3. Ergebnisse

Zur Bearbeitung der Frage, ob die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* ein Reservoir immunogener Antigene mit interindividueller, T-Zell-stimulatorischer Potenz darstellen, denen eine mögliche Rolle bei der Pathogenese der ReA zukommt, war ein Versuchsaufbau zu entwerfen, der neben der effektiven Präparation der zu untersuchenden Antigene und einem Detektionssystem zur Erkennung von immundominanten T-Zell-stimulatorischen Proteinen eine sichere Identifikation derselben gewährleistet. Abb. 3 zeigt den Versuchsaufbau in schematisierter Form.

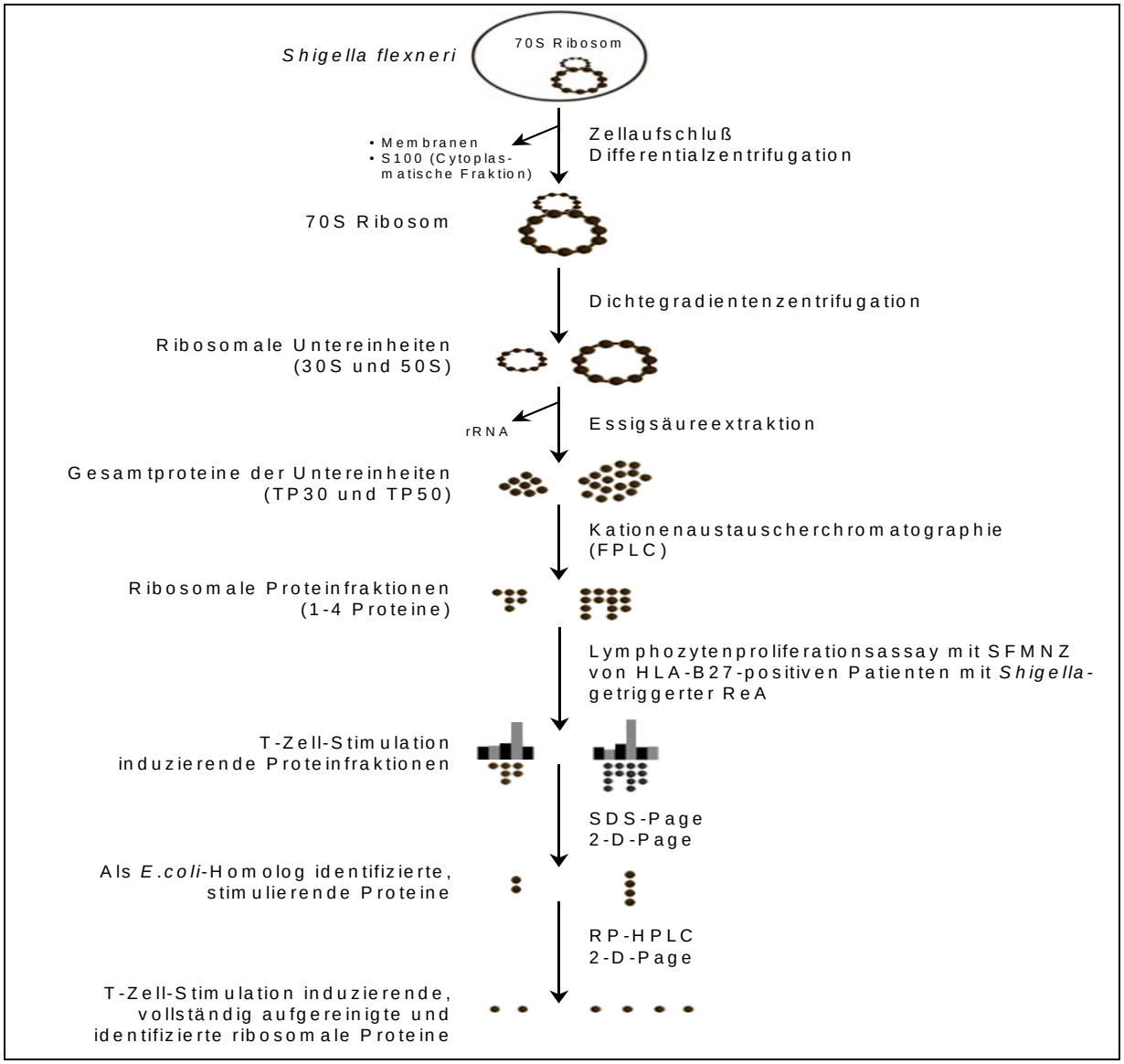


Abb. 3: **Versuchaufbau zur Identifikation von T-Zell-Antigenen von *Shigella flexneri*:** Präparation der Antigene, Detektion der Immunogenität, Identifikationssystem, vollständige Isolierung der einzelnen Proteine.

3.1 Isolierung der 70S-Ribosomen („crude“ 70S)

Aus *Shigella flexneri* ließ sich nach Zellernte in der frühlogarithmischen Wachstumsphase und durch eine Abfolge von Zentrifugationsschritten die Fraktion der 70S-Ribosomen isolieren. Abb. 4 zeigt die gesamten Proteine des Ribosoms (TP70).

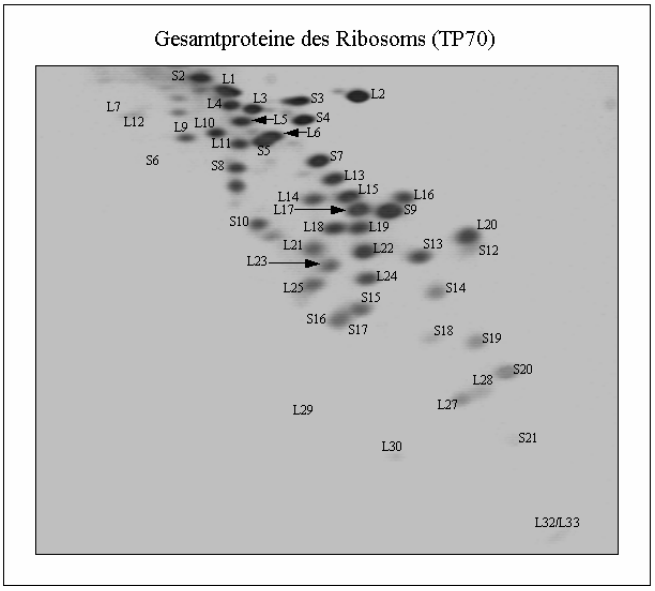


Abb. 4: 2-D-PAA-Gel von TP70 (*Shigella flexneri 2a 259*).

3.2 Präparation ribosomaler Untereinheiten

Mittels Zonalzentrifugation erfolgte die Auftrennung des 70S-Ribosoms in seine beiden Untereinheiten 30S und 50S.

Um die Bedingungen für den präparativen Lauf zu bestimmen, wurden zunächst analytische Vorläufe durchgeführt, wobei neben den 70S-Ribosomen von *S. flexneri* auch solche von *E. coli* bzw. Mischfraktionen zusammengesetzt aus *S. flexneri* und *E. coli* als Referenz zum Einsatz kamen. Erwartungsgemäß wiesen die resultierenden Profile keine Differenzen auf (Daten nicht gezeigt). Die anschließend durchgeführte präparative Zonalzentrifugation von 6000 A_{260}-Einheiten „cruden“ 70S-Ribosomen in einem 6-38 % Sucrosegradienten (17 h, 23000 rpm, Ti15-Rotor) zeigt Abb.5. Unter Registrierung der A_{290} wurde der Gradient bei 3000 rpm ausgepumpt und unter Beachtung des Absorptionsprofils die 30S und 50S enthaltenden Fraktionen vereinigt.

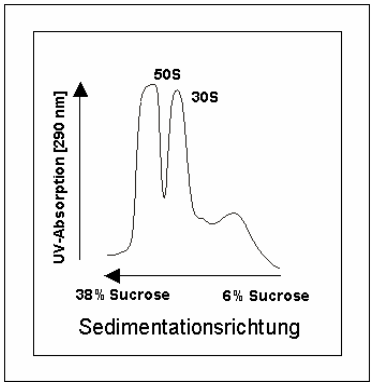
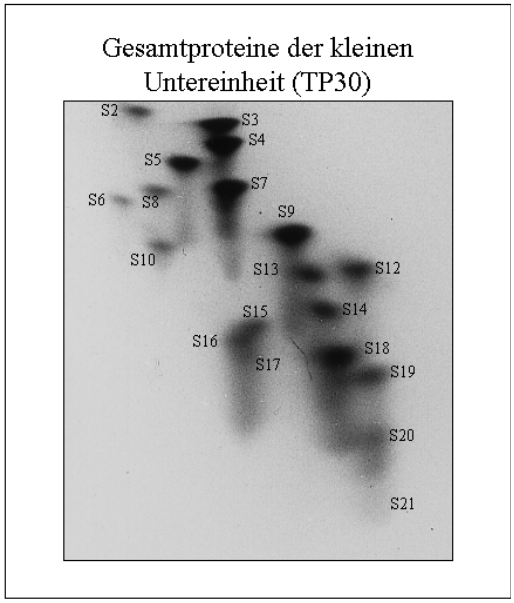


Abb. 5: Präparative Zonalzentrifugation von 6000 A_{260}-Einheiten „cruden“ 70S-Ribosomen von *S.flexneri* zur Darstellung der ribosomalen Untereinheiten 30S und 50S.

