

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 21—28

Antagonistischer Effekt von Antikörpern und Komplement auf die zytotoxische Aktivität von *E.histolytica*

H. Hudler¹, O. Scheiner², H. Stemberger¹, H. Kollaritsch¹, G. Wiedermann¹

1 = Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

2 = Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien

Einleitung

Unter dem bei der Amöbiasis neben dem sogenannten "Parasite Factor" postulierten "Host Factor" (10) werden verschiedene Abwehrfunktionen subsummiert, unter anderem die Produkte des Immunsystems, von denen wir die Bedeutung des Komplements und der Antikörper untersucht haben.

Material und Methodik

Amöben: Für alle Tests wurden Kulturamöben des Stammes SFL3 in monoxenischer AC-(Amöben-Crithidien)-Kultur verwendet.

Die Crithidien wurden in TP-SB- oder TTY-SB-Medium (1, 5), die Amöben in TYI-S-33-Medium (2) kultiviert.

Die Amöben wurden für alle Tests 72 Stunden nach dem Überimpfen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt sind keine die Versuche störenden Crithidien mehr vorhanden. Die Trophozoiten wurden 3 mal in RPMI 1640, supplementiert, mit 10% fetalem hitzeinaktivierten Kälberserum (RPMI/FCS) gewaschen, gezählt und je nach Effektor-zu-Targetzell-Ratio (E/T-R) auf die Konzentration von 5×10^5 — $0,625 \times 10^4$ Zellen/ml RPMI/FCS eingestellt.

Zielzellen: Als Zielzellen verwendeten wir K562-Gewebekulturzellen, welche in RPMI/FCS in Suspension kultiviert wurden. In den Versuchen wurden ausnahmslos Zielzellen eingesetzt, die 72 Stunden nach dem Umsetzen geerntet worden waren.

Markierung der Zielzellen: Eine Suspension von K562 ($2,5 \times 10^6$ Zellen) wurde zentrifugiert (600xg, 5 Minuten), der Überstand quantitativ abgehoben und das Pellet mit $200 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr -Natriumchromat, Hoechst-Austria) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 mal in RPMI/FCS gewaschen; nach dem letzten Waschen wurde die Viabilität der Zielzellen mit Trypanblau getestet (sie lag stets über 95%); die Zellen wurden dann auf eine endgültige Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. 0,2 ml dieser Zellsuspension wiesen eine Aktivität von 2.000 bis 7.000 cpm auf.

Markierung der Amöben: Die nur wenige Trophozoiten enthaltenden oberen 90% des Inhaltes einer 120 ml-Massenkultur wurden vorsichtig abgesaugt, der Rest aufgeschüttelt, die Amöben wurden gezählt. $2,5 \times 10^6$ Amöben wurden nun zur Chromierung genauso behandelt, wie dies bei den K562 beschrieben wurde. Die endgültige Konzentration war 6×10^5 Amöben/ml.

