

IV. Ergebnisse

1 p53-Expression

Das p53-Protein war im Nukleus detektierbar. Häufig, insbesondere in den Geweben von Brust und Ovar, war diese nukleäre Färbung von einer zytoplasmatischen Färbung begleitet. Für die Auswertung wurde jedoch ausschließlich die nukleäre Färbung beurteilt.

1.1 Kolonkarzinome

Das normale Kolongewebe sowie die den Kolonkarzinomen benachbarte, nicht transformierte Übergangsmukosa zeigten keine Färbung.

57% (12 von 21) der nichtmucinösen Kolonkarzinome zeigten eine p53-Expression, davon färbten sich drei schwach (14%), 4 mäßig (19%) und fünf stark (24%).

39% (11 von 28) der mucinösen Kolonkarzinome zeigten eine p53-Expression, davon wiesen neun eine schwache (32%) und zwei eine starke Färbung (7%) auf.

Die Färbung war in den meisten untersuchten Schnitten auf den Zellkern beschränkt. Nur in einigen wenigen Präparaten von nichtmucinösen Kolonkarzinomen war eine leichte hellbraune Färbung von Zytoplasma und Stroma zu beobachten.

Der Unterschied in der p53-Expression zwischen mucinösen und nichtmucinösen Kolonkarzinomen ist zwar weniger stark ausgeprägt als in Untersuchungen anderer Autoren¹³⁸, er ist jedoch statistisch signifikant ($p=0.0253$).

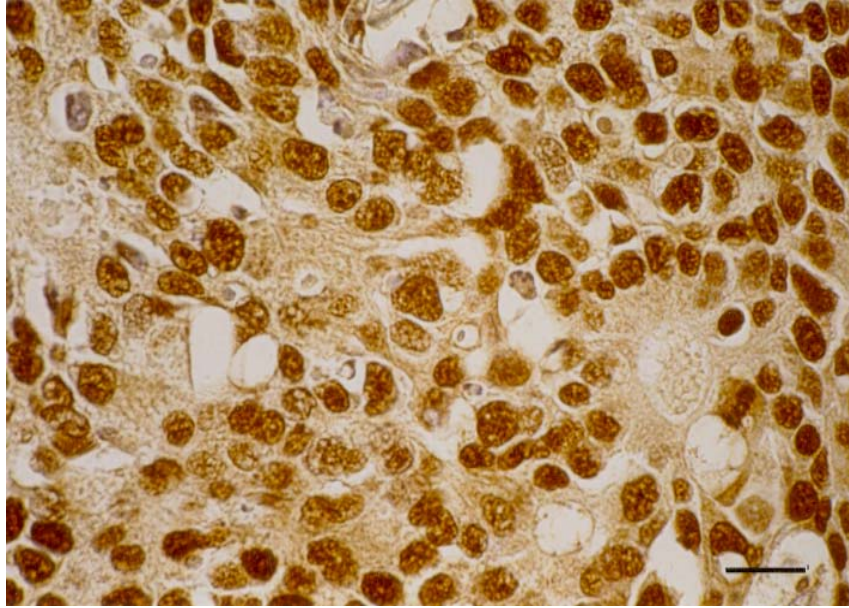


Abb. 1a: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in nichtmucinösem Kolonkarzinom. Zu sehen sind fast ausschließlich Zellen eines nichtmucinösen Kolonkarzinoms die alle eine intensive dunkelbraune Färbung der Zellkerne sowie eine schwache hellbraune Färbung des Zytoplasmas aufweisen. Balken = 25 μ m.

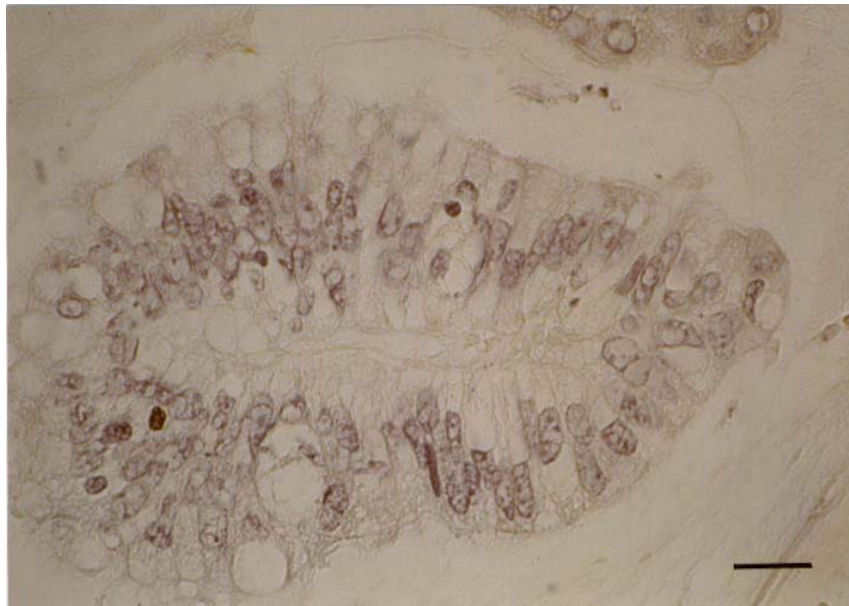


Abb. 1b: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in einem mucinösen Kolonkarzinom. Sichtbar ist ein Verband von Zellen eines mucinösen Kolonkarzinoms, umgeben von einem „See“ extrazellulären sezernierten Mucus. Nahezu alle Tumorzellen haben intrazelluläre mucusgefüllte Sekretionsvakuolen. Weder Zellkerne noch Zytoplasma sind gefärbt. Balken = 25 μ m.

1.2 Mammakarzinome

Das die Mammakarzinome umgebende normale Brustdrüsengewebe und Bindegewebe zeigte in keinem der Fälle eine Färbung.

72% (13 von 18) der nichtmucinösen Brustkarzinome zeigten eine detektierbare p53-Expression, davon zehn eine schwache (56%), zwei eine mittlere (11%) und eines eine starke (5%).

64% (14 von 22) der mucinösen Mammakarzinome wiesen eine p53 Protein-Färbung auf, davon neun eine schwache (41%) und fünf eine mittlere (23%).

Die Färbung war nukleär, in der Hälfte der Schnitte war diese nukleäre Färbung begleitet von einer leichten zytoplasmatischen Färbung.

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der p53-Expression zwischen nichtmucinösen und mucinösen Mammakarzinomen ($p=0.928$).

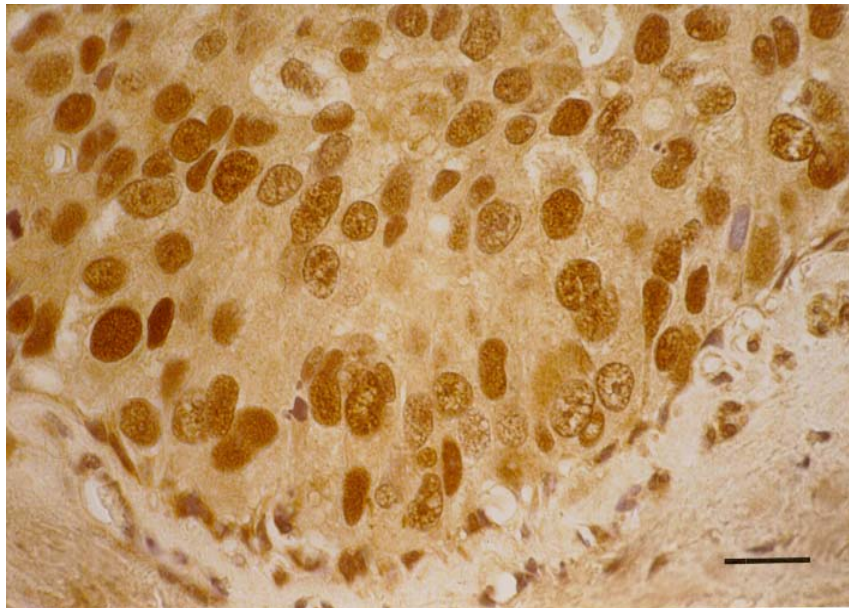


Abb.2a: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in nichtmucinösem Mammakarzinom. Die Abbildung zeigt eine starke nukleäre Färbung aller Tumorzellen des gezeigten Ausschnittes eines nichtmucinösen Mammakarzinoms. Auch das Zytoplasma aller Zellen zeigt eine mäßige homogene Färbung, während das Bindegewebe ungefärbt bleibt. Balken = 25 μm .