Die anschließende Essigsäureextraktion und Acetonfällung trennte die anhaftende rRNA ab und konzentrierte die Proteine. Abb. 6 und 7 zeigen die resultierenden gesamten Proteine der beiden ribosomalen Untereinheiten.



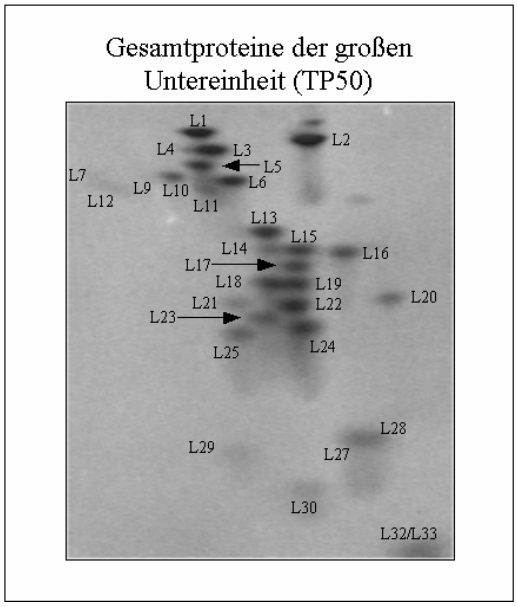


Abb. 6 und 7: Darstellung der gesamten Proteine der beiden ribosomalen Untereinheiten von *Shigella flexneri* in der 2-D-PAGE (TP30 und TP50).

3.3 Chromatographische Auftrennung der Proteinfraktionen (TP30,TP50)

Nachdem die Proteine des 70S-Ribosoms durch Präparation der Untereinheiten bereits in zwei Fraktionen aufgetrennt wurden, erfolgte die weitere Separation mittels flüssigkeitschromatographischer Methoden. Moderne FPLC-Techniken verbinden gute Auflösungen mit hohen Kapazitäten im Bereich von Milligramm- bis Gramm-Mengen an Protein und stellten daher ein Optimum für die geplante Proteinpräparation dar. Die

Proteingemische der jeweils aufzutrennenden ribosomalen Untereinheit wurden an ein Mono S-Kationenaustauscherbett adsorbiert und anschließend in einem ansteigenden Kaliumionengradienten entwickelt. Die Trennungen erfolgten bei 4 °C.

3.3.1 Chromatographie der TP30-Proteinfraktion

Die zu separierende Proteinfraktion wurde aufgetaut, dreimal gegen das 200fache Volumen Rek-4-6U, und anschließend gegen das 200fache Volumen FPLC-Startpuffer dialysiert, um anschließend auf die Kationenaustauschersäule aufgebracht zu werden. Sobald das ungebundene Material ausgewaschen war und sich die UV-Absorption wieder auf dem Niveau der Grundlinie befand, erfolgte nach 160 min die fraktionierte Elution der gebundenen Proteine im ansteigenden Kaliumionengradienten (BisTris-HCl, pH 6,0 (4 °C) 10 mM, CH_3COO^- 10 mM, Methylamin 2 mM, KCl 500 mM, Harnstoff 6 M).

Der Gradient wurde so programmiert, dass der Anteil des Elutionspuffers nach 680 min 70 % betrug, woran sich eine kurze Erhöhung auf 100 % anschloss, um eventuell noch an der Säule haftende Proteine zu desorbieren. Abb. 8 zeigt das Elutionsprofil von 83 A_{230}-Einheiten TP30. Die Chromatographiedauer betrug 12 h.

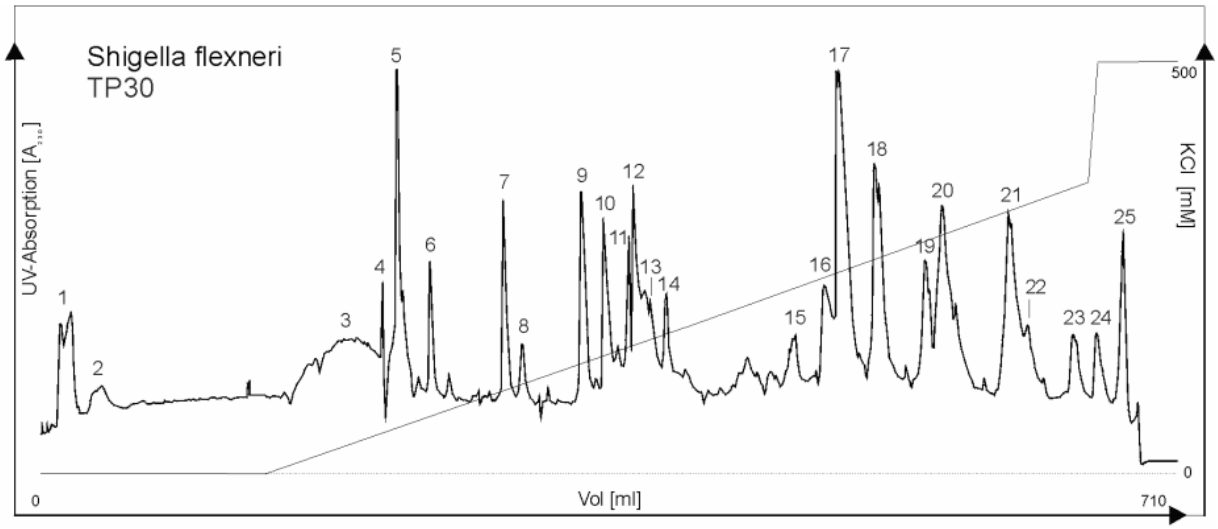


Abb. 8: Kationenaustauscherchromatographie der ribosomalen TP30-Proteinfraktion.

Trennung von 83 A_{230}-Einheiten TP30 (ca. 20 mg) von *S.flexneri* auf Mono S 16/10 im ansteigenden Kaliumionengradienten mit der Flussrate 1 ml/min. Gezeigt ist das UV-Profil (A_{230}) des Eluats.

Das Chromatogramm zeigt 25 distinkte Signale. Die jeweils zu einem Signal gehörenden Proteinfraktionen wurden vereinigt, ausgiebig gegen MQ dialysiert, die optische Dichte

bestimmt und lyophilisiert. Mittels gelelektrophoretischer Verfahren erfolgte die weitere Charakterisierung, welche bereits einen hohen Anteil vollständig isolierter Proteine nach der FPLC dokumentierten.

3.3.2 Chromatographie der TP50-Proteinfraktion

Die Vorbereitung der zu trennenden TP50-Probenfraktion erfolgte in analoger Weise. Nach Dialyse gegen Rek-4-6U schloss sich die Einstellung auf FPLC-Startpufferbedingungen an.

Um der höheren Anzahl von Proteinen innerhalb der großen ribosomalen Untereinheit Rechnung zu tragen, wurden Dauer der durchgeführten Trennung und Ionenstärke des Elutionspuffers variiert.

Nach Auftragen der TP50-Proteinfraktion auf die stationäre Phase und Auswaschen des ungebundenen Materials erfolgte nach 120 min der Start des Gradienten. Die Trennung erstreckte sich linear über 2000 min, bis die Konzentration des Elutionspuffers (BisTris-HCl, pH 6,0 (4 °C) 10 mM, CH_3COO^- 10 mM, Methylamin 2 mM, KCl 1000 mM, Harnstoff 6 M) 50 % betrug. Es schloss sich das kurze Spülen der Säule mit 100 % an. Abb. 9 zeigt das Elutionsprofil.

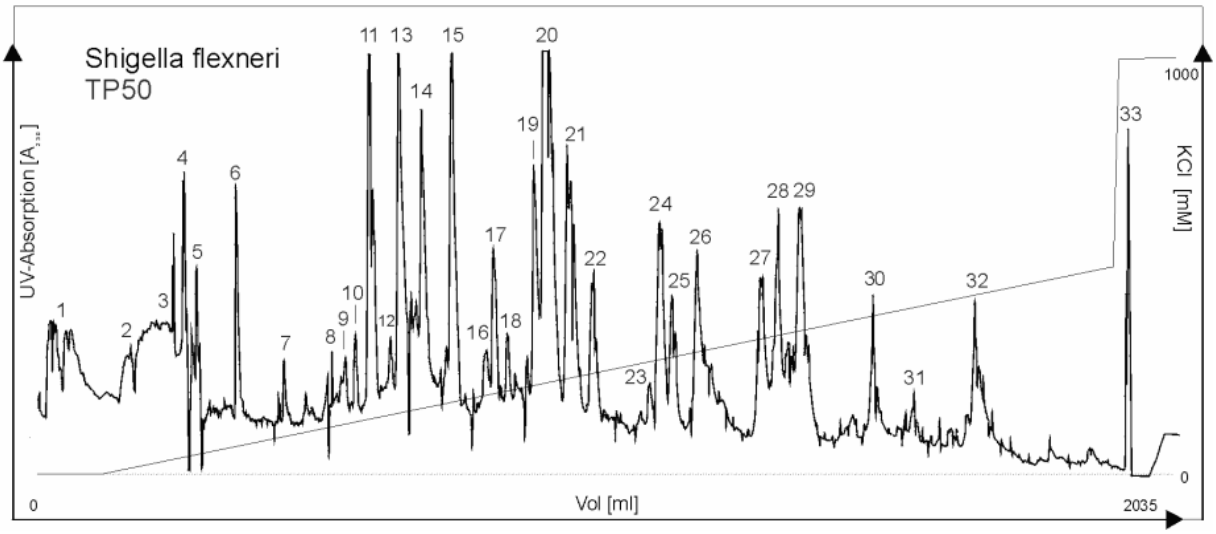


Abb. 9: Kationenaustauscherchromatographie der ribosomalen TP50-Proteinfraktion.

