

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Charakterisierung eines neuen mitochondrialen
Antigen-Antikörper-Systems
bei der primär- biliären Zirrhose**

-

**Isolierung und Charakterisierung eines 60 kD Antigens
aus dem Überstand von submitochondrialen Partikeln**

**Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Manon Christine Feuchtinger, geb. Beringer
aus
Scherzingen/ Schweiz**

2006

Dekan: Professor Dr. C. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Lauer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Historisches	1
1.2 Vorkommen, Klinik und Diagnose der primär- biliären Zirrhose	1
1.3 Behandlung der primär- biliären Zirrhose	4
1.4 Entstehung der primär- biliären Zirrhose	4
1.5 Antimitochondriale Antikörper (AMA)	6
1.6 Fragestellung und Vorgehensweise	10
2. Probanden, Material und Methoden	11
2.1 Probanden	11
2.1.1 Patienten mit primär- biliärer Zirrhose (PBC)	11
2.1.1.1 Patienten mit Anti-M2 negativer PBC	11
2.1.1.2 Patienten mit Anti-M2 positiver PBC	12
2.1.2 Patienten mit anderen Lebererkrankungen (autoimmun und toxisch)	13
2.1.3 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen	14
2.1.3.1 Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA)	14
2.1.3.2 Patienten mit Kollagenerkrankung	14
2.1.4 Kontrollgruppe	15
2.2 Materialien	16
2.2.1 Labormaterialien und Geräte	16
2.2.2 Reagenzien	17
2.2.3 Antikörper	19
2.2.4 Gewebeschnitte	19
2.2.5 Pufferansätze und andere selbst hergestellte Flüssigkeiten	20
2.3 Methoden	21
2.3.1 Immunfluoreszenztest	21
2.3.2 Antigengewinnung	21
2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford	22
2.3.4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	23

2.3.4.1	Serumverdünnungen	23
2.3.4.2	Antigene und Antigenkonzentration	23
2.3.4.3	Durchführung des ELISA	23
2.3.5	Gelelektrophorese und Immunoblotting	24
2.3.5.1	Gelelektrophorese	24
2.3.5.2	Transferbedingungen	24
2.3.5.3	Inkubation und Anfärbung der Nitrocellulosepapiere	25
2.3.6	Molekulargewichtsbestimmung	25
2.3.7	Antigenkonzentrierung, Antigenisolierung, Antigenidentifikation	25
2.3.7.1	Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose	25
2.3.7.2	Antigenisolierung: Bandenexzision und Elektroelution	27
2.3.8	Antigenanalyse	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Screening nach neuen Antigen-Antikörper-Systemen	28
3.1.1	Immunfluoreszenztest	28
3.1.2	Ergebnisse in ELISA	28
3.1.3	Ergebnisse im Immunoblot (Westernblot)	29
3.1.4	Gruppenbildung	32
3.2	Antigenisolierung	33
3.2.1	Dichtegradientenzentrifugation	33
3.2.2	Austestung des 5. Gradienten gegen weitere Seren	34
3.3	Elektroelution, Konzentrierung und Analyse	35
3.4	Reaktionen von AMA positiven/ Anti-M2 negativen PBC Seren mit selbst isoliertem 60 kD Antigen und kommerzieller Na ⁺ /K ⁺ - ATPase im Westernblot	36
3.5	Reaktionen von AMA positiven/ Anti-M2 negativen PBC Seren mit selbst isoliertem 60 kD Antigen und kommerzieller Na ⁺ /K ⁺ - ATPase im ELISA	40
3.6	Korrelation zwischen Westernblot und ELISA Ergebnissen zum Nachweis von Antikörpern gegen isoliertes 60 kD Antigen aus Rinderherz SMP SN Gradient 5	44

4.	Diskussion	46
4.1	Diskussion der Methodik	46
4.2	Diskussion der Ergebnisse	47
4.2.1	Screeninguntersuchungen	47
4.2.2	Antigenisolierung und –analyse	48
4.2.3	Austestung des isolierten Antigens, Testung von Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Sigma)	49
4.2.3.1	Austestung im Westernblot	49
4.2.3.2	Testung auf Kreuzreaktivität mit einer anderen ATPase	49
4.2.3.3	Antikörper gegen F ₁ -ATPase/ Cytochrom-bc ₁ -Komplex sind im ELISA nicht nachweisbar	50
4.3	Einordnung der potentiellen Antigene	51
4.3.1	Lokalisation, Funktion und Struktur der F ₁ -ATPase	51
4.3.2	Lokalisation, Funktion und Struktur des Cytochrom-bc ₁ -Komplexes	52
4.4	Wie lässt sich die mögliche Entstehung von Anti- F ₁ -ATPase-Antikörpern oder Anti-Cyt Bc ₁ -Antikörpern in die heutigen Hypothesen zur Entstehung von antimitochondrialen Antikörpern einordnen?	53
4.5	Ausblick: Bedeutung der neuen AMA für Forschung, Diagnose und Monitoring	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Anhang	67

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

γ -GT	Gamma - Glutaryltransferase
AiH	Autoimmune Hepatitis
Ak	Antikörper
AMA	antimitochondriale Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ARA	American Rheumatological Association
ATPase	Adenosin-5'-triphosphat Synthase
d	Dalton
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Isomer-1
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
Mb	Morbus
MHC	major histocompatibility complex
NC	Nitrocellulose
NOMA	naturally occurring mitochondrial antibodies
OADH	Oxo-Acid-Dehydrogenase-complex (= α - Keto-glutaratdehydrogenase-Komplex)
p-ANCA	Anti-Neutrophilic-Cytoplasm antibodies with perinuclear (p) staining
PBC	primär- biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
RA	Rheumatoide Arthritis

Rh	Rinderherz
RI	Rattenleber
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMP	Submitochondriale Partikel
Sn	Schweineniere
SN	Supernatant (engl.: Überstand)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane
UDCA	Ursodesoxycholsäure
WB	Westernblot
WP	Waschpuffer

1. Einleitung

1.1 Historisches

Die primär-biliäre Zirrhose (PBC) ist eine chronische, progressive cholestatische Lebererkrankung mit bisher ungeklärter Ätiologie, die aufgrund der nachweisbaren Autoantikörper bis heute zu den Autoimmunerkrankungen gerechnet wird.

Erstmalig beschrieben wurde die Erkrankung 1851 durch Addison und Gull (2), die über eine kleine Gruppe Patienten mit ähnlicher Symptomatik berichteten: Ikterus, Vitiligo und Xanthome. Es dauerte jedoch mehr als 20 Jahre, bis ein direkter Zusammenhang zwischen Gallengangsobstruktion und Leberzellschädigung erkannt wurde. So wurde 1876 von Hanot die Bezeichnung „hypertrophische Zirrhose mit chronischem Ikterus“ (30) eingeführt, die verschiedene klinische Symptome umfasste; 1950 erschien der erste Übersichtsartikel über 92 anderweitig beschriebene und 21 eigene Fälle mit „biliärer Zirrhose“ durch Ahrens et al. (4). Hier wurde durch die Einteilung in intra- bzw. extrahepatische Obstruktion erstmals die Unterscheidung einer „primären“ von einer „sekundären“ biliären Zirrhose vorgenommen.

Die PBC wird als eigenständiges Krankheitsbild allerdings erst seit der Veröffentlichung von Sherlock im Jahr 1959 aufgefasst (74). Da mit zunehmend verbesserter Diagnostik die PBC meistens weit vor dem Stadium der Zirrhose erkannt wird, bemühte sich Rubin 1965 nach histologischen Kriterien um die Einführung des präziseren Terminus „chronische nicht-eitrige destruiende Cholangitis“ (66), jedoch hat sich dieser Begriff nur wenig durchgesetzt. Seit der Entdeckung von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) in Seren von Patienten mit PBC durch Walker et al. 1965 (82) wird die Erkrankung zu den Autoimmunerkrankungen gerechnet.

1.2 Vorkommen, Klinik und Diagnose der primär-biliären Zirrhose

Die primär-biliäre Zirrhose ist eine Erkrankung, die weltweit vorkommt und alle Ethnien betrifft, obwohl beobachtet wurde, dass sie in bestimmten Gegenden häufiger auftritt als in anderen (65). Man kann jedoch postulieren, dass die

Angaben zur Häufigkeit stark damit zusammenhängen, wie sorgfältig die Differentialdiagnose der PBC gestellt wird und in welchem Umfang serologische Untersuchungen durchgeführt werden. Das mittlere Erkrankungsalter ist etwa 55 Jahre, wobei das Alter bei Erstdiagnose stark variiert: es werden sowohl 20- wie auch 90-jährige Patienten diagnostiziert. Von der PBC betroffen sind überwiegend Frauen (7,5 : 1) (36).

Prävalenz und Inzidenz werden von verschiedenen Autoren zwischen 100 –165 (19-240) Fällen/ 1Mio Einwohner (Prävalenz) beziehungsweise 5,8-19 (2-24)/ 1 Mio Einwohner (Inzidenz) angegeben (34;36;52;83).

Erste klinische Anzeichen für eine PBC sind unspezifische Symptome wie Pruritus und Müdigkeit. Bei der körperlichen Untersuchung können kutane Hyperpigmentationen, Xanthelasmen und Hepatosplenomegalie (bei 30% der Patienten [36]) auffallen. Ein Ikterus ist normalerweise erst in fortgeschrittenen Stadien der PBC zu beobachten (76). Komplikationen sind neben der Entwicklung der Leberzirrhose mit portaler Hypertension, Aszites, Bildung und Blutung von Ösophagusvarizen, hepatischer Enzephalopathie und letztlich der Notwendigkeit zur Lebertransplantation auch durch die Malabsorption auftretende Osteomalazie und Osteoporose.

Bezüglich der Klinik ist anzumerken, dass heutzutage die meisten Erstdiagnosen bei noch asymptomatischer Klinik gestellt werden, da die Patienten durch Blutuntersuchungen, die meist aus anderem Grund erfolgen, auffällig werden (76).

Einige andere Erkrankungen mit wahrscheinlich autoimmuner Genese sind häufig mit der PBC assoziiert. Am häufigsten sind diesbezüglich das Sjögren Syndrom (5), das etwa 50-75% aller PBC Patienten haben oder entwickeln, die Sklerodermie (54), CREST-Syndrom (63) , Arthritis und Thyroiditis (43).

Serologische und biochemische Veränderungen gehen dem Einsetzen von Symptomen zumeist um Jahre voraus. So findet sich fast immer eine massive Erhöhung der Alkalischen Phosphatase (bis 20fach über oberem Normwert) (58), der Gamma-Glutamyl-Transferase (bis 2000 mg/dl) und in Spätstadien (III

+ IV) eine stetige Zunahme des Serumbilirubins (36). Letzteres wird als Verlaufparameter für die Indikation einer Lebertransplantation herangezogen. Serologisch fallen vor allem eine Erhöhung des Gesamt- Ig M auf bei üblicherweise normalen Werten von Ig G und Ig A. Antimitochondriale Anti-körper (AMA) sind sogar schon vor biochemischen Veränderungen feststellbar und sind ab einem Titer > 1:40 hochgradig verdächtig für eine PBC (58). Außer AMA können auch noch andere spezifische Autoantikörper gegen intrazelluläre Strukturen gefunden werden, wie zum Beispiel gegen „nuclear dots“ (sp 100) und Kernmembran (gp 120)(15).

Histologisch lässt sich die Entwicklung der PBC nach Scheuer in vier Stadien einteilen (70;71):

Die primär-biliäre Zirrhose beginnt mit einer Schädigung des Epithels der kleinen und mittleren Gallengänge (bis 100 µm Durchmesser). Die Läsionen sind nur fokal zu sehen. Die Portalfelder sind durch die Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen, Eosinophilen und Histozyten erweitert, das Leberparenchym ist jedoch noch nicht verändert. Im Stadium I ist oft eine Granulombildung mit Histozyten, Lymphozyten und gelegentlich Riesenzellen zu beobachten. Stadium II ist charakterisiert durch eine Ausbreitung der Inflammation von periportal in das Leberparenchym bei gleichzeitiger Proliferation der kleinen Gallengänge. Zur Fibrosierung kommt es im Stadium III. Der Vernarbungsprozess beginnt in den Portalfeldern und zerstört schrittweise die Architektur der Leber. Verlust der Gallengänge und piecemeal Nekrosen (Mottenfraßnekrosen) sind ebenso kennzeichnend. In diesem Stadium kann es schwierig sein, die PBC von einer chronisch aktiven Hepatitis zu unterscheiden. Im Stadium IV sieht man die zirrhotische Leber mit fibrösen Septen und einigen Regenerationsknoten. Letztere sind allerdings unregelmäßig verteilt und daher nicht immer in jeder Biopsie enthalten.

Ein Problem der histologischen Beurteilung ist, dass bioptisch nicht immer das richtige Stadium erfasst wird, da die Läsionen sehr lokalisiert beginnen und das eigentliche Stadium im entnommenen Gewebe eventuell nicht enthalten ist.

1.3 Behandlung der primär-biliären Zirrhose

Die Behandlung der PBC kann in drei Zeitfenster eingeordnet werden: anfänglich wird mit dem Ziel behandelt, das Voranschreiten der Erkrankung zu verlangsamen, später geht es um eine spezifische Behandlung der Symptome und Komplikationen. Bei fortgeschrittener Zirrhose bleibt als einzige Therapieoption die Lebertransplantation.

Zur Zeit gilt die Ursodesoxycholsäure (UDCA) als Mittel der Wahl zur Behandlung einer PBC in Stadium I und II. Mehrere Studien der letzten Zeit konnten zeigen, dass UDCA, wenn früh und anhaltend appliziert, sowohl biochemische als auch histologische Parameter verbessert beziehungsweise den Prozess insgesamt verlangsamt (7;47;62). Terasaki et al. konnten eine Reduktion der HLA-Expression auf Hepatozyten und Gallengangsepithelien unter UDCA-Gabe nachweisen (77), was zur Reduzierung der T-Zell vermittelten hepatozellulären Nekrosen beitragen könnte. Ebenso berichten Yoshikawa et al. von einer Abnahme der Cytokininduktion (IL-2, IL-4, IFN γ) durch UDCA in mononukleären Zellen (87). Die empfohlene Tagesdosis UDCA für PBC Patienten liegt bei 13-15 mg/kg/d und sollte so früh wie möglich eingesetzt werden.

Kombinationsstudien von UDCA mit immunsuppressiven Medikamenten zeigten keinen Vorteil gegenüber alleiniger Therapie mit UDCA (31;46).

Behandlung der Begleitsymptome wie Pruritus, Osteopenie, Mangel an fettlöslichen Vitaminen, Hypercholesterinämie und Steatorrhoe sowie der möglichen Komplikationen werden entsprechend ihrer Ausprägung und ihrem zeitlichen Auftreten behandelt.

1.4 Entstehung der primär-biliären Zirrhose

Die Ätiopathogenese der PBC ist bis heute ungeklärt, allerdings scheinen sowohl eine Dysfunktion des Immunsystems wie auch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen (76). Eine genetische Prädisposition wurde mit Allelen der MHC loci assoziiert. Die Haplotypen DR3, DR8 und DR4 sind häufiger bei PBC-Patienten europäischer Abstammung anzutreffen, im Gegensatz zum Vorherrschen von DR2- und DR8- Haplotypen bei japanischen Patienten (28).

Verwandte ersten Grades von Patienten mit PBC haben ein erhöhtes Risiko, eine PBC oder eine andere Autoimmunerkrankung zu erwerben, wobei hier besonders die Töchter erkrankter Mütter betroffen sind (32). Dieser Zusammenhang zwischen familiärer Belastung und erhöhter Krankheitsdisposition gilt als indirekter Hinweis für eine genetische Komponente der Ätiologie (76).

Bis heute beobachtete Auffälligkeiten des Immunsystems schließen zelluläre und humorale Faktoren mit ein. Dazu gehören sowohl eine eingeschränkte Funktion regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit PBC und deren asymptomatischen Angehörigen ersten Grades (53), die Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) auf beschädigten Gallengangsepithelien (44) sowie erhöhte Konzentrationen von TNF- α , IL-8 und IL-12 bei fortgeschrittener PBC im Vergleich zu Anfangsstadien (56).

Auch eine infektiöse Genese wird bei der PBC immer wieder diskutiert, wobei verschiedene Erreger in Erwägung gezogen werden. Untermauert wird die Hypothese „Infektion“ zum Beispiel durch die Beobachtung, dass es eine hohe Prävalenz unter PBC Patientinnen gibt, die unter einer rezidivierenden Bakteriurie leiden. Die Prävalenz in dieser Patientengruppe ist deutlich erhöht gegenüber anderen Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung (23). Auch konnte in 69 % einer Patientengruppe mit gesunder Leberfunktion und wiederkehrenden Harnwegsinfekten eine schwach positive Reaktivität antimitochondrialer Antigene beobachtet werden (24). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass es eine kausale Verbindung zwischen Bakterien, die Harnwegsinfekte auslösen können, und der Ätiologie der PBC geben könnte. Man vermutet eine Induktion der für die PBC pathognomonischen antimitochondrialen Antikörper (s. 1.5) durch Kreuzreaktionen, die durch die auffällige Ähnlichkeit zwischen der mitochondrialen Membran und der Zellwand mancher Bakterienstämme entstehen könnten. Sowohl einige Stämme von Enterobacteriaceae als auch diverse Mykobakterien wurden als ursächlich diskutiert (36). Konkret in Erwägung gezogen wurden bereits eine ganze Reihe von Mikroben, darunter *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella minnesota*, da hier jeweils

eine Kreuzreaktion mit AMA gezeigt werden konnte. Das genaue Targetantigen der AMA bezüglich dieser Keime konnte jedoch nie vollständig dargestellt werden (10). In jüngster Zeit wird eine Infektion durch *N. aromaticivorans* (72) erwogen (s. auch Kap. 4.4), ein weiterer potentieller Keim, der in den letzten Jahren untersucht wurde ist *Chlamydia pneumoniae* (1). Auch Retroviren standen bereits im Verdacht eine PBC auslösen zu können, aber beweisende Ergebnisse konnten nicht erbracht werden (28;48). Endgültige Beweise für eine Infektion als Ursache bzw. einen möglichen Kandidaten stehen bis heute aus, und die Vielfalt der postulierten Erreger demonstriert die allgemeine Unsicherheit.

