



p53-Autoantikörper ELISA

Kat.-Nr. DIA 0302 E (2. Generation)

Der Elisa-Kit auf einen Blick:

- § höhere Spezifität durch den Einsatz von hochaufgereinigtem, rekombinatem p53-Protein
- § einfachere Durchführung durch gebrauchsfertige Reagenzien
- § quantitative Bestimmung des Antikörpertiters (Follow-up) mit Angabe in Units
- § einfache Auswertung der ELISA-Ergebnisse
- § hohe Übereinstimmung von Doppelwerten
- § hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
- § sehr gute Übereinstimmung mit Western Blot-Ergebnissen

1. Einleitung

Das p53-Tumorsuppressorgen ist von besonderem Interesse für die onkologische Diagnostik, da in ca. 60% aller Tumoren Mutationen in diesem Gen auftreten (1). Die häufigsten genetischen Aberrationen stellen dabei Punktmutationen dar (2,3). Diese Mutationen haben eine p53-Proteinakkumulation innerhalb der Zelle zur Folge. Mutationen im p53-Gen können sehr früh bei der Karzinogenese nachgewiesen werden.

In einem nicht endgültig geklärten Mechanismus kann es zu einer Immunreaktion kommen, die zur Bildung von p53-Autoantikörpern führt. Zahlreiche Studien beschreiben p53-Autoantikörper im Serum von verschiedensten Tumorpatienten (4-14) bei Krankheiten wie beispielsweise Darmtumoren, Ovarialtumoren, Mundhöhlenkarzinomen, Tumoren im Hals-Kopf-Bereich, Lungentumoren und Leberzellkarzinomen. Durchschnittlich entwickelt einer von vier Patienten mit solch einem diagnostizierten Karzinom p53 Autoantikörper. Der Nachweis von p53-Autoantikörpern gilt als spezifischer Malignitätsmarker und ist verbunden mit einer schlechteren Prognose (7). Häufig korrelieren p53-Autoantikörper mit einer kürzeren Überlebensrate und einem höheren Risiko für Rezidive. Bei malignen Erkrankungen wie beim Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Leukämien oder dem malignen Melanom werden p53 Autoantikörper weniger häufig beobachtet und sind von geringerem klinischen Wert (5).

p53 Autoantikörper sind nicht spezifisch für eine bestimmte Krebserkrankung. Da diese Antikörper in Patienten mit nicht malignen Erkrankungen (s.u.) nur sehr selten beobachtet werden, ist die Spezifität dieses Markers höher wie die vieler anderer Tumormarker.

In seltenen Fällen lassen sich auch bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Lupus erythematodes, Morbus Wegener, Morbus Basedow, p53-Autoantikörper nachweisen, wobei hier lediglich sehr niedrige Serum-Autoantikörper-Titer auftreten (16). In einer quantitativen Studie zeigten alle p53 Autoantikörper positiven Autoimmunpatienten einen sehr geringen Antikörpertiter, der sich in einem Bereich knapp über dem cut-off Wert bewegte (17). Dieser bemerkenswerte Unterschied im Antikörpertiter verdeutlicht die Notwendigkeit einer Quantifizierung des p53 Autoantikörpertiters. Allerdings sollte immer dann, wenn p53 Autoantikörper nachgewiesen werden, die Möglichkeit einer klinisch unauffälligen Krebserkrankung in Betracht gezogen werden.

Der p53-Autoantikörper-Status kann wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf einzelner Patienten liefern, denn p53-Autoantikörper wurden häufiger bei Patienten nachgewiesen, die nach einer Tumorbehandlung oder einer Tumoresektion ein Rezidiv entwickelten.