Trennung von 110 A_{230}-Einheiten TP50 (ca. 27 mg) von *S.flexneri* auf Mono S 16/10 im linear ansteigenden Kaliumionengradienten mit der Flußrate 1 ml/min.

Das Chromatogramm weist 33 distinkte Signale auf, deren Bearbeitung in Analogie zur TP30-Proteinfraktion erfolgte. Gelelektrophoretische Charakterisierungen wiesen bis zu 4 Proteine pro erzielter Proteinfraktion nach.

3.4 Identifikation T-Zell-Stimulation induzierender Proteinfraktionen

Als Einschlusskriterium für die weitere Untersuchung der durch Einsatz der FPLC erhaltenen Proteinfraktionen aus TP30 und TP50 wurde eine Ausbeute von jeweils 80 µg Protein festgesetzt, da geringere Mengen keine weitere Bearbeitung mit finaler Identifikation gewährleisten können.

Um zu untersuchen, ob und welche der ribosomalen Proteinfraktionen eine T-Zell-Immunreaktion provozieren und somit als mögliche immundominante Antigene bei der Pathogenese der ReA anzusehen sind, wurden diese mit synovialen mononukleären Zellen von Patienten, die an *Shigella*-getriggerter ReA leiden und HLA-B27-positiv sind, für 6 Tage in Kultur genommen. Eine erhöhte Teilung der humanen Zellen, gemessen durch den Einbau von ^{3}H- Thymidin in deren DNA, spricht für eine spezifische Reaktion auf das angebotene bakterielle Antigen. Neben 39 durch die FPLC separierten Proteinfraktionen, die das Einschlusskriterium erfüllten, wurde ebenfalls die Reaktion auf die vollständigen Fraktionen TP30 und TP50, auf die S-100 Enzymfraktion und auf ganze, hitzeinaktivierte Zellen von *S. flexneri* und *E. coli* untersucht. Als Indikator für die Proliferationsfähigkeit der SFMNZ diente Pokeweed-Mitogen, ein unspezifischer T- und B-Zell-Stimulator.

Die im Lymphozytenproliferationsassay zu analysierenden Proteinfraktionen wurden nach Einstellung auf eine Konzentration von 200 µg/ml in PBS mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml pro Antigen eingesetzt. Abb. 10 zeigt die eingesetzten Proteinfraktionen mit dem Profil der resultierenden T-Zell-Proliferation.

Die Proliferation der T-Zellen wird als Stimulationsindex (SI, Quotient aus Proliferation der Zellen mit Antigen dividiert durch Proliferation ohne Antigen (Hintergrund)) angegeben.

Da sich die Stimulierbarkeit der T-Zellen von Individuum zu Individuum teilweise deutlich unterscheidet, war individuell zu definieren, was unter erhöhter Stimulation zu verstehen ist. Jene Proteinfraktionen, die übereinstimmend bei allen 3 Patienten eine erhöhte Stimulation und einen Stimulationsindex > 4 (Patient #1 und #3) bzw. > 25 (Patient #2) aufweisen, wurden als stimulierende Fraktionen gewertet.

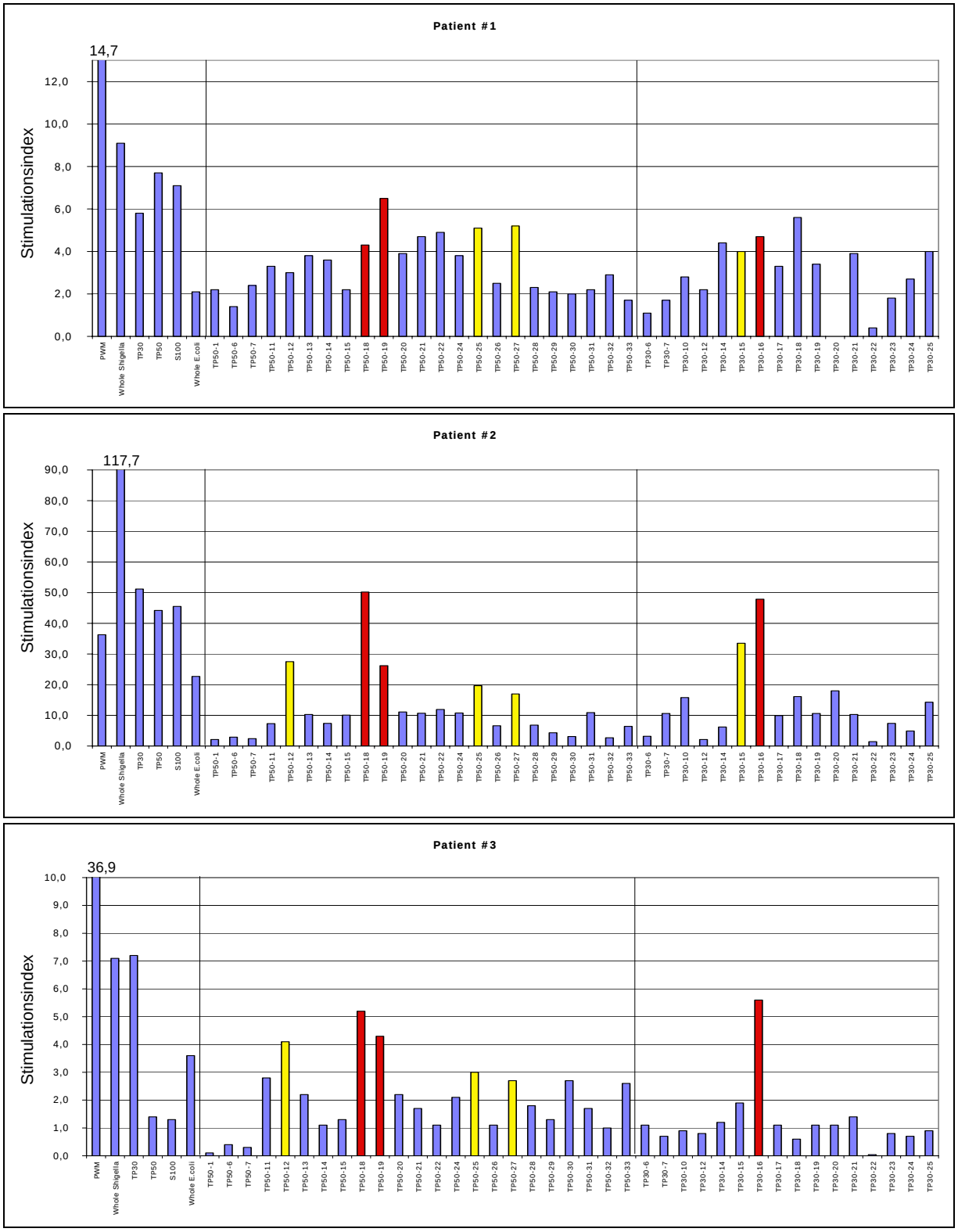


Abb. 10: Lymphozytenproliferationsassay mit synovialen MNZ von drei HLA-B27-positiven Patienten mit *Shigella*-getriggerter ReA. Gezeigt ist die durch die eingesetzten Proteinfraktionen (x-Achse) induzierte T-Zell-Stimulation als Stimulationsindex SI (y-Achse). Definitionsgemäß übereinstimmend eine hohe Stimulation induzierende Fraktionen aus TP50 und TP30 sind rot markiert (gelb: Definition verfehlt aber höher als durchschnittlicher SI; PWM: Pokeweed Mitogen).