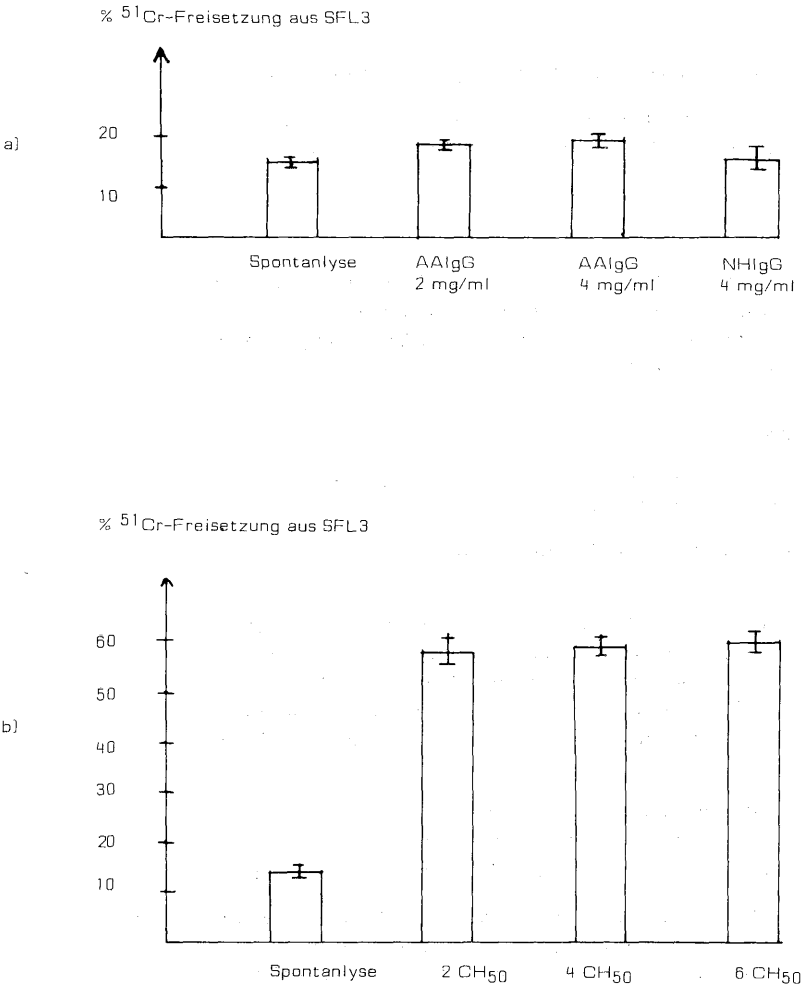


Abbildung 1: Chromfreisetzung aus SFL 3

a) bei Anwendung von Antikörper: Anti-Amöben-IgG (AAIgG), Normal-Human-IgG (NHIgG)
b) bei Anwendung von Komplement (CH₅₀)

Komplement: Als Komplementquelle diente frisches, in allen amöbenspezifischen Serotests negatives normales Humanserum mit einem Komplementgehalt von 20 CH₅₀, welches je nach Versuchsansatz konzentriert oder in RPMI/FCS verdünnt eingesetzt wurde.

Antikörper: Das Serum eines Patienten nach durchgemachtem Amöbenleberabszeß, das im indirekten Hämagglutinationstest (IHA) einen Titer von 1 : 4.000 aufwies, wurde zur Herstellung der IgG-Fraktion einer Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex 1750 unterzogen. Die erhaltenen IgG-Präparationen wurden eingeeengt, gegen PBS dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml eingestellt. Der IHA-Titer dieser Präparation war 1 : 32.000. Für den Versuch wurde das IgG dann mit RPMI/FCS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Normal-human-IgG als Kontrolle (NH-IgG) wurde durch Verdünnen eines käuflichen Gammaglobulinpräparates auf eine dem entsprechende Konzentration gewonnen.

Versuchsansatz:

Zytotoxizitätstest: Der von Stemberger (3) beschriebene Zytotoxizitätstest wurde zur Überprüfung der Wirkung von Antikörpern und Komplement wie folgt modifiziert. Für die Beeinflussung der Zytotoxizität durch Komplement wurden in Mikrozytotoxizitätsröhrchen (7 x 50 mm, Greiner) 0,2 ml der jeweiligen Komplementverdünnung pipettiert, anschließend 0,2 ml Amöbensuspension, und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Schließlich wurde 0,2 ml der Suspension ⁵¹Cr-markierter K562 zugefügt, 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und anschließend 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die "Schachbrett-Titration" mit Antikörpern und Komplement wurden 0,2 ml der Amöbensuspension mit 0,1 ml der Antikörperverdünnung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beifügen von 0,2 ml der Suspension ⁵¹Cr-markierter K562 wurden dann die Röhrchen 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur weiterinkubiert. Anschließend wurde resuspendiert und 30 Minuten im Overheadmixer bei 37°C inkubiert. Bei beiden Versuchen wurde nach Ende der Inkubationszeit der Röhrcheninhalt, wenn er nicht in Suspension war, resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität zu erreichen und sofort 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert.

Von jedem Röhrchen wurde danach der halbe Überstand (300 µl) in ein neues Röhrchen transferiert, und die Radioaktivität in beiden Röhrchen (½ Überstand, sowie Bodensatz + halber Überstand) ermittelt. Der Prozentsatz der Chromfreisetzung in den Überstand wurde als Maß für die Zellschädigung herangezogen und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{2 \times \ddot{U}}{\ddot{U} + B} \times 100 = \%^{51}\text{Cr-freisetzung.}$$

$\ddot{U}$ = 300 µl Überstand, B = 300 µl Überstand + Bodensatz.

Alle Versuche wurden in Dreifachansätzen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit 0,2 ml radioaktiv markierten Zielzellen und 0,4 ml RPMI/FCS ohne Effektorzellen unter sonst identischen Bedingungen mitgeführt (Spontan-Lyse).

