

Lore Beate Martin  
Dr. med.

## **Autoantikörper gegen ein lösliches Leberantigen (SLA) als diagnostischer Parameter der Autoimmunhepatitis**

Geboren am 14. 04. 1973 in Karlsruhe  
Reifeprüfung am 19. 05. 1992 in Karlsruhe  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis SS 2000  
Physikum am 31. 08. 1994 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 16. 05. 2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Fiehn

Die Autoimmunhepatitis Typ 3, eine spezifische Untergruppe der Autoimmunhepatitiden, wird durch sogenannte anti-SLA-Autoantikörper charakterisiert, die gegen ein lösliches Antigen der Hepatozyten gerichtet sind. Es befindet sich im Überstand eines bei 100000 g zentrifugierten Homogenisates aus menschlichem Lebergewebe oder kultivierten Hep3B- und PLC-Zellen und kann sowohl im ein-, als auch im zweidimensionalen Immunoblot mithilfe eines anti-SLA-positiven Patientenserums nachgewiesen werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen diagnostischen Test zum Nachweis der anti-SLA-Antikörper zu etablieren. Auf der Grundlage der publizierten Daten, Hauptantigene der anti-SLA-Ak seien die Zytokeratine 8 und 18, wurde ein ELISA auf der Basis rekombinanter und aus kultivierten Zellen aufgereinigter Zytokeratine aufgebaut. Er wurde mit zwei anti-SLA-positiven Patientenseren (kompetitiver ELISA gegen Referenzserum) getestet, die von der Abteilung Prof. Dr. M. Manns an der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurden. Die Absorptionwerte dieser anti-SLA-positiven Patientenseren im ELISA waren jedoch nicht eindeutig von denen gesunder Kontrollseren zu unterscheiden. Obwohl ein Störfaktor technischer Art ausgeschlossen werden konnte, führten methodische Abwandlungen der Versuchsbedingungen wie Blockierung der Platten, Konzentrationsänderungen der Erst- oder Zweitantikörper, Verlängerung der Waschphasen u.a. nicht zu einer eindeutigen Differenzierung zwischen Patienten- und Kontrollseren.

Dies führte zu Zweifeln an der Rolle der Zytokeratine als Antigene der anti-SLA-Antikörper, die durch weitere Untersuchungen verstärkt wurden. Im eindimensionalen Immunoblot konnte keine Übereinstimmung der Signale der anti-SLA-positiven Patientenseren mit denen der monoklonalen Ak gegen die Zytokeratine gefunden werden. Ferner unterschieden sich die im zweidimensionalen Immunoblot dargestellten Eigenschaften des SLA (Größe etwa 50 kD, IP bei 7,5) von den in der Literatur bekannten Eigenschaften der Zytokeratine 8 (Größe 52,5 kD, IP bei 6,1) und 18 (Größe 45 kD, IP bei 5,7).

Ziel der weiteren Arbeit war nun, SLA neu zu charakterisieren. Da die Antigenpräparation aus menschlichem Lebergewebe in den Immunoblots hohe Hintergrundsignale verursachte, wurde eine HPLC-Aufreinigung durchgeführt und das SLA in mehreren der Fraktionen angereichert. Die Proteinatur des SLA konnte durch die enzymatische Spaltung mit Trypsin, Pronase und Proteinase nachgewiesen werden. SLA wurde dabei zeitabhängig vollständig abgebaut. Ferner stellte sich heraus, dass SLA - entgegen der ursprünglichen Annahme - bei 65 °C stabil ist.

Der Versuch, SLA aus einem 2D-Gel zu eluieren und durch Proteinmikrosequenzierung näher zu charakterisieren, war wahrscheinlich aufgrund eines zu geringen Proteingehaltes leider nicht erfolgreich. Dies führte zu der Hypothese, es könnte sich um ein Glykoprotein handeln. Das Vorhandensein von N-glykosidisch gebundenen Zuckerseitenketten am Molekül des SLA konnte jedoch durch den als Suchtest verwendeten „Glycan Detection Kit“ und die Inkubation des SLA mit spezifischen Endoglykosidasen ausgeschlossen werden.

Als weiterer Ansatz zur Charakterisierung des SLA wurde die Untersuchung einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Lebergewebe gewählt. Dabei wurden mithilfe des einen anti-SLA-positiven Patientenserums drei Klone gefunden, die von dem zweiten Patientenserum - wahrscheinlich aufgrund eines wesentlich niedrigeren Antikörpertiters - jedoch nicht erkannt wurden. Bei der Sequenzierung dieser DNA-Stücke wurden zwei der drei Klone als Sequenz für das sogenannte SSA-Antigen, ein Antigen der antinukleären Antikörper bei Sjögren-Syndrom, identifiziert. Bei der Verwendung eines SSA-positiven Patientenserums im eindimensionalen Immunoblot fand sich ein Signal auf der gleichen Höhe wie bei den anti-SLA-positiven Seren. Dies könnte ein Hinweis auf immunologische Ähnlichkeiten und Kreuzreaktivität zwischen SLA und SSA sein.

Für den dritten Klon konnten in einer Datenbankanalyse zwei fast vollständig homologe Sequenzen gefunden werden: eine genomische DNA-Sequenz von Chromosom 4 und eine als „kodierende Region für das SLA-Ag“ bezeichnete Sequenz. Letztere unterscheidet sich nur an einigen wenigen Positionen von der in dieser Arbeit beschriebenen. Folglich handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Fragment der DNA-Sequenz des SLA-Antigens. Dies muss nun hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit noch näher untersucht werden.