Es ließen sich hohe Proliferationen auf ganze, hitzeinaktivierte Zellen von *Shigella* beobachten, die deutlich höher als bei den von *E. coli* eingesetzten Zellen lagen. Bei Patient #1 betrug der SI auf *Shigella* 9,1, auf *E.coli* 2,1, bei Patient #2 117,7 versus 22,7 und bei Patient #3 7,1 versus 3,6.
Auch die gesamten Proteinfraktionen von TP30 und TP50 sowie die S-100-Enzymfraktion erzielten hohe Proliferationen. Dabei wies Patient #1 hohe Stimulationen durch alle 3 Fraktionen mit der höchsten durch TP50, gefolgt von S100 und TP30 auf. Patient #2 zeigte bei ebenfalls hohen Proliferationen auf alle Fraktionen die höchste Stimulation durch TP30, gefolgt von S-100 und TP50. Patient #3 dagegen zeigte eine isolierte erhöhte Proliferation auf TP30, wohingegen TP50 und S-100 nur sehr geringe Proliferationen auf Niveau von wenig stimulierenden, durch die FPLC gewonnenen Proteinfraktionen erzielten.

Innerhalb der durch Einsatz der FPLC aus TP50 und TP30 separierten 39 ribosomalen Proteinfraktionen ließen sich deutliche interindividuelle Unterschiede in der Fähigkeit, eine T-Zell-Stimulation zu induzieren, beobachten.
Übereinstimmend bei allen drei Patienten fanden sich bei den aus der 50S-Untereinheit separierten Proteinfraktionen gemäß der aufgestellten Definition hohe Stimulationen auf folgende 2 Proteinfraktionen: TP50-18 und TP50-19. Für die Fraktion TP50-18 betrug der SI für Patient #1 4,3, für Patient #2 50,2 und für Patient #3 5,2. Der SI für die Fraktion TP50-19 betrug für Patient #1 6,5, für Patient #2 26,2 und für Patient #3 4,3.
Die Fraktionen TP50-25 und TP50-27 wiesen Übereinstimmungen bei allen Patienten auf, erfüllten jedoch nicht den geforderten Stimulationsindex. Die Fraktion TP50-12 induzierte einen erhöhten Stimulationsindex, allerdings nur bei 2 der geforderten 3 Patienten (#2 und #3).
Bei den aus der 30S-Untereinheit aufgetrennten Proteinfraktionen erfüllte TP30-16 die geforderten Kriterien einer stimulierenden Fraktion. Der SI für Patient #1 betrug 4,7, für Patient #2 47,9 und für Patient #3 5,6.
Die Fraktion TP30-15 zeigte nur bei 2 Patienten eine erhöhte Stimulation, wobei diese auch nur knapp den geforderten Stimulationsindex erreichte.
Isoliert bei Patient #1 zeigte sich eine sehr hohe Stimulation durch die Fraktion TP30-18 mit einem SI von 5,6.

Die gelelektrophoretische Analyse der T-Zell-Stimulation induzierenden Proteinfraktionen erfolgte zunächst durch SDS-PAGE, welche vor allem die Identifikation der großen ribosomalen Proteine erlaubt. Die kleineren ribosomalen Proteine dagegen können mit diesem Verfahren nicht sicher bestimmt werden, weshalb in diesen Fällen die 2-D-PAGE eingesetzt wurde, die unter Ausnutzung von Ladungsunterschieden aufgrund differierender Aminosäuresequenzen auch Proteine gleichen Molekulargewichts unterscheiden kann. Die Identifikation der zu analysierenden Proteinfraktionen von *Shigella* erfolgte als *E. coli*-Homolog (siehe 2.3.3).

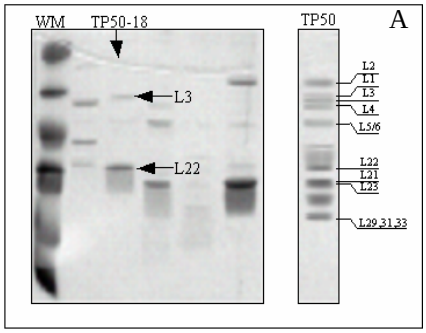
Die weitere Auftrennung der stimulierenden Fraktionen in deren Einzelkomponenten erfolgte mittels RP-HPLC. Auch solche Fraktionen, die bereits nach der FPLC nur ein Protein enthielten und somit vollständig aufgereinigt waren, wurden der RP-HPLC unterzogen, um einerseits die Richtigkeit der vorgenommenen Identifikation zu kontrollieren und andererseits zu gewährleisten, dass die biologische Aktivität aller Proteine für spätere Proliferationsexperimente mit MNZ gleichsinnig durch bei der HPLC verwendete organische Lösungsmittel verändert wird.

3.4.1 Charakterisierung T-Zell-Stimulation induzierender Proteinfraktionen

Die mittels gelelektrophoretischer und flüssigkeitschromatographischer Methoden durchgeführte Analyse jener Proteinfraktionen, die gemäß der aufgestellten Definition stimulierende Fraktionen darstellen, identifizierte folgende Einzelproteine:

Aus der 50S-Untereinheit stammend:

TP50-18



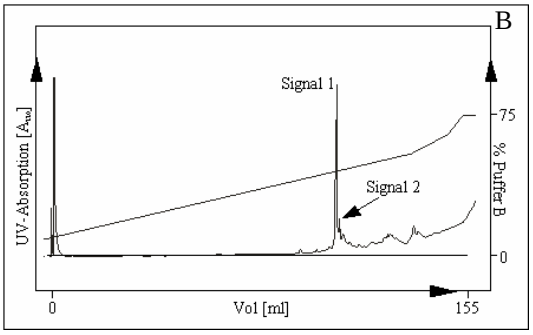
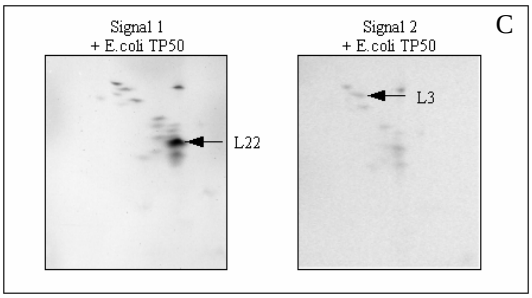


Abb. 11: Identifikation der Fraktion TP50-18

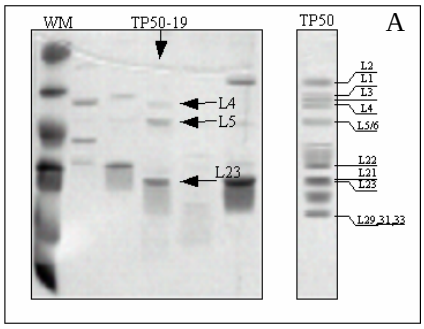
A: SDS-PAGE von TP50-18 mit TP50 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).

B: RP-HPLC von TP50-18 bei einer UV-Absorption von A_{220}.

C: 2-D-PAGE der in der RP-HPLC erzielten beiden Signale (**L22, L3**).



TP50-19



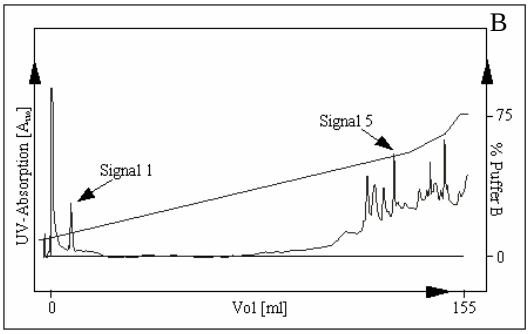
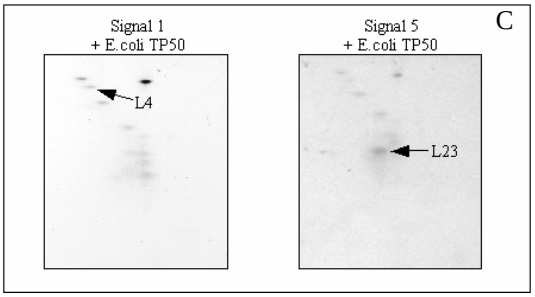


Abb. 12: Identifikation der Fraktion TP50-19

A: SDS-PAGE von TP50-19 mit TP50 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).

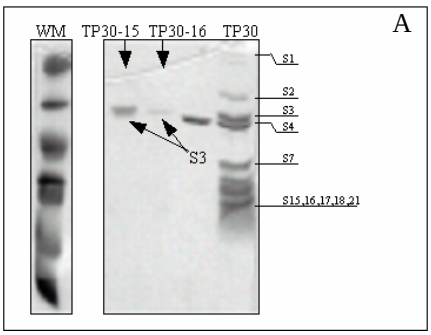
B: RP-HPLC von TP50-19 bei einer UV-Absorption von A_{220}.

C: 2-D-PAGE der in der RP-HPLC erzielten beiden Signale 1 und 5 (**L4, L23**). Kein Protein in den Fraktionen der übrigen Signale nachweisbar.