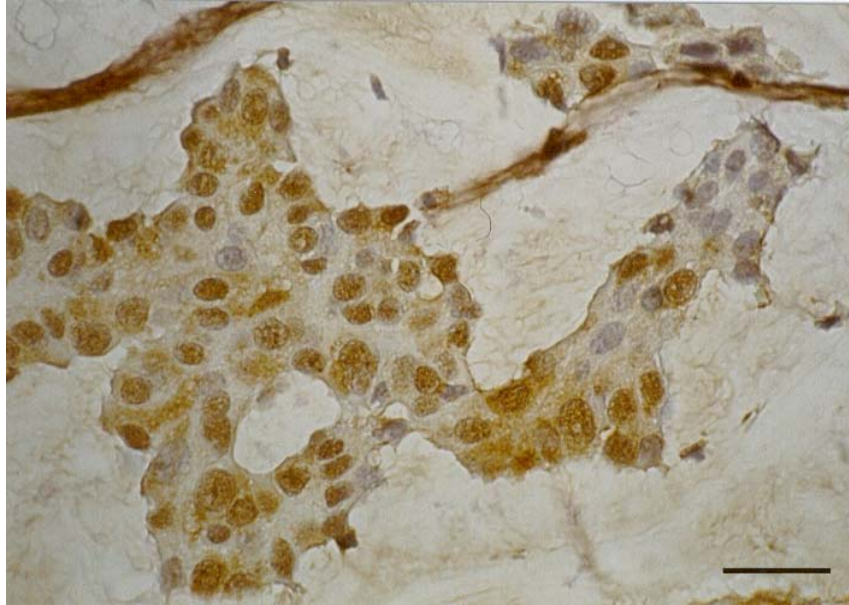


Abb. 2b: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in muzinösem Mammakarzinom. Die Abbildung zeigt den Zellverband eines muzinösen Mammakarzinoms in dem ca. 80% der Zellen eine starke nukleäre Färbung aufweisen. Davon zeigen wiederum etwa die Hälfte auch eine zytoplasmatische Färbung. Balken = 50 µm.

1.3 Ovarialkarzinome

Sowohl das dem Tumor benachbarte normale Ovariepithel als auch das Stroma zeigten keine detektierbare p53-Expression.

69.5% (16 von 23) der nichtmuzinösen Ovarialkarzinome zeigten eine p53-Expression. Von diesen färbten sich sechs stark (26%), drei mittel (13%) und sieben schwach (30.5%).

56% (9 von 16) der muzinösen Ovarialkarzinome zeigten eine p53 Protein-Färbung, davon drei eine mittlere (19%) und sechs eine schwache (37%).

Der Gesamtunterschied in der p53 Überexpression zwischen muzinösen und nichtmuzinösen Ovarialkarzinomen ist nicht signifikant ($p=0.1285$).

Nur in der Kategorie der starken Färbung unterscheiden sich die muzinösen und nichtmuzinösen Ovarialkarzinome signifikant ($p<0.05$).

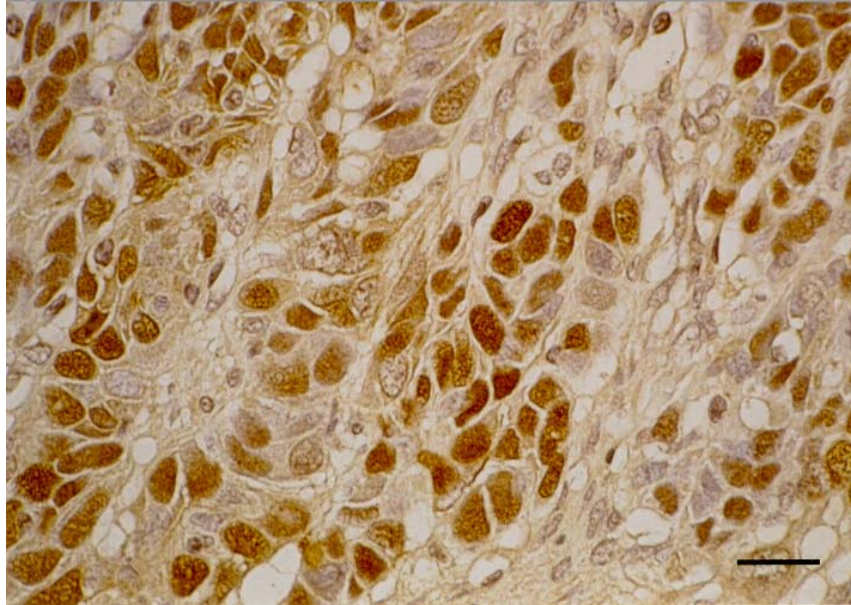


Abb. 3a: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in nichtmuzinösem Ovarialkarzinom. Etwa 70% der das Stroma infiltrierenden Karzinomzellen weisen eine intensive nukleäre Färbung auf. Balken = 25 μ m.

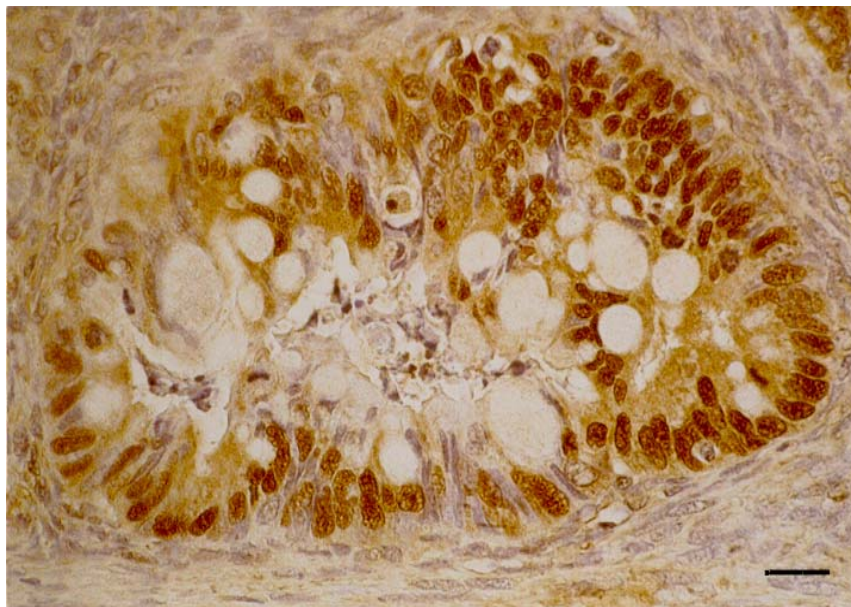


Abb. 3b: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit dem CM-1 Antikörper in muzinösem Ovarialkarzinom. Es zeigen etwa 90% der Tumorzellen eine starke nukleäre und zytoplasmatische Färbung während die umliegenden Stromazellen sich nicht anfärbten. Balken = 25 μ m.

1.4 Pankreaskarzinome

Das an die Karzinome angrenzende normale Pankreasdrüsengewebe zeigte keine detektierbare p53-Expression.

32% (8 von 25) der nichtmuzinösen Pankreaskarzinome zeigten eine p53-Expression. Von diesen färbten sich zwei stark (8%), eines mäßig (4%) und 5 nur schwach (20%).

41% (6 von 14) der muzinösen Pankreaskarzinome wiesen eine p53 Färbung auf. Von diesen eines eine starke (7%) drei eine mittlere (21%) und zwei eine schwache (14%).

Die p53-Expression war in muzinösen Pankreaskarzinomen entgegen der Arbeitshypothese sogar häufiger als in nichtmuzinösen.

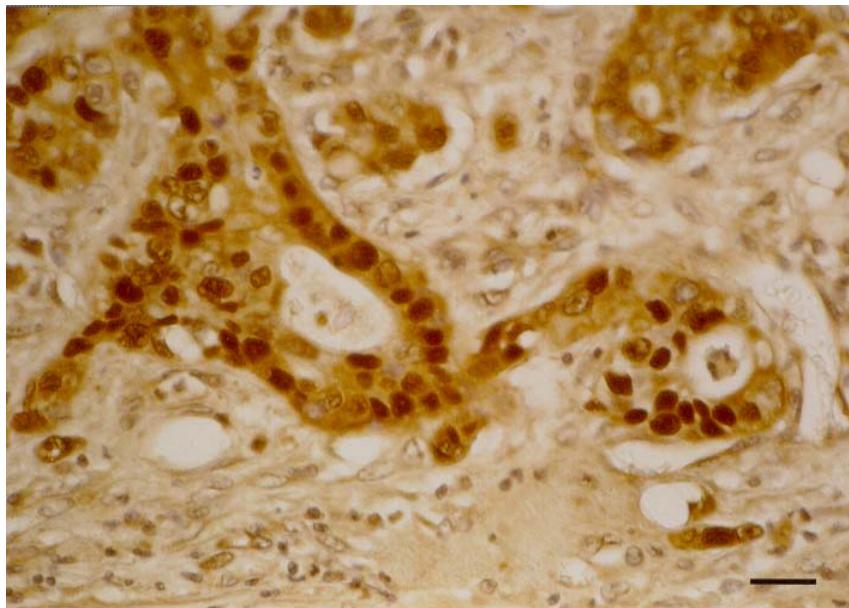


Abb. 4a: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit CM-1 Antikörper in nichtmuzinösem Pankreaskarzinom. Alle Pankreaskarzinomzellen weisen eine sehr intensive Anfärbung der Kerne sowie eine mittelstarke zytoplasmatische Färbung auf. Balken = 25 μ m.