1.5 Antimitochondriale Antikörper (AMA)

Auf humoraler Ebene finden sich in 90 – 95% der Fälle antimitochondriale Antikörper (AMA) (18;38), die ein wichtiges und fast pathognomonisches Kriterium für die serologische Diagnose der PBC darstellen. Es konnte allerdings bis heute noch nicht genau geklärt werden, wodurch AMA bei der PBC induziert werden und ob sie eine Rolle in der Pathogenese spielen. (17;28). Das heutige Verständnis der AMA spricht gegen eine pathogenetische Rolle bei der Induktion der Gallengläsionen. Zum einen werden immer wieder Patienten beobachtet, die zwar eine PBC, aber nie AMA entwickeln; zum anderen lässt sich in Versuchstieren nach Gabe rekombinanter E2-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (PDH, s.u.) die Bildung von AMA induzieren, die aber nicht mit den histologischen Veränderungen, die für die PBC typisch sind, einhergehen. Zudem persistieren AMA auch nach Lebertransplantation, allerdings ohne Wiederauftreten der Erkrankung (8;36).

Das Haupttargetantigen der AMA ist der α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex (auch M2-Antigen genannt), welcher auf der inneren mitochondrialen Membran liegt und im Rahmen des Zitronensäurezyklus an der aeroben Energiegewinnung beteiligt ist. Im Westernblot lassen sich fünf Determinanten (M2a-M2e) unterscheiden, wobei ca. 80 % der AMA positiven PBC-Seren mit der M2a-Determinante, der E2-Einheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes reagieren (17). Das immundominante Epitop ist die lipoylbindende Region der

Dihydrolipoamidacetyltransferase (79;86). Weitere, bei der PBC vorkommende AMA sind Anti-M4, Anti-M8 und Anti-M9. Anti-M4 und Anti-M8 sind prognostisch relevante Antikörper, kommen aber nie in Abwesenheit von Anti-M2 vor. Anti-M9-Antikörper können in seltenen Fällen auch allein auftreten und werden sonst als prognostisch günstig für den Verlauf der PBC bewertet. Die korrespondierenden Antigene sind, soweit bis heute bekannt, in Tabelle 1.1 und 1.2 beschrieben (17;39).

Tabelle 1.1: Vier mitochondriale Antigen-Antikörper-Systeme bei primär-biliärer Zirrhose

Antigen	Korrespondierend mit	Klinische Relevanz
M2	α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex (5 Determinanten)	Diagnostischer Marker
M4	Assoziiert mit Sulfitoxidase	Prognostischer Marker
M8	Unbekannt; wird gewonnen aus Mikrosomen aus Schweineleiere	Prognostischer Marker
M9	Glykogenphosphorylase (zwei Determinanten bei 98 und 59 kD)	Diagnostischer Marker (wenn Anti-M2 negativ) und prognostischer Marker

Tabelle 1.2: Korrespondierende Enzyme der M2-Determinanten

M2-Determinante	Korrespondierendes Enzym	Molekulargewicht (kD)
M2a	E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	70
M2b	Protein X des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	56
M2c	E2-Untereinheit des α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex	51
M2d	E1alpha Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	45
M2e	E1beta Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	36

Bei der Überlegung, wodurch die AMA bei PBC induziert werden, muss berücksichtigt werden, dass Autoantikörper allgemein zunächst im Rahmen physiologischer Prozesse gebildet werden, da sie ein wichtiger Bestandteil des natürlichen Immunsystems sind. So sind natürlich vorkommende Autoantikörper wichtig bei der Abwehr von Infektionen und bei der Protektion vor Autoimmunerkrankungen, da durch sie alternde Zellen und Zellreste beseitigt werden (9;25).

Inwieweit natürliche Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen zusammenhängen, konnte bis heute nicht geklärt werden. Von der Charakterisierung von Autoantigen-Antikörper-Systemen erhofft man sich stets neue Erkenntnisse hinsichtlich der Ätiologie dieser Autoimmunerkrankungen, aber auch Hinweise auf die Pathogenese. Von einigen Autoantikörpern weiß man heute, dass sie durch die Expression von Neoantigenen (z.B. bei medikamentös-induzierten Reaktionen) oder durch eine Kreuzreaktion mit exogenen Agenzien induziert werden können. Als Beispiele hierfür lassen sich Anti-M1-Antikörper nennen, die sich gegen Cardiolipin, ein Antigen der inneren Mitochondrienmembran richten, und sich bei Syphilis nachweisen lassen. Man

hätte daher bei der Syphilis von einer Autoimmunerkrankung ausgehen können, wenn nicht *Treponema Pallidum* als Erreger identifiziert worden wäre. Die Autoantikörper entstehen hier durch „molecular mimicry“, d.h. es gibt ein identisches Epitop auf bakterieller Zellwand und humanen Mitochondrien, gegen das sich die Antikörper richten (16;84).

Ein ähnliches Erklärungskonzept erhofft man sich bereits seit Jahren im Hinblick auf die primäre biliäre Zirrhose; auf die potentiell infektiöse Genese und die diskutierten Keime wurde bereits in Kap. 1.4 eingegangen.

1.6 Fragestellung und Vorgehensweise

Insgesamt sind bis heute neun verschiedene AMA (M1-M9) bekannt. Für die PBC spezifisch sind davon vier, wobei diese nicht spezie-spezifisch und nicht organ-spezifisch reagieren. In den letzten Jahren wurden jedoch zunehmend weitere AMA-Spezifitäten bei Patienten mit PBC beobachtet, die mit den bisher bekannten Anti-M1-Anti-M9 Antikörpern keine Gemeinsamkeiten haben (35). Seren dieser Patienten zeigen im Immunfluoreszenztest eine zytoplasmatische Fluoreszenz, die typisch für antimitochondriale Antikörper ist, sie reagieren jedoch weder in der Komplementbindungsreaktion, noch in ELISA oder Westernblot mit den bisher definierten mitochondrialen Antigenfraktionen. Insbesondere konnte eine Identität mit Anti-M2-Ak ausgeschlossen werden, da diese Seren im Westernblot keine M2-spezifischen Determinanten erkannten.

Im Immunpathologischen Labor der Medizinischen Klinik II Tübingen fallen zur Zeit pro Woche ca. zwei bis drei Patienten auf, die die oben geschilderte Konstellation aufweisen: klinisch und/oder histologisch eindeutige PBC mit für AMA positivem Immunfluoreszenztest bei unbekanntem Subspezifitäten. Diese zunehmend größer werdende Patientengruppe ist ein starkes Indiz dafür, dass es noch weitere Spezifitäten außer den bisher bekannten geben müsste.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit sollte die Untersuchung der neuen, bisher nur im Immunfluoreszenztest nachweisbaren Antigen-Antikörper-Systeme sein.

Zu diesem Zweck sollte eine Anti-M2-negative Patientengruppe zusammengestellt und die Seren in Westernblot und ELISA gegen subzelluläre Fraktionen aus Rinderherz, Schweineniere und Rattenleber ausgetestet werden. Bei auffälliger Häufung von gleichen Reaktionen wurden die entsprechenden Fraktionen aufgereinigt, isoliert und extern analysiert. Weiterhin sollte die antigene Fraktion zur ersten Charakterisierung gegen verschiedene Kollektive von Patienten mit anderen Erkrankungen bzw. gesunde Probanden ausgetestet werden.

2. Probanden, Material und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC)

2.1.1.1 Patienten mit Anti- M2 negativer PBC

Es wurden insgesamt 73 Patienten mit atypischer (d.h. positiv für AMA, aber negativ für Anti-M2 Antikörper) PBC untersucht, jedoch nicht alle in den gleichen Untersuchungen.

Alle Seren zeigten im Immunfluoreszenztest das typische Fluoreszenzmuster für antimitochondriale Antikörper, die aber in ELISA und Westernblot nicht den bisher bekannten PBC-spezifischen AMA-Subspezifitäten zugeordnet werden konnten.

Geschlecht und Alter dieser Patienten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt, Angaben zu Laborwerten (Leberenzyme, Gesamt-Bilirubin) in Tabelle 2.2.

Tabelle 2.1: Patienten mit Anti-M2 negativer PBC

	Anzahl	Mittleres Alter in Jahren	Bereich (Jahre)
Insgesamt	73	58,51	22-84
Frauen	66	58,02	32-82
Männer	7	61	22-84

Tabelle 2.2: Biochemische Parameter von Patienten mit Anti-M2 negativer PBC

	AP (IU)	γ -GT (IU)	GLDH (IU)	GOT (IU)	GPT (IU)	Bilirubin (mg%)
Mittelwert	367,12	151,68	107,74	43,20	54,43	0,68
SD	321,20	124,35	89,38	63,83	78,22	0,28
Median	259,50	119,50	119,00	23,50	36,00	0,60

Insgesamt lagen 19 histologische Untersuchungen vor. Von diesen wurden 14 als sicher (8) oder hochgradig verdächtig (6) für eine PBC beurteilt. Ein Befund wurde als Overlap zwischen PBC und Autoimmuner Hepatitis (AiH) klassifiziert, wobei es für eine AiH serologisch keinen Hinweis gab. Vier Befunde zeigten noch keine histologischen Merkmale für eine PBC.

2.1.1.2 Patienten mit Anti-M2 positiver PBC

Es wurden 22 Patienten mit klinisch und serologisch typischer, d.h. Anti-M2-positiver PBC untersucht. Alter und Geschlecht sind in Tabelle 2.3, biochemische Parameter in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Patienten mit Anti-M2-positiver PBC

	Anzahl	Mittleres Alter in Jahren	Bereich (Jahre)
Insgesamt	22	59,27	(29-80)
Frauen	19	57,37	(29-80)
Männer	3	71,33	(63-78)

Tabelle 2.4: Biochemische Parameter von Patienten mit Anti-M2 positiver PBC

	AP (IU)	γ -GT (IU)	GLDH (IU)	GOT (IU)	GPT (IU)	Bilirubin (mg%)
Mittelwert	449,22	292,82	n.d.	37,11	48,73	0,87
SD	322,72	195,95	n.d.	23,05	32,68	0,42
Median	309	162	n.d.	24	46	0,8

2.1.2 Patienten mit anderen Lebererkrankungen (autoimmun und toxisch)

a) Patienten mit Autoimmunhepatitis (AiH)

20 Seren von Patienten mit hochgradigem Verdacht auf Autoimmunhepatitis (Ausschluss viraler und toxischer Ursachen, erhöhte IgG-Globuline, erhöhte Transaminasen [GPT > 20 U/l, GOT > 20 U/l], sowie positive Reaktionen für die typischen Autoantikörper [s.u.]) wurden untersucht. Die Seren stammten aus den Einsendungen in das Immunpathologische Labor und mussten im Immunfluoreszenztest eindeutig Antikörper gegen antinukleäre Antikörper (ANA), gegen Leber-Nieren-Mikrosomen (Anti-LKM), gegen glatte Muskulatur (Anti-SMA) bzw. Aktin (Anti-A) oder gegen Leber-Pankreas-Antigen (Anti-LP) aufweisen. Die Patienten durften keine antimitochondrialen Antikörper aufweisen.

Die meisten der untersuchten Patienten wurden gemäß dem „International scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis“ (6) als definitive AiH eingestuft. Die Fälle, in denen keine Histologie durchgeführt worden war, wurden aufgrund der übrigen Datenlage bei entsprechender Klinik als „hochgradig wahrscheinlich für eine AiH“ eingestuft.

b) Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis (PSC)

20 Seren von Patienten mit serologisch hochgradigem Verdacht auf eine Primär Sklerosierende Cholangitis wurden untersucht. In den Seren mussten pANCA (perinukleäre Antikörper) hochtitrig nachweisbar sein, da diese ein typischer Marker für die PSC sind. Bei den meisten der untersuchten Patienten war eine die PSC bestätigende ERCP (endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikografie) durchgeführt worden.

c) Patienten mit alkohol-toxischer Lebererkrankung

Es wurden 20 Seren von Patienten mit klinisch und anamnestisch eindeutig alkohol-toxischer Lebererkrankung untersucht.

Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten a)-c) siehe Tabelle 2.5.

Tabelle 2.5: Patienten mit autoimmuner oder toxischer Lebererkrankung

	Autoimmune Hepatitis	Primär Sklerosierende Cholangitis	alkohol-tox. Lebererkrankung
Anzahl total	20	20	20
Frauen	15	5	12
Männer	5	15	8
Mittleres Alter (in Jahren)	43,9	47,75	57,4
Bereich (in Jahren)	6-76	11-78	38-80

2.1.3 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen

2.1.3.1 Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA)

Acht Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurden untersucht. Alle sind Patienten der Rheumaambulanz der Medizinischen Klinik Tübingen und haben eine klinisch aktive Rheumatoide Arthritis.

Alters- und Geschlechtsverteilung siehe Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Patienten mit Rheumatoider Arthritis

	Anzahl	Mittleres Alter in Jahren	Bereich (Jahre)
Insgesamt	8	56,25	46-71
Frauen	7	55,14	46-71
Männer	1	64	64

2.1.3.2 Patienten mit Kollagenerkrankung

20 Seren von Patienten mit serologisch hochgradigem Verdacht auf eine Kollagenerkrankung (darunter Patienten mit Morbus Sjögren, Lupus Erythematoses und Morbus Sharp) und klinischen Symptomen gemäß der ARA-Kriterien wurden untersucht. Die Seren mussten im Immunfluoreszenztest eindeutig positiv sein für ANA sowie in der Immundiffusion präzipitierende

Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) aufweisen. Diese Patientengruppe ist in Tabelle 2.7 beschrieben.

Tabelle 2.7: Patienten mit einer Kollagenerkrankung

	Anzahl	Mittleres Alter (Jahre)	Bereich (Jahre)
Insgesamt	20	43,5	11-75
Frauen	18	44,67	17-75
Männer	2	33	11-55
<u>davon mit</u>			
Mb. Sjögren	5	60,4	52-69
Lupus Erythematoses	9	37,56	20-75
Mb. Sharp	6	38,33	11-71

2.1.4 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 30 Seren von gesunden Blutspendern, die in Tabelle 2.8 beschrieben sind.

Tabelle 2.8: Alters- und Geschlechtsverteilung von 30 gesunden Blutspendern

	Anzahl	mittleres Alter (in Jahren)	Bereich (in Jahren)
Insgesamt	30	44,47	20-56
Frauen	18	41,67	20-56
Männer	12	49,17	39-56

Seren und klinische/laborchemische Daten der verschiedenen Patienten waren zur Diagnostik von verschiedenen Kollegen aus Deutschland an das Immunpathologische Labor geschickt worden. Die Seren der gesunden Blutspender wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. D. Wernut, Institut für Transfusionsmedizin, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

2.2 Materialien

2.2.1 Labormaterialien und Geräte (jeweils alphabetisch)

a) Materialien

- *Beckman ultra-clear™ centrifuge tubes* (Beckman, Palo Alto, CA, USA)
- *Blue Max™, 50 ml* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- *Chromatography paper 3MM Chr* (Whatman® Int., Maidstone, England)
- *Cuvettes 10x4x45 mm* (Sarstedt, Nümbrecht)
- *Deckgläser 0,13-0,17 mm* (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- *Hitplates* (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- *Hybond™-c-super; supported pure nitrocellulose membrane* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK)
- *Immuno Plates Maxi Sorp™ Surface* (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- *PapPen® Liquid Blocker* (SCI Science Services, München)
- *Pasteurpipetten Plastibrand®* (Brand GmbH, Wertheim)
- *Reaktionsgefäße mit Deckel 1,5 ml* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Reaktionsgefäße ohne Deckel 1,5 ml* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Super Frost Objektträger* (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- *Test tubes 14/100* (Greiner-Bio one GmbH, Frickenhausen)
- *Wallac Sample Bags 1205-411* (Wallac, Turcu, Finnland)

b) Geräte

- *Branson Sonifier B-12* (Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA)
- Drucker: *hp laserjet 1200 series*
- *Electro-Eluter Model 422* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Electrophoresis Power Supply EPS 500/400* (Pharmacia)
- Elisa-Reader: *SLT Rainbow* (SLT LabInstruments, Österreich), Software: *Easybase* (SLT Instruments, Crailsheim)
- *Gel-Dokumentationsanlage BioDoc* (Biometra®, Göttingen)

- *Heat Sealer LKB Wallac* (Wallac, Turku, Finnland)
- Immunfluoreszenz-Mikroskop: *Olympus, Modell U-SDO* (Olympus Deutschland, Hamburg)
- *Küchenmixer (Braun)*
- *Lyophilisator Hetosicc FD 2.5* (Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark)
- *Mini Trans-Blot[®] Cell* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Mini-Protean[®] 3 Electrophoresis Cell* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Mini-Protean[®] Multi-Casting Chamber* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Mixer Ultra turrax* (Janke und Kunkel, Staufen)
- *pH-Meter* (Wissenschaftlich-technische Werkstätten)
- *Pipetboy IBS* (Integra Biosciences)
- *Scanner* (Agfa)
- *Schüttler SM 25* (Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen)
- *Sony Laptop pentium III, Software: Microsoft[®] Windows[®]2000 Professional*
- *Sorvall-Centrifuge RC-5-Superspeed Refrigerated* (DuPont Instruments)
- *Spectrophotometer Ultraspec III* (Pharmacia LKB)
- *Ultracentrifuge TGA* (Kontron[®] Instruments)
- *Waage 5g - 820g* (Sartorius, Göttingen)
- *Waage, fein: Mettler H20T 0,001g-160g* (Mettler-Waagen GmbH, Gießen)

2.2.2 Reagenzien:

- *α -Ketoglutarat –Dehydrogenase aus Schweineherz* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *α -Phenylendiaminedihydrochloride* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Adenosine 5'-Triphosphatase aus Hundeniere* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

- *AEC- (3-Amino-9-Ethylcarbazole-) Tablets* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Ammonium persulfate, analytical grade* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- *Ammoniumbicarbonate (NH₄HCO₃)* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Bovines Serum Albumin* (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- *Citronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇·H₂O)* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- *Coomassie[®] Brilliant Blue G-250* (Serva, Heidelberg)
- *Dimethylformamid research grade* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- *Essigsäure 100% wasserfrei* (Merck, Darmstadt)
- *Glycerin 87% zur Analyse* (Merck, Darmstadt)
- *Glycin* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)
- *Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)* (Merck, Darmstadt)
- *Methanol (CH₃OH), reinst* (Merck, Darmstadt)
- *Natriumacetat-Trihydrat (CH₃COONa)* (Merck, Darmstadt)
- *Natriumcarbonat (NaCO₃)* (Merck, Darmstadt)
- *Natriumchlorid (NaCl)* (Merck, Darmstadt)
- *Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)*(Merck, Darmstadt)
- *PlusOne[™] Silver Staining Kit* (Amersham Biosciences, Sweden)
- *Pyruvatdehydrogenase aus Schweineherz* (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Rotiphorese[®] Gel 40 (19:1)* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- *Saccharose für die Mikrobiologie* (Merck, Darmstadt)
- *Salzsäure (HCl) 32%* (Merck, Darmstadt)
- *Schwefelsäure (H₂SO₄) 25%* (Merck, Darmstadt)
- *SDS (Sodium dodecyl sulfate, C₁₂ H₂₅NaO₄S)* (FLUKA BioChemika, Buchs, Schweiz)

- *Temed (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamide)* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- *TIZMA®Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethane)* (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇)* (Merck, Darmstadt)
- *Triton®X-100* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- *Tween®20* (MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn)
- *Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%* (Merck, Darmstadt)

2.2.3 Antikörper

- *Dako Polyclonal Rabbit anti-human Ig A, Ig G, Ig M, Kappa, Lambda, FITC (Fluorescein-Isothiocyanat-Isomer-1), in Phosphatpuffer mit 15 mmol/l NaN₃, pH 7,2* (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- *Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat anti-human Ig G, Fc5μ fragmented specific* (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove, PA, USA)
- *Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat anti-human Ig M, Fc5μ fragmented specific* (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove, PA, USA)
- *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP* (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/HRP* (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)

2.2.4 Gewebeschnitte

Das Anfertigen der Kryostatschnitte von Rattenleber,-niere,-magen und –herz sowie menschlicher Schilddrüse auf Objektträgern für den Immunfluoreszenztest wurde freundlicherweise von Frau Susanne Duman übernommen.