Aus der 30S-Untereinheit stammend:

TP30-16



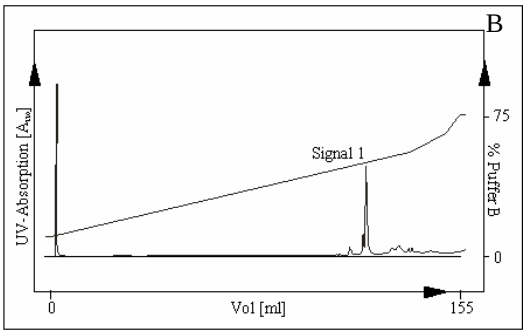
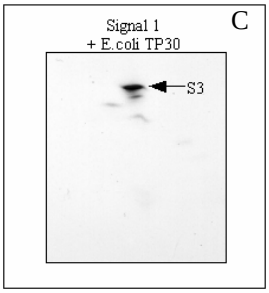


Abb. 13: Identifikation der Fraktionen TP30-16

A: SDS-PAGE von TP30-16 mit TP30 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).

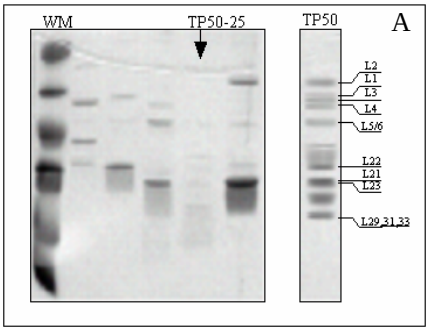
B: RP-HPLC der Fraktion TP30-16 bei einer UV-Absorption von A_{220}.

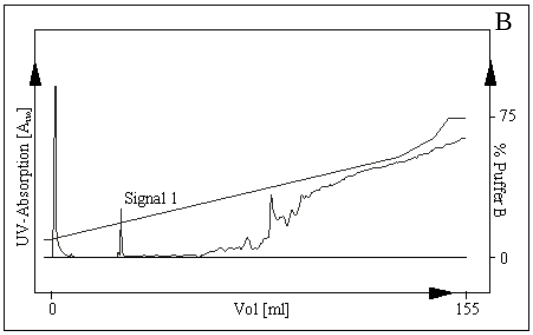
C: 2-D-PAGE des in der RP-HPLC erzielten Signals (**S3**).

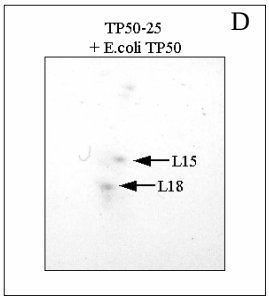


Fraktionen, welche die definierten Kriterien mit gefordertem SI und Übereinstimmung bei allen 3 Patienten verfehlen, aber dennoch eine erhöhte Proliferation aufweisen:

TP50-25







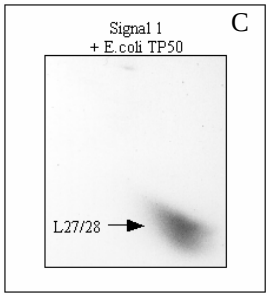


Abb. 14: Identifikation der Fraktion TP50-25

A: SDS-PAGE von TP50-25. Keine Identifikation der Proteine möglich.

B: RP-HPLC von TP50-25 bei einer UV-Absorption von A_{220}.

C: 2-D-PAGE des in der RP-HPLC erzielten Signals 1 (**L27/28**).

D: 2-D-PAGE von TP50-25 mit dem Nachweis von 2 ribosomalen Proteinen (**L15, L18).**

TP50-27

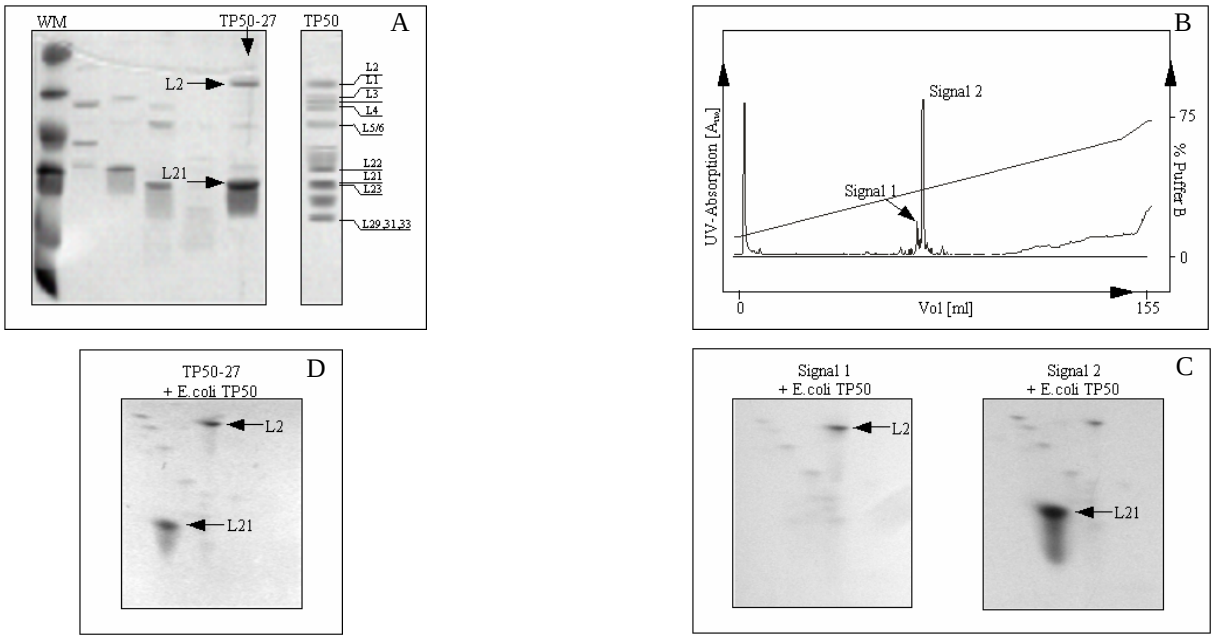


Abb. 15: Identifikation der Fraktion TP50-27

A: SDS-PAGE von TP50-27 mit TP50 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).

B: RP-HPLC von TP50-27 bei einer UV-Absorption von A_{220}.

C: 2-D-PAGE der in der RP-HPLC erzielten Signale 1 und 2 (**L21, L2**).

D: 2-D-PAGE von TP50-27 mit dem Nachweis der beiden ribosomalen Proteine **L21, L2**.

TP50-12

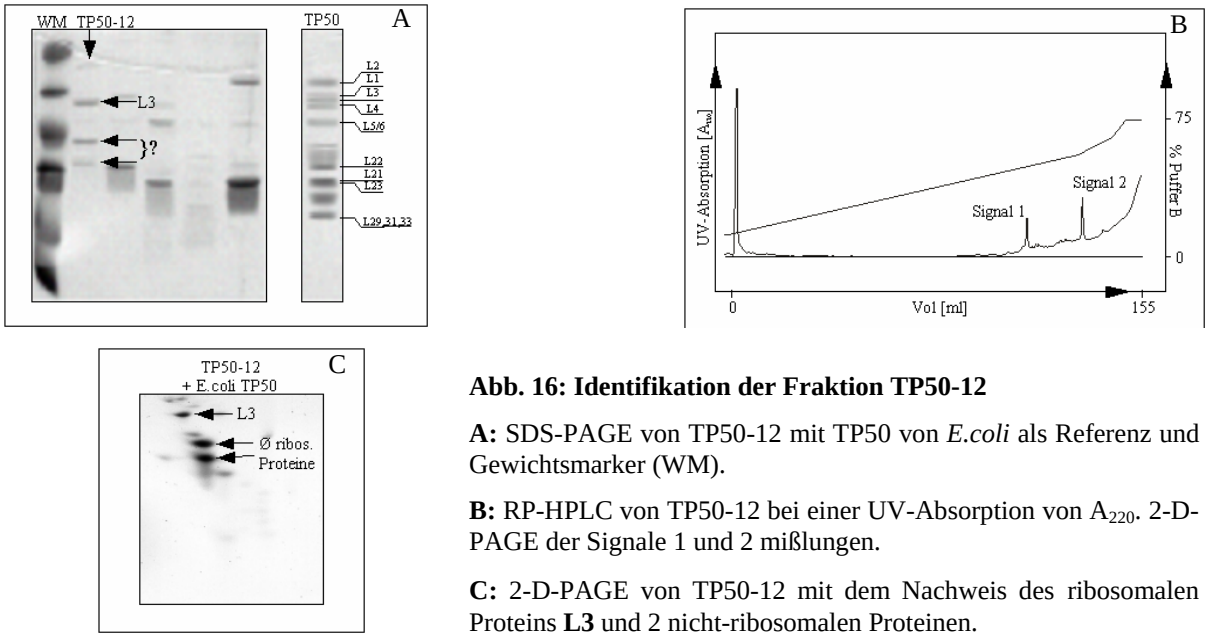


Abb. 16: Identifikation der Fraktion TP50-12

A: SDS-PAGE von TP50-12 mit TP50 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).

B: RP-HPLC von TP50-12 bei einer UV-Absorption von A_{220}. 2-D-PAGE der Signale 1 und 2 mißlungen.

C: 2-D-PAGE von TP50-12 mit dem Nachweis des ribosomalen Proteins **L3** und 2 nicht-ribosomalen Proteinen.