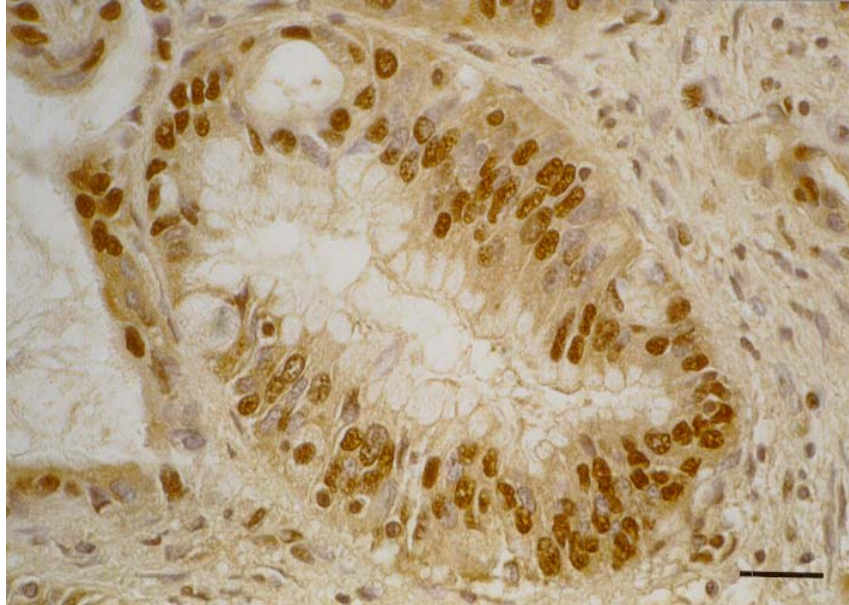


Abb. 4b: Immunhistochemische Färbung von p53 Protein mit CM-1 Antikörper in muzinösem Pankreaskarzinom. Etwa 80% der Tumorzellen sind intensiv gefärbt. Das umliegende Stromagewebe ist nicht gefärbt. Balken = 25 μm .

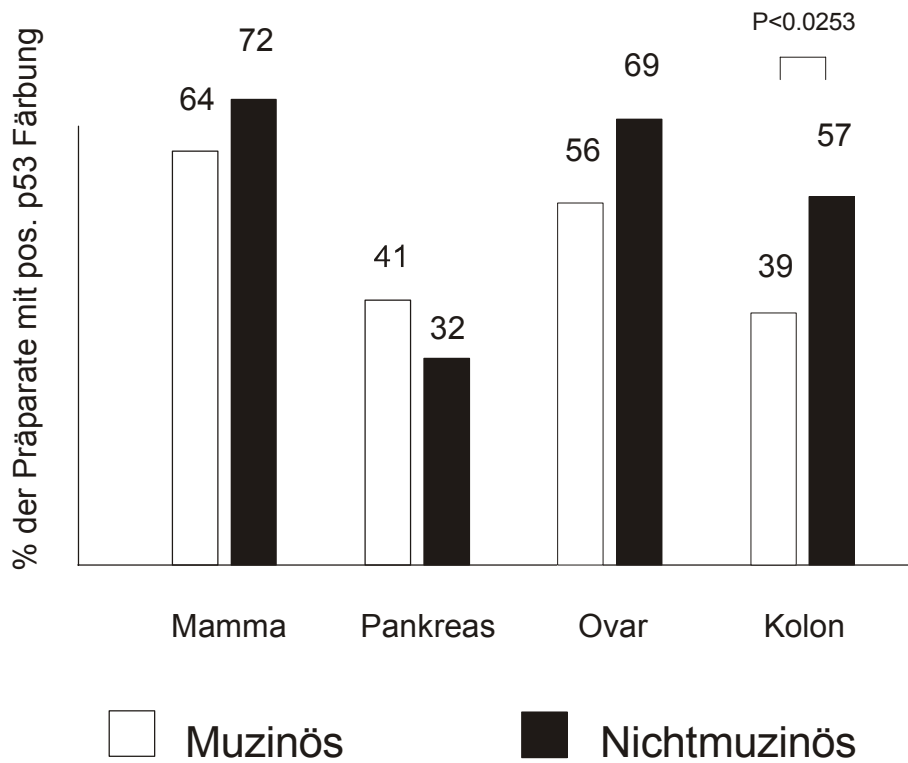


Abb.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion der p53-Expression in muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen von Mamma, Pankreas, Ovar und Kolon mit dem CM-1 Antikörper. In den Karzinomen von Mamma, Ovar und Kolon war die p53-Expression in den nichtmuzinösen Tumoren (schwarze Balken) häufiger als in dem muzinösen detektierbar. Dieser Unterschied war jedoch nur bei den Kolonkarzinomen signifikant ($p < 0.05$).

p53 Expression in Karzinomen

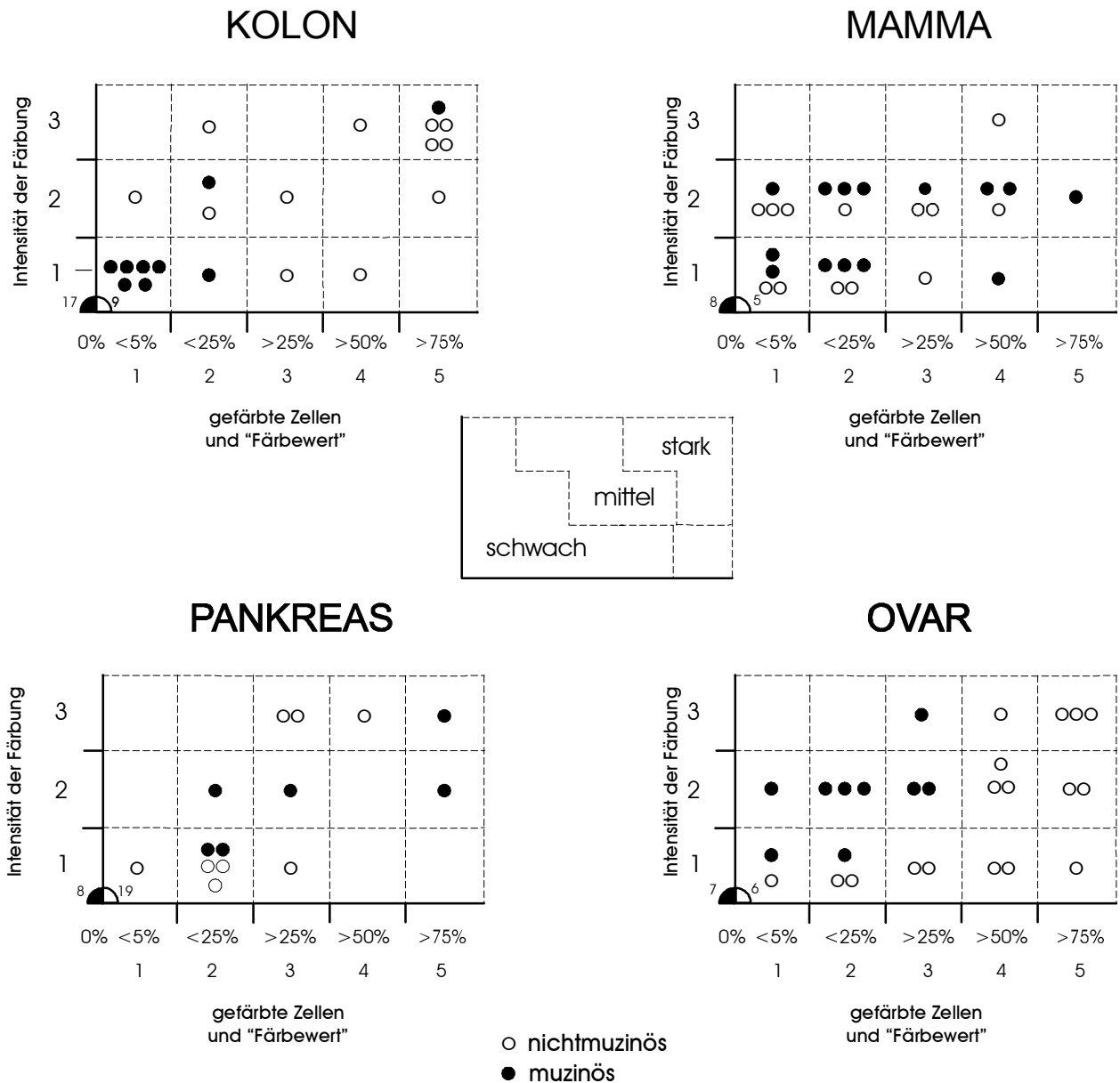


Abb. 6: Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von p53 mit dem CM-1 Antikörper in muzinösen (ausgefüllte Kreise) und nichtmuzinösen Karzinomen (nichtausgefüllte Kreise) der Organe Kolon, Mamma, Pankreas und Ovar. Die Bezeichnung schwache Expression entsprechen dem Produkt aus Intensität und Färbewert von 1-4, mittlere Expression 5-9 und starke Expression 10-15.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von MUC2 in Kolon-, Mamma-, Pankreas- und Ovarkarzinomen zeigt dass nur in der Untergruppe von Kolonkarzinomen einen Unterschied in der p53 Expression zwischen muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen besteht. Die muzinösen Kolonkarzinome zeigten überwiegend keine p53 Expression während der überwiegende Teil der nichtmuzinösen Kolonkarzinome eine p53 Expression aufwies.