Amöbizidie-Test: 0,1 ml der Suspension chromierter Amöben, 0, 0,1, 0,2 oder 0,3 ml konzentriertes Nativserum, 0, 0,1 oder 0,2 ml Anti-Amöben-IgG (AAIgG), 0 oder 0,2 ml NH-IgG und RPMI/FCS ad 0,6 ml wurden in die Zytotoxizitätsröhrchen pipettiert, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und der Versuch dann analog zum Zytotoxizitätstest beendet. Für die Kinetik der amöbiziden Wirkung von Komplement wurden je 4 ml einer Suspension chromierter Amöben mit $1,24 \times 10^6$ Amöben, sowie 2 ml Serum und 6 ml RPMI/FCS oder

% ^{51}Cr -Freisetzung aus SFL3

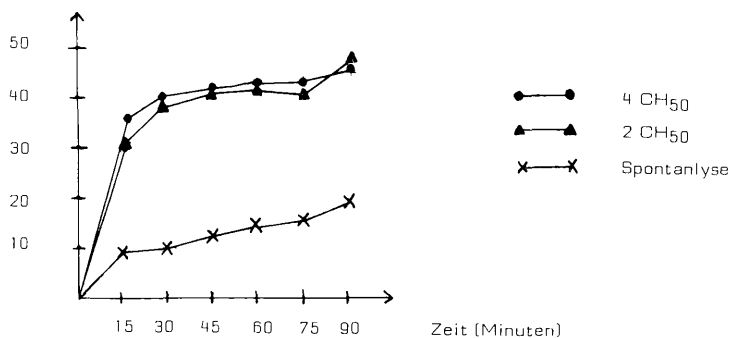


Abbildung 2: Kinetik der amöbiziden Wirkung von Komplement

% ^{51}Cr -Freisetzung aus K562

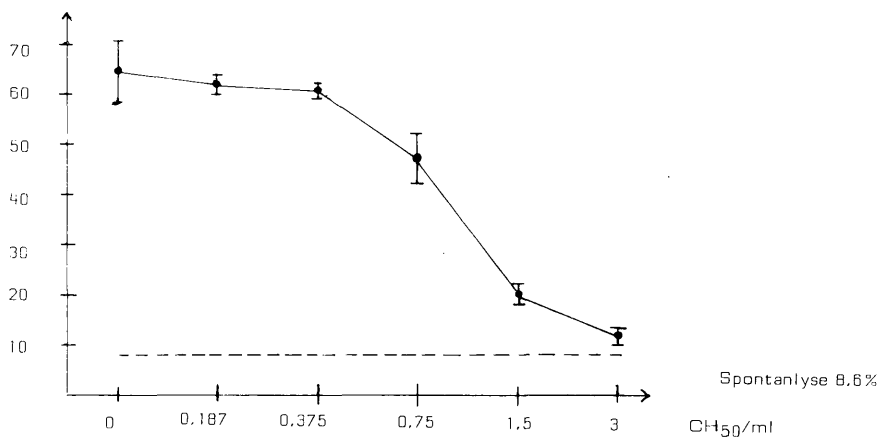


Abbildung 3: Dosisabhängigkeit der Komplementwirkung auf die zytotoxische Wirkung von SFL3 auf K562 (Effektor-Target-Zell-Ratio 5 : 1)

1 ml Serum und 7 ml RPMI/FCS bzw. 8 ml RPMI/FCS in der Kontrolle in je einem Kolben bei 37°C inkubiert, und zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden je 3 x 0,6 ml entnommen und in Zytotoxizitätsröhrchen wie beschrieben die Chromfreisetzung ermittelt. Die 3 Ansätze enthielten also in der Endkonzentration 3,6 CH₅₀, 1,8 CH₅₀ und kein Komplement zur Kontrolle.

Ergebnisse und Diskussion

Die erste Serie von Untersuchungen beschäftigte sich mit der amöbiziden Wirkung von Humankomplement und Antiamöbenantikörpern im Amöbizidie-Test. Abbildung 1 zeigt die amöbiziden Effekte von Antiamöben-IgG bzw. Komplement. Antiamöben-IgG, egal ob in 2 oder 4 mg/ml eingesetzt entfaltete eine nur gering über der Spontanlyse liegende amöbizide Wirkung. Auch Normalhuman-IgG war in dieser Hinsicht wirkungslos. Anders war allerdings die Komplementwirkung auf Trophozoiten von SFL3: Bereits bei Einsatz von 2 Komplementeinheiten wurde eine beinahe 60 %ige Lyse von Trophozoiten erzielt, die sich durch eine weitere Steigerung der Komplementmenge nur mehr unwesentlich erhöhte. Die maximal erreichbare Lyse allerdings schwankte von Versuch zu Versuch zwischen 40 und 60 %.