TP30-18

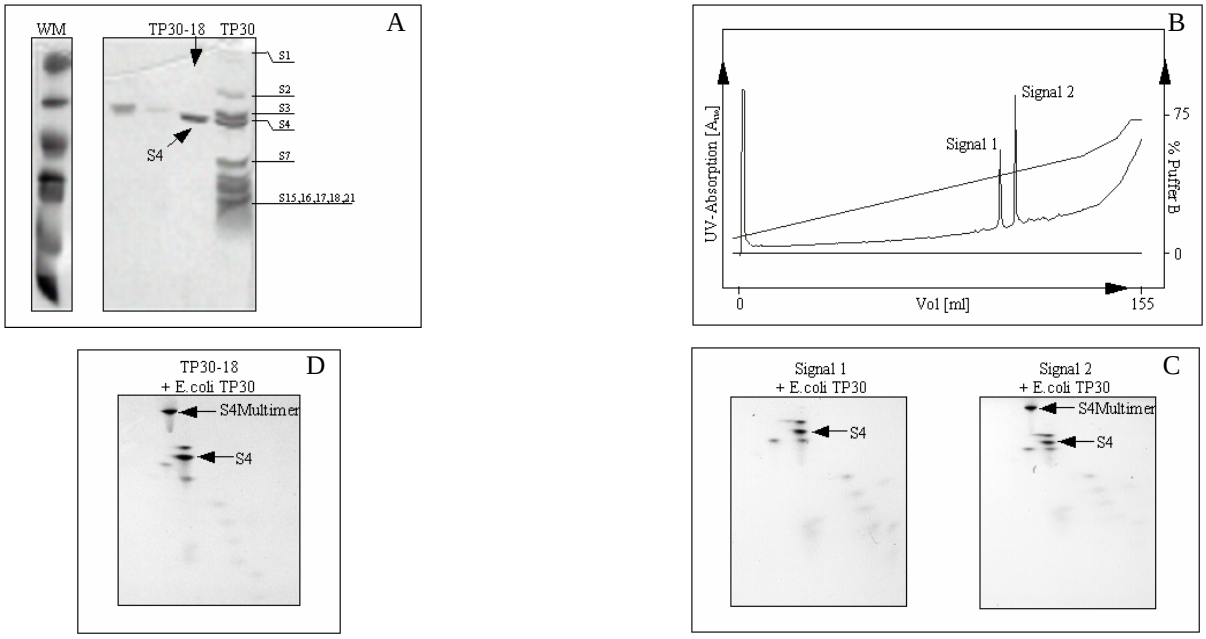


Abb. 17: Identifikation der Fraktion TP30-18

A: SDS-PAGE von TP30-18 mit TP30 von *E.coli* als Referenz und Gewichtsmarker (WM).
B: RP-HPLC von TP30-18 bei einer UV-Absorption von A_{220}.
C: 2-D-PAGE der in der RP-HPLC erzielten Signale 1 und 2 (**S4, S4Multimer**).
D: 2-D-PAGE von TP30-18 mit dem Nachweis des ribosomalen Proteins **S4** (singulär und als Multimer)

3.4.2 Zusammenstellung der identifizierten Proteine

In Tabelle 2 sind die im Lymphozytenproliferationsassay detektierten, stimulierenden ribosomalen Proteinfraktionen von *Shigella* sowie deren mittels Gelelektrophorese und RP-HPLC ermittelte Zusammensetzung und Identifikation der immundominanten Proteine zusammengefasst.

Hohe T-Zell-Proliferation induzierende ribosomale Proteinfraktionen	Identifiziert als ribosomales Protein
TP50-18	**L22**, L3
TP50-19	**L23**, L4, L5
TP30-16	**S3**

Tabelle 2: Identifizierte immundominante T-Zell-Antigene von *Shigella*
Definitionsgemäß geforderter SI übereinstimmend bei allen 3 Patienten;
fettgedruckt: Hauptprotein der stimulierenden Fraktion, dünn: Spuren von Protein.

Die Analyse der 3 ribosomalen Proteinfraktionen TP50-18, TP50-19 und TP30-16, die bei allen 3 Patienten übereinstimmend eine hohe T-Zell-Stimulation induzieren, identifiziert in der Zusammenschau folgende Hauptproteine: L22, L23 und S3.
In Spuren lassen sich zusammengefasst in den genannten Fraktionen auch die Proteine L3, L4 und L5 nachweisen.

Weitere stimulierende ribosomale Fraktionen	Identifiziert als ribosomales Protein
TP50-12	**L3, 2 nicht-ribosomale Proteine**
TP50-25	**L15, L18**, L27/28
TP50-27	**L21,** L2
TP30-18	**S4**

Tabelle 3: Identifizierte weitere T-Zell-Antigene von *Shigella*
Definitionsgemäß Kriterien für erhöhten SI und Übereinstimmung bei allen 3 Patientenverfehlt; fettgedruckt: Hauptprotein der Fraktion; dünn: Spuren von Protein.

Tabelle 3 führt weitere T-Zell-Antigene auf, welche die Kriterien des geforderten SI und Übereinstimmung bei allen Patienten nicht erfüllen. Zusammengefasst sind in diesen Fraktionen als Hauptproteine L3, L15, L18, L21, S4 sowie 2 nicht-ribosomale Proteine zwischen L5/L6/L11 und L6/L13 nachweisbar. In Spuren lassen sich zusammengefasst L2 und L27/28 nachweisen.

3.5 Humorale Immunantwort gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella*

Nach erstmaliger Identifikation T-Zell-Stimulation induzierender ribosomaler Proteine von *Shigella* erfolgte die Analyse der humoralen Immunantwort.
Dabei war insbesondere von Interesse, ob jene ribosomalen Proteine von *Shigella*, die zellulär eine starke Proliferation provozieren, auch auf humoraler Ebene eine Immunantwort induzieren.
Da kein sicheres serologisches Verfahren zum Nachweis einer stattgehabten Infektion mit *Shigella* existiert, galt es darüber hinaus zu untersuchen, ob sich gegen ribosomale Proteine von *Shigella* gerichtete Antikörperprofile im Serum von Patienten als diagnostisches Instrument zum Nachweis einer stattgehabten Infektion eignen.

Zur Bearbeitung dieser Frage wurde der Western Blot eingesetzt, ein Verfahren, bei dem die zu untersuchenden Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert werden, wo sie nach Hinzufügen von Serum mit darin enthaltenen spezifischen Antikörpern komplexieren. Der Nachweis der primären Komplexe erfolgt durch Bindung eines Antikörper-Enzymkonjugats (hier: anti-humanes IgG von der Ziege mit gebundener Peroxidase), welches nach Zugabe des Substrates eine Farb- bzw. Lichtreaktion hervorruft.
Zunächst erfolgte die Auftrennung der zu untersuchenden Proteinfraktionen (TP30 und TP50) mittels SDS-PAGE. Nach Transfer der Proteine, Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper sowie Substratzugabe ergab sich eine Fülle von Banden und somit der Nachweis einer deutlichen Antikörperbildung gegen die ribosomalen Proteine sowohl von *Shigella*, als auch von *E. coli* im Serum von ReA-Patienten und gesunden Kontrollen (Daten nicht gezeigt).
Die Identifikation von Unterschieden zwischen *Shigella* und *E. coli* bzw. Patienten und Kontrollen war jedoch aufgrund der Dichte der Banden, insbesondere bei den kleineren Proteinen, nicht möglich. Daher wurden die Proteine in der Folge vor Transfer mittels 2-D-PAGE separiert, welche durch ihre Fähigkeit, selbst Proteine gleichen Molekulargewichts unterscheiden zu können, die eindeutige Identifikation der detektierten Proteine ermöglichte.

Die ribosomalen Proteinfraktionen TP30 und TP50 von *Shigella flexneri* wurden nach Transfer auf eine Membran mit dem Serum von jeweils 5 an *Shigella*-getriggerter ReA leidenden Patienten sowie dem Serum von 6 gesunden Probanden als Kontrolle inkubiert. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen der Proteinfraktionen TP30 und TP50 von *E. coli* mit den Seren der an *Shigella*-getriggerter ReA leidenden Patienten.

3.5.1 Charakterisierung der humoralen Immunantwort gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* mittels Western Blot

Die in den eingesetzten Seren detektierten, gegen ribosomale Proteine der jeweiligen ribosomalen Untereinheit (TP30, TP50) gerichteten IgG-Antikörper sind markiert.