2.2.5 Pufferansätze und andere selbst hergestellte Flüssigkeiten

- 0,2 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6
- 1 M Trispuffer pH 6,8 (HCl)
- 10 %ige SDS-Lösung
- 10 mMol Trispuffer pH 7,4
- 3 M Trispuffer pH 8,9 (HCl)
- 60 mM PBS, pH 7,4
- BSA-Puffer (60 mM PBS, pH 7,4 plus 3% Rinderalbumin (BSA))
- 0,1M Citratpuffer, pH 5,0
- Coomassie – Blue Proteinfärbelösung 0,1%ig
- Elektrodenpuffer pH 8,3 nach Laemmli (41)
- ELISA-Waschpuffer I (PBS, 60mM, pH 7,4) plus 0,5% BSA)
- ELISA-Waschpuffer II (WP I plus 0,2% Triton X 100)
- Gel Entfärbelösung (65% Aqua dest., 25% Methanol, 10% konz. Essigsäure)
- Mercaptoethanolpuffer nach Laemmli (41)
- Proteinelutionspuffer: 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffer plus 0,1 % SDS
- Transferpuffer pH 8,3 (78)
- Westernblot Waschpuffer (60 mM PBS, pH 7,4 plus 0,25 % Rinderalbumin plus 0,25% Tween[®]-20)

2.3 Methoden

2.3.1 Immunfluoreszenztest

Vorbereitete Gefrierschnitte (-70°C) wurden aufgetaut und jeder Objektträger mit einem PapPen® in 3 Teile unterteilt. So entstehen drei Versuchsfelder pro Objektträger mit je 5 Organschnitten (Rattenleber, Rattenherz, Rattenniere, Rattenmagen und menschliche Schilddrüse). Die Seren werden mit PBS-Puffer 1:5 verdünnt, auf die Versuchsfelder mit einer Plastikpipette aufgetragen und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Objektträger vorsichtig mit PBS abgespült und zweimal 15 Min. in PBS auf dem Rüttler gewaschen. Nun werden die Versuchsfelder mit den mit FITC verbundenen, 1:45 verdünnten Antikörpern (Dako Kappa Lambda IgG, IgM und IgA) großzügig bedeckt, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wiederum zweimal 15 Min. mit PBS gewaschen. Die Objektträger werden unter Zugabe von Eindeckmittel (50% Glycerin + 50% PBS) mit einem Deckglas bedeckt.

Die AMA-Fluoreszenz ist charakterisiert durch eine feingranuläre zytoplasmatische Fluoreszenz der proximalen und distalen Tubuli der Niere, der Parietalzellen der Magenschleimhaut, der Hepatozyten, der Epithelzellen der Schilddrüsenfollikel sowie Färbung der Herzmuskelfasern.

2.3.2 Antigengewinnung

In Eis gekühlte Rattenleber, Rinderherz und Schweinenieren werden wie zur M2-Gewinnung nach Beechey et al. (13) bei 4°C aufgearbeitet. Dazu wird entsprechendes Gewebe in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, gewaschen, abgewogen und bei -70°C bis zum Verarbeitungstag eingefroren. Nach Auftauen der Gewebe werden zu je 250g 500 ml Tris-Puffer (wie oben) gegeben und etwa 30 sec. in einem Küchenmixer auf höchster Stufe zerkleinert. Während des Mischens werden je 5 ml einer 1M Tris-Lösung zupipettiert, um einem zu starken Absinken des pH-Wertes entgegenzuwirken. Zum weiteren Zellaufschluss wird anschließend für 15 s mit einem Ultra turrax behandelt. Das

Gewebehomogenat wird mit 1M Tris-Lösung auf pH 7,4 eingestellt und bei 2000 rpm (545 g) 10 Min. in der Sorvall GSA Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei 10 000 rpm (13 630 g) für 10 Min. zentrifugiert. Die Mitochondrien befinden sich nun im Pellet, welches resuspendiert, mit einem Glaspotter homogenisiert und dreimal je 10 Min. bei 11 000 rpm gewaschen wird (Sorvall SS 34). Danach werden die Pellets mit etwas Puffer resuspendiert und bei – 20° C eingefroren. Aufgetautes Homogenat wird in kleinen Fraktionen mit Ultraschallwellen behandelt und anschließend in einer Ultrazentrifuge bei 100 000g zentrifugiert. Die Überstände der jetzt freigesetzten submitochondrialen Partikel werden als Antigen bei der Suche nach neuen antigenen Strukturen respektive Antikörpern eingesetzt. Dieses „Antigengemisch“ enthält Fragmente der äußeren Mitochondrienmembran, die intermembranöse Matrix der Mitochondrien und Reste der inneren Mitochondrienmembran.

Die im Pellet konzentrierten submitochondrialen Partikel werden je nach Organ mit oder ohne Chloroformbehandlung (Herz und Niere mit, Leber ohne) und weiteren Zentrifugationsschritten bei 1000 rpm und 33 000 rpm zur Gewinnung des M2-Antigens (früher: „ATPase-Fraktion“) weiterverarbeitet.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Alle zur Durchführung dieser Arbeit notwendigen Proteinbestimmungen wurden nach der Bradford-Methode (21) gemacht. Als Reagenzlösung wurde BIOQUANT[®]-Reagenz verwendet und die Proben wurden bei 595 nm in Plexiglasküvetten im Spectrophotometer Ultraspec III gemessen. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit BSA angefertigt. Die Messproben bestanden je aus 50 µl Probelösung und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz, die Standardlösung aus 50 µl bidestilliertem Wasser und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz.

2.3.4 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

2.3.4.1 Serumverdünnungen

Die zu testenden Seren wurden beim Screening nach neuen Antikörpern 1:1000 verdünnt. Diese Verdünnung wurde gewählt, da sie sich im Routinelabor zum Nachweis von Antikörpern gegen submitochondriale Partikel sowie M2 und M4 bewährt hat.

Beim Einsatz spezifischer Antigene wurden die optimale Serumverdünnung mit Serumverdünnungsreihen (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 usw. bis 1:1000) austitriert.

2.3.4.2 Antigene und Antigenkonzentrationen

Bei der Suche nach neuen antigenen Strukturen bzw. Antikörpern wurden 100 000 g Überstände von submitochondrialen Partikeln von Rinderherz, Schweineiere und Rattenleber verwendet. Zur Kontrolle wurden außerdem gekaufte Pyruvatdehydrogenase (SIGMA) sowie α -Ketoglutaratdehydrogenase (SIGMA) eingesetzt. Beide Enzyme sind Untereinheiten des M2-Komplexes, wobei die Pyruvatdehydrogenase der 70 kD Untereinheit entspricht und die α -Ketoglutaratdehydrogenase der 52 kD Untereinheit. Alle Antigene wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml verwendet.

Beim Austesten des isolierten Antigens wurde immer selbst isoliertes, gereinigtes Protein (siehe 2.3.2 und 2.3.8) eingesetzt. Zur Testung auf Kreuzreaktivität wurde kommerziell hergestellte Na^+/K^+ -ATPase aus Hundeniere (SIGMA) verwendet. Beide Proteine wurden in einer Konzentration von 2 μ g/ml eingesetzt.

2.3.4.3 Durchführung des ELISA

Mikrotiterplatten (Maxi-Sorb, Nunc) werden 16 Stunden bei +4°C mit in Bikarbonatpuffer (0,2M, pH 9,6) verdünnten Antigenen inkubiert. Danach folgt viermaliges Waschen über 15 Min. im ELISA-Waschpuffer I (PBS, 60mM, pH 7,4 plus 0,5% Rinderalbumin (BSA)) zur Abdeckung noch freier Bindungsstellen auf der Platte. Anschließend werden je Loch 100 μ l Serumverdünnung pipettiert

und über 90 Min. bei RT inkubiert. Es folgt viermaliges Waschen über 15 Min. in ELISA- Waschpuffer II (WP I plus 0,2% Triton X 100). So werden nichtgebundene Proteine entfernt, zugleich verhindert Triton X 100 unspezifische Bindungen. Peroxidase-konjugierte Antihuman Ig G- und Ig M-Antikörper der Ziege wurden mit WP II 1:3333 bzw. 1:2000 verdünnt und je 100 µl/Loch über 60 Min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten wie oben beschrieben in WP II gewaschen.

Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von α -Phenylendiamin (gelöst in Citratpuffer 0,1M, pH 5,0) mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gestartet und nach guter Farbentwicklung der Positivkontrollen mit 25%iger Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt. Die Absorptionen werden im ELISA Einlesegerät (SLT rainbow) bei 450 nm gemessen (Easybase, SLT) und als $\Delta A/\text{Min.}$ angegeben.

2.3.5 Gelelektrophorese und Immunoblotting

2.3.5.1 Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Laemmli (41) selbst gegossen, wobei ein 3,7%iges Sammelgel und ein homogen 10%iges Trenngel verwendet wurden. Je nach gewünschter Untersuchung wurden die Geltaschen mit 52 µg PDH (SIGMA), 69 µg α -Ketoglutaratdehydrogenase, 18 µg M2, 290 µg von Leber SMP Überstand, 276 µg von Nieren SMP Überstand, 81 µg Herz SMP Überstand, 84 µg selbst eluiertes Antigen, 3 µg Herz SMP SN Gradient 5, 15 µg industrielle Na^+/K^+ -ATPase (SIGMA) oder 5 µl Molekulargewichtsmarker (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) befüllt.

Die SDS-Gele wurden entweder direkt mit Coomassieblau G-250 oder mit Silbernitrat angefärbt oder für die Übertragung auf Nitrocellulosefolien weiterverwendet.

2.3.5.2 Transferbedingung

Nach der Beschreibung von Towbin et al. (78) wurden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine nach dem Lauf auf Nitrocellulosefolien übertragen. Dazu wurden die SDS-Gele in dichter Packung,

luftblasenfrei, zwischen in Transferpuffer getränkte Schwämme, Filterpapier und Nitrocellulosefolie im Sandwichmodell geschichtet.

In einer Transferkammer wurden die Proteine bei 100 V während 60 Min. unter Kühlung und Pufferumwälzung transferiert. Nach dem Transfer wurden die Nitrocellulosepapiere mindestens zwei Stunden mit 3%igem BSA-Puffer inkubiert.

2.3.5.3 Inkubation und Anfärbung der Nitrocellulosepapiere

Sowohl Kontroll- als auch Patientenseren wurden 1:50 mit Serumverdünnungspuffer verdünnt. 6 ml der Verdünnung wurden mit der antigenbeschichteten Nitrocellulosefolie über 45 Min. bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler inkubiert. Nach Waschen für je 10 Min. in Westernblot Waschpuffer (60 mmol PBS plus 0,25% BSA plus 0,25% Tween[®]-20) wurden die Folien mit 1:200 verdünnten IgG und IgM-HRP Anti-Human-Antikörpern für 30 Min. auf dem Schüttler bei RT inkubiert und mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) angefärbt.

2.3.6 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch mehrmaliges Zuordnen der Bande gegenüber vorgefärbte Standards (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad). Als Referenzproteine dienten folgende Marker:

Myosin 200 000 d, β -Galaktosidase 116 250 d, Phosphorylase b 97 400 d, Serumalbumin 66 200 d, Ovalbumin 45 000 d, Karboanhydrase 31 000 d, Trypsinhibitor 21 500 d, Lysozym 14 400 d, Aprotinin 6 500 d.

2.3.7 Antigenkonzentrierung, Antigenisolierung, Antigenidentifikation

2.3.7.1 Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁)

Es werden zehn verschiedene Saccharoselösungen (10% - 59%) mit aqua dest. hergestellt (siehe Tabelle 2.9). Diese können bei -20°C konserviert oder bei +4°C direkt verwendet werden. Die verschiedenen Saccharoseansätze werden ihrem spezifischen Gewicht nach aufsteigend in in Eis eingebetteten Reagenzgläsern (Beckman ultra-clear[™] centrifuge tubes) vorsichtig

übereinandergeschichtet (jeweils 1 ml). Nachdem zehnmal je 1 ml pipettiert wurde, werden 2 ml Antigenlösung (Rinderherz SN SMP) darauf pipettiert. Nun folgt die Zentrifugation über 24 h bei +4°C und 100 000g, Schwingrotor Sw 40, Ultrazentrifuge RC-5.

Danach werden jeweils zwei Gradienten gemeinsam mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgetragen. Es stehen nun sechs Dichtegradienten à 2 ml zur Verfügung (im folgenden G1-G6 genannt, wobei G1 = <1,04, G2 = 1,04-1,08, G3 = 1,1-1,12, G4 = 1,14-1,16, G5 = 1,18-1,2 und G6 = 1,24-1,28 entsprechen (vgl. Tabelle 1.10).

Diese werden im Immunoblot mit Hilfe von bekannt reagierenden Seren auf ihre Antigenaktivität weiter untersucht.

Tabelle 2.9: Spezifische Gewichte von wässrigen Saccharose-Lösungen (4°C) (Nach LANGE, N.A. (Hrsg.), *Handbook of Chemistry*, Sandusky (1956); und HODGMAN et al. (Hrsg.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 1958/59, 40.Aufl., Cleveland (1958).

Spezifisches Gewicht	Gramm pro Liter	%
$C_{12}H_{22}O_{11}$		
1,0341	103,8	10
1,0810	216,2	20
1,0990	263,8	24
1,1222	325,4	29
1,1415	376,7	33
1,1612	429,7	37
1,1816	484,5	41
1,2025	541,1	45
1,2406	645,1	52
1,2806	755,6	59

2.3.7.2 Antigenisolierung: Bandenexzision, Elektroelution

Mittels Westernblot identifizierte Determinanten wurden entsprechenden Banden in Coomassie Blue gefärbten Gelen zugeordnet, die dann mit einem Skalpell ausgeschnitten wurden. Das Antigen wurde im Bio-Rad Electro Eluter Modell 422 nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung eines 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffers mit 0,1% SDS bei 58 mA über 4 Stunden eluiert. Zur Verminderung der SDS-Konzentration im Eluat wurde, wie vom Hersteller empfohlen, 30 Min. vor Ende der Elutionszeit der Elutionspuffer gegen SDS freien Elutionspuffer (50 mM Ammoniumbikarbonatpuffer) ausgetauscht. Jeweils 600 µl Antigeneluat wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen lyophilisiert und danach mit ca. 100 µl aqua dest. resuspendiert.

2.3.8 Antigenanalyse

Die Proteinidentifizierung wurde anhand von „peptide mass fingerprints“ durch die Massenspektrometrie (MALDI-TOF) freundlicherweise von Jörn Dengjel (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abtl. Immunologie) durchgeführt.

Bei dieser Methode werden angefärbte Proteinbanden aus SDS-Gel ausgeschnitten, entfärbt und drei Stunden lang einem Verdau mit Schweinetrypsin ausgesetzt. Die Peptidmixturen werden wiederum elektrophoresiert und mittels 1%iger Ameisensäure vom Gel extrahiert. So werden mehrere „Fingerabdrücke“ eines Proteins angefertigt und mehrere Fragmente des Verdau in der Massenspektrometrie sequenziert. In Kenntnis mehrerer Peptide kann über Protein-Datenbanken ein Molekül mit hoher Sicherheit identifiziert werden (61).

3. Ergebnisse

3.1 Screening nach neuen Antigen-Antikörper-Systemen

3.1.1 Immunfluoreszenztest (IFT)

In allen 73 AMA-positiven / Anti-M2 negativen Seren wurde die AMA-Reaktivität im IFT nochmals verifiziert. (Vgl. Abb. 3.1.)