überwiegende Teil der nichtmucinösen Kolonkarzinome eine p53-Expression aufwies.

2 Expression von MUC2

Nur in Kolonkarzinompräparaten war MUC2 im Normalgewebe und in der dem Karzinom angrenzenden Übergangsmukosa detektierbar.

Die Färbung von MUC2 stellte sich in den Karzinomen aller vier Organe und in der Übergangsmukosa des Kolon als zytoplasmatische granuläre Färbung dar. Das extrazelluläre Muzin färbte sich nicht. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das extrazelluläre Muzin glykosyliert vorliegt und diese Glykosylierung das 4F1-Epitop des Proteingerüsts für den 4F1-Antikörper unzugänglich macht.

2.1 Kolonkarzinome

In der Übergangsmukosa des Kolon fand sich die beschriebene, physiologische Expression von MUC2⁶⁷, besonders an der Basis der Krypten. Weder das extrazelluläre Muzin, noch der Inhalt der Schleimvakuolen der Becherzellen färbte sich jedoch, sondern die Färbung war, wie in den untersuchten mucinösen Karzinomen, granulär und zytoplasmatisch.

Von 22 untersuchten nichtmucinösen Kolonkarzinomen zeigte keines eine starke, drei eine mittlere (14%) und zwölf eine schwache (55%) MUC2-Expression.

Alle der 27 untersuchten mucinösen Kolonkarzinome zeigten eine MUC2-Expression: zwölf eine starke (45%), neun eine mittlere (33%) und sechs Karzinome eine schwache (22%).

Der Unterschied in der Häufigkeit der MUC2-Expression zwischen den mucinösen und nichtmucinösen Kolonkarzinomen ist hochsignifikant ($p < 0.0001$).

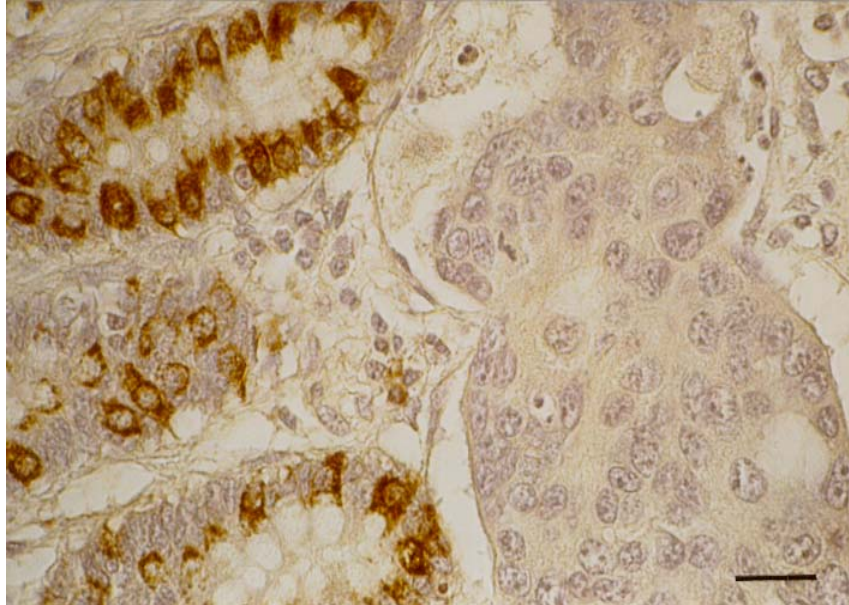


Abb.7a: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem nichtmucinösem Kolonkarzinom. Auf der linken Bildhälfte sind drei Krypten der Übergangsmucosa zu sehen, auf der rechten Bildhälfte Anteile eines nichtmucinösen Kolonkarzinoms. Während fast alle Becherzellen der Übergangsmucosa eine perinukleäre, zytoplasmatische granuläre Färbung mit dem 4F1-Antikörper zeigen, weisen die Karzinomzellen keine MUC2-Expression auf. Balken = 25 μ m.

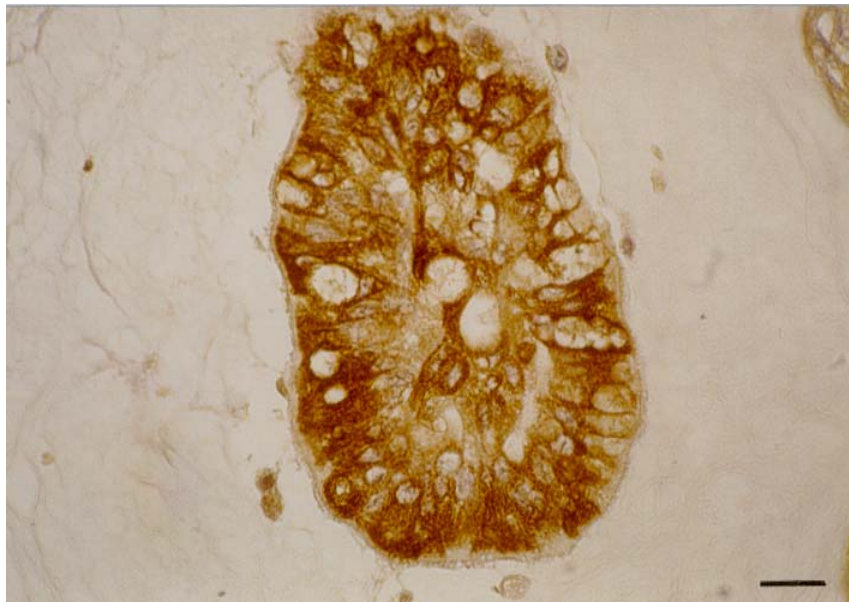


Abb. 7b: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem mucinösem Kolonkarzinom. Die Abbildung zeigt die intensive Färbung aller sichtbaren Zellen des mucinösen Kolonkarzinoms. Die Dichte der gefärbten zytoplasmatischen Granula ist hier deutlich höher als in den Zellen der Übergangsmucosa. Balken = 25 μ m.

2.2 Mammakarzinome

Das an die untersuchten Mammakarzinome angrenzende nichttransformierte Brustdrüsengewebe sowie Stromazellen und Bindegewebe wies keine MUC2-Expression auf.

Keines der 18 untersuchten nichtmuzinösen Mammakarzinome wies eine MUC2-Expression auf.

Von den 22 untersuchten muzinösen Mammakarzinomen zeigten alle eine MUC2-Expression: sieben eine starke (32%), acht eine mittlere (36%) und sieben eine schwache (32%). Der Unterschied in der MUC2-Expression zwischen den muzinösen und nichtmuzinösen Mammakarzinomen ist statistisch hochsignifikant ($p < 0.0001$).

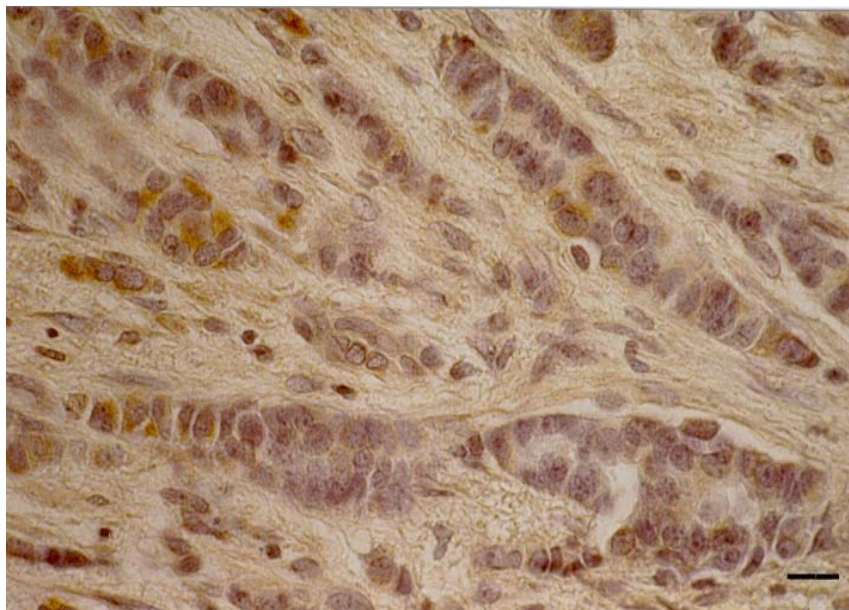


Abb. 8a: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem nichtmuzinösem Mammakarzinom. Stränge von Tumorzellen infiltrieren das Bindegewebe. Weder die Tumorzellen noch das Bindegewebe zeigen eine Anfärbung durch den 4F1-Antikörper. Balken = 25 μm .