Veränderungen des p53 Autoantikörpertiters können mit dem Krankheitsverlauf der Tumorpatienten korrelieren. Bei 23% (53/229) der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden p53 Autoantikörper nachgewiesen. Der Antikörpertiter variierte hierbei zwischen 300 und 500.000 willkürlich gewählten Einheiten. In Verlaufsstudien zeigte sich, daß Konzentrationsänderungen der p53 Autoantikörper den Krankheitsverlauf widerspiegeln (8). Ähnlich zeigten 24% von Ovarialkarzinom-Patienten (41/174) Antikörpertiter, die zwischen einigen hundert und 1.000.000 Units variierten. Auch hier wurden Schwankungen des Antikörpertiters während des Krankheitsverlaufs beobachtet (9). In einer von Vogl et al. durchgeführten Studie (10) war der p53 Autoantikörper von hoher Spezifität bezüglich der Malignität bei Patienten mit Ovarial-Karzinom. Hohe Antikörpertiter korrelierten mit einer schlechten Prognose.

Ein schnellen und spezifischen Abfall des p53 Autoantikörpertiters wurde von Zalzman und Mitarbeitern bei Lungenkrebspatienten beobachtet, die mittels Chemotherapie erfolgreich behandelt wurden (11). Ähnlich beschreiben Takeda und Kollegen eine signifikante Korrelation zwischen der erfolgreichen Tumor Resektion und dem postoperativen Verschwinden von p53 Autoantikörper bei Darmkrebspatienten (12).

Hauptindikation zur Bestimmung von p53 Autoantikörpern ist die Bestätigung klinischer Daten bezüglich eines Tumorverdachtes und zusätzliche Informationen zum Krankheitsverlauf des Tumorpatienten. Eine postoperative Abnahme des Antikörpertiters kann eine komplette Tumor-Resektion und erfolgreiche (nachfolgende) Chemotherapie anzeigen. In Fällen, in denen etablierte Tumormarker eine geringe Sensitivität besitzen (wie beispielsweise CEA in frühen Stadien maligner Darmtumoren), liefert der p53 Autoantikörper, der unabhängig von CEA ist, zusätzliche Daten. Die Kombination der Tumormarker CEA und p53 Autoantikörper erhöht daher signifikant die Sensitivität des Patientenmonitorings bei Darmkrebserkrankungen in frühen Stadien (16).

Der p53 Autoantikörper ist zum Monitoring von Patienten geeignet, die unter einer Krankheit leiden, die sich zu einer Darmkrebserkrankung weiterentwickeln kann (wie z.B. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa).

Beim Einsatz von Sonographie-Techniken zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen, die eine relativ hohe Sensitivität bei gleichzeitig niedriger Spezifität besitzen, kann der p53 Autoantikörper als Marker die diagnostische Spezifität verbessern (10).

Rohayem et al. verglichen die Fähigkeit dreier auf dem Markt befindlicher p53 Autoantikörper ELISA bezüglich ihrer diagnostischen Zuverlässigkeit. Die zuverlässigste Unterscheidung zwischen zwei Populationen (72 Tumorpatienten und 72 gesunden Blutspendern) gelang mit dem dianova ELISA wobei signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Systemen beobachtet wurden (15).

Mit dem vorliegenden p53-Autoantikörper-ELISA von dianova GmbH kann auf eindeutige Art und Weise der p53-Autoantikörper-Status im Serum von Tumorpatienten bestimmt werden, außerdem erleichtert die quantitative Bestimmung des Seruntiters die Beurteilung von seropositiven Patienten im Follow-Up. Dies bietet völlig neue Möglichkeiten zur Untersuchung dieses Markers in Forschung und Klinik.

2. Messprinzip

Sandwich-ELISA mit Festphase-gekoppeltem, rekombinantem p53-Protein, das die anti-p53-Autoantikörper aus der Serumprobe bindet; der Nachweis erfolgt über ein Peroxidase-konjugiertes Ziege anti-Human IgG als Detektor und anschließende Messung einer Peroxidase-bedingten Farbstoffumsetzung.

3. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- § Mikropipette für 0,5 - 10µl und 50 - 200µl Volumina.
- § Multipipette oder 8-Kanal-Pipette für 50µl-, 100µl- und 200µl Volumina.
- § Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (auch manuelles Waschen möglich).
- § Photometer für Mikrotiterplatten.