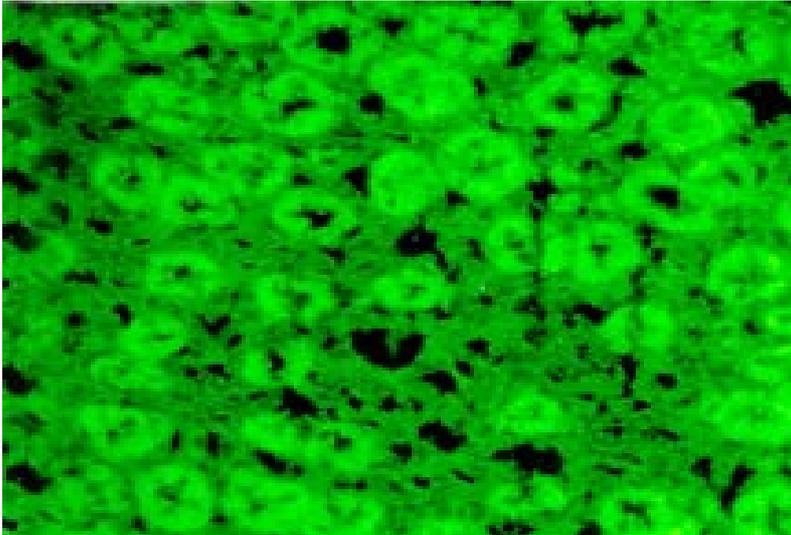


Abb. 3.1: Positiver Immunfluoreszenztest für antimitochondriale Antikörper: feingranuläre Fluoreszenz der proximalen Nierentubuli. Kryostatschnitt von Rattenniere, FITC markiert.

3.1.2 Ergebnisse in ELISA

51 der 73 Seren von Anti-M2 negativen, AMA positiven sowie acht Anti-M2 positive Seren von Patienten mit PBC wurden im ELISA gegen 100 000 g Überstände (SN) von submitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherz (Rh), Rattenleber (RI) und Schweinenieren (Sn) getestet. Kommerziell gefertigte Pyruvatdehydrogenase (PDH) und α -Ketoglutaratdehydrogenase (OADH) (SIGMA, Steinheim, Deutschland; beide aus Schweineherz) enthalten M2a + M2c und dienten somit als Positivkontrolle für Anti-M2 positive PBC Seren.

Anti-M2 negative PBC Seren reagierten besonders häufig mit Rh SMP SN, PDH und OADH (45,1 %, 45,1% bzw. 47,1%), Anti-M2 positive Seren reagierten mit allen fünf Antigenen. Vgl. Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Positive Reaktionen von Anti-M2 negativen, AMA positiven Seren von Patienten mit PBC gegen Überstände (SN) von submitochondrialen Partikeln (SMP) im ELISA. Als positiv gewertet wurden OD-Werte > MW + 3 SD von 7 gesunden Blutspendern. PDH= Pyruvatdehydrogenase, OADH = α -Ketoglutaratdehydrogenase.

PBC Seren	Anzahl	Rinderherz	Rattenleber	Schweinenieren	PDH	OADH
		SMP SN Anzahl (%)	SMP SN Anzahl (%)	SMP SN Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
AMA pos/ Anti-M2 neg.	n= 51	23 (45,1)	16 (31,4)	20 (39,2)	23 (45,1)	24 (47,1)
AMA pos./ Anti-M2 pos.	n= 8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)

3.1.3. Ergebnisse im Immunoblot (Westernblot)

43 der 73 Anti-M2 negativen Seren wurden im Westernblot gegen die gleichen Antigene wie in 3.1.2 getestet (PDH, OADH, je 100 000 g Überstände von Rinderherz SMP, Rattenleber SMP und Schweinenieren SMP). Als positive Reaktion wurde eine gut gefärbte, klar geschnittene Bande gewertet. Drei verschiedene Anti-M2 positive Seren von Patienten mit PBC dienten als Positivkontrolle (siehe Abb. 3.2)

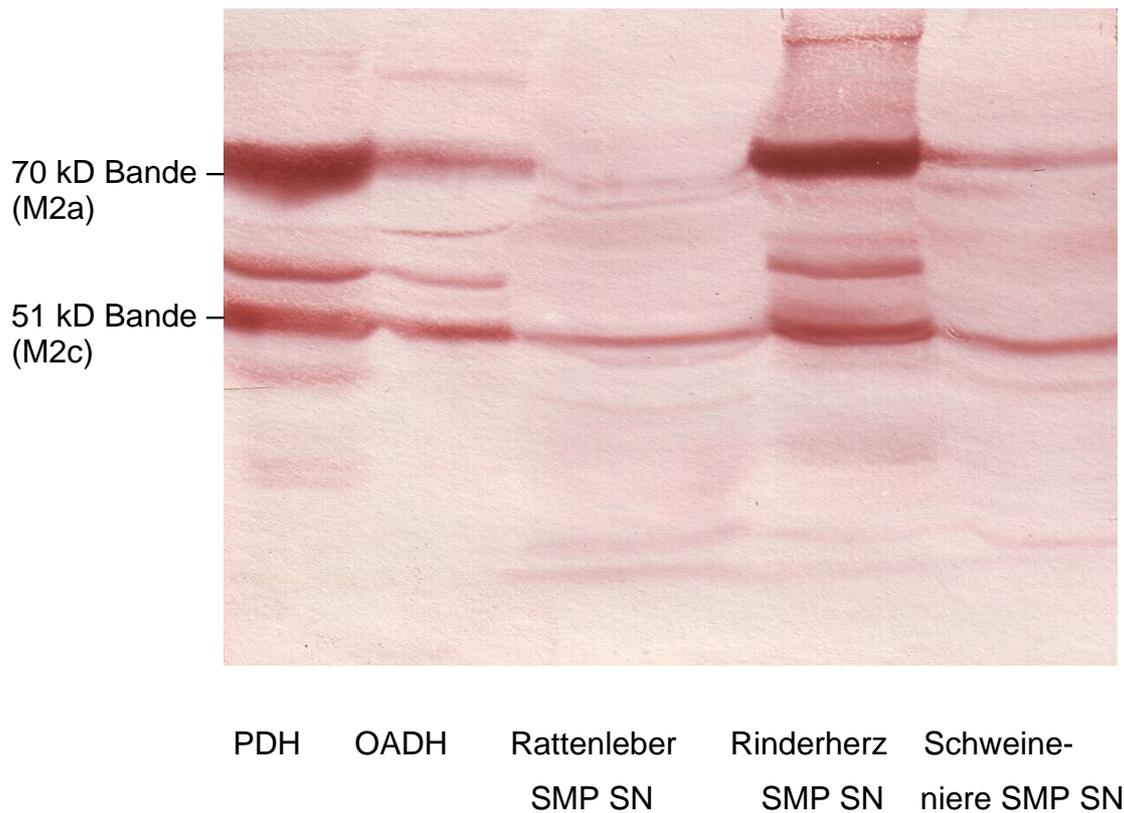
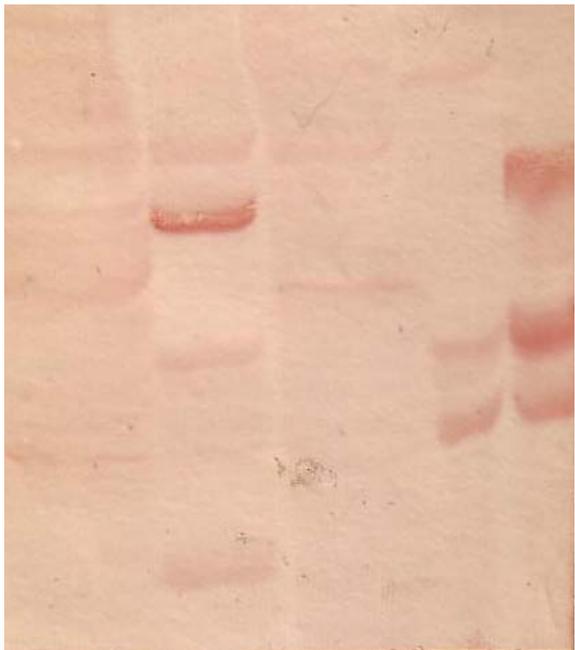


Abb. 3.2: Positivkontrolle: Westernblot eines Anti-M2 positiven Serums. Gut zu sehen sind die M2a-Bande bei 70 kD und die M2c-Bande bei 51 kD.

Positive Reaktionen fanden sich in der Gruppe der AMA positiven, Anti-M2 negativen Seren (n=43) im Westernblot mit allen getesteten Antigenen sowie mit PDH und OADH, jedoch hatten die Determinanten unterschiedliche Molekulargewichte (vgl. Tabl. 3.2).

Die häufigsten positiven Reaktionen fanden sich mit dem 100 000 g Überstand von Rinderherz Submitochondrialen Partikeln mit 60,5%. Reaktionen mit PDH und OADH waren in der Gruppe der AMA-positiven, Anti-M2 negativen Seren von Patienten mit PBC auf Höhe der Komponenten des M2-Komplexes durchweg unspezifisch: es fanden sich keine scharf geschnittenen Banden. Abb. 3.3 und 3.4 zeigen positive Reaktionen mit Rinderherz Submitochondrialen Partikeln bei gleichzeitig negativer Reaktion gegen alle übrigen Antigene.

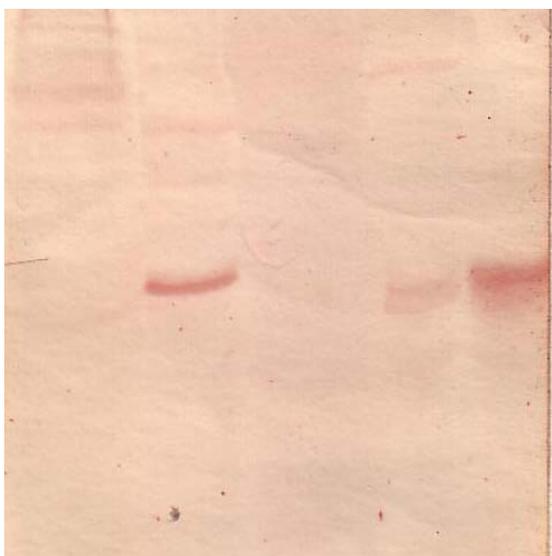


-ca.70 kD
Bande

Schweine- Rinder- Ratten- OADH PDH
nieren herz leber
SMP SN SMP SN SMP SN

glutaratdehydrogenase (OADH) wurden als unspezifisch gewertet.

Abb. 3.3: AMA positives, Anti-M2 negatives Serum eines Pat. mit PBC im Westernblot (10% Acrylamidgel). Zu sehen ist eine scharf geschnittene Bande bei etwa 70 kD im Lauf von 100000 g Überstand von Rinderherz Submitochondrialen Partikeln. Die unscharfen Banden im Lauf von Pyruvatdehydrogenase (PDH) und α -Keto-



-60 kD
Bande

Schweine- Rinder- Ratten- OADH PDH
nieren herz leber
SMP SN SMP SNSMP SN

Abb. 3.4: Westernblot eines AMA positiven, Anti-M2 negativen Serums eines Pat. mit PBC. Zu sehen ist eine scharf geschnittene Bande bei 60 kD im Lauf von Rinderherz SMP SN (100 000g Überstand von Submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz. Die Reaktionen gegen alle anderen Antigene sind negativ. Auch die etwa

gleich hohe Bande in PDH (Pyruvatdehydrogenase) ist als negativ zu werten, da sie unspezifisch bereits von dem Peroxidase konjugierten Anti-Human Ig G-Antikörper erkannt wird.

Tabelle 3.2: Positive Reaktionen von 43 Anti-M2 negativen Seren von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose gegen 100 000g Überstände von Submitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherz (Rh), Rattenleber (RI) und Schweineniere (Sn) im Westernblot unter Verwendung von 10 %igem Sammelgel (Acrylamidgel).

	Rh SMP SN Anzahl (%)	RI SMP SN Anzahl (%)	Sn SMP SN Anzahl (%)
total n = 43	26 (60,5)	12 (27,9)	19 (44,2)

3.1.4 Gruppenbildung

Bei 26 der 43 Patienten (60,5%) war eine Reaktion mit Rh SMP SN zu beobachten. 14 dieser 26 Patienten (53,8%) wiesen eine identische Reaktion bei 60 kD auf. Bei 10 Patienten (38,5%) wurde eine 70 kD Determinante beobachtet (Abb.3.5).

Mit den SMP SN aus Rattenleber und Schweineniere fanden sich positive Reaktionen nur bei 27,9% bzw. 44,2%. Seren von maximal 6 Patienten reagierten mit identischen Proteinbanden (z. B. bei ~ 20 kD gegen RI SMP SN).

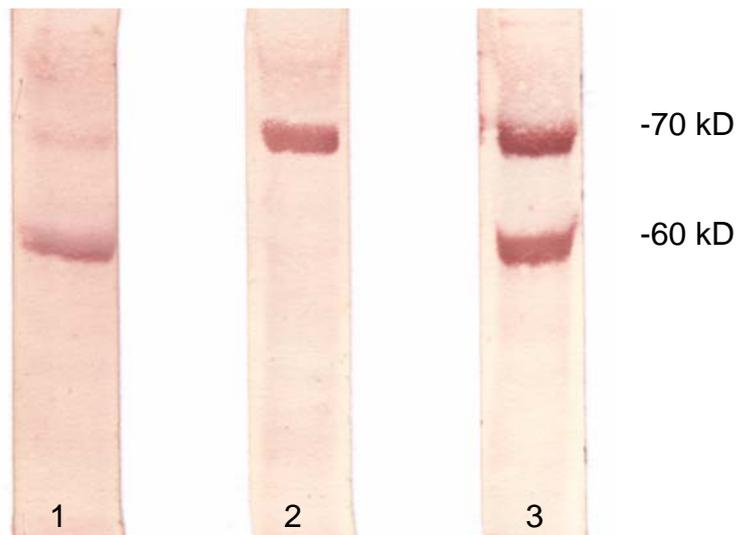


Abb. 3.5: Gruppenbildung: Reaktionen von drei AMA positiven/ Anti-M2 negativen PBC-Seren im Westernblot unter Verwendung von Rh SMP SN.

3.2 Antigenisolierung

3.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

In der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Antigene, die in Rh SMP SN enthalten sind, getrennt. Dabei entstanden sechs Saccharosegradienten mit Dichten von $< 1,04$ bis $1,24-1,28$, da jeweils zwei Schichten gemeinsam abgenommen werden (vgl. Kap. 2.3.7.1).

Elektrophorese und Westernblotting der Gradienten 1-6 zeigte, dass die Antigene beide im Gradient 5 (Dichte $1,18-1,20$) enthalten sind (vgl. Abb. 3.6 und 3.7)

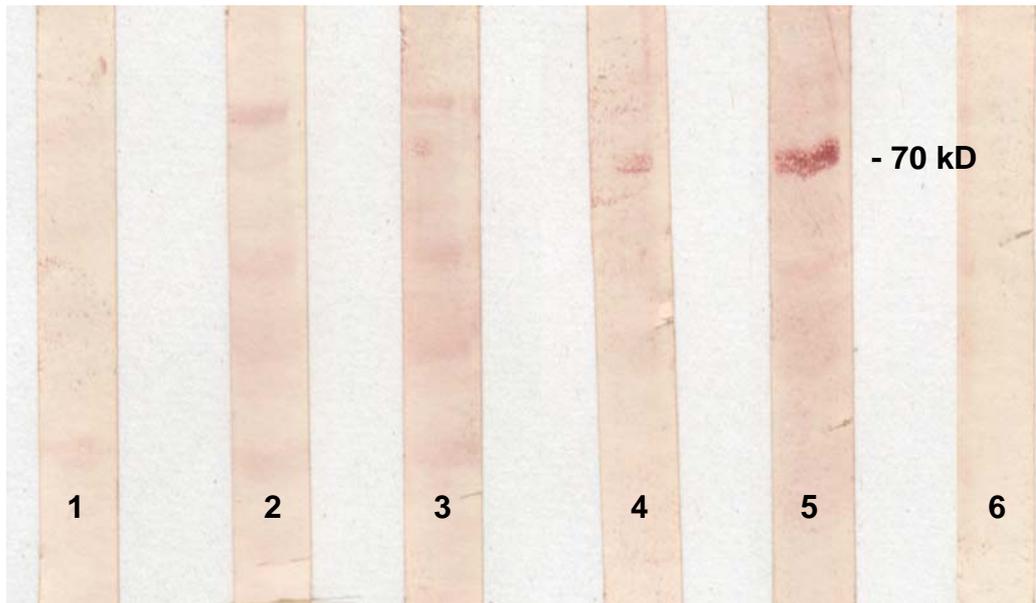


Abb. 3.6: Analyse der Dichtegradientenstufen nach Zentrifugation eines 100 000g Überstandes von Rinderherz SMP SN im Hinblick auf den Nachweis des 70 kD- Proteins: Westernblot eines AMA positiven, Anti-M2 negativen Serums, das mit Rh SMP SN bei 70 kD reagiert hatte. Die Nummern auf den abgebildeten Nitrocelluloseträgern bezeichnen die Dichtegradienten (1= Dichtegradient <1,04; 2= Dichtegradient 1,04-1,08; 3= Dichtegradient 1,10-1,12; 4= Dichtegradient 1,14-1,16; 5= Dichtegradient 1,18-1,20; 6= Dichtegradient 1,24-1,28).

3.2.2 Austestung des Gradienten 1,18-1,20 (G5) gegen weitere Seren

Fünf der Seren, die mit Rh SMP SN entweder bei 60 oder 70 kD reagiert hatten, wurden nun gegen Rh SMP SN G5 ausgetestet. Hier konnte gezeigt werden, dass auch das 60 kD Antigen in G5 enthalten ist.