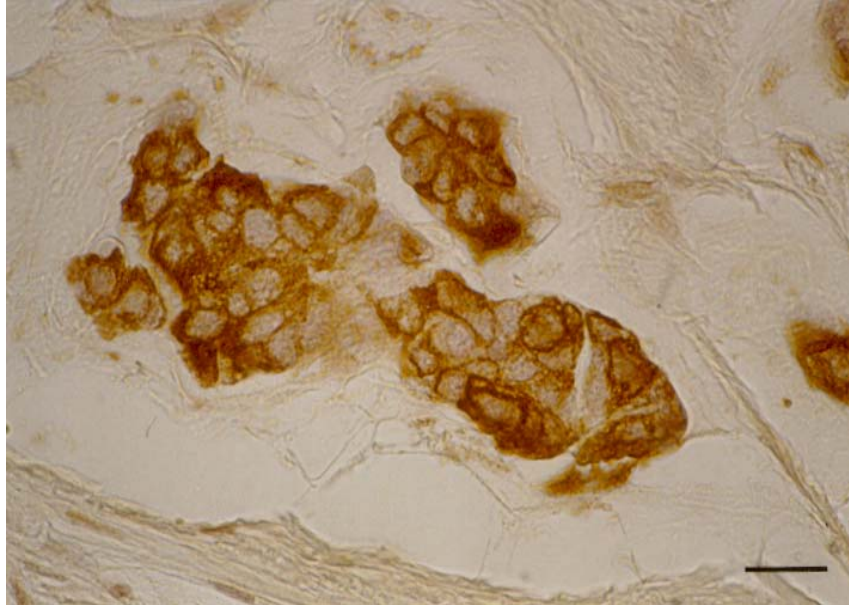


Abb. 8b: Auf der Abbildung sind einzelne Zellkonglomerate eines muzinösen Mammakarzinoms zu sehen inmitten eines „Sees“ aus extrazellulärem Muzin. Alle Tumorzellen auf dem Bild weisen eine intensive gränuläre cytoplasmatische Färbung auf. Tumorzellkerne, extrazellulärer Mucus sowie einzelne Bindegewebszellen bleiben ungefärbt. Balken = 25 µm.

2.3 Ovarialkarzinome

Weder in den nichttransformierten Ovariepithelzellen noch im Stroma der untersuchten Ovarkarzinome war eine MUC2-Expression zu detektieren.

Nur 9% (2 von 23) der untersuchten nichtmuzinösen Ovarialkarzinomen zeigten eine schwache MUC2-Expression, die übrigen wiesen keine MUC2-Expression auf.

Alle 16 untersuchten muzinösen Ovarialkarzinome zeigten eine MUC2-Expression: vier eine starke (25%), acht eine mittlere (50%) und vier eine schwache (25%).

Der Unterschied in der MUC2-Expression zwischen nichtmuzinösen und muzinösen Ovarialkarzinomen ist hochsignifikant ($p < 0.0001$).

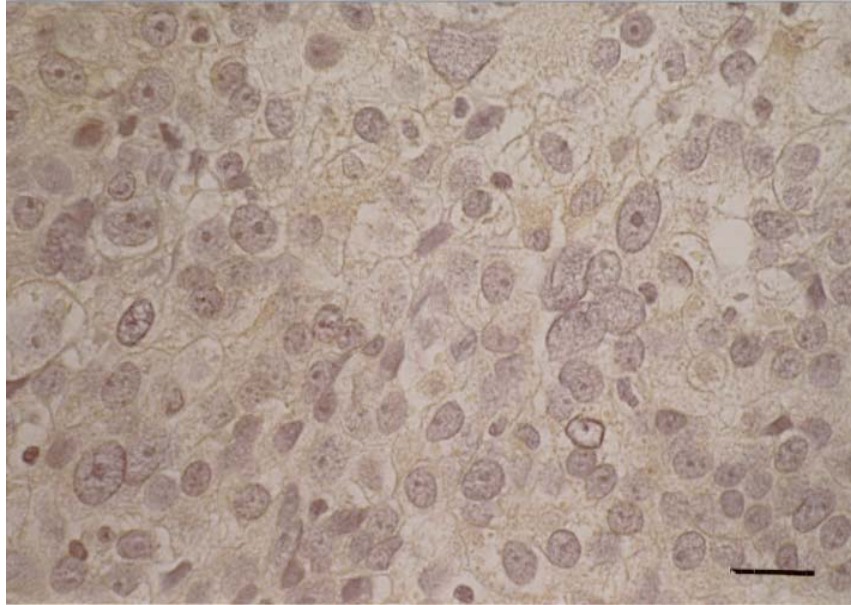


Abb. 9a: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem nichtmucinösen Ovarkarzinom. Es ist keine MUC2-Expression detektierbar. Balken = 25 μ m.

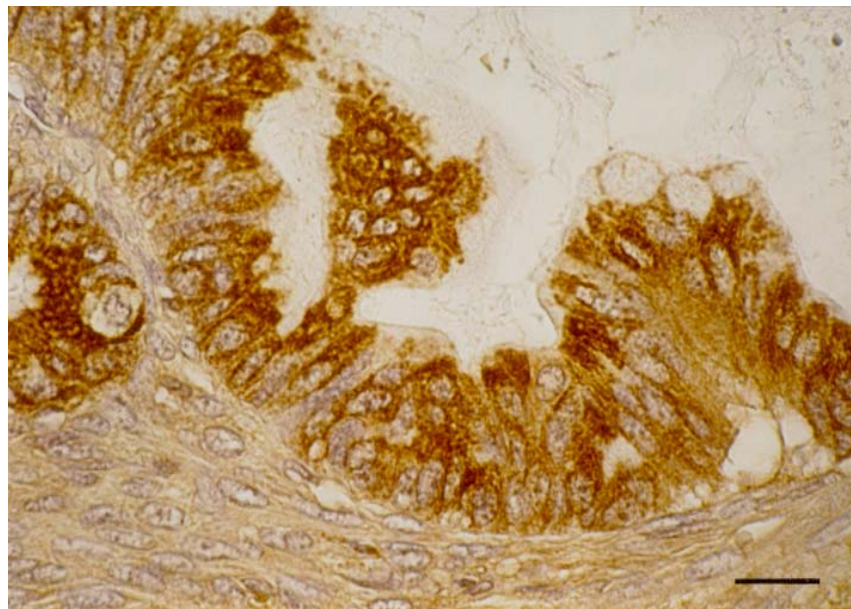


Abb. 9b: Immunhistochemische Färbung von MUC2 in einem mucinösen Ovarkarzinom. Es ist eine intensive granuliert zyttoplasmatische Anfärbung der epithelialen neoplastischen Zellen zu sehen. Der sezernierte, extrazelluläre Mukus bleibt ungefärbt. Balken = 25 μ m.

2.4 Pankreaskarzinome

Eine MUC2-Expression im Pankreasnormalgewebe war immunhistochemisch nicht nachweisbar.

52% (14 von 27) der nichtmucinösen Pankreaskarzinome wiesen eine MUC2-Expression auf: eines eine mittlere (4%) und 13 eine schwache (48%).

Alle 14 untersuchten mucinösen Pankreaskarzinomen zeigten eine MUC2-Expression: drei eine starke (21.5%) drei eine mittlere (21.5%) und acht eine schwache (57%).

Der Unterschied in der MUC2-Expression zwischen mucinösen und nichtmucinösen Pankreaskarzinomen ist statistisch hochsignifikant ($p < 0.0001$).