Inkubierten wir im Sinne einer Schachbrett-Titration die Trophozoiten mit unterschiedlichen Komplement- und Antikörperkonzentrationen, so konnte bei keinem der eingesetzten Mengenverhältnisse zwischen Komplement und Antikörper ein synergistischer Effekt beobachtet werden; in keinem Fall wurde die komplementbedingte Lyse durch einen zusätzlichen Einsatz von Antikörpern weiter gesteigert. Diese Ergebnisse zeigen, daß von den humoralen Immunmechanismen allenfalls dem Komplement eine Wirkung im Sinne einer Reduktion der Zahl der Krankheitserreger zukommt.

Wie Stemberger (3) gezeigt hat, entfalten Amöben einen sehr rasch einsetzenden zytotoxischen Effekt auf Zielzellen vom Typ K562. Auf Grund der hohen Geschwindigkeit dieses Vorganges kommt das Komplement daher nur dann als effizienter Abwehrmechanismus in Frage, wenn seine amöbiziden Effekte rasch genug einsetzen. Aus diesem Grund untersuchten wir auch die Kinetik der amöbiziden Wirkung von Komplement (Abbildung 2). Bei diesem Versuch zeigte sich, daß bereits nach einer Viertelstunde praktisch das Gesamtausmaß der maximal erzielbaren Lyse der Trophozoiten eingetreten ist. Komplement kann also als wirksamer humoraler Abwehrmechanismus der Amöbiasis angesehen werden.

Zieht man allerdings nur den amöbiziden Effekt der Produkte des Immunsystems als Maßstab für ihre Bedeutung in der Infektabwehr in Betracht, läßt man unberücksichtigt, daß nicht notwendigerweise ein Zellschaden bei der Amöbe, der das Ausmaß der Chromfreisetzung erreicht, notwendig ist, um zytotoxische Effekte der Amöbe gegenüber der Wirtszelle zu unterbinden. Es wäre ja denkbar, daß eine Blockade der Amöbenoberfläche durch Antikörper oder Komplement die Voraussetzung für die Kontaktlyse von Zielzellen entscheidend beeinträchtigt. Wir untersuchten daher zunächst die Wirkung von Komplement im Zytotoxizitätstest. Abbildung 3 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der Zytotoxizität der *E.histolytica* durch Komplement, die bei Einsatz der höchsten Konzentration die Lyse der K562 bis in den Bereich der Spontanlyse erniedrigt. Schon hier ist zu erkennen, daß der Effekt des Komplements auf die Zytotoxizität der Amöben über die rein amöbizide Wirkung des Komplements, die nie eine 100 %ige Lyse der Amöben bewirkt, hinausgeht.

Wir untersuchten nun nach Art einer Schachbrett-Titration die kombinierte Wirkung von AAIgG und Komplement auf die Zytotoxizität der *E.histolytica*. Wie Stemberger