Vgl. Abb. 3.7

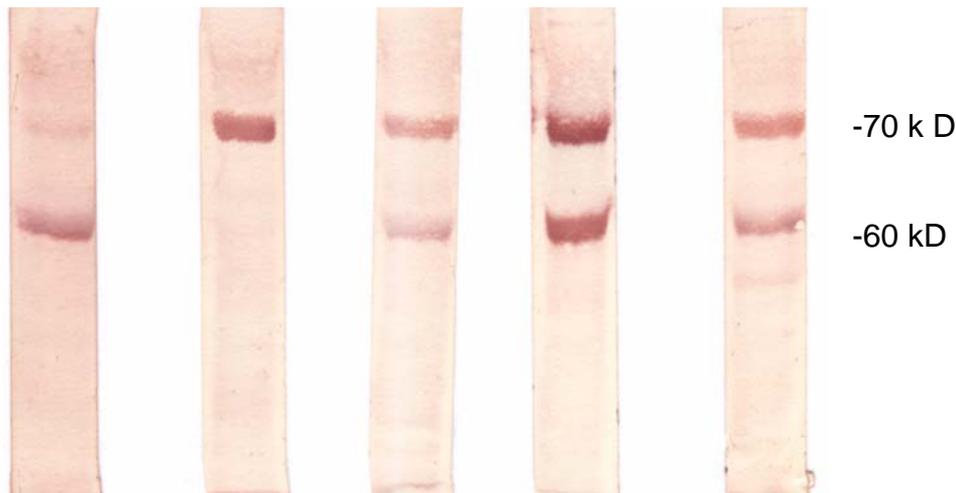


Abb. 3.7: Austestung von fünf Anti-M2 negativen PBC Seren, die zuvor mit Rh SMP SN reagiert hatten, gegen Rh SMP SN G5 (Dichtegradient 1,18-1,20). Die Abbildung zeigt, dass sowohl das 70 kD - als auch das 60 kD - Protein im Gradient 5 enthalten sind.

3.3 Elektroelution, Konzentrierung und Analyse

Nach der Elektrophorese von Rh SMP SN G5 in 10%igen Acrylamidgelen wurden die Gele mit Coomassie-Blue G-250 gefärbt und die den Blots korrespondierende 60 kD-Bande ausgeschnitten. (Abb.3.8)

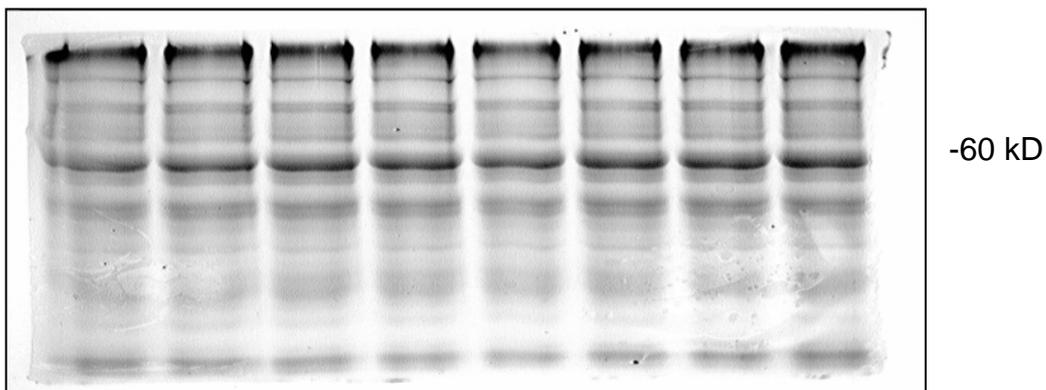


Abb. 3.8: Nachweis unterschiedlicher Proteindeterminanten in der Elektrophorese nach Auftrennung von G5 (10% Acrylamidgel, Coomassie-Blue-Färbung). Die Bande bei 60 kD entspricht der Bande, die Anti-M2 negative PBC Seren im Westernblot gezeigt haben. Sie wurde per Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und elektroeluiert.

Danach wurden die max. 1cm langen Gelteilchen in 50 mmol Ammoniumbikarbonatpuffer (plus 0,1% SDS) elektroeluiert. Das Eluat wurde zur SDS-Reduktion 30 Min. gegen 50 mmol Ammoniumbikarbonatpuffer ohne SDS elektrodialysiert. Nach diesem Schritt wurde das Eluat noch etwa 5-fach konzentriert, indem ca. 500 µl Eluat lyophilisiert und mit 100 µl aqua dest. resuspendiert wurden.

Mit dem Eluat der 60 kD-Bande wurde erneut eine SDS Elektrophorese durchgeführt. Aus diesem Gel folgte die Proteinanalyse per Massenspektrometrie (MALDI-TOF) im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Tübingen, freundlicherweise durchgeführt von Jörn Dengjel.

Die Analysen ergaben, dass es sich bei der Bande entweder um mitochondriale F₁-ATPase oder Komplex III der Elektronentransportkette (syn.: Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, Cytochrom-bc1-Komplex) handelt. Hinsichtlich der F₁-ATPase konnten Fragmente der β-,δ- und ε- Kette identifiziert werden, bezüglich der Cytochrom-c-Oxidoreduktase konnten noch keine Zugehörigkeiten zu bestimmten Untereinheiten ausgemacht werden. Zur Sicherheit wurde von später angefertigten Gelen wiederholt Proben analysiert, die das gleiche Ergebnis erbrachten.

3.4 Reaktionen von AMA positiven/ Anti-M2 negativen PBC Seren mit selbst isoliertem 60 kD-Antigen und kommerzieller Na⁺/K⁺-ATPase im Westernblot

Zehn Seren von Patienten mit Anti-M2 positiver PBC und drei Seren von Patienten mit Anti-M2 negativer PBC (gezielt ausgesucht, mit zu erwartender positiver Reaktion) wurden im Westernblot gegen selbst isoliertes 60 kD-Antigen mit der Frage nach Kreuzreaktionen gegen kommerzielle Na⁺/K⁺-ATPase (=Adenosine 5'-Triphosphatase, aus Hundeniere; SIGMA, Steinheim) getestet.

Sieben von zehn Anti-M2 positiven Seren reagierten mit selbst isoliertem Antigen, fünf dieser zehn reagierten auch mit dem kommerziellen Enzym bei 60 kD. Drei Anti-M2 negative PBC Seren reagierten eindeutig mit beiden Präparaten, aber nicht mit M2-Antigen. Seren von Patienten mit anderen oder keiner Erkrankung reagierten mit keinem der verwendeten Antigene.

Um zu testen, ob sich auf höherprozentigem Acrylamidgel das selbst isolierte 60 kD Antigen eventuell in mehrere Banden aufspalten würde und man so bessere Aussagen über die antigene Untereinheit treffen könnte, wurde hier in einigen Fällen ein homogen 15 %iges Trenngel verwendet (bei 3,7 %igem Sammelgel). Das höher prozentige Trenngel zeigte jedoch weder in der Coomassie-Färbung noch unter Anfärbung mit Silber eine weitere Auftrennung der Bande.

In diesem Arbeitsschritt zeigte sich also, dass

1. das selbst isolierte Antigen bei 60 kD ein eigenständiges Antigen ist, das keinesfalls zum M2-Komplex dazugehört,
2. dieses Antigen nicht im herkömmlichen M2 enthalten ist,
3. die meisten der Anti-M2 positiven PBC-Seren (70%) auch mit dem 60 kD Antigen reagieren,
4. die PBC Seren, die Antikörper gegen das Antigen bei 60 kD enthalten, mit kommerziell hergestellter Na^+/K^+ -ATPase (Sigma) auf gleicher Höhe reagieren.

Vgl. hierzu Tabelle 3.2 und Abb. 3.9a+b.

Tabelle 3.3: Austestung von ausgewählten Anti-M2 negativen PBC-Seren, Anti-M2 positiven PBC-Seren und Seren von Patienten mit anderen/keinen Erkrankungen gegen selbst isoliertes Antigen bei 60 kD, kommerziell hergestellte Na⁺/K⁺-ATPase und M2-Antigen im Westernblot unter Verwendung von 12%igen oder 15%igen Sammelgelen.

Erkrankung	Zahl	Kommerzielle Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	60kD Antigen Eluat	M2
Anti-M2 neg. PBC	3	3	3	0
Anti-M2 pos. PBC	10	5	7	10
Autoimmune Hepatitis	3	0	0	0
Primäre Sklerosierende Cholangitis	2	0	0	0
Kollagenerkrankung	3	0	0	0
Gesunde Spender	1	0	0	0

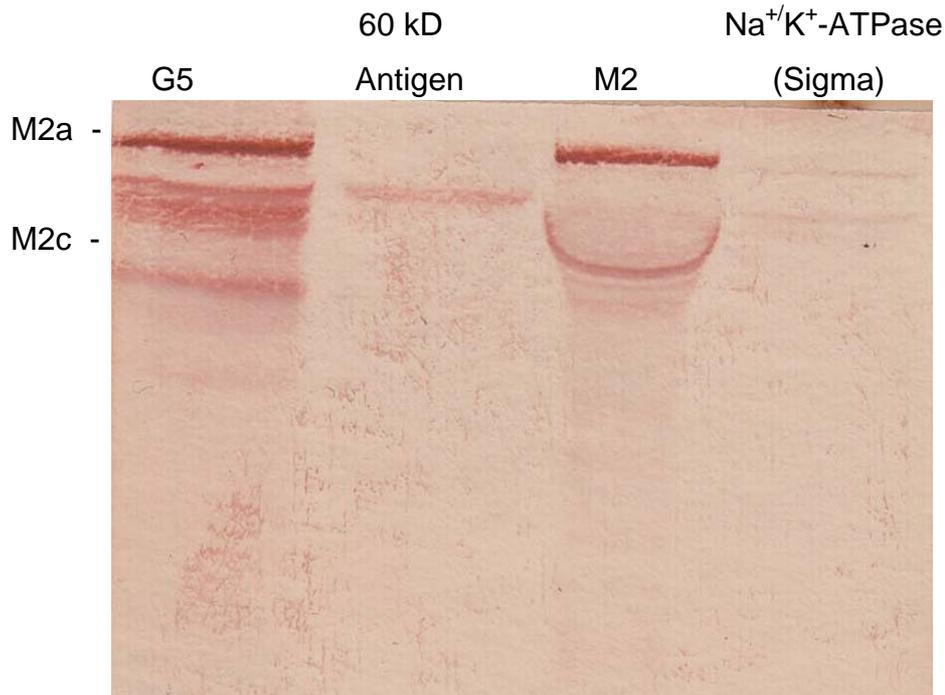


Abb. 3.10: Westernblot eines Anti-M2 positiven PBC Serums (15 %iges Gel). Gut zu sehen ist, dass Teile des M2-Komplexes im 5. Gradient enthalten sind (A-Bande). Die Reaktionen gegen eigenes 60 kD Antigen und kommerziell hergestellte Na⁺/K⁺-ATPase sind hier so schwach, dass sie nicht positiv gewertet wurden.

3.5 Reaktionen von AMA pos./ Anti-M2 neg. PBC-Seren mit selbst isoliertem 60 kD Antigen und Na⁺/K⁺-ATPase im ELISA

54 der 73 Seren von AMA pos./ Anti-M2 neg. Patienten wurden im ELISA gegen selbst isoliertes 60 kD Antigen sowie kommerzielle Na⁺/K⁺-ATPase getestet.

Die Austitrierung von Kontrollseren (vgl. Kap. 2.3.4.1) in Serumverdünnungsreihen zeigte bei Verdünnungen von 1:200 und 1:300 die beste Differenzierung zwischen positiver und negativer Reaktion, so dass für die Antigenaustestung im ELISA eine Serumverdünnung von 1:250 gewählt wurde.

Als positive Reaktion wurde hier der Mittelwert der gesunden Spender plus zwei Standardabweichungen gewählt. Allerdings wurden bereits bei diesen

gesunden Spendern teilweise sehr hohe OD-Werte erreicht und starke interindividuelle Unterschiede beobachtet, so dass die errechneten Grenzwerte (Ak gegen 60 kD Antigen: Ig G = 526,3 OD, Ig M = 323,1 OD, Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Ak: IgG = 381,2 OD, Ig M= 649,2 OD) zum einen sehr hoch lagen und zum anderen stark streuten.

Die Ergebnisse mit selbst isoliertem Antigen waren durchweg unspezifisch. Die Analyse der verschiedenen Patientengruppen ergab keine eindeutige Zuordnung der mit dieser Methode gemessenen Antikörper und einer bestimmten Erkrankung. Seren, von denen eine positive Reaktion gegen das 60 kD Antigen aus vorherigen Westernblots bereits bekannt war, reagierten im ELISA teilweise negativ, andererseits ließen sich hochpositive Antikörpertiter im ELISA bei nicht PBC-Patienten im Westernblot nicht verifizieren (s.u.).

Ähnliche Ergebnisse fanden sich unter Verwendung der kommerziellen Na⁺/K⁺-ATPase (Abb. 3.12), d.h. nach unseren bisherigen Daten scheint die ELISA-Methode nicht für den Nachweis von Antikörpern gegen das 60 kD Antigen geeignet zu sein.

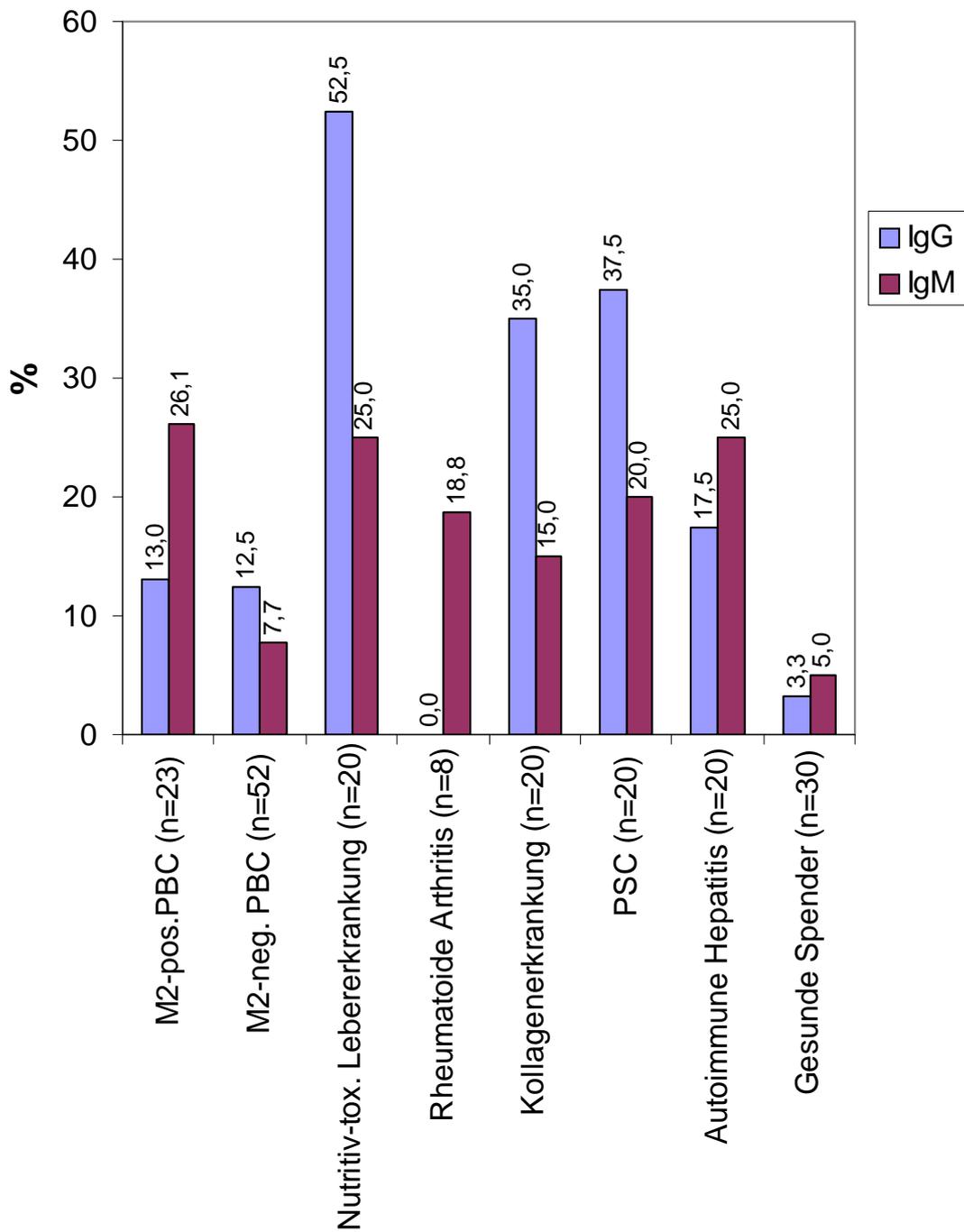


Abb. 3.11: Analyse von Anti-M2 positiven und Anti-M2 negativen Patienten mit PBC im ELISA unter Verwendung von selbst isoliertem 60 kD Antigen und Vergleich mit anderen Patientengruppen: Häufigkeit positiver Reaktionen in Prozent.