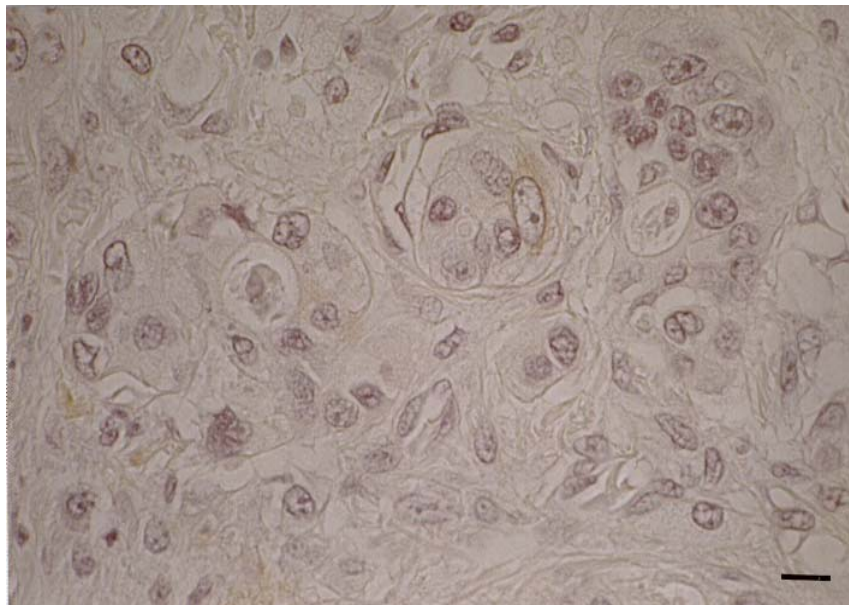


Abb. 10a: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem nichtmucinösen Pankreaskarzinom. Es besteht keine Reaktivität des 4F1-Antikörpers mit den nichtmucinösen Pankreaskarzinomzellen. Balken = 25 μ m.

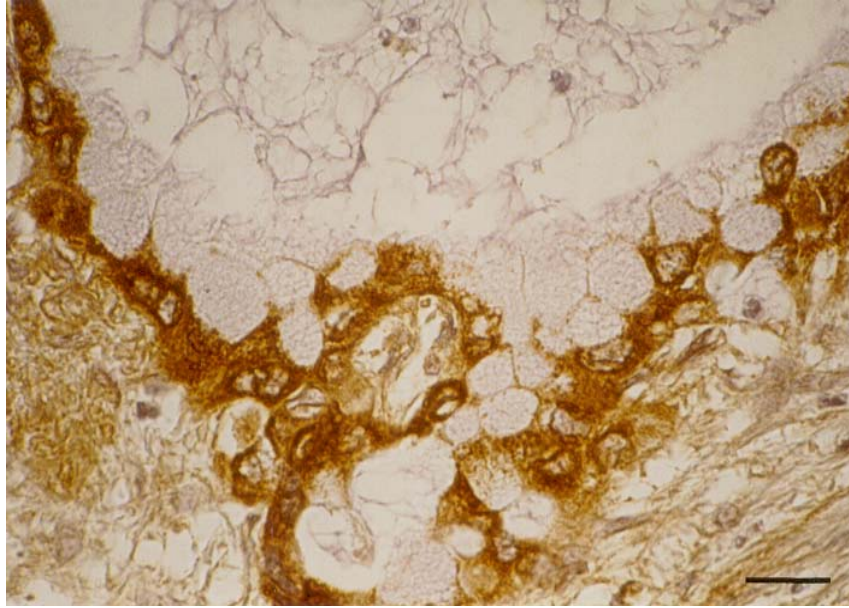
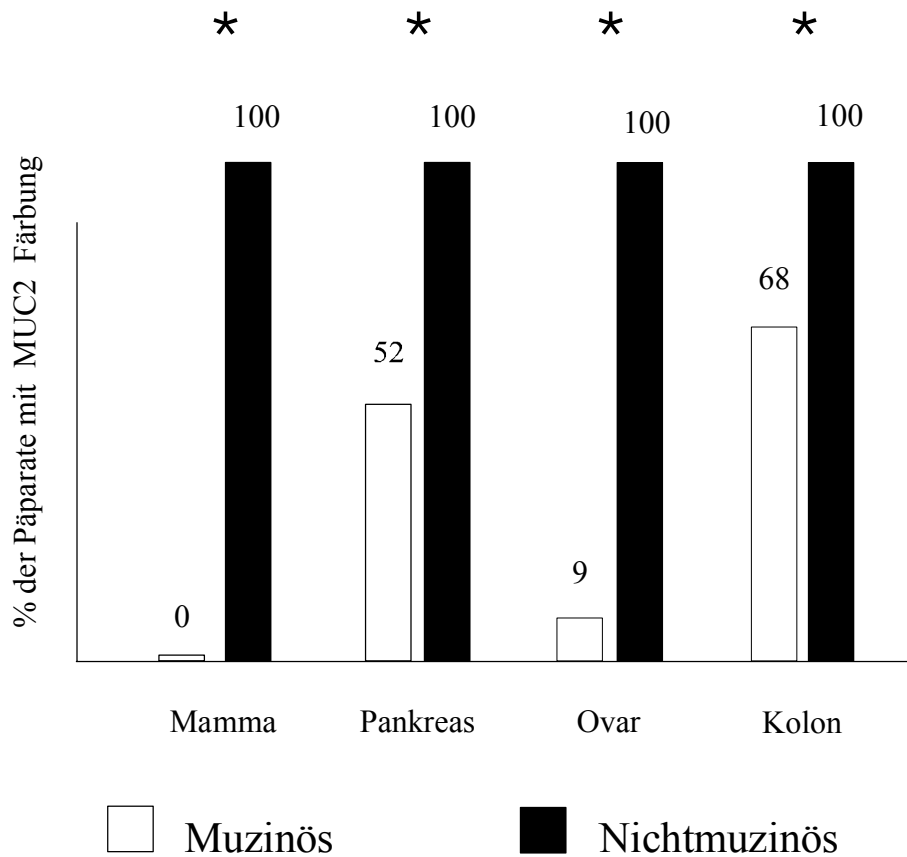


Abb. 10b: Immunhistochemische Färbung von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in einem muzinösen Pankreaskarzinom. Es ist eine intensive granuliert zytoplasmatische Färbung aller Karzinomzellen zu sehen. Extrazellulärer Mukus sowie die intrazellulären Schleimvakuolen bleiben ungefärbt. Balken = 25 μm .



*: $p < 0.0001$

Abb.11: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen von Mamma, Pankreas, Ovar und Kolon. Der Unterschied in der MUC2-Expression zwischen muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen ist allen vier untersuchten Organen statistisch hochsignifikant ($p < 0.0001$).

