRITIDIS

M. arthritidis Stamm ISR-1 wurde in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37⁰ C in Friis Flüssigmedium angezüchtet. Verkeimungskontrollen wurden auf Blutagar, Wachstumskontrollen auf Friis-Agar angelegt.

Im Verlauf der Anzucht wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) von *M. arthritidis* nach der Methode von ALBERS und FLETCHER (1982) bestimmt und ein indirekter Immunfluoreszenztest nach GARDELLA et al. (1983) durchgeführt.

7.2.2. ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON CHONDROZYTEN

Knorpel wurde aus den Knie- und Ellbogengelenken von Lewis-Ratten entnommen und die Knorpelmatrix durch eine 90 min Inkubation mit 0.25% Dispase / 0.15% Collagenase in PBS bei 37⁰ C abgebaut. Die Chondrozyten wurden mit Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) durch Zentrifugation gewaschen, mit DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (DMEM + 10% FKS) auf 15.000 - 20.000 Zellen / ml eingestellt und bei 37,7⁰ C in 8%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Verkeimungskontrollen wurden mit Friis-Agar und Friis-Flüssig-Medium sowie Blutagar vorgenommen.

7.2.3. HERSTELLUNG VON MEMBRANANTIGEN VON M. ARTHRITIDIS UND CHONDROZYTEN

M. arthritidis wurde 45 min bei 25.000g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde 30 min bei 40.000g zentrifugiert und in PBS aufgenommen.

Chondrozyten wurden durch Trypsinisierung vom Kulturgefäß gelöst und 15 min bei 800g abzentrifugiert.

Die Pellets von *M. arthritidis* und den Chondrozyten wurden in PBS aufgenommen, eingefroren und wieder aufgetaut, homogenisiert und anschließend ultrabeschallt. Danach wurden sie bei 30.000g 60 min zentrifugiert, in PBS aufgenommen und abwechselnd mit destilliertem Wasser und PBS durch Zentrifugation gewaschen

7.2.4. PROTEINBESTIMMUNG

Der Proteingehalt der Membranantigene wurde mit der Biuret-Methode bestimmt. Dazu werden 20 µl Probe bzw. 20 µl Aqua. dest. (Kontrolle) mit 1 ml Biuret-Reagenz 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 546 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

Absorption x 19 x 10 = Proteingehalt in mg / ml

Der Faktor 19 war vorher durch eine Standardkurve ermittelt worden.

7.2.5. ANTIKÖRPER

Antiseren gegen Rattenchondrozyten wurden mit Balb/c Mäusen, Antiseren gegen *M. arthritidis* oder Collagen Typ II mit Lewis Ratten gewonnen.

Ein monoklonaler Antikörper (A31) gegen *M. arthritidis* wurde vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

7.2.6. ENZYME IMMUNE ASSAY (EIA)

M. arthritidis- und Chondrozyten-Membranantigen wurde in einer Konzentration von 20 µg Protein / ml coating-Puffer an Mikrotiterplatten gebunden. Nach dem Waschen der Platten wurden die unter 7.2.5 aufgeführten Antiseren, der monoklonale Antikörper oder Maus-Normalserum bzw. Ratten-Normalserum (Negativ-Kontrollen) 1:1000 mit PBS verdünnt in die 1. Vertiefung gegeben. Anschließend wurde in 1:10 Verdünnung bis 1:2560 titriert. Nach Inkubation wurden die Platten gewaschen, mit einem biotinylierten sekundären Antikörper beschickt, wieder inkubiert und gewaschen. Danach wurde der Biotin-Streptavidin-Komplex hinzugegeben. Als Substrat diente eine ortho-Phenyldiamin-Lösung. Die Farbreaktionen wurde mit H₂SO₄ gestoppt und im Spektrophotometer bei 492 nm Wellenlänge gemessen.