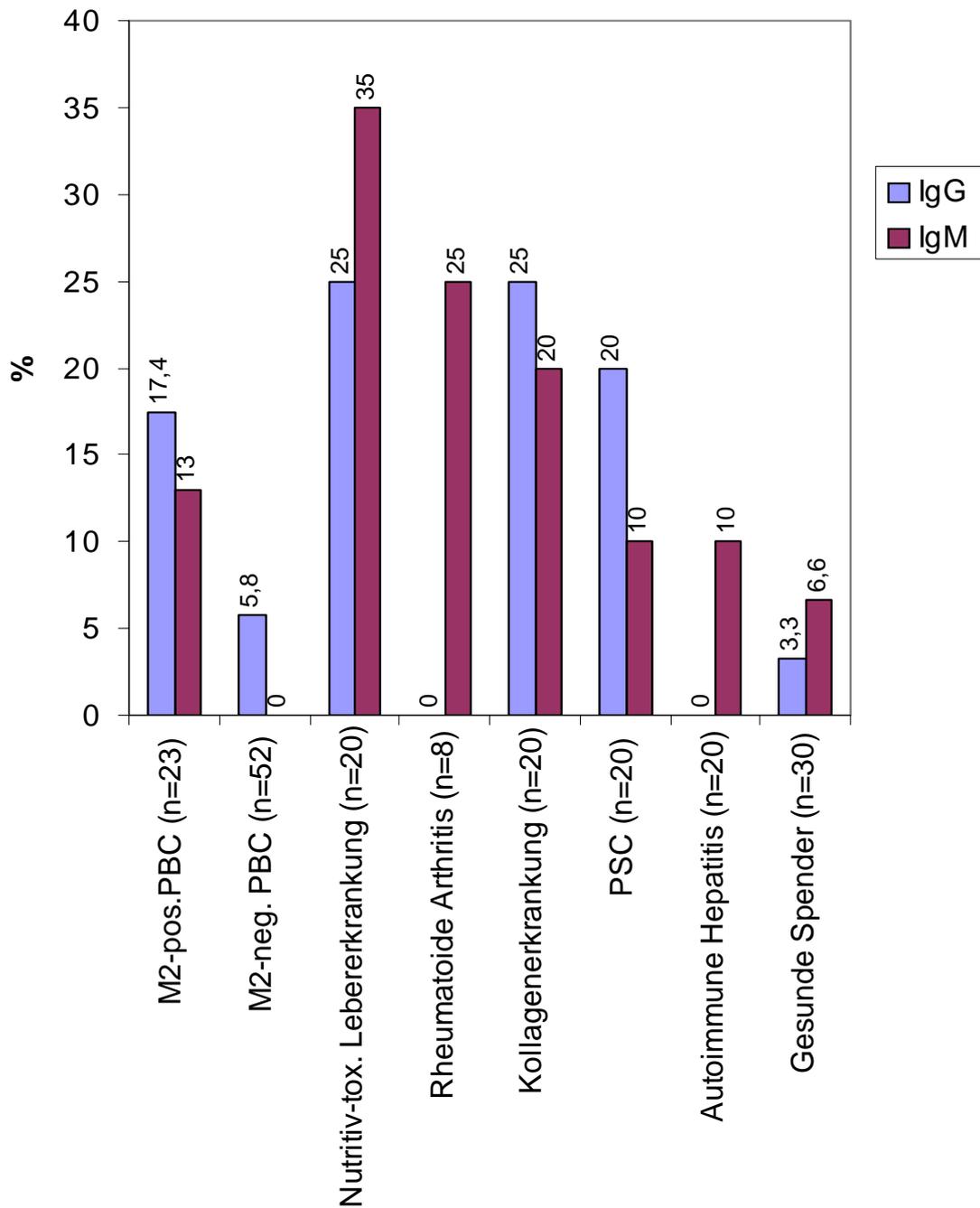


Abb. 3.12: Analyse von Anti-M2 positiven und Anti-M2 negativen Patienten mit PBC im ELISA unter Verwendung kommerzieller Na⁺/K⁺-ATPase (Sigma, Steinheim) und Vergleich mit anderen Patientengruppen: Häufigkeit positiver Reaktionen in Prozent.

3.6 Korrelation zwischen Westernblot und ELISA Ergebnissen zum Nachweis von Antikörpern gegen isoliertes 60 kD Antigen aus Rinderherz SMP SN Gradient 5

Neun Anti-M2 positive und neun Anti-M2 negative PBC Seren sowie Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen (n=12) und gesunden Spendern (n=4), die im ELISA für Antikörper gegen das 60 kD Antigen positiv waren, wurden nochmals im Westernblot gegen die Fraktion G5 und das isolierte 60 kD Antigen getestet. Wie in Tab. 3.4 für die PBC-Seren dargestellt, ergab sich keine Korrelation zwischen WB- und ELISA-Ergebnissen.

Von den 16 Seren von Patienten mit anderer oder keiner Erkrankung, die im ELISA positiv für Antikörper gegen das 60 kD Antigen waren, zeigte keines im Westernblot die typische 60 kD Determinante.

Tabelle 3.4: Vergleich der Anti-60 kD Antigen Reaktivität zwischen ELISA und Westernblot. 18 Seren von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose wurden gegen selbst isoliertes 60 kD Antigen und/oder die korrespondierende Bande in Gradient 5 aus Überstand (SN) von Rinderherz (Rh) Submitochondrialen Partikeln (SMP) getestet. Die jeweiligen Ergebnisse wurden mit den ELISA-Ergebnissen (s. 3.7) verglichen. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ergab sich in den meisten Fällen (14 von 18) keine Korrelation der Westernblot- zu den ELISA- Ergebnissen. In vier Fällen stimmte die Art der Reaktion überein, in einem Fall reagierte das Serum nicht kongruent gegen die 60 kD-Bande aus dem 5. Gradient Rinderherz Überstand Submitochondrialer Partikel (kurz: „G5“ in Tabelle genannt) und dem selbst isolierten 60 kD Antigen, so dass hier keine Aussage getroffen werden kann. ■ = positive Reaktion, □ = negative Reaktion, nd = nicht untersucht.

Patienten mit Anti-M2 negativer PBC	G5 Westernblot	60 kD Antigen Westernblot	60 kD Antigen ELISA	Korrelation
1	■	■	□	-
2	■	nd	□	-
3	■	■	□	-
4	□	□	■	-
5	■	nd	□	-
6	□	□	■	-
7	□	■	□	?
8	■	■	□	-
9	■	■	□	-
Patienten mit Anti-M2 positiver PBC				
1	■	■	■	+
2	■	■	□	-
3	■	■	□	-
4	■	■	□	-
5	□	□	□	+
6	■	nd	■	+
7	nd	■	■	+
8	nd	■	□	-
9	■	■	□	-

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Suche nach neuen antimitochondrialen Antigen-Antikörper-Systemen bei primär-biliärer Zirrhose beschrieben und ein neuer, gegen ein 60 kD Protein gerichteter Antikörper identifiziert, der sowohl bei Anti-M2 negativer als auch Anti-M2 positiver PBC auftreten kann. Zu diesem Zweck wurden in ELISA und Westernblot drei verschiedene subzelluläre Fraktionen eingesetzt, wobei sich die hier beschriebenen Antikörper im Westernblot gegen ein Antigen richteten, welches sich im 5. Gradient (1,18-1,20) eines durch Dichtegradientenzentrifugation getrennten 100 000g Überstandes von submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz anreicherte. Dieses Antigen wurde gereinigt, isoliert und konzentriert. Die Analyse der 60 kD Bande zeigte, dass zwei Proteine darin enthalten sind, die als Antigen in Frage kommen.

4.1 Diskussion der Methodik

Alle selbst verwendeten Methoden wurden nach Protokollen, die sich in jahrelanger Anwendung in der Routinediagnostik des Immunpathologischen Labors zum Nachweis von Autoantikörpern bewährt haben, durchgeführt. Beim Einsatz protokollfremder Antigene wurden diese zuvor in Verdünnungsreihen ausgetestet, um möglichst optimale und valide Ergebnisse zu erhalten. Bei Methoden, die im Routinelabor seltener Verwendung finden (Elektroelution und Elektrodialyse) wurde streng nach Herstelleranleitung gearbeitet.

Zu Beginn der Arbeit stand die Überlegung, das Ergebnis (d.h. die Antigenidentifikation) mit Hilfe kommerzieller Enzyme zu verifizieren; dieser Schritt konnte leider nicht durchgeführt werden, da zur Zeit der Durchführung der Untersuchung (Januar 2003 – Februar 2004) keines der beiden identifizierten Proteine in gereinigter Form auf dem Markt erhältlich waren. Statt dessen wurde im Nebenversuch ein kommerzielles Enzym der Familie der ATPasen verwendet, um auf mögliche Kreuzreaktionen zu testen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Screeninguntersuchungen

Zu Anfang durchgeführte Screeninguntersuchungen (vgl. Kap. 3.1.2) an AMA positiven/Anti-M2 negativen und AMA positiven/Anti-M2 positiven Seren von Patienten mit PBC zeigten im ELISA und Westernblot viele positive Reaktionen mit 100 000 g Überständen von submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz (45,1%), Rattenleber (31,4%) und Schweineniere (39,2%) sowie kommerzieller Pyruvatdehydrogenase (45,1%) und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (47,1%). Die durchweg (hoch-) positiven Ergebnisse der Anti-M2 positiven Seren zeigten, dass das M2-Antigen in allen verwendeten Fraktionen mehr oder weniger konzentriert enthalten ist. Nach Abschluss aller durchgeführten Tests ist zu überlegen, ob auch bei diesem ersten ELISA mit dem gesuchten Antigen weder in der Anti-M2-positiven, noch in der Anti-M2-negativen Patientengruppe Reaktionen zwischen dem gesuchten Antigen und den dazugehörigen Antikörpern stattgefunden haben, da auch die nachfolgenden Untersuchungen im ELISA mit isoliertem Enzym (s.4.2.3.) keine spezifischen Ergebnisse erbrachten. Denkbar ist aber, dass das Antigen in der Gesamtfraktion besser für die AMA erreichbar ist als in der gereinigten Fraktion. Dieser Unterschied in der Antigenexpressivität wäre dadurch erklärbar, dass die antigene Proteinstruktur in der Gesamtfraktion noch besser erreichbar ist für Antikörper, während durch die Weiterbehandlung das Epitop eventuell verborgen wird. Positive ELISA Ergebnisse der Anti-M2 negativen Seren auch mit PDH und OADH können durch die weitere Untersuchung im WB (Kap. 3.1.3) so interpretiert werden, dass die beiden genannten Präparate außer dem M2-Komplex auch noch andere Strukturen enthalten, gegen die sich NOMA (naturally occurring mitochondrial antibodies) oder andere unspezifische Antikörper richten: die Darstellung im WB hat bei dieser Patientengruppe keine spezifischen Reaktionen gegen Einheiten des M2-Komplexes gezeigt. Zudem waren einige dieser Seren schon früher der Arbeitsgruppe von M. Eric Gershwin (University of California, Davis) zugesandt worden, der die Anti-M2-Negativität dieser im Immunfluoreszenztest für AMA positiven Seren bestätigte. Die positiven Reaktionen der Anti-M2 negativen Seren im ELISA mit den drei

anderen Antigenfraktionen aus SMP Überständen lassen sich durch den Westernblot entweder auch als NOMA werten, oder weisen möglicherweise auf andere, bisher noch nicht beschriebene AMA hin (s.u.: z.B. die 70 kD Bande; vgl. auch Kap.3.1.4).

Untergruppierung der positiven Ergebnisse von Anti-M2 negativen Seren im Westernblot gegen Rh SMP SN (Kap. 3.1.4) zeigten bei 53,8% eine Bande bei 60 kD und bei 38,5% eine Bande bei 70 kD.

Aufgrund der Häufigkeitsverteilung konzentrierte ich mich während der weiteren Bearbeitung zunächst auf die 60 kD Bande. Im weiteren Verlauf der Experimente versuchte ich auch, die 70 kD Bande zu eluieren und auszutesten, jedoch fand sich im Endextrakt jeweils so wenig Antigenmenge, dass sich im Westernblot mit Eluat keine positive Reaktion erzeugen ließ.

4.2.2 Antigenisolierung und -analyse

Nach Aufreinigung und Isolierung konnte das Antigen bei 60 kD als entweder zur F₁-ATPase oder zur Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (syn.: Cytochrom-bc₁-Komplex, Komplex III der mitochondrialen Elektronenübertragungskette) gehörig identifiziert werden. Die massenspektrometrischen Analysen ergaben, dass in der Bande mindestens drei (β, δ, ϵ) der fünf Untereinheiten der F₁-ATPase enthalten sind; eine genauere Identifizierung beteiligter Untereinheiten des Cytochrom-bc₁-Komplexes war nicht möglich. In der von mir isolierten und eluierten Bande befinden sich demnach zwei Proteine oder Fragmente von zwei verschiedenen Proteinen, die mit den hier verwendeten Verfahren nicht voneinander getrennt werden konnten. Aus diesem Grund ist noch unklar, zu welchem Protein die 60 kD Bande gehört.

Zur Methode der Antigenanalyse muss gesagt werden, dass sie bezüglich der Proteine, die identifiziert werden, sehr genau ist. Aus der zu analysierenden Bande werden mehrere „fingerprints“ isoliert (d.h. Peptidsequenzen), die in ihrer Kombination miteinander über Proteindatenbanken eine nahezu 100 %ige Identifikation des Proteins, zu dem sie gehören, zulassen. Allerdings muss

erwähnt werden, dass unter Verwendung dieser Methode sehr kleine Proteine oder Untereinheiten übersehen werden können.

Die Bande bei 70 kD konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

4.2.3 Austestung des isolierten Antigens, Testung von Na⁺/K⁺-ATPase (Sigma)

4.2.3.1 Austestung im Westernblot

Nach Isolierung der 60 kD Bande durch Elektroelution wurden einige der bisherigen Reaktionen der Anti-M2-negativen Seren unter Verwendung des Eluats im Westernblot bestätigt, und auch bei sieben von zehn ausgewählten Anti-M2 positiven Seren konnten Antikörper gegen die 60 kD Bande festgestellt werden (vgl. Tab. 3.3). Es wurden diejenigen Anti-M2-positiven Seren ausgewählt, die zuvor in Westernblots mit Rh SMP SN oder Gradient 5 von Rh SMP SN mit einer 60 kD Bande reagiert hatten. Dies konnte in dieser Gruppe während des Screenings nicht eindeutig festgestellt werden, da die 60 kD Bande sehr nah an der M2a- und M2c-Bande liegt und so Verwechslungen nicht sicher auszuschließen waren. Diese möglichen Verwechslungen konnten durch die Verwendung des Eluats hiermit sicher ausgeschlossen werden. Man kann also hier als Gesamtergebnis festhalten, dass 70 % der hier untersuchten Anti-M2 positiven Seren auch positiv für das Antigen bei 60 kD waren. Einschränkend muss gesagt werden, dass es sich um ausgewählte Seren handelte.

4.2.3.2 Testung auf Kreuzreaktivität mit einer anderen ATPase

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen (vgl. Kap. 3.4) wurde kommerzielle Na⁺/K⁺-ATPase (Sigma) eingesetzt, um eine mögliche Kreuzreaktivität mit einer anderen ATPase zu testen. Interessanterweise wurden hier bei fast allen Seren, die im Westernblot mit der Bande bei 60 kD positiv reagierten, deutliche positive Reaktionen bei identischem Molekulargewicht festgestellt.

Daraus lassen sich zwei Folgerungen ableiten: einerseits ist es tatsächlich möglich, dass, falls das Antigen zur F_1 -ATPase gehören sollte, es sich um eine Kreuzreaktion handelt. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die P-ATPasen, zu denen die Na^+/K^+ -ATPase gehört, sich von den F-ATPasen sehr stark unterscheiden. Die Familie der ATPasen wird aufgeteilt in P-, F- und V-ATPasen (in englischer Literatur entsprechen die „P-ATPasen“ den „A-ATPasen“) und ist in den letzten zehn Jahren auf ihre Homologien und Unterschiede ausführlichst untersucht worden (29;42). Basierend auf der Zusammenstellung der Untereinheiten und Primärsequenzen sind die V-ATPasen (H^+ -ATPasen) den P-ATPasen (zu denen auch die Na^+/K^+ -ATPase gehört) enger verwandt als die F-ATPasen (69), es gibt jedoch zwischen den α - und β -Untereinheiten der F_1 -ATPase und den A- und B- Einheiten der P_1/V_1 -ATPasen auch einige identische Primärsequenzen (55).

Es wäre also trotz des unterschiedlichen Aufbaus der Na^+/K^+ - und der F_1 -ATPase eine Kreuzreaktion zwischen den möglichen Anti- F_1 -Ak und Na^+/K^+ -ATPase denkbar, letztlich war sie aber nicht beweisbar, da das definitive antigene Epitop bisher noch nicht bestimmt werden konnte.

Wahrscheinlicher ist, dass die antigene Struktur aus der 60 kD Bande als Kontamination in dem kommerziellen Präparat vorhanden ist, zumal auch die herstellende Firma dies auf Anfrage für durchaus möglich hielt.

Dennoch ließ sich die kommerzielle Na^+/K^+ -ATPase mit dem Wissen, dass das gesuchte antigene Epitop der 60 kD Bande darin enthalten ist bzw. die Antikörper mit einem sehr ähnlichen Epitop kreuzreagieren, im Westernblot gut für Kontrollzwecke einsetzen.

4.2.3.3 Antikörper gegen F_1 -ATPase/ Cytochrom- bc_1 -Komplex sind im ELISA nicht nachweisbar

Am Ende der Untersuchungsreihe (Kap. 3.5) wurde ein ELISA mit 54 AMA positiven/Anti-M2 negativen und 22 AMA positiven/Anti-M2 positiven Seren von Patienten mit PBC sowie von 88 Patienten mit anderen Erkrankungen und 30 gesunden Blutspendern mit der Fragestellung durchgeführt, ob die Antikörper

auch im ELISA nachweisbar und somit auch quantifizierbar wären. Da zu diesem Zeitpunkt bereits offensichtlich war, dass die antigene Komponente auch in kommerzieller Na^+/K^+ -ATPase (Sigma) vorhanden ist, wurde diese im Vergleich zu selbst isoliertem Protein eingesetzt. Die Ergebnisse mit beiden eingesetzten Antigenen zeigen eine deutliche Streubreite sowohl der Grenzwerte als auch der positiven Resultate (in Abb. 3.9 und 3.10 dargestellt) sowie unspezifische Ergebnisse im Hinblick auf die Zuordnung zu den Erkrankungen der Patienten. Es ergab sich keine Korrelation mit im Westernblot wiederholbaren Ergebnissen (Kap. 3.6). Aus diesem Ergebnis ist zu schlussfolgern, dass sich der ELISA nicht für den Nachweis von Antikörpern gegen die 60 kD Bande eignet, sondern lediglich Immunfluoreszenztest und Westernblot verwendet werden können. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem antigenen Epitop um ein kryptisches Antigen, das heißt eine Struktur, die sich zwar im SDS-Gel linear anordnet und somit für Antikörper frei erreichbar ist, die sich aber in Flüssigkeit gelöst wieder zusammenfaltet und das Epitop während des ELISA somit nicht direkt an der Proteinoberfläche zu finden ist.