4. Packungsinhalt

Alle Reagenzien sind in ungeöffnetem Zustand bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Mikrotiterplatte

12 Streifen-Module à 8 Nöpfchen ('Wells'), beschichtet mit Festphase-gebundenem, gereinigtem, rekombinantem p53-Protein.

Klammer

Zum Verschließen der Alufolie.

Reagenzientrog

Zum Pipettieren mit Mehrkanalpipette

Kalibrator

Gebrauchsfertige Lösung (2 ml) von Humanserum mit geprüfter anti-p53-Autoantikörper-Konzentration.

Negativ-Kontrolle

Gebrauchsfertige Lösung (1 ml) von Humanserum ohne p53-Autoantikörper.

Proben-Verdünnungspuffer

Lyophilisat (6 Flaschen) einer Proteinmatrix mit 0,05% Natrium-Azid zur Verdünnung der Proben. Das Lyophilisat wird mit jeweils 12 ml dest. Wasser rekonstituiert.

Detektor-Antikörper

Gebrauchsfertige Lösung (12 ml) eines anti-Human-IgG Antikörpers (Peroxidase-Konjugat) in einer Proteinmatrix.

Substratlösung

Gebrauchsfertige TMB-Lösung (12 ml) für den Peroxidase-Nachweis, lichtempfindlich.

[Xn gesundheitsschädlich, enthält 3,3,5,5,-Tetramethylbenzidin; R: 10-23/25-36/37/38; S: 7-16-24-45].

Stopplösung

2 N HCl (7,5 ml)

[C korrosiv, enthält Hydrochlorid; R: 34-36-37; S: 26-45].

Waschpuffer

Puffer (Konzentrat, 3 Flaschen à 15 ml). Gebrauchslösung: 15 ml Konzentrat + 285 ml dest. Wasser.

5. Aufarbeitung der Proben

Das Serum wird nach Koagulation der Blutproben durch Zentrifugation gewonnen. Die Serumproben sollten höchstens 24 h bei 2-8 °C gelagert werden; zur längeren Aufbewahrung empfiehlt sich die Lagerung geeigneter Aliquots bei -20 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Zur Messung des anti-p53-Antikörper-Gehalts im ELISA ist eine 1:100-Verdünnung der Proben in Proben-Verdünnungspuffer notwendig (z.B. 5 µl Serum + 495 µl Puffer).

6. Testdurchführung (Kurzfassung)

Eine genauere Anleitung und Anweisungen zur Auswertung finden Sie, in der dem Produkt beiliegenden Beschreibung.

Vorgang	Inkubation
1. Herstellung der Waschlösung 15 ml Konzentrat + 285 ml dest. Wasser	
2. Herstellung des Proben-Verdünnungspuffers Zugabe von 12 ml dest. Wasser pro Flasche	
3. Verdünnung der Serumproben 1 : 100 mit Proben-Verdünnungspuffer	
4. Hydratisierung der benötigten Streifen (Einpipettieren von 200 µl/'Well' Waschlösung, 3 Minuten stehenlassen, dekantieren)	
5. Inkubation mit 100 µl/'Well' Kalibrator , Neagativ-Kontrolle , bzw. vorverdünnte Proben (Empfehlung: jeweils Doppelwertansätze)	60 Min., RT
6. 5 x Waschen mit 200 µl/'Well' Waschlösung	
7. Inkubation mit 100 µl/'Well' Detektor-Antikörper	60 Min., RT
8. 5 x Waschen mit 200 µl/'Well' Waschlösung	
9. Inkubation mit 100 µl/'Well' Substratlösung (!!! Im Dunkeln !!!)	30 Min., RT
10. Zugabe von 50 µl/'Well' Stopplösung	
11. Photometrische Messung bei 450 nm (empfohlene Referenz: 620 nm oder 750 nm)	
12. Gesamtdauer des Tests: ca. 3 Stunden	