MUC2-Expression in Karzinomen

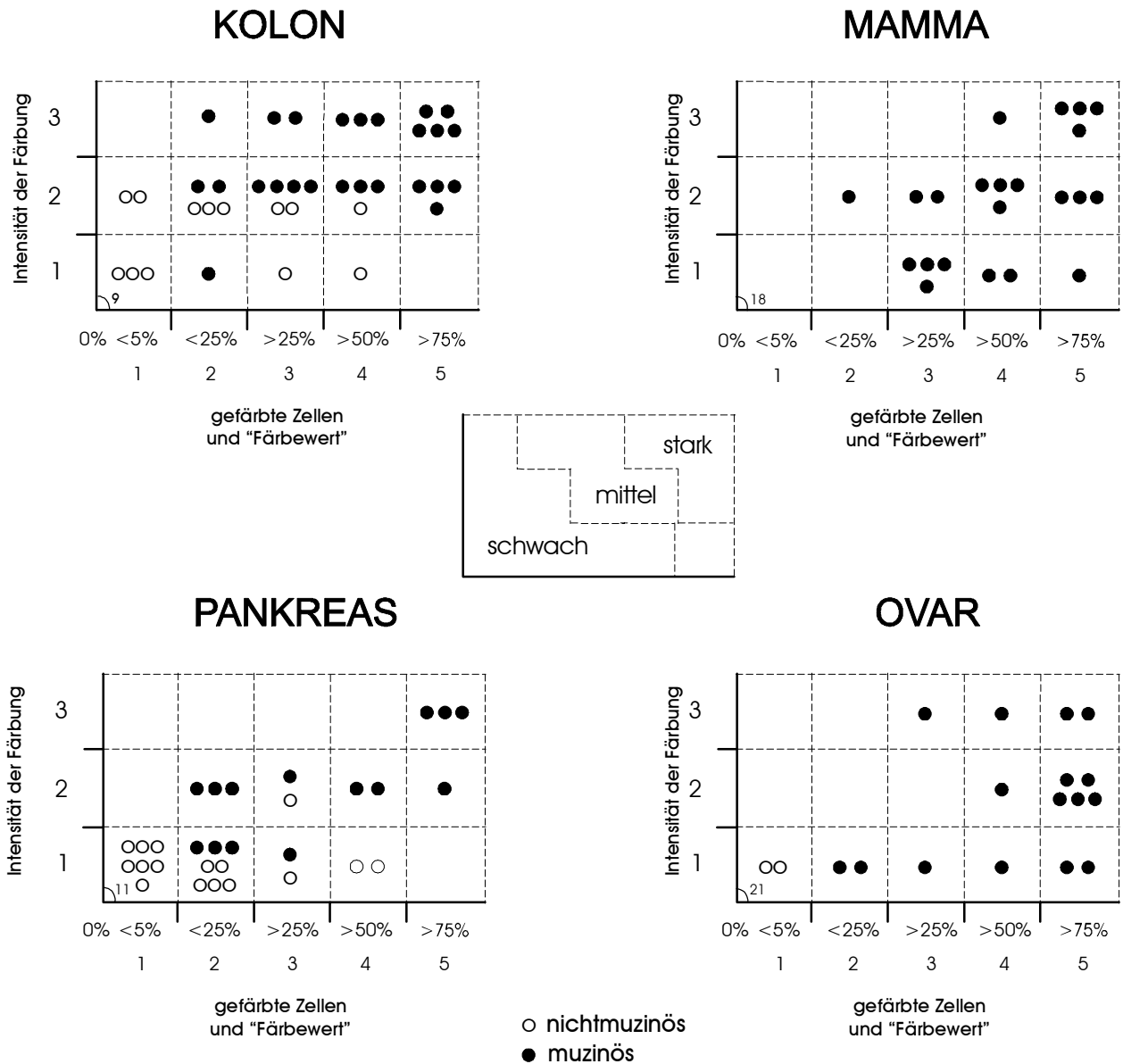


Abb. 12: Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von MUC2 mit dem 4F1-Antikörper in mucinösen (ausgefüllte Kreise) und nichtmucinösen Karzinomen (nichtausgefüllte Kreise) der Organe Kolon, Mamma, Pankreas und Ovar. Die Bezeichnung schwache Expression entsprechen dem Produkt aus Intensität und Färbewert von 1-4, mittlere Expression 5-9 und starke Expression 10-15.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von MUC2 in Kolon-, Mamma-, Pankreas- und Ovarkarzinomen zeigt den Unterschied in der MUC2-Expression zwischen mucinösen und nichtmucinösen Karzinomen. Die mucinösen Karzinome aller vier untersuchten Organe wiesen fast alle eine starke und mittlere MUC2-Expression auf, während die nichtmucinösen Karzinome fast

ausnahmslos eine schwache oder keine MUC2-Expression zeigten. Nur drei nichtmuzinöse Kolonkarzinome und ein Pankreaskarzinom zeigten eine mehr als schwache MUC2-Expression.

3 Korrelation zwischen der Expression der Antigene p53 und MUC2

Es fand sich keine Korrelation zwischen einer starken MUC2-Expression und schwacher oder fehlender p53-Detektion. (Spearman's Korrelationskoeffizient: $p > 0.1$)

4 Humorale Immunantwort auf MUC2 in Patienten mit muzinösen Karzinomen

4.1 Untersuchung des Serums des Patienten BRM mit smuc41-Protein, erhalten aus dem pQE-Expressionssystem

Für die Untersuchung der humoralen Immunantwort auf MUC2 wurde ein rekombinantes MUC2 Fragment (smuc41-Protein) als Antigen verwendet. Gereinigtes smuc41-Protein und gereinigtes Bakterienlysat von Bakterien mit dem smuc41-Insert, das im falschen Leserahmen einkloniert war (*frameshift*, zur Kontrolle der unspezifischen Reaktion im Western Blot) wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Western-Blot wurden diese Proben parallel mit dem Serum BRM von einem Patienten mit einem muzinösen Kolonkarzinom und mit BRM-Serum, das mit Bakterienlysat präadsorbiert worden war, detektiert. Als Kontrolle der spezifischen Reaktion von Antikörpern mit dem exprimierten Protein wurde smuc41 mit dem α -His Antikörper detektiert.

Das nicht präadsorbierte Serum BRM reagierte sowohl mit smuc41 als auch mit der *frameshift*-Probe. Beide Proben lieferten nach Reaktion mit dem BRM-Serum eine Bande auf der Höhe der Bande von smuc41, detektiert mit α -His-Antikörper. Nach Präadsorption des Patientenserums mit Bakterienlysat verschwindet die Bande bei *frameshift*, die bei smuc41 jedoch nicht. Die Bande der *frameshift*-Probe mit dem nicht-präadsorbierten BRM-Serum entsprach also vermutlich einer Reaktion von Serumantikörpern mit bakteriellen Antigenen die zufällig die gleichen Wanderungseigenschaften in der Gelelektrophorese besitzen wie smuc41. Demgegenüber wird das smuc41-Protein auch nach Präadsorption von dem BRM-Patientenserum detektiert. Dies ist ein Hinweis auf eine Reaktion von MUC2-Antikörpern mit smuc41 und nicht die Reaktion von Serumantikörpern mit bakteriellen Antigenen.

Da das BRM-Serum mit smuc41 jedoch auch noch nach Präadsorption eine Vielzahl von Banden detektierte, davon zwei auf Höhe der smuc41 Bande, ließ sich nicht eindeutig entscheiden, ob die detektierten Banden auf einer Reaktion von spezifischen anti-smuc41 Antikörpern mit smuc41 Protein beruhen. Sie könnten auch auf Reaktion der humanen IgG mit bakteriellen Antigenen, die zufällig das Wanderungsverhalten von smuc41 hatten, zurückzuführen sein. Aus diesem Grund

wurde ein anderes Expressionssystem gewählt, das eine höhere Ausbeute und eine bessere Reinigung des exprimierten smuc41-Proteins ermöglicht.

Detektion von smuc41 mit dem Serum BRM

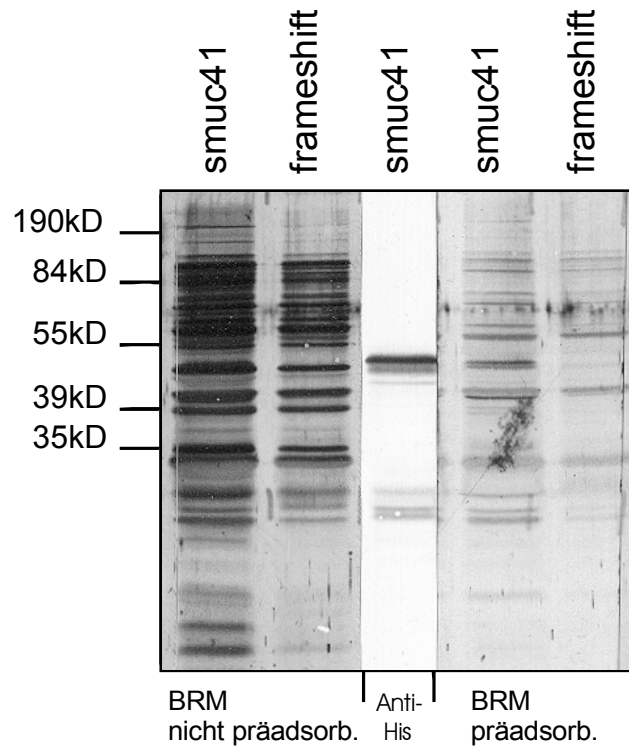


Abb. 13: Detektion von smuc41 Protein und gereinigtem Bakterienlysat von smuc41 frameshift mit dem BRM-Patientenserum Western-Blot. Links die Detektion mit nicht präadsorbiertem BRM-Serum, rechts mit präadsorbiertem BRM-Serum. In der Mitte Detektion von smuc41-Protein mit dem anti-His Antikörper zur Kontrolle der spezifischen smuc41-Anti-His-Antikörper Reaktion und Bestimmung der Lage der Banden.

4.2 Untersuchung von Patientenseren mit smuc41-Protein, erhalten aus dem pET-Expressionssystem

Da die Untersuchung des Patientenseren BRM (4.1) mit smuc41-Protein aus dem His-*tag* (pQE) Proteinexpressionssystem viele Banden ergab neben der erwarteten 54kD Bande, und dies möglicherweise auf eine unzureichende Proteinreinigung zurückzuführen ist, wurde für die Untersuchung weiterer Patientenseren das T7-*tag* (pET) Expressionssystem gewählt, das eine höhere Ausbeute und reineres Protein versprach.