4.3 Einordnung der potentiellen Antigene

4.3.1 Lokalisation, Funktion und Struktur der F_1 -ATPase

Die F_1 -ATPase bildet zusammen mit ihrem F_0 -Anteil den F_0F_1 -Komplex (entspricht Komplex V) der mitochondrialen Elektronentransportkette von Säugetieren und besitzt ein Molekulargewicht von 380 kD. Sie kommt in verwandter Form ubiquitär bei Bakterien und Pflanzen vor. F_1 , der wasserlösliche Anteil, stellt die eigentliche ATPase dar, welche in der Atmungskette unter Nutzung eines elektrischen Gradienten ATP aus ADP und anorganischem Phosphat synthetisiert. Der reine F_1 -Anteil besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten: Aus drei α -, drei β -, sowie je einer γ -, δ - und ε -Kette (85). Dabei stellt die ganze Einheit funktionell einen rotierenden Motor dar, bei dem die γ - und wahrscheinlich auch die δ - und ε -Untereinheit den zentralen Anteil bilden, der innerhalb eines aus den α - und β -Ketten aufgebauten Zylinders rotiert und zugleich als Stiel an die Membran fungiert

(29;33). Die katalytischen Bindungsstellen für ATP liegen größtenteils innerhalb der β -Untereinheit an α - β -Schnittstellen (20). F_0 , der innerhalb der inneren mitochondrialen Membran gelegene Anteil, ist für den H^+ -Ionen-transport durch die innere mitochondriale Membran verantwortlich. F_0 stellt den Stator des rotierenden Motors dar und besteht aus a, b, c, d, e, f, g, A6L, OSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein) und dem coupling factor 6 (14;29). Humane F_1/F_0 -ATPase hat denselben stöchiometrischen Aufbau wie bovine F_1/F_0 -ATPase (3), eng verwandte F_1/F_0 -ATPasen werden sowohl in Chloroplasten sowie in der Plasmamembran von Bakterien gefunden (z.B. E.Coli), d.h. es handelt sich um archaische Enzyme, aus denen sich im Lauf der Evolution immer wieder Verwandte entwickelt haben. Das stöchiometrische Verhältnis von $\alpha_3\beta_3f_3\gamma\delta\varepsilon$ - Untereinheiten ist in F_1 in allen bisher untersuchten Spezies identisch (73).

4.3.2 Lokalisation, Funktion und Struktur des Cytochrom- bc_1 -Komplexes

Der Cytochrom- bc_1 -Komplex (Cyt Bc_1), auch Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase genannt, ist der Komplex III der mitochondrialen Elektronentransportkette von Säugetieren. Er enthält insgesamt elf Untereinheiten mit einem Gesamtgewicht von 248 kD: die Cytochrome b_{562} und b_{566} , Cytochrom c_1 , ein Eisen-Schwefel-Protein, und acht weitere Protein-Untereinheiten. Diese Proteine sind asymmetrisch in der inneren Mitochondrienmembran angeordnet. Cytochrom b durchspannt die Membran, Cytochrom c_1 und das Eisen-Schwefel-Protein liegen auf der äußeren Oberfläche.

Innerhalb des Komplex III erfolgt der Übergang von dem Zweielektronen-Carrier Ubichinon auf die Einelektronen-Carrier (Cytochrom b_{562} , b_{566} , c_1 und c) über eine Reihe von Reaktionen, die als „Q-Zyklus“ bezeichnet werden, d.h. UQH_2 wird zu UQ oxidiert und Cytochrom c wird reduziert. Die bei der Oxidation anfallenden Protonen werden an den Intermembranraum abgegeben, wobei eine Differenz in der Protonenkonzentration über die Membran hinweg – der Protonengradient – aufgebaut wird, die wiederum Voraussetzung für die Funktion des F_0F_1 -Komplexes ist (42;49).

4.4 Wie lässt sich die mögliche Entstehung von Anti-F₁-ATPase-Ak oder Anti-Cyt Bc₁-Ak in die heutigen Hypothesen zur Entstehung von antimitochondrialen Antikörpern einordnen?

Diesbezüglich muss zuerst erwähnt werden, dass die F₁-ATPase in ihrer Geschichte bereits schon einmal im Verdacht stand, ein mitochondriales Antigen zu sein: so wurde das M2-Antigen bis Anfang der 80er Jahre für die F₁-ATPase gehalten. Die F₁-ATPase ist ebenso wie der M2-Komplex Bestandteil der inneren mitochondrialen Membran und wird in den Präparationsschritten zur Gewinnung von M2 auch zusammen mit diesem aus Rinderherz isoliert (11;12;68). Sayers et al. konnten jedoch 1981 zeigen, dass es sich um verschiedene Antigene handelt und die typischen Reaktionen von PBC-Seren einer Antigenfraktion zuzurechnen sind, die zwar eng mit der F₁-ATPase zusammenhängt, aber nicht identisch mit dieser ist (67). Bis zur genauen Beschreibung des M2-Komplexes wurde M2 aus diesem Grund auch „ATPase-assoziiertes“ Antigen genannt (45).

Die hier vorliegende Untersuchung zeigt jedoch deutlich, dass Antikörper gegen eine Bande bei 60 kD sowohl in Anti-M2 negativen sowie Anti-M2 positiven Seren von Patienten mit PBC vorhanden sein können und es sich bei der Bande um Untereinheiten sowohl der F₁-ATPase als auch der Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase handelt. Bisher ist noch unklar, in welchem der beiden Enzyme/ Enzymkomplexe das korrespondierende Epitop zu finden sein wird. Es könnte durchaus sein, dass die jetzt beschriebenen Antikörper sich gegen die F₁-ATPase richten und bisher übersehen wurden, da die Freisetzung von F₁- aus submitochondrialen Partikeln mit Chloroform von einem schnellen proteolytischen Zerfall der N-terminalen Endigungen der α -, β - und δ - Kette begleitet ist (80;81). Wenn, wie im hier vorliegenden Fall, F₁ jedoch durch Beschallung freigesetzt wird und eine solche proteolytische Zersetzung nicht stattfindet, könnte das Enzym so noch seine volle Antigenität bewahren.

PBC spezifische Antikörper gegen Cytochrom-c-Oxidoreduktase wurden bisher noch nie diskutiert. Ihr Auftreten wäre also komplett neu, aber natürlich durchaus möglich, zumal es sich auch hier um ein Antigen der inneren mitochondrialen Membran handelt, das im Lauf der Zeit äußerst gut konserviert wurde (49).

Auf die Möglichkeit des „molecular mimicry“ zur Induktion von AMA wurde bereits in der Einleitung verwiesen; diese Hypothese gilt bis heute für Anti-M2-AK. Dabei werden immer wieder andere Erreger (u.a. E.Coli, Chlamydia pneumoniae und verschiedene Mykobakterien (1;27;40;51;59;75)) als ursächlich beschrieben. Selmi et al. postulierten 2003 als ursächlichen Erreger das ubiquitär vorkommende Bakterium N.aromaticivorans. Zwei Proteine dieses Bakteriums haben Homologien mit der E2-Komponente des PDH-Komplexes, gegen die mit Seren von PBC Patienten 100-1000fach höhere Titer als gegen bisher identifizierte Homologien mit Untereinheiten des PDH-Komplexes aus E.Coli festgestellt werden konnten. Interessanterweise waren auch positive Reaktionen gegen drei andere Proteine von N.aromaticivorans (eines davon bei etwa 60 kD!) bei > 90% der Anti-M2 positiven Seren und 29% der Anti-M2-negativen Seren zu finden, die jedoch bei Veröffentlichung der Studie noch nicht identifiziert waren (72).

Vor diesem Hintergrund hat die Theorie des „molecular mimicry“ ihre Berechtigung auch hinsichtlich der neu entdeckten Antikörper, gerade auch aufgrund des Vorhandenseins von F₁-ATPase oder ähnlichen ATPasen in der Zellwand von Bakterien (s.o.). Möglich wäre allerdings auch ein „antigen-shift“, wie wir es durch die Veränderung von Bakterien und Viren im Laufe der Zeit her kennen; dafür spricht die deutliche Zunahme der Anti-M2 negativen PBC Patienten, wie sie in den letzten Jahren im Immunpathologischen Labor Tübingen beobachtet werden konnte.

Klein und Berg (37) haben mit ihrer Untersuchung von natürlich vorkommenden mitochondrialen Antikörpern (NOMA) bei gesunden Angehörigen von Patienten mit PBC auch die Hypothese aufgestellt, nach der sämtliche zur PBC gehörenden AMA als natürlich vorkommende Antikörper zu verstehen sind und

somit eine protektive Funktion hinsichtlich der PBC hätten. Die Produktion von natürlichen Autoantikörpern wird bei allen Menschen im Rahmen von infektiösen Prozessen generell stimuliert, da sie aufgrund ihrer Polyspezifität eine effektive Erstabwehr gegenüber Bakterien, Viren und Parasiten bilden. Mit dem Wissen, dass auch die gesunden Angehörigen von PBC Patienten in 70% AMA aufweisen, die jedoch gegen andere Epitope als die PBC-spezifischen AMA gerichtet sind (37) und dass PBC Patienten selbst etliche Auffälligkeiten in der Immunregulation aufweisen (s. Einleitung), ist es denkbar, dass ein immunogenes, wahrscheinlich infektiöses Agens im Blut verantwortlich ist für die Induktion von wirksamen NOMA bei den Familienangehörigen und durch die Kombination eines Immundefektes und dem Erreger zur Bildung spezifischer AMA und Entwicklung der PBC führt. Die AMA würden zwar auch hier zur Protektion gebildet werden, können aber aufgrund des Defektes nicht derart wirken und so die Infektion mit dem PBC spezifischen Agens erleichtern (36). Die Protektivität von unspezifischen Antikörpern konnte in anderen Fällen auch schon gezeigt werden, z. B. für Antikörper gegen OLDL (oxidized low-density lipoprotein) oder APA (Antiphospholipidantikörper) bei Atherosklerose (19;22;57).

Zuletzt gilt es noch zu erwähnen, dass es Beobachtungen über veränderte Apoptoseregulationsmechanismen bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen gibt (64), die möglicherweise sogar ursächlich für bestimmte Erkrankungen sein könnten, und die Antikörper-Produktion zweitrangig nach der Präsentation von Antigenen aus Cytosol oder Mitochondrium einsetzt. Den Mitochondrien wird im Rahmen der Apoptoseregulation eine zunehmend bedeutendere Rolle beigemessen: so spielt zum Beispiel gerade die F_1/F_0 -ATPase eine wichtige Rolle bei der Induktion von mitochondrien-abhängiger Apoptose (26;50;60).

4.5 Ausblick: Bedeutung der neuen AMA für Forschung, Diagnose und Monitoring der PBC

Das Gesamtergebnis der hier vorliegenden Arbeit lässt sich so darstellen, dass ein neuer, spezifischer antimitochondrialer Antikörper bei PBC gefunden wurde, der bislang im Immunfluoreszenztest entdeckt und in nachfolgendem Westernblot als Subspezifität der AMA bestätigt werden kann. Bisher waren serologische Befunde mit im IFT positiver AMA Fluoreszenz, aber negativer Anti-M2-Reaktivität zwar stets als hochgradig verdächtig, aber nicht beweisend für eine PBC einzuordnen. Durch den jetzt möglichen Nachweis von weiteren spezifischen Antikörpern lässt sich in einem Teil dieser Gruppe eine Unsicherheit in der Beurteilung des Krankheitsgeschehens vermeiden.

Welche Bedeutung die hier neu beschriebenen Antikörper für die künftige serologische Diagnostik der PBC im Rahmen von Routineuntersuchungen erlangen werden, wird stark davon abhängen, ob man durch eine genauere Identifizierung des antigenen Epitops weniger aufwendige Verfahren zum Nachweis einsetzen können wird. Die hier angewendete, recht zeitaufwendige Methode zur Isolierung des Antigens und Nachweis der Antikörper müsste durch rekombinante Herstellung des antigenen Proteins ersetzt werden können, das in dieser Form im ELISA einsetzbar wäre und so nicht nur einzelne Patienten, sondern größere Gruppen getestet werden könnten.

Hinsichtlich der Forschung wäre dies also die nächste Aufgabe; eine weitere wäre die Fragestellung, ob sich die Antikörper gegen das 60 kD Antigen, ähnlich wie Anti-M4 und Anti-M8, hinsichtlich der Prognose des Krankheitsverlaufs auswerten lassen. Sollten hier ähnlich klare Aussagen möglich werden, könnten die Anti-60 kD- Antikörper zum Monitoring der bislang uneindeutigen „atypischen“ PBC-Fälle erheblich beitragen.

Darüber hinaus verweisen die hier vorgelegten Ergebnisse auf eine bislang wahrscheinlich viel zu einseitige Betonung des α -Ketosäuredehydrogenase-Komplexes in den Untersuchungen zur Klärung der Ätiopathogenese der PBC. Gerade durch die Screenings am Beginn der Experimente wird deutlich, dass außer dem hier beschriebenen neuen Antikörper bei Anti-M2-negativen Seren

von Patienten mit PBC wahrscheinlich noch eine Reihe weiterer, bislang nicht beschriebener Antigen-Antikörper-Systeme bei PBC existieren. Hieraus ergeben sich neue immunologische Fragen im Verstehensprozess von Autoimmunerkrankungen, die ja auch in vielen aktuellen Arbeiten bereits behandelt werden. Wodurch geschieht die Toleranzaufhebung gegenüber Autoantigenen? Spielen dendritische Zellen hierbei eine Rolle, und wenn ja, welche? Welche Rolle spielen Autoantigene/ die Toleranzaufhebung gegenüber Autoantigenen bezüglich der Apoptoseregulation?

Zusammenfassend haben die vorliegenden Experimente eine Vielzahl an noch zu beantwortenden Fragen aufgeworfen, die ein Verständnis der Ätiopathogenese der PBC in Zukunft verbessern helfen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden neue antimitochondriale Antigen-Antikörpersysteme bei der primär-biliären Zirrhose vorgestellt, vor allem im Hinblick auf im Immunfluoreszenztest AMA positive, aber dennoch Anti-M2 negative Seren von Patienten mit PBC oder klinisch/histologisch hochgradigem Verdacht auf PBC.

Zu diesem Zweck wurden 73 Anti-M2 negative Seren von Patienten mit PBC, 22 Anti-M2 positive Seren, insgesamt 88 Seren von Patienten mit anderen Autoimmun- oder Lebererkrankungen (Autoimmune Hepatitis, Primär Sklerosierende Cholangitis, Rheumatoide Arthritis, Kollagenerkrankungen, alkohol-toxische Lebererkrankung) sowie 30 Seren von gesunden Blutspendern untersucht. Bei 14 von 43 (32,56%) Anti-M2 negativen Seren von Patienten mit PBC, die im Westernblot gegen einen 100 000g Überstand von submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz getestet wurden, konnte eine Bande bei 60 kD festgestellt werden, die sich in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation bei 1,18-1,20 anreichern ließ. Nach folgender Isolierung mittels Elektroelution konnte in der Bande durch massenspektrometrische Analysen F₁-ATPase und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette identifiziert werden. Von den Seren der Vergleichsgruppen reagierten auch 70% der Anti-M2 positiven Seren mit der 60 kD Bande. Ansonsten konnten weder in der gesunden Kontrollgruppe noch unter den Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen positive Reaktionen gegen diese Determinante festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den neuen Antikörpern um für die PBC spezifische Antikörper handelt, die bisher allerdings ausschließlich im IFT und Westernblot nachgewiesen werden können und die sowohl bei Anti-M2 negativen wie auch Anti-M2 positiven Seren auftreten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdulkarim, A. S., Petrovic, L. M., Kim, W. R., Angulo, P., Lloyd, R. V., and Lindor, K. D. Primary Biliary Cirrhosis: an Infectious Disease Caused by Chlamydia Pneumoniae? *J.Hepatol.* 2004;40(3):380-4.
2. Addison, T. and Gull, W. On a Certain Affection of the Skin-Vitiligoidea-Beta-Plana B-Tuberosa. *Guys Hospital Reports* 1851;(7):265-77.
3. Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S. W., Ghosh, S. S., Garcia, J. J., Capaldi, R. A., and Marusich, M. F. A Functionally Active Human F1F0 ATPase Can Be Purified by Immunocapture From Heart Tissue and Fibroblast Cell Lines. Subunit Structure and Activity Studies. *J.Biol.Chem.* 2002;277(37):33906-12.
4. Ahrens, E. H., Jr., Payne, M. A., Kunkel, H. G., Eisenmenger, W. J., and Blondheim, S. H. Primary Biliary Cirrhosis. *Medicine (Baltimore)* 1950;29(4):299-364.
5. Alarcon-Segovia, D., Diaz-Jouanen, E., and Fishbein, E. Features of Sjogren's Syndrome in Primary Biliary Cirrhosis. *Ann.Intern.Med.* 1973;79(1):31-6.
6. Alvarez, F., Berg, P. A., Bianchi, F. B., Bianchi, L., Burroughs, A. K., Cancado, E. L., Chapman, R. W., Cooksley, W. G., Czaja, A. J., Desmet, V. J., Donaldson, P. T., Eddleston, A. L., Fainboim, L., Heathcote, J., Homberg, J. C., Hoofnagle, J. H., Kakumu, S., Krawitt, E. L., Mackay, I. R., MacSween, R. N., Maddrey, W. C., Manns, M. P., McFarlane, I. G., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Zeniya, M., and . International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of Criteria for Diagnosis of Autoimmune Hepatitis. *J.Hepatol.* 1999;31(5):929-38.
7. Angulo, P., Batts, K. P., Therneau, T. M., Jorgensen, R. A., Dickson, E. R., and Lindor, K. D. Long-Term Ursodeoxycholic Acid Delays Histological Progression in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 1999;29(3):644-7.
8. Angulo, P. and Lindor, K. D. Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Liver Dis.* 1999;3(3):529-70.
9. Avrameas, S. and Ternynck, T. Natural Autoantibodies: the Other Side of the Immune System. *Res.Immunol.* 1995;146(4-5):235-48.
10. Baum, H. Mitochondrial Antigens, Molecular Mimicry and Autoimmune Disease. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;1271(1):111-21.