7. Literatur

HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C.; p53 mutations in human cancers; *SCIENCE* 253, 49-53 (1991)

BURKART C.; Das Tumorsuppressorprotein p53; *Deutsches Ärzteblatt* 91: 679-684 (1994)

SOUSSI T.; The humoral immune response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapie; *Immunology Today* 17 (8): 354-356 (1996)

GADDUCCI, A., FERDEGHINI, M., BUTTITTA, F., FANUCCHI, A., ANNICCHIARICO, C., PRONTERA, C., BEVILACQUA, G., GENAZZANI, A.R.; Preoperative serum antibodies against the p53 protein in patients with ovarian and endometrial cancer; *Anticancer Research* 16, 3519-3524 (1996)

ANGELOPOULOU, K., DIAMANDIS, E.P., SUTHERLAND, D.J.A., KELLEN, J.A., BUNTING, P.S.; Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor supressor gene protein in various cancers; *Int. J. Cancer* 58, 480-487 (1994)

SHIN, D.M., KIM, J., RO, J.Y., HITTELMAN, J., ROTH, J.A., HONG, W.K., HITTELMAN, W.N.; Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis.; *Cancer Res.* 54, 321-326 (1994)

HOUBIERS J.G.A., VAN DER BURG S.H., VAN DE WATERING L.M.G., TOLLENAR R.A.E.M., BRAND A., VAN DE VELDE C.J.H., MELIEF C.J.M.; Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer; *Br J Cancer* 72: 637-641 (1995)

ANGELOPOULOU K, STRATIS M, DIAMANDIS EP; Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma; *Int. J. Cancer* 70: 46-51 (1997)

ANGELOPOULOU K, ROSEN B, STRATIS M, YU H, SOLOMOU M, DIAMANDIS EP; Circulating antibodies against p53 protein in patients with ovarian carcinoma. Correlation with clinopathologic features and survival; *Cancer* 78: 2146-2152 (1996)

VOGL FD, FREY M, KREIENBERG R, RUNNEBAUM IB; Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with an ovarian mass; *British J. Cancer*, 83 1338-1343 (2000)

ZALCMAN G, SCHLICHTHOLZ B, TREDANIEL J, URBAN T, LUBIN R, DUBOIS I ET AL; Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment.; *Clin. Cancer Res.*, 4: 1359-1366 (1998)

TAKEDA A, SHIMADA H, NAKAJIMA K, IMASEKI H, SUZUKI T, ASANO T, OCHIAI T, ISONO; Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: relationship to operative curability.; *Eur J Surg.*, 167: 50-53 (2001)

CASTELLI M, CIANFRIGLIA F, MANIERI A, PALMA L, PEZZUTO R, FALASCA G, DELPINO A; Anti p53 and anti heat shock proteins antibodies in patients with malignant or pre-malignant lesions of the oral cavity.; *Anticancer Res*, 21: 753-758 (2001)

SITRUK V, VAYSSE J, CHEVRET S, GANNE-CARRIE N, CHRISTIDIS C, TRINCHET J, BEAUGRAND M; Prevalence and prognostic value of serum anti-p53 antibodies in hepatocellular carcinoma. A study of 159 patients.; *Gastroenterol Clin Biol*, 24: 1159-1163 (2000)

ROHAYEM J, CONRAD K, ZIMMERMANN T, FRANK K-H; Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Commercially Available Enzyme Immunoassays for Anti-p53 Antibodies; *Clin Chem*, 45: 2014-2016 (1999)

FLAMMANN HT, KUHN H-M; p53 Autoantibodies and Cancer: Specificity, Diagnosis and Monitoring.; IN: *CANCER AND AUTOIMMUNITY* (EDS. SHOENFELD Y, GERSHWIN ME) ELSEVIER, AMSTERDAM. PP. 181-191 (2000)

KUHN H, KROMMINGA A, FLAMMANN H, FREY M, LAYER P, ARNDT R; p53 autoantibodies in patients with autoimmune diseases: a quantitative approach; *Autoimmunity*, 31: 229-235 (1999)