

Andrea Bäurle
Dr. med.

Expression und Charakterisierung des rekombinanten SLA-p35 als diagnostischer Parameter der Autoimmunhepatitis

Geboren am 08.06.1976 in Heidelberg
Reifeprüfung am 27.06.1995 in Neckarbischofsheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2001/2
Physikum am 25.03.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und in Aigle (französische Schweiz)
Staatsexamen am 24.04.2002 an der Universität Heidelberg

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

Die Autoimmunhepatitis (AIH) ist eine chronische Leberentzündung aufgrund einer Immunreaktion gegen körpereigenes Leberparenchym. Sie betrifft vorwiegend Frauen im jüngeren Lebensalter. Die Abgrenzung der AIH von anderen Formen der Leberentzündung ist von großer klinischer Bedeutung, da sich beispielsweise die immunsuppressive Therapie der AIH grundlegend von der eher immunstimulatorisch ausgerichteten Therapie der viralen Hepatitis unterscheidet. Bei der Diagnostik besitzt der spezifische serologische Nachweis von Autoantikörpern eine wichtige differentialdiagnostische Bedeutung. Die AIH vom serologischen Typ 3 ist mit dem Auftreten von Antikörpern gegen ein zytosolisches, lösliches Leberantigen (Soluble Liver Antigen, SLA), gegen das „Leber-Pankreas-Protein“ (LP) oder gegen einen tRNA^{(Ser)Sec}-Komplex, assoziiert.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines im bakteriellen System exprimierten, rekombinanten SLA-Proteins einen diagnostischen Test für die Typ 3-AIH zu etablieren. Als Basis hierfür diente eine in einer vorangegangenen Arbeit gewonnene cDNA aus einer Leberexpressionsgenbibliothek. Der Vergleich von Sequenzdaten ergab, dass die Aminosäuresequenz des SLA-p35-Isolates weitgehende Homologie zu dem „SLA/LP-Protein“ aufwies (Wies et al. 2000). Der Unterschied bestand in einer Aminosäure in der vermutlich antigenen Domäne des SLA-Moleküls aufgrund eines Basenaustausches an Position 472 der kodierenden Sequenz. Es ist denkbar, dass dieser Aminosäureaustausch die in der vorliegenden Arbeit festgestellte leicht veränderte immunologische Reaktivität des SLA-p35 im Vergleich zu der des SLA/LP-Proteins erklärt. Ferner wurde im Verlauf der Arbeiten zu SLA-p35 eine cDNA-Sequenz beschrieben, die für ein Protein kodiert, das einer Selenozystein-modifizierten tRNA assoziiert ist (Costa et al. 2000). Diese Sequenz zeigte

vollständige Homologie zu der von SLA-p35, auch in Position 472. Allerdings reichte das kodierte Protein um 147 Aminosäuren über das N-terminale Ende von SLA-p35 hinaus.

Nach Expression des rekombinanten Polypeptids SLA-p35 konnte zunächst gezeigt werden, dass die Reaktivität des SLA-p35 gegenüber Patientenseren mit der von nativem SLA vergleichbar war. SLA-p35 wurde anschließend für die Etablierung diagnostischer Testverfahren (Immunoblot und ELISA) verwendet. Zunächst wurden mit Hilfe von 85 vorcharakterisierten anti-SLA-positiven Seren sowie 50 Kontrollseren von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen Immunoblots durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine hohe Sensitivität (78,8%) und Spezifität (100%) der Reaktivität des SLA-p35 für die anti-SLA-positive AIH. Ferner wurde ein ELISA als quantifizierbare und routinetaugliche Methode etabliert. Auch hier bestätigte sich eine hohe Spezifität der SLA-p35-Reaktivität für die AIH Typ 3. Bei 410 zu diesem Zweck untersuchten Seren von Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen und autoimmunen Erkrankungen ergab sich kein positiver Befund. Der ELISA zeigte eine ähnlich hohe Sensitivität wie der SLA-p35-Immunoblot, wobei insgesamt neun Seren nur entweder im Immunoblot oder im ELISA positiv waren. Es zeigten sich ferner vier positive Reaktionen im Kollektiv der zur Grenzwertbestimmung eingesetzten Seren von Blutspendern.

Der inzwischen kommerziell erhältliche SLA/LP-ELISA wurde vergleichend getestet und zeigte eine gute Korrelation mit dem SLA-p35-ELISA (Korrelationskoeffizient 0,88), allerdings mit einer etwas geringeren Sensitivität von 63/85 Seren (74,1%). Die N-terminale Trunkierung des SLA-p35 und der Aminosäureaustausch am Kodon 472 gegenüber dem Voll-längenartigen SLA/LP brachte also keine Einbuße in der diagnostischen Effizienz. Allerdings waren trotz der gegenüber dem kommerziell verfügbaren Test leicht erhöhten Sensitivität von den im polyklonalen Inhibitions-ELISA vorcharakterisierten anti-SLA-positiven Seren 18% im hier etablierten SLA-p35-Immunoblot oder SLA-p35-ELISA negativ, obwohl sie im Inhibitionstest zum Teil hochpositiv gewesen waren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, ein bisher unbekanntes Polypeptid (SLA-p35) im bakteriellen System zu exprimieren und zur Diagnostik von Autoimmunhepatitiden zu verwenden. Dabei erwies sich das SLA-p35-Protein als hoch sensitiv und spezifisch für die AIH Typ 3. Es stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Hauptantigenkomponente des Löslichen Leber Antigens (SLA) dar. Obwohl die hier beschriebene verkürzte Form (SLA-p35) helfen könnte, die Diagnostik der AIH Typ 3 zu verbessern, kann der polyklonale Inhibitions-ELISA aktuell noch nicht vollständig durch Tests auf der Basis rekombinanter

Moleküle ersetzt werden. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um diese diagnostische Lücke zu schließen. Von der Aufklärung der Funktion des SLA-p35/SLA-LP/tRNA^{(Ser)^{Sec}}-Proteins sind darüber hinaus wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese der AIH zu erwarten.