7.2.7. LICHTMIKROSKOPISCHER NACHWEIS VON KREUZREAGIERENDEN ANTIGENEN AUF RATTEN-CHONDROZYTEN DURCH IMMUNOGOLD-SILVER-STAINING (IGSS)

Ratten-Chondrozyten wurden, wie unter 7.2.2 beschrieben, angezchtet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie mit PBS-Tween gewaschen und mit den jeweils zu untersuchenden Seren (Maus-Normalserum, Ratte-anti-*M. arthritidis* ISR-1-Serum, Ratte-anti-Collagen Typ II-Serum, Maus-anti-Ratten-Chondrozyten Serum, Monoklonaler Antikörper A31) in den Verdünnungen 1:10 bis zu 1:2560 1 hr bei 37⁰ C inkubiert. Die Chondrozyten wurden dann gründlich mit PBS gewaschen und mit biottingekoppeltem Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Ratten-Konjugat, 1:1000 in PBS verdünnt, 30 min bei 37⁰ C inkubiert. Die Zellen wurden wieder gründlich mit PBS gewaschen und mit einem 1:50 in PBS verdünntem Streptavidin-Gold-Komplex 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS und mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach dem Spülen wurde der Kontrast der Färbung mit einer Silber-Verstärkung gesteigert (6 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen wieder mit destilliertem Wasser gewaschen und die Reaktionen im Lichtmikroskop beurteilt.

7.2.8. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER NACHWEIS VON KREUZREAGIERENDEN ANTIGENEN AN RATTENCHONDROZYTEN MIT IGSS

Eine Chondrozytensuspension wurde nach Waschen mit PBS wie unter 7.2.7. beschrieben, mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert und markiert. Die markierten Zellen wurden in Durcupan eingebettet. Nach der Polymerisation (bei 40⁰ C und bei 60⁰ C für jeweils 2 Tage) wurden aus den ausgehärteten Präparaten Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Nach jeder Behandlung erfolgte ein sorgfältiger Waschvorgang mit Aqua bidest. Die Auswertung wurde mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 10 Carl Zeiss) vorgenommen.

7.2.9. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen im Enzym-Immuno-Assay sind in Tab.4 (S. 45) zusammengestellt. Das Ratten-anti-*M. arthritidis* ISR-1 Serum reagierte mit *M. arthritidis* ISR-1 Membranen bis zur Verdünnung 1:2560. Ratte-anti-Collagen Typ II Serum reagierte bis zur Verdünnung 1:640. Das Maus-anti-Ratten-Chondrozyten-Serum zeigte bis zur Verdünnung von 1: 2560 eine Reaktion mit den *M. arthri-tidis* ISR-1 Membranen. Der monoklonale Antikörper A31 reagierte bis 1:2560 . Ratten-Normalserum und Maus-Normalserum zeigten keine Reaktion. Ähnliche Reaktionen im EIA ergaben sich, wenn Ratten-Chondrozyten-Membranen als Antigen eingesetzt wurden (Tab.5).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Ratten-Chondrozyten mittels IGSS sind in Tab.6 und Fig.4 und 5 dargestellt. Fig. 4-A zeigt die Negativ-Kontrolle mit Maus Normalserum. Fig. 4-B (1. Antikörper: Ratte-anti-*M. arthritidis* ISR-1 Serum) Fig. 5-A (1. Antikörper: Ratte-anti-Collagen Typ II Serum) und Fig. 5-B (1. Antikörper: monoklonaler Antikörper gegen *M. arthritidis* ISR-1 A31) zeigen ähnlich Reaktionsmuster. Bei Inkubation mit diesen Antikörpern werden Bereiche an und um den Chondrozyten gefärbt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Chondrozyten mittels IGSS zeigen ebenfalls keine Reaktionen mit Maus-Normalserum (Fig.6), aber eine starke Reaktion mit Ratte-anti-*M. arthritidis* ISR-1 Serum (Fig.7), Ratte-anti-Collagen Typ II Serum (Fig.8) und dem mono-klonalen Antikörper A31 (Fig.9).

7.2.10. Diskussion

Untersuchungen zur *M. arthritidis*-Polyarthrititis der Ratte wurden von verschiedenen Autoren durchgeführt. Die experimentell induzierte Polyarthrititis der Ratte gleicht im histologisch-pathologischen Erscheinungsbild der humanen rheumatoiden Arthritis (HERMANNNS et al., 1983). CAHILL et al. (1971) entdeckten kreuz-reagierende Antigene zwischen *M. arthritidis* und verschiedenen Rattengeweben (Muskel, Nieren, Testis, Milz, und Gehirn, sowie

