Daniel Luithle
Dr. med.

Nachweis des humanen Korrelats zum rekombinanten SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ in löslichem Leberextrakt als Autoantigen in der Autoimmunhepatits Typ 3

Geboren am 23.02.1973 in Heilbronn
Reifeprüfung am 05.02.1997 in Esslingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1998/99 bis WS 2004/05
Physikum am 29.08.2000 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe-Rüppurr
Staatsexamen am 11.05.05 an der Universität Freiburg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Volkmann

Die Autoimmunhepatitis Typ 3, eine diagnostische Untergruppe der Autoimmunhepatitiden, wird durch anti-SLA-Autoantikörper charakterisiert, die gegen ein lösliches Antigen der Hepatozyten gerichtet sind. Dieses Antigen befindet sich im Überstand eines bei 100000 *g* zentrifugierten Homogenisates aus menschlichem Lebergewebe oder hepatischen Zellkulturen (A172C, A127, Huh7) und kann im Immunoblot mithilfe anti-SLA-positiver Patientenseren nachgewiesen werden. Charakteristisch ist die Immunoreaktivität mit einem 50-52kD großen Protein. Im Immunoblot zeigt sich SLA jedoch oft auch als Doppelbande bei 48 und 52kD.

Die molekulare Identität des SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ blieb lange umstritten. Zwar wurden drei homologe rekombinante Polypeptide mit anti-SLA-positiven Patientenseren isoliert. Der Nachweis des nativen Korrelats stand jedoch aus, und noch in jüngster Zeit wurden andere humane Antigene als anti-SLA-Autoantikörper-reaktiv beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob ein natives humanes Protein mit Sequenzhomologie zum rekombinanten SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ in der S100-Fraktion von humanen Leberzellen nachzuweisen ist. Hierzu sollte das native Antigen aufgereinigt werden. In einem zweiten Ansatz wurde ein monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes SLA-p35 untersucht.

Bei der Aufreinigung des nativen SLA zeigten sich unterschiedliche Eigenschaften der im Immunoblot sichtbaren 48kD- und 52kD-SLA-Banden. So konnte 48kD-SLA mithilfe einer Immunoaffinitätssäule aufgereinigt werden. Jedoch konnte aus dem Produkt der Aufreinigung SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ nicht massenspektropskopisch nachgewiesen werden.
Es konnte jedoch 52kD-SLA in zwei Stufen mit einem DEAE-Ionenaustauscher und anschließender Immunoaffinitätssäule soweit angereichert werden, dass mit der Massenspektroskopie eindeutig ein humanes Protein mit hoher Sequenzhomologie zum rekombinanten SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ nachgewiesen werden konnte. Dies erfolgte durch die Identifizierung von neun Fragmenten des entsprechenden Proteins. Einige dieser Fragmente wurden durch Oxidation, ein weiterer Abschnitt durch PSD bestätigt.

Der Nachweis des SLA in der unaufgereinigten S100-Leberproteinfraktion mit dem getesteten monoklonalen anti-SLA-p35 IgG-Antikörper gelang leider nur unzureichend. Nach Anreicherung mittels Ionenaustauscher und Immunoaffinitätssäule konnte jedoch eine geringtitrige, aber spezifische Reaktion gegen natives 52kD-SLA gezeigt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte erstmals das native Homolog des rekombinanten SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ nachgewiesen und einer Strukturanalyse mittels Massenspektroskopie

zugeführt werden. Damit kann die Frage der molekularen Identität des 52kD-Hauptantigens des SLA als geklärt betrachtet werden.
Die 48kD-SLA-Subspezies ließ sich im vorliegenden Ansatz weder in der Massenspektroskopie noch mit dem monoklonalen Antikörper HZ-SLA-10/58/64 nachweisen. Wahrscheinliche Ursache hierfür ist eine noch unzureichende Aufreinigung und/oder eine Maskierung/Modifikation des Epitops des monoklonalen Antikörpers. Es ist jedoch letztlich nicht auszuschließen, dass das 48kD-Molekül ein von SLA/LP/tRNP$^{(Ser)Sec}$ differierendes Antigen darstellt. Diese Frage sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.