HLA-B27-positive Patienten mit *Shigella*-getriggerter ReA

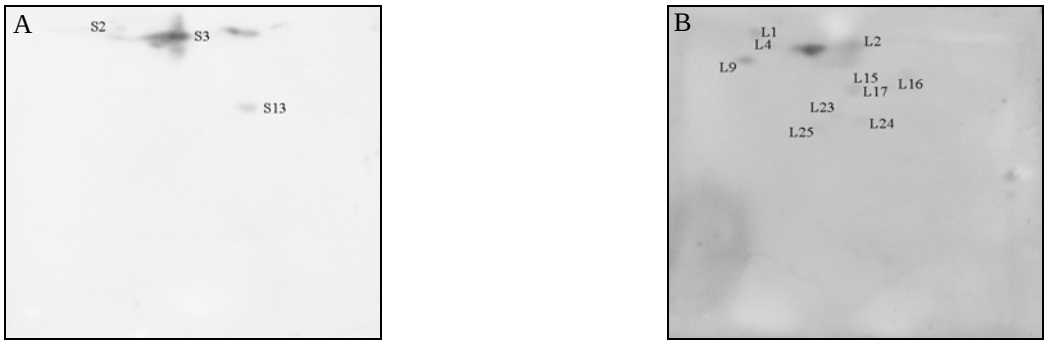


Abb. 18: ReA-Patient 1. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.

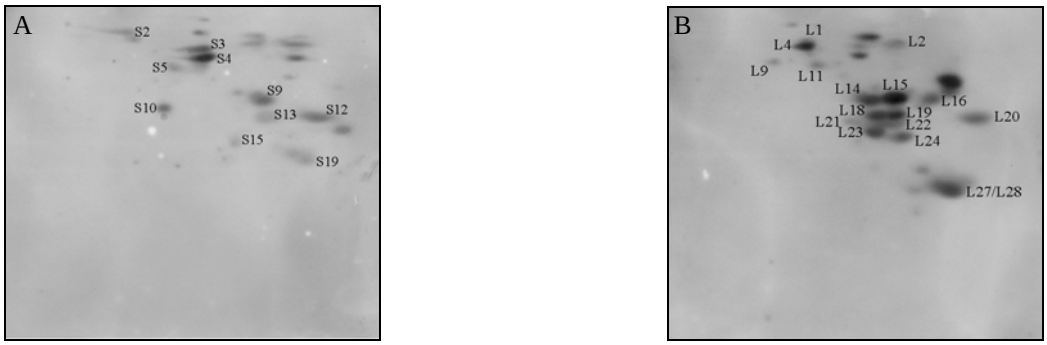


Abb. 19: ReA-Patient 2. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.

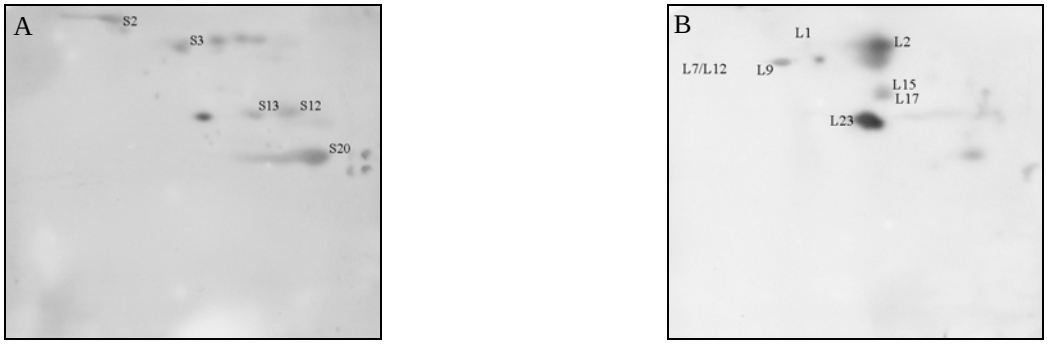
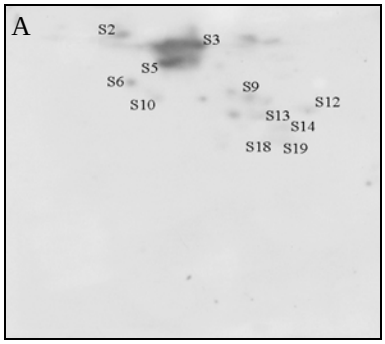


Abb. 20: ReA-Patient 3. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



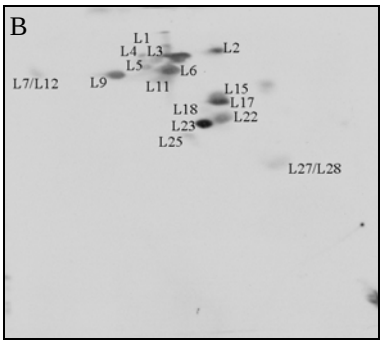
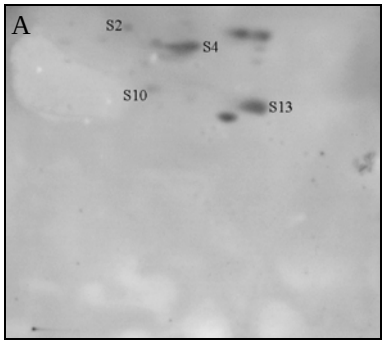


Abb. 21: ReA-Patient 4. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



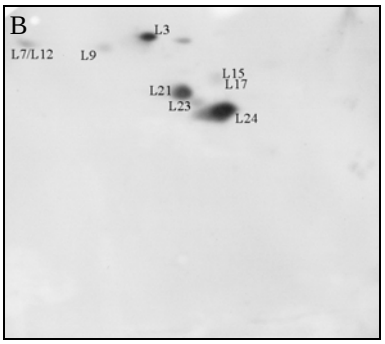
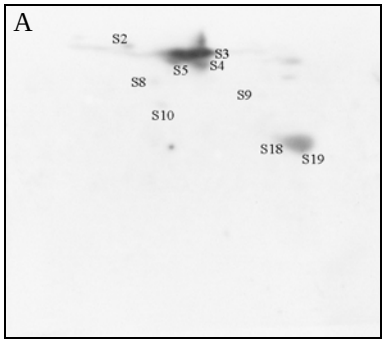


Abb. 22: ReA-Patient 5. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.

Gesunde Kontrollen als Referenz



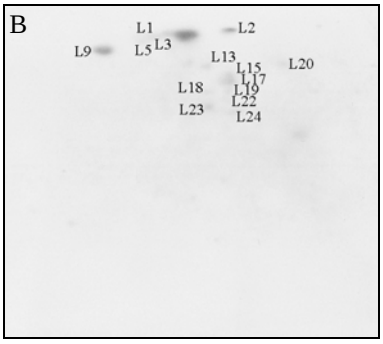
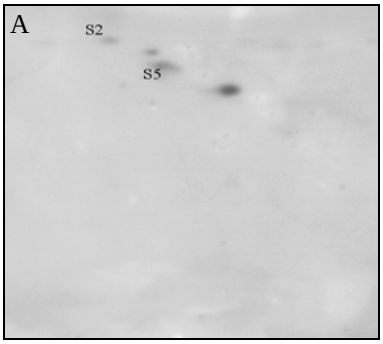


Abb. 23: Kontrolle 1. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



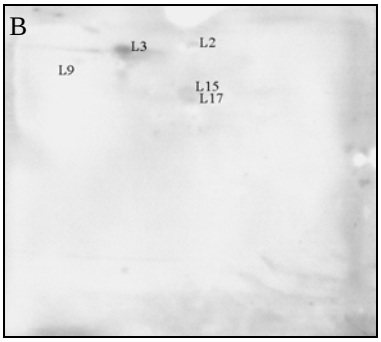
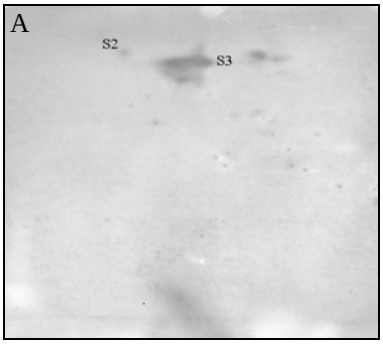


Abb. 24: Kontrolle 2. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



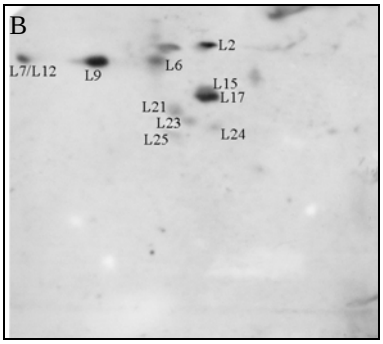
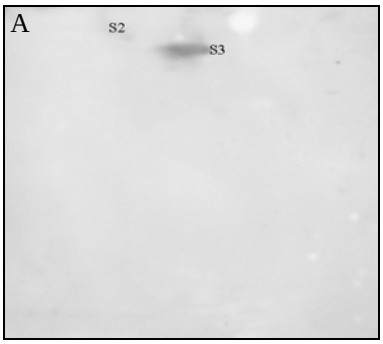