4.2.1 Reinigung von smuc41 mit pET-Expressionssystem

Bakterien wurden mit dem Plasmid smuc41 transformiert. Nach Induktion der Proteinsynthese wurden sie lysiert, abzentrifugiert und der Überstand mit dem exprimierten Protein zur Reinigung auf eine Immunaффinitätssäule gegeben. Nach Durchlaufen des Überstands wurde ungebundenes Protein von der Säule gewaschen und danach das gebundene smuc41-Protein in drei Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden im Western Blot auf smuc41 getestet. (Abb. 14)

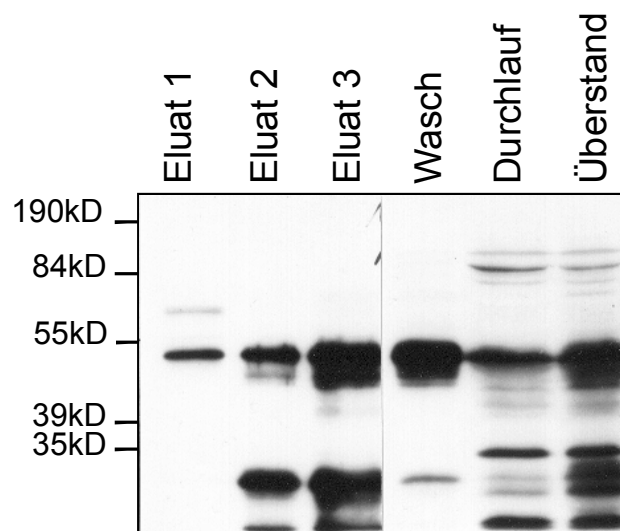


Abb. 14: Detektion von smuc41-Protein mit dem 4F1 Antikörper in den Fraktionen 1-3 des Eluats, Waschlösung, Durchlauf und Überstand nach Bakterienlyse aus der Herstellung von rekombinantem smuc41 mit dem pET-Expressionssystem und Reinigung über Immunaффinitätssäule.

Der Western Blot zeigt Überstand, Durchlauf, Waschlösung und Fraktionen 1-3 der Eluate detektiert mit 4F1. Alle getesteten Proben liefern eine intensive Bande auf der Höhe von 54 kD, dem Molekulargewicht von smuc41. Die Intensität der Bande bei 54 kD nimmt von Eluat 1 bis 3 zu. Die Waschlösung weist offensichtlich die gleiche smuc41 Proteinmenge auf wie die dritte Eluatfraktion, daher wurde die Waschlösung aufbewahrt und erneut über die Säule gereinigt.

4.2.2 Untersuchung der Patientenserum KRA, LES, BRU, POT und GEI

Das wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben gereinigte smuc41-Peptid wurde in einem Western Blot mit fünf verschiedenen Tumoreren und als Kontrolle der spezifischen Reaktion von Antikörpern mit dem gereinigten Protein mit dem 4F1-Antikörper detektiert. Auf eine Präadsorption der untersuchten Seren mit Bakterienlysate wurde wegen der saubereren Proteinaufbereitung im pET-Expressionssystem verzichtet.

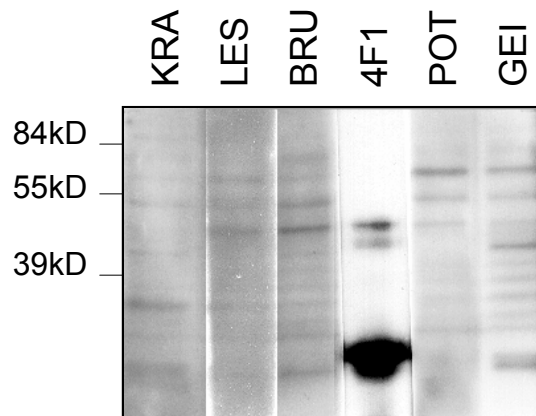


Abb. 15: Untersuchung von Seren der Patienten KRA, LES, BRU, POT und GEI mit smuc41-Protein als Antigen. Auf Bahn 4 wurde smuc41-Protein mit 4F1 als Antikörper zur Bestimmung der Lage der Bande detektiert.

Auf dem mit dem 4F1-Antikörper detektierten Blotstreifen sind drei Hauptbanden sichtbar, wovon die oberste bei 55 kD in etwa der Molekülgröße von smuc41 entspricht. Auf der gleichen Höhe finden sich auch in den vier mit den Seren LES,

BRU, POT und GEI inkubierten Blotstreifen Banden, die deutlichste bei dem BRU-Serum. In dem mit dem Serum KRA inkubierten Blotstreifen findet sich keine Bande auf der entsprechenden Höhe. Neben den Banden auf der Höhe von dem Molekulargewicht von 55 kD detektierten die Seren jedoch eine Vielzahl von Antigenen unterschiedlichen Molekulargewichts.

Ob den Banden bei 55 kD eine spezifische Reaktion von humanen Antikörpern mit dem smuc41-Peptid oder eine Reaktion der Antikörper gegen bakterielle Antigene zugrunde liegt war nicht klar. Um das zu klären, wurde auf einen Blot neben gereinigtem smuc41-Peptid auch Lysat aus Bakterien, die kein smuc41 exprimierten, aufgebracht.

4.2.3 Untersuchung der Seren der Patienten LES, POT und BRM

Als Kontrolle der Reaktion von Antikörpern aus Patientenserum mit bakteriellen Antigenen wurde Bakterienlysat von Bakterien, die nicht mit dem Plasmid smuc41 transformiert worden waren, hergestellt. Diese Bakterien waren parallel mit IPTG behandelt, und das Lysat über die Immunaффinitätssäule-Säule gereinigt worden. Die so gewonnenen Proben von nicht mit smuc41 transformierten Bakterien wurden in einem Western Blot auf Bahn 1-4 aufgetragen. Auf Bahn 1-3 wurden diese Proben mit den Patientenseren LES, POT und BRM detektiert, auf Bahn 4 mit dem 4F1-Antikörper.

Auf Bahn 5-7 des Western Blots wurde smuc41-Protein aufgetragen. Bahn 5 wurde mit dem 4F1 Antikörper inkubiert, Bahn 6 und 7 mit den Seren der Patienten POT und BRM.

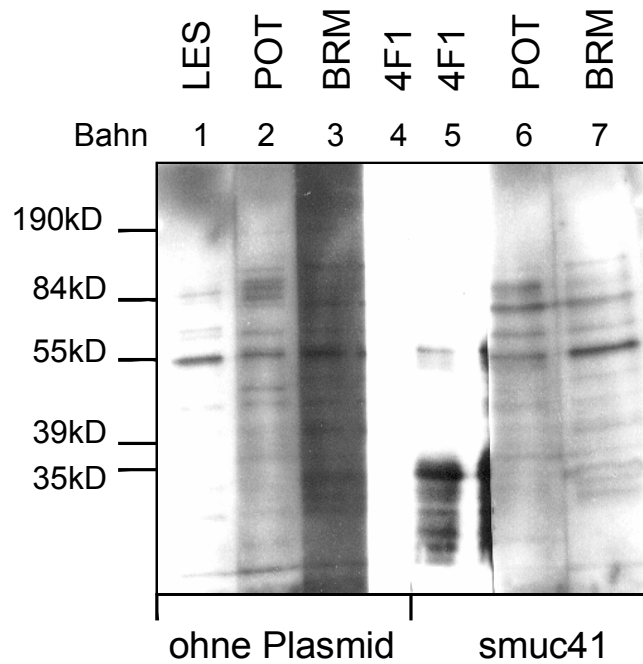


Abb. 16: Untersuchung der Seren der Patienten LES, POT und BRM mit smuc41-Peptid als Antigen (Bahn 6,7) und Proben aus Bakterien ohne Plasmid als Antigen (Bahn 1-3) im Western Blot. Die Detektion beider Proben mit dem 4F1 Antikörper (Bahn 4,5) diente der Bestimmung der Lage der Peptidbande.

Die Seren POT und BRM detektierten beide eine Bande bei 55 kD (Bahn 6 und 7). Die Bahn 6, die mit dem POT-Serum inkubiert wurde, wurde jedoch zerschnitten, und ein Teil mit dem 4F1-Antikörper inkubiert. Dies erlaubt einen unmittelbaren Höhenvergleich der Banden in Bahn 5 und 6 und zeigt, dass sie sich nicht exakt auf der gleichen Höhe befinden. Das Säuleneluat aus Bakterien ohne Plasmid zeigt bei Detektion mit den Seren LES, POT und BRM (Bahnen 1,2 und 3) ebenfalls eine Bande bei 55 kD, während der 4F1-Antikörper nicht reagiert (Bahn 4). Die Tatsache, dass der 4F1-Antikörper nicht mit der Proteinpräparation aus Bakterien ohne Plasmid reagiert, zeigt, dass sich in dieser Probe keine detektierbare Menge an smuc41-Protein, z.B. durch Kontamination, befand.

Sowohl die Differenz im Molekulargewicht zwischen den Banden detektiert mit 4F1 und Patientenserum, als auch das Vorhandensein der gleichen Banden bei den Proben aus Bakterien ohne Plasmid zeigen, dass es sich bei der 55 kD-Bande der Seren POT und BRM nicht um eine Reaktion von Serumantikörpern mit smuc41-

Protein handelt, sondern wahrscheinlich um eine Reaktion von humanen Antikörpern gegen bakterielle Antigene mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kD.