Lymphozyten) im Immunofluoreszenztest. Der Antigengemeinschaft zwischen *M. arthritidis* und Rattengewebe, besonders Ratten Gelenkgewebe, könnte durch die Entstehung von Autoimmun-Reaktionen eine gewisse Bedeutung in der Pathogenese der *M. arthritidis*-Polyarthrititis der Ratte zukommen. In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche durchgeführt um die kreuzreagierenden Antigene an der Oberfläche der Knorpelzellen mittels licht-und immuneelektronenmikroskopischen Untersuchungen unter Verwendung von goldmarkierten Antikörpern zu lokalisieren. Ratten-Chondrozyten wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen *M. arthritidis* Membran-Antigene, und Collagen Typ II, sowie mit dem monoklonalen Antikörper A31 behandelt und durch IGSS markiert. Im Lichtmikroskop zeigten die untersuchten Antikörper eine starke Bindung an die Knorpelmatrix, im Elektronenmikroskop eine Bindung an die Chondrozytenmembran. Die wesentlichen Bestandteile der Chondrozytenmatrix sind Collagene, zum größten Teil Collagen Typ II, Hyaluronsäure und verschiedene Proteoglykane. RUNGE et al. (1990) beschrieben, daß polyklonale und monoklonale Antikörper gegen *M. arthritidis* mit Collagen Type II nicht reagieren, aber eine starke Bindung an Proteoglykane aufweisen, die aus humanem Gelenkknorpel gewonnen wurden, und polyklonale und monoklonale Antikörper gegen diese Proteoglykane mit *M. arthritidis* reagieren. Dies weist darauf hin, daß es sich bei den kreuzreagierenden Antigenen um Proteoglykane handelt. Die Gold-Silber-Färbungen in den Ultradünnschnitten der Chondrozyten könnten die Stellen markieren, an denen die Proteoglykane aus den Zellen geschleust werden. In der vorliegenden Arbeit werden für die Herstellung der Ultradünnschnitte die Chondrozyten von der Matrix abgetrennt und mit den Antikörpern in Suspensionen inkubiert. In weiteren Untersuchungen sollten Ultradünnschnitte von Rattenknorpel mit den Antikörpern gegen *M. arthritidis* und mit dem Gold-Silber-Komplex gefärbt werden, um die kreuzreagierenden Antigene im Gelenkknorpel zu lokalisieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen einen weiteren Beweis für die Existenz von kreuzreagierenden Antigenen zwischen *M. arthritidis* und Chondrozytenzellen dar und zeigen die Lokalisation der kreuzreagierenden Antigene an der Chondrozytenmembran.

6. SUMMARY

Author: Hong-Bum Koh

Titel: Immuno-electron-microscopic study on cross-reacting antigens of *Mycoplasma arthritidis* and rat cells

Cross-reacting antigens between *Mycoplasma arthritidis* and chondrocytes were demonstrated by enzyme immuno assay (EIA) and immunogold silver staining (IGSS). Chondrocytes were obtained from knee and elbow joints of mycoplasma free Lewis rats. The EIA was performed on the membrane antigens of *M. arthritidis* and chondrocytes with rat anti-*M. arthritidis* serum, rat anti-collagen type II serum, and the monoclonal antibody A31. The IGSS was performed on rat chondrocytes using the streptavidin gold system and evaluated in light and electron microscopy.

In EIA, rat anti-*M. arthritidis* ISR-1 serum showed a positive reaction with chondrocyte membrane antigen up to a dilution of at least 1:2560. Rat anti-collagen type II serum reacted positive with this antigen up to a dilution of 1:2560. The monoclonal antibody and mouse anti-rat chondrocyte serum showed also a strong positive reaction up to at least 1:2560. No reaction was obtained by incubation of the antigen with mouse normal serum. Almost the same results were obtained using *M. arthritidis* membranes as antigens.

For light microscopy, monolayers of chondrocytes were stained with IGSS. The cells showed no reaction with normal mouse serum in IGSS. But there was a strong reaction after incubation with rat anti-*M. arthritidis* ISR-1 serum. It appeared that predominantly areas around and between the cells reacted with the antiserum. Similar staining patterns were obtained with rat anti-collagen type II serum or with the monoclonal antibody A31.

For electron microscopy suspensions of rat chondrocytes were incubated with rat anti-*M. arthritidis* ISR-1 serum, rat anti-collagen type II serum, or the monoclonal antibody A31.

As shown in ultrathin sections all three antibodies bound to the chondrocyte membrane, giving additional evidence for the cross-reactivity between *M. arthritidis* and chondrocytes and exhibiting the localization of the cross-reacting antigens on the chondrocyte surface.