Abb. 25: Kontrolle 3. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



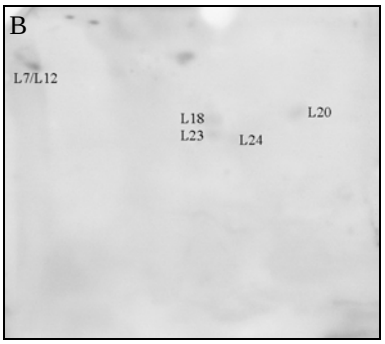
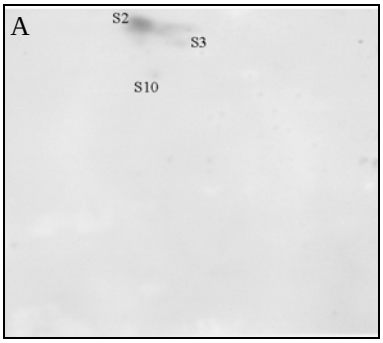


Abb. 26: Kontrolle 4. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



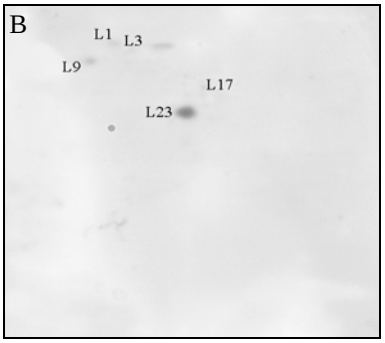
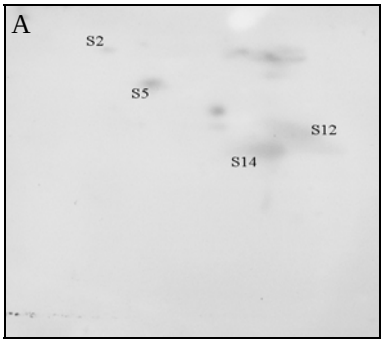


Abb. 27: Kontrolle 5. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.



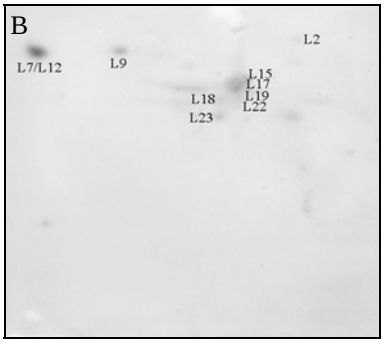


Abb. 28: Kontrolle 6. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Western Blot

A: Gegen TP30 von *Shigella*. **B:** Gegen TP50 von *Shigella*.

Die gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella* nachgewiesenen Antikörper der Klasse IgG im Serum von Patienten mit *Shigella*-getriggerter ReA und gesunden Kontrollen sind in den Tabellen 4a und 4b zusammengefasst.

Shigella-protein	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Kon 1	Kon 2	Kon 3	Kon 4	Kon 5	Kon 6
S1											
S2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
S3	+++	+++		+++	+++	+++		+++	+++	++	
S4	+++		+++			++					
S5	++	+++				+	+++				+++
S6		++									
S7											
S8						+					
S9	+++	++				+					
S10	+++	++	++			+				++	
S11											
S12	+++	++			+++						++
S13	+++	++	+++	+++	+++						
S14		++									+++
S15	++										
S16											
S17											
S18	++	++				+++					
S19	++	++				+++					
S20					+++						
S21											

Tabelle 4a: **Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit (S-Proteine) von *Shigella* im Serum von ReA-Patienten mit *Shigella*-getriggerter ReA und gesunden Kontrollen**
+: schwaches Signal; ++: mittleres Signal; +++: starkes Signal

Shigella-protein	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Kon 1	Kon 2	Kon 3	Kon 4	Kon 5	Kon 6
L1	+	++		+	+	+				++	
L2	++	+++		++	+++	+++	+	+++			+
L3		++	+++			+	+++			++	
L4	+++	++		+							
L5		++				+					
L6		+++						+++			
L7		++	++		+			++	++		++
L8											
L9	++	+++	++	+++	+++	+++	+	++		++	+++
L10											
L11	++	+									
L12		++	++		+			++	++		++
L13						++					
L14	+++										
L15	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++			+++
L16	+++			++							
L17		+++	++	++	+++	++	++	+++		+	+
L18	+++	+				+			++		+
L19	+++					+					++
L20	+++					+			++		
L21	++		+++					++			
L22	++	+++				+					+
L23	+++	+++	++	++	+++	++		++	++	+++	++
L24	+++		+++	++		+		++	++		
L25		+		++				+			
L26											
L27	+++	++									
L28	+++	++									
L29											
L30											

Tabelle 4b: Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (L-Proteine) von *Shigella* im Serum von ReA-Patienten mit *Shigella*-getriggerter ReA und gesunden Kontrollen
+: schwaches Signal; ++: mittleres Signal; +++: starkes Signal

Die auf zellulärer Ebene eine starke Stimulation induzierenden Proteine L22/L3, L23 und S3 provozierten ebenfalls eine humorale Reaktion.
Antikörper gegen L22 waren im Serum bei 2 von 5 Patienten nachweisbar, gleiches gilt für L3. Antikörper gegen L23 fanden sich im Serum aller 5 ReA-Patienten und S3 wurde bei 4 der 5 Patienten detektiert.
Auch jene Proteine, die die Definition einer hohen zellulären Proliferation verfehlt haben, aber eine überdurchschnittliche Stimulation aufweisen, wurden humoral erkannt: Antikörper gegen L15 ließen sich im Serum aller 5 Patienten nachweisen, Antikörper gegen L18 und L21 jeweils bei 2 von 5 Patienten.

In den Seren der gesunden Probanden waren Antikörper gegen L22 bei 2 von 6 Kontrollen nachweisbar und L3 wurde im Serum von 3 von 6 Kontrollen detektiert. Antikörper gegen L23 wiesen 5 von 6 Kontrollen auf und S3 wurde bei 4 von 6 Kontrollen erkannt.
Antikörper gegen L15 wiesen 4 von 6 Kontrollen auf, L18 wurde bei 3 von 6 Kontrollen erkannt und L21 bei 1 Kontrolle.

Auf humoraler Ebene war in den Seren von Patienten und gesunden Probanden somit kein deutlicher Unterschied in Bezug auf die eine starke T-Zell-Stimulation induzierenden ribosomalen Proteinfraktionen nachweisbar (L22 bei 2 von 5 Patienten detektiert versus 2 von 6 Kontrollen, L23 bei 5 von 5 Patienten detektiert versus 5 von 6 Kontrollen, S3 detektiert bei 4 von 5 Patienten versus 4 von 6 Kontrollen).

Ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ließ sich jedoch in Bezug auf ein anderes ribosomales Protein feststellen, welches zellulär für keine erhöhten T-Zell-Stimulationen verantwortlich war: Das ribosomale Protein S13 induzierte eine ausgeprägte Antikörperbildung nur im Serum aller Patienten, nicht jedoch im Serum der Kontrollen (Tabelle 4a).

Bei den zur gleichen Gattung gehörenden Bakterien *Shigella* und *E. coli* war darüber hinaus eine Antikörperkreuzreaktivität zwischen deren ribosomalen Proteinen im Serum von an *Shigella*-getriggerter ReA leidenden Patienten nachweisbar (Western Blots mit TP30 und TP50 von *E.coli* nicht gezeigt).

Vor Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgte nach Übertragung von TP30 und TP50 aus der 2-D-PAGE auf die Membran zur Kontrolle des vollständigen, erfolgreichen Transfers immer die Anfärbung mit Ponceau S. Dabei waren jeweils nur die transferierten Proteine nachweisbar.
Nach Entwicklung der Blots ließen sich dann jedoch sowohl im Serum der Patienten als auch bei den Kontrollen neben gegen die transferierten ribosomalen Proteine gerichteten Antikörperprofilen auch Antikörper gegen weitere Proteine nachweisen, die in der vorgeschalteten Transferkontrolle mit Ponceau S jeweils nicht detektiert worden waren. Bei TP30 waren diese zusätzlichen Proteine keinem S-Protein zuzuordnen und selbiges traf auf die Proteine von TP50 zu, wo neben dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen L-Proteine ebenfalls weitere Signale detektiert wurden.
Die eingehende Betrachtung der Western Blots von TP30 und TP50 mit dem Serum jeweils eines Patienten zeigte dann, dass die meisten dieser zusätzlich detektierten Signale den Proteinen der jeweils anderen ribosomalen Untereinheit zugeordnet werden können. So fanden sich z. B. neben Antikörpern gegen L-Proteine in der Fraktion TP50 auch solche gegen einige S-Proteine, die ihrerseits im Western Blot der TP30-Fraktion nachweisbar waren. Selbiges galt auch umgekehrt. Durch Übereinanderlegen der die Signale enthaltenden Filme konnten diese Zuordnungen vorgenommen werden.
Neben der Aufklärung jener oben genannter Signale als gegen ribosomale Proteine gerichteter Antikörper waren auch Antikörper gegen andere, nicht-ribosomale Proteine nachweisbar. Durch ihre Lokalisation in Beziehung zu den gut definierten ribosomalen Proteinen von *E. coli* bzw. *S. flexneri* in der 2-D-PAGE war eine Abschätzung über Größe und isoelektrische Punkte dieser Proteine möglich.