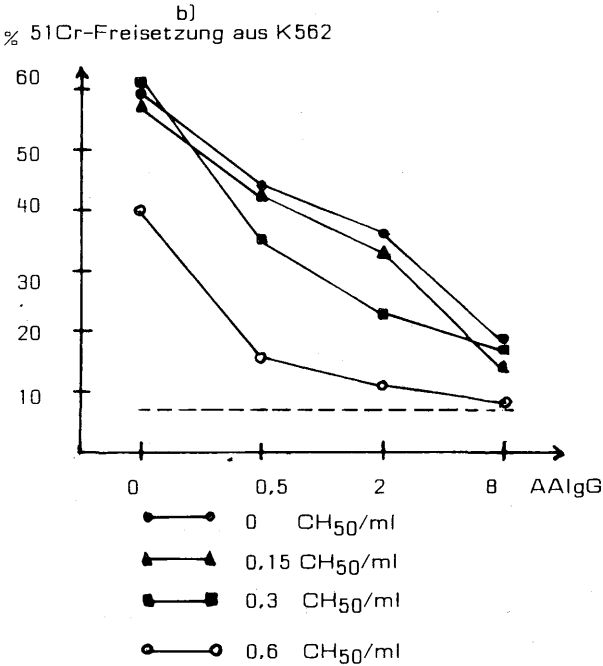
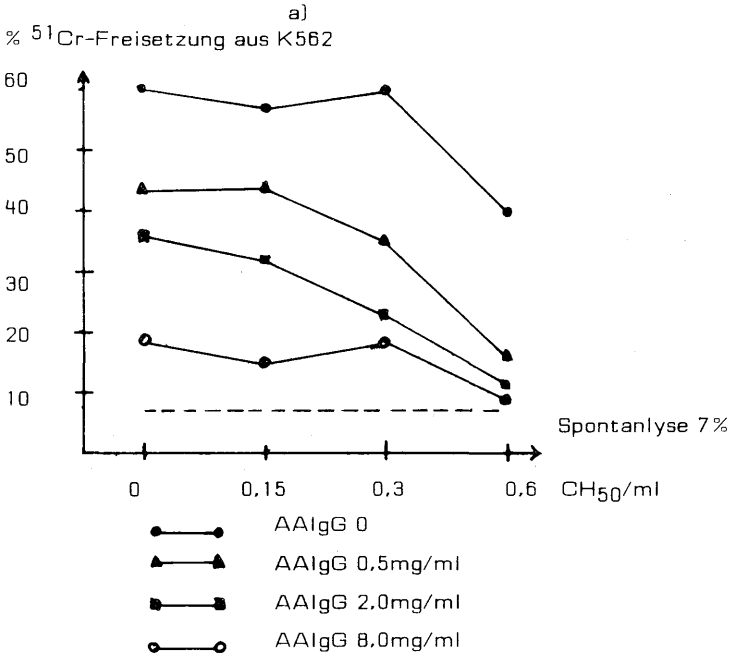


Abbildung 4: Schachbrett-Titration der kombinierten Antikörper-Komplementwirkung auf den zytotoxischen Effekt von SFL3 auf K562

zeigen konnte (3), entscheidet sich im zentrifugierten Ansatz das Schicksal der Zielzellen bereits innerhalb der ersten 10 Minuten. Andererseits zeigten immunfluoreszenz-optische Untersuchungen (4), daß Amöben imstande sind, an ihre Oberfläche gebundene Antikörper zu internalisieren und nach einiger Zeit ihre normale zytotoxisch aktive Oberfläche wieder herzustellen.

Wir versuchten also in dem nun gewählten Ansatz, diesen beiden Tatsachen Rechnung zu tragen, indem wir den Kontakt zwischen Amöben und Zielzellen nach 10 Minuten durch Suspendieren drastisch verschlechterten, um eine antikörper- und komplementbedingte Beeinflussung der Zytotoxizität besser differenzieren zu können.

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Es zeigte sich (Abb. 4a), daß erst ab einer Komplementdosis von 0,6 Einheiten pro Röhrchen ein signifikanter Abfall der zytotoxischen Wirkung der Amöben beobachtet werden konnte. Wurden dem Komplement Antikörper zugesetzt, so war zunächst die Zytotoxizität auf Grund der Antikörperwirkung geringer, und es zeigte sich ein komplementbedingter Abfall der Zytotoxizität bereits bei Einsatz von 0,3 CH₅₀. Bei Einsatz der höchsten Antikörperkonzentration war ein potenzierender Effekt auf die Komplementwirkung nicht mehr zu beobachten, höchstwahrscheinlich deswegen, weil hier die erzielten Lysen bereits nahe der Spontanlyse gelegen waren. Abbildung 4b zeigt die Ergebnisse des gleichen Versuches, dargestellt in Linien gleicher Komplementdosis. Im Gegensatz zur amöbiziden Wirkung, die bei Antikörpern nicht nachgewiesen werden konnte, zeigte sich eine dosisabhängige Behinderung der Zytotoxizität durch Antikörper, die durch Komplement in ihrer Wirkung verstärkt wird. Dieser Versuch weist auf eine Art "Amplifying-Effekt" von Antikörpern auf die Komplementwirkung, einer additiven Kombination von beiden Einzelwirkungen hin.

Über die Natur dieser Kooperation von Antikörpern und Komplement können wir vorläufig nur spekulieren. Sicher erscheint, wie aus unseren Versuchen mit radioaktiv markierten Amöben hervorgeht, daß eine klassische antikörpermedierte komplementinduzierte Lyse von Trophozoiten nicht stattfindet. Ein solcher Mechanismus dürfte daher auch im Zytotoxizitätsansatz ausscheiden.

Von Bedeutung ist aber möglicherweise eine in der Amöbe vorkommende Protease (6, 7, 8), die von drei verschiedenen Autoren unabhängig voneinander beschrieben wurde. Sie ist in ihrer Wirkung teilweise dem Trypsin vergleichbar, löst also etwa Monolayerkulturzellen aus ihrem Verband und ist wahrscheinlich auch in der Lage, den Komplementfaktor C3 zu spalten. Sie wird von der lebenden Amöbe nicht freigesetzt, spielt also bei der Zytotoxizität selbst keine Rolle.

Wir vermuten nun, daß im Laufe der komplementbedingten Lyse der Trophozoiten die erwähnte Protease frei wird. Diese Protease dürfte nun Komplement in der flüssigen Phase verbrauchen und eine weitere Lyse der Amöben unterbinden. Andererseits wird auch eine mehr oder weniger starke Hemmung der Protease durch natürliche im Serum vorkommende Trypsininhibitoren sowie durch AAIgG beschrieben (9). Eine synergistische Wirkung von Antikörper und Komplement könnte also auch durch eine teilweise Blockade dieser Protease durch den Antikörper bedingt sein. Weitere Versuche zur Klärung dieses Mechanismus sind im Gange.

Zusammenfassung

Mit einem Chromfreisetzungstest wurde die Wirkung von Antikörpern und Komplement auf Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* des Stammes SFL3 untersucht. Bei Markierung der Trophozoiten zeigte lediglich Komplement eine signifikante amöbizide

Wirkung, die innerhalb weniger Minuten einsetzt und rasch ein zwischen 40 und 60 % gelegenes Plateau der Chromfreisetzung aus den Amöben erreicht, während spezifisches IgG von Patienten mit invasiver Amöbiasis die Chromfreisetzung aus den Trophozoiten nicht steigern kann. Sowohl Antikörper als auch Komplement zeigten jedoch eine dosisabhängige, additive Behinderung der zytotoxischen Wirkung von Amöben auf Gewebekulturzellen (K562).

Summary

The consequences of the interaction of antibody and complement with trophozoites of *E. histolytica* is being investigated by means of chromium release assay. With radiolabeled trophozoites as target cells only complement exhibited a significant amoebicidal effect within a few minutes which was sufficient to induce an isotope release of 40 to 60 %.

Moreover, purified IgG from patients with amoebic abscess of the liver did not show a direct amoebicidal action. On the other hand, the antibody fraction was not able to increase the complement mediated lysis of trophozoites. However, antibody and complement inhibited synergistically the cytotoxic action of amoebae against radiolabelled tissue culture cells.

Literatur

- 1.) DIAMOND, L.S. (1968): Improved Method for the Monoxenic Cultivation of *E. histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae with Trypanosomatids. *J. Parasitol* 54, 715—719.
- 2.) DIAMOND, L.S. (1980): A new medium for the axenic cultivation of *E. histolytica* and other Entamoebae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431—432.
- 3.) STEMBERGER, H. et al. (1982): Die zytotoxische Wirkung von *E. histolytica* auf Gewebekulturzellen. *Mittell. d. ÖGTP* 1982, im Druck.
- 4.) BIAGI, F.F. et al. (1966): Remobilisation of *Entamoeba histolytica* after exposure to immobilizing antibodies. *Exp. Paras.* 18, 87.
- 5.) DIAMOND, L.S. (1968): Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*-like amoebae. *L. Parasitol* 54, 1074.
- 6.) LUSHBAUGH, W. et al. (1979): Isolation of a Cytotoxin-Enterotoxin from *E. histolytica*. *J. Inf. Dis.* 139, 9—17.
- 7.) KOBILER et al. (1981): Lectin and Toxin-like activities of *E. histolytica*: A comparison of Properties. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (5), 955—959.
- 8.) MATTERN, et al. (1980): *Entamoeba histolytica* "Toxin": Fetuin neutralizable and lectin-like. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1), 26—30.
- 9.) LUSHBAUGH, W. et al. (1981): Inhibition of *E. histolytica* cytotoxin by alpha- α Antiprotease and alpha-Macroglobulin. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (3), 575—585.
- 10.) MARTINEZ-PALOMO, A. (1982): *The Biology of Entamoeba histolytica*. Res. Stud. Press, John Wiley & Sons Ltd.

Korrespondenzadresse:

Dr. Helmut Hudler
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin
der Universität Wien
A-1090 Wien, Kinderspitalgasse 15

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1983

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Hudler Helmut, Scheiner O., Stemberger Heinrich, Kollaritsch Herwig, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Antagonistischer Effekt von Antikörpern und Komplement auf die zytotoxische Aktivität von E. histolytica. 21-28](#)