11. Baum, H. and Berg, P. A. The Complex Nature of Mitochondrial Antibodies and Their Relation to Primary Biliary Cirrhosis. *Semin.Liver Dis.* 1981;1(4):309-21.
12. Baum, H., Davey, J. M., Elsdon, J., Leoutsakos, A., Meek, F., and Sayers, T. Evidence That Adenosine Triphosphatase Is One of the Mitochondrial Antigens of Autoimmune Liver Disease [Proceedings]. *Biochem.Soc.Trans.* 1979;7(1):213-5.
13. Beechey, R. B., Hubbard, S. A., Linnett, P. E., Mitchell, A. D., and Munn, E. A. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Adenosine Triphosphatase From Submitochondrial Particles. *Biochem.J.* 1975;148(3):533-7.
14. Belogradov, G. I., Tomich, J. M., and Hatefi, Y. ATP Synthase Complex. Proximities of Subunits in Bovine Submitochondrial Particles. *J.Biol.Chem.* 1995;270(5):2053-60.
15. Berg PA and Klein R. Immunology of Primary Biliary Cirrhosis. *Ballieres Clin Gastroenterology* 1987;(1):675-706.
16. Berg, P. A. and Klein, R. Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis and Other Disorders: Definition and Clinical Relevance. *Dig.Dis.* 1992;10(2):85-101.
17. Berg, P. A. and Klein, R. Mitochondrial Antigen/Antibody Systems in Primary Biliary Cirrhosis: Revisited. *Liver* 1995;15(6):281-92.
18. Berg, P. A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., and Kloppel, W. ATPase-Associated Antigen (M2): Marker Antigen for Serological Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet* 25-12-1982;2(8313):1423-6.
19. Binder, C. J., Horkko, S., Dewan, A., Chang, M. K., Kieu, E. P., Goodyear, C. S., Shaw, P. X., Palinski, W., Witztum, J. L., and Silverman, G. J. Pneumococcal Vaccination Decreases Atherosclerotic Lesion Formation: Molecular Mimicry Between *Streptococcus Pneumoniae* and Oxidized LDL. *Nat.Med.* 2003;9(6):736-43.
20. Boyer, P. D. Catalytic Site Occupancy During ATP Synthase Catalysis. *FEBS Lett.* 2002;512(1-3):29-32.
21. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal.Biochem.* 1976;72:248-54.
22. Brizzi, P., Tonolo, G., Bertrand, G., Carusillo, F., Severino, C., Maioli, M., Malaguarnera, L., and Musumeci, S. Autoantibodies Against

Oxidized Low-Density Lipoprotein (Ox-LDL) and LDL Oxidation Status. *Clin Chem.Lab Med.* 2004;42(2):164-70.

23. Burroughs, A. K., Rosenstein, I. J., Epstein, O., Hamilton-Miller, J. M., Brumfitt, W., and Sherlock, S. Bacteriuria and Primary Biliary Cirrhosis. *Gut* 1984;25(2):133-7.
24. Butler, P., Hamilton-Miller, J., Baum, H., and Burroughs, A. K. Detection of M2 Antibodies in Patients With Recurrent Urinary Tract Infection Using an ELISA and Purified PBC Specific Antigens. Evidence for a Molecular Mimicry Mechanism in the Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis? *Biochem.Mol.Biol.Int.* 1995;35(3):473-85.
25. Dighiero, G. Natural Autoantibodies, Tolerance, and Autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 5-4-1997;815:182-92.
26. Eguchi, Y., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. ATP-Dependent Steps in Apoptotic Signal Transduction. *Cancer Res.* 1-5-1999;59(9):2174-81.
27. Fussey, S. P., Ali, S. T., Guest, J. R., James, O. F., Bassendine, M. F., and Yeaman, S. J. Reactivity of Primary Biliary Cirrhosis Sera With Escherichia Coli Dihydrolipoamide Acetyltransferase (E2p): Characterization of the Main Immunogenic Region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87(10):3987-91.
28. Gershwin, M. E., Ansari, A. A., Mackay, I. R., Nakanuma, Y., Nishio, A., Rowley, M. J., and Coppel, R. L. Primary Biliary Cirrhosis: an Orchestrated Immune Response Against Epithelial Cells. *Immunol.Rev.* 2000;174:210-25.
29. Gruber, G., Wieczorek, H., Harvey, W. R., and Muller, V. Structure-Function Relationships of A-, F- and V-ATPases. *J.Exp.Biol.* 2001;204(Pt 15):2597-605.
30. Hanot, V., Etude sur une forme de cirrhose hypertrophique du foie (cirrhose hypertrophique avec ictere chronique). Paris: J.B.Balliere; 1876.
31. Hempfling, W., Grunhage, F., Dilger, K., Reichel, C., Beuers, U., and Sauerbruch, T. Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Action of Budesonide in Early- and Late-Stage Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 2003;38(1):196-202.
32. Jones, D. E., Watt, F. E., Metcalf, J. V., Bassendine, M. F., and James, O. F. Familial Primary Biliary Cirrhosis Reassessed: a Geographically-Based Population Study. *J.Hepatol.* 1999;30(3):402-7.

33. Junge, W., Panke, O., Cherepanov, D. A., Gumbiowski, K., Muller, M., and Engelbrecht, S. Inter-Subunit Rotation and Elastic Power Transmission in F₀F₁-ATPase. *FEBS Lett.* 31-8-2001;504(3):152-60.
34. Kim, W. R., Lindor, K. D., Locke, G. R., III, Therneau, T. M., Homburger, H. A., Batts, K. P., Yawn, B. P., Petz, J. L., Melton, L. J., III, and Dickson, E. R. Epidemiology and Natural History of Primary Biliary Cirrhosis in a US Community. *Gastroenterology* 2000;119(6):1631-6.
35. Klein R.: mündliche Mitteilung
36. Klein R und Berg PA. Immunopathien der Leber. Baenkler, H.-W. *Medizinische Immunologie*. Landsberg: ecomed; 1995. pp.14-33.
37. Klein, R. and Berg, P. A. Demonstration of "Naturally Occurring Mitochondrial Antibodies" in Family Members of Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 1990;12(2):335-41.
38. Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., and Berg, P. A. Use of ATPase-Associated Antigen (M2) for Detection of Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis by Fluorometric Immunoassay. *J.Immunol.Methods* 11-11-1983;64(1-2):227-38.
39. Klein, R., Pointner, H., Zilly, W., Glassner-Bittner, B., Breuer, N., Garbe, W., Fintelmann, V., Kalk, J. F., Muting, D., Fischer, R., Tittor, W., Pausch, J., Maier, K. P., and Berg, P. A. Antimitochondrial Antibody Profiles in Primary Biliary Cirrhosis Distinguish at Early Stages Between a Benign and a Progressive Course: a Prospective Study on 200 Patients Followed for 10 Years. *Liver* 1997;17(3):119-28.
40. Klein, R., Wiebel, M., Engelhart, S., and Berg, P. A. Sera From Patients With Tuberculosis Recognize the M2a-Epitope (E2-Subunit of Pyruvate Dehydrogenase) Specific for Primary Biliary Cirrhosis. *Clin Exp.Immunol.* 1993;92(2):308-16.
41. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 15-8-1970;227(259):680-5.
42. Lehninger A, Nelson D Cox M. Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung. Tschesche H. *Prinzipien der Biochemie*. 2 ed. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verlag; 1994. pp.627-83.
43. Leuschner, U. Primary Biliary Cirrhosis--Presentation and Diagnosis. *Clin.Liver Dis.* 2003;7(4):741-58.

44. Lim, A. G., Jazrawi, R. P., Ahmed, H. A., Levy, J. H., Zuin, M., Douds, A. C., Maxwell, J. D., and Northfield, T. C. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in Primary Biliary Cirrhosis: Relationship With Disease Stage, Immune Activity and Cholestasis. *Hepatology* 1994;20(4 Pt 1):882-8.
45. Lindenborn-Fotinos, J., Baum, H., and Berg, P. A. Mitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis: Species and Nonspecies Specific Determinants of M2 Antigen. *Hepatology* 1985;5(5):763-9.
46. Lindor, K. D., Dickson, E. R., Jorgensen, R. A., Anderson, M. L., Wiesner, R. H., Gores, G. J., Lange, S. M., Rossi, S. S., Hofmann, A. F., and Baldus, W. P. The Combination of Ursodeoxycholic Acid and Methotrexate for Patients With Primary Biliary Cirrhosis: the Results of a Pilot Study. *Hepatology* 1995;22(4 Pt 1):1158-62.
47. Lindor, K. D., Therneau, T. M., Jorgensen, R. A., Malinchoc, M., and Dickson, E. R. Effects of Ursodeoxycholic Acid on Survival in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Gastroenterology* 1996;110(5):1515-8.
48. Mason, A. L., Xu, L., Guo, L., Munoz, S., Jaspán, J. B., Bryer-Ash, M., Cao, Y., Sander, D. M., Shoenfeld, Y., Ahmed, A., Van de Water J., Gershwin, M. E., and Garry, R. F. Detection of Retroviral Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis and Other Idiopathic Biliary Disorders. *Lancet* 30-5-1998;351(9116):1620-4.
49. Mathews CK; van Holde KE; Ahern KG. Electron Transport, Oxidative Phosphorylation, and Oxygen Metabolism. Weber L and Roberts B. *Biochemistry*. third edition ed. San Fransisco: Addison Wesley Longman; 2000. pp.522-59.
50. Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., and Reed, J. C. The Mitochondrial F0F1-ATPase Proton Pump Is Required for Function of the Proapoptotic Protein Bax in Yeast and Mammalian Cells. *Mol.Cell* 1998;1(3):327-36.
51. Mayo, I., Arizti, P., Pares, A., Oliva, J., Doforno, R. A., de Sagarra, M. R., Rodes, J., and Castano, J. G. Antibodies Against the COOH-Terminal Region of E. Coli ClpP Protease in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *J.Hepatol.* 2000;33(4):528-36.
52. Metcalf, J. V., Bhopal, R. S., Gray, J., Howel, D., and James, O. F. Incidence and Prevalence of Primary Biliary Cirrhosis in the City of Newcastle Upon Tyne, England. *Int.J.Epidemiol.* 1997;26(4):830-6.

53. Miller, K. B., Sepersky, R. A., Brown, K. M., Goldberg, M. J., and Kaplan, M. M. Genetic Abnormalities of Immunoregulation in Primary Biliary Cirrhosis. *Am.J.Med.* 1983;75(1):75-80.
54. Murray-Lyon, I. M., Thompson, R. P., Ansell, I. D., and Williams, R. Scleroderma and Primary Biliary Cirrhosis. *Br.Med.J.* 1-8-1970;1(717):258-9.
55. Nelson, N. Evolution of Organellar Proton-ATPases. *Biochim.Biophys.Acta* 20-5-1992;1100(2):109-24.
56. Neuman, M., Angulo, P., Malkiewicz, I., Jorgensen, R., Shear, N., Dickson, E. R., Haber, J., Katz, G., and Lindor, K. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Transforming Growth Factor-Beta Reflect Severity of Liver Damage in Primary Biliary Cirrhosis. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2002;17(2):196-202.
57. Nicolo, D. and Monestier, M. Antiphospholipid Antibodies and Atherosclerosis. *Clin Immunol.* 2004;112(2):183-9.
58. Nishio, A., Keeffe, E. B., Ishibashi, H., and Gershwin, E. M. Diagnosis and Treatment of Primary Biliary Cirrhosis. *Med.Sci.Monit.* 2000;6(1):181-93.
59. O'Donohue, J., McFarlane, B., Bomford, A., Yates, M., and Williams, R. Antibodies to Atypical Mycobacteria in Primary Biliary Cirrhosis. *J.Hepatol.* 1994;21(5):887-9.
60. Pedersen, P. L. Mitochondrial Events in the Life and Death of Animal Cells: a Brief Overview. *J.Bioenerg.Biomembr.* 1999;31(4):291-304.
61. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data. *Electrophoresis* 1999;20(18):3551-67.
62. Poupon, R. Trials in Primary Biliary Cirrhosis: Need for the Right Drugs at the Right Time. *Hepatology* 2004;39(4):900-2.
63. Powell, F. C., Schroeter, A. L., and Dickson, E. R. Primary Biliary Cirrhosis and the CREST Syndrome: a Report of 22 Cases. *Q.J.Med.* 1987;62(237):75-82.
64. Prasad, K. V. and Prabhakar, B. S. Apoptosis and Autoimmune Disorders. *Autoimmunity* 2003;36(6-7):323-30.
65. Prince, M. I., Chetwynd, A., Diggle, P., Jarner, M., Metcalf, J. V., and James, O. F. The Geographical Distribution of Primary Biliary

- Cirrhosis in a Well-Defined Cohort. *Hepatology* 2001;34(6):1083-8.
66. Rubin, E., Schaffner, F., and Popper, H. Primary Biliary Cirrhosis. Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis. *Am.J.Pathol.* 1965;46:387-407.
 67. Sayers, T., Leoutsakos, A., Berg, P., and Baum, H. Antimitochondrial Antibodies (AMA) in Primary Biliary Cirrhosis. I. Separation of the PBC Antigen Activity From Mitochondrial ATPase Activity. *J.Bioenerg.Biomembr.* 1981;13(5-6):255-67.
 68. Sayers, T. J., Binder, T., and Berg, P. A. Heterogeneity of Anti-Mitochondrial Antibodies: Characterization and Separation of the Antigen Associated With the Pseudolupus Erythematosus Syndrome. *Clin Exp.Immunol.* 1979;37(1):68-75.
 69. Schafer, G., Engelhard, M., and Muller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1999;63(3):570-620.
 70. Scheuer, P. Primary Biliary Cirrhosis. *Proc.R.Soc.Med.* 1967;60(12):1257-60.
 71. Scheuer, P. J., *Liver biopsy interpretation.* 3rd ed. London: Ballière, Tindall and Cossell; 1980.
 72. Selmi, C., Balkwill, D. L., Invernizzi, P., Ansari, A. A., Coppel, R. L., Podda, M., Leung, P. S., Kenny, T. P., Van de Water J., Nantz, M. H., Kurth, M. J., and Gershwin, M. E. Patients With Primary Biliary Cirrhosis React Against a Ubiquitous Xenobiotic-Metabolizing Bacterium. *Hepatology* 2003;38(5):1250-7.
 73. Senior, A. E. and Wise, J. G. The Proton-ATPase of Bacteria and Mitochondria. *J.Membr.Biol.* 1983;73(2):105-24.
 74. Sherlock, S. Primary Biliary Cirrhosis (Chronic Intrahepatic Obstructive Jaundice). *Gastroenterology* 1959;37:574-86.
 75. Stemerowicz, R., Hopf, U., Moller, B., Wittenbrink, C., Rodloff, A., Reinhardt, R., Freudenberg, M., and Galanos, C. Are Antimitochondrial Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis Induced by R(Rough)-Mutants of Enterobacteriaceae? *Lancet* 19-11-1988;2(8621):1166-70.
 76. Talwalkar, J. A. and Lindor, K. D. Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet* 5-7-2003;362(9377):53-61.
 77. Terasaki, S., Nakanuma, Y., Ogino, H., Unoura, M., and Kobayashi, K. Hepatocellular and Biliary Expression of HLA Antigens in Primary

Biliary Cirrhosis Before and After Ursodeoxycholic Acid Therapy. *Am.J.Gastroenterol.* 1991;86(9):1194-9.

78. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1979;76(9):4350-4.
79. Van de Water J., Gershwin, M. E., Leung, P., Ansari, A., and Coppel, R. L. The Autoepitope of the 74-KD Mitochondrial Autoantigen of Primary Biliary Cirrhosis Corresponds to the Functional Site of Dihydrolipoamide Acetyltransferase. *J.Exp.Med.* 1-6-1988;167(6):1791-9.
80. Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M., and Tybulewicz, V. L. Primary Structure and Subunit Stoichiometry of F1-ATPase From Bovine Mitochondria. *J.Mol.Biol.* 20-8-1985;184(4):677-701.
81. Walker, J. E., Lutter, R., Dupuis, A., and Runswick, M. J. Identification of the Subunits of F1F0-ATPase From Bovine Heart Mitochondria. *Biochemistry* 4-6-1991;30(22):5369-78.
82. Walker, J. G., Doniach, D., Roitt, I. M., and Sherlock, S. Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. *Lancet* 17-4-1965;39:827-31.
83. Watson, R. G., Angus, P. W., Dewar, M., Goss, B., Sewell, R. B., and Smallwood, R. A. Low Prevalence of Primary Biliary Cirrhosis in Victoria, Australia. *Melbourne Liver Group. Gut* 1995;36(6):927-30.
84. Wright, D. J., Doniach, D., Lessof, M. H., Turk, J. L., Grimble, A. S., and Catterall, R. D. New Antibody in Early Syphilis. *Lancet* 11-4-1970;1(7650):740-3.
85. Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinoshita, K., Jr., and Itoh, H. Resolution of Distinct Rotational Substeps by Submillisecond Kinetic Analysis of F1-ATPase. *Nature* 19-4-2001;410(6831):898-904.
86. Yeaman, S. J., Kirby, J. A., and Jones, D. E. Autoreactive Responses to Pyruvate Dehydrogenase Complex in the Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis. *Immunol.Rev.* 2000;174:238-49.
87. Yoshikawa, M., Tsujii, T., Matsumura, K., Yamao, J., Matsumura, Y., Kubo, R., Fukui, H., and Ishizaka, S. Immunomodulatory Effects of Ursodeoxycholic Acid on Immune Responses. *Hepatology* 1992;16(2):358-64.

7. Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Reinhild Klein, die mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir stets mit Rat, Tat und Humor zur Seite stand und auch in für den Einstiegsforscher harten Zeiten mit immer positiver Grundhaltung stark motivationserhaltend wirkte. Bedanken möchte ich mich insbesondere auch bei Herrn Prof. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“. Die Veranstaltungen im Rahmen des Graduiertenkollegs haben die Promotionszeit durch das breit angelegte Programm an Vorträgen, Seminaren und Exkursionen sehr bereichert. Ohne das Stipendium des Graduiertenkollegs, das durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziert wurde, sowie im Folgenden das Kontaktstipendium zur Förderung von Frauen im Rahmen des Hochschul- und Wissenschaftsprogramms wäre die gesamte Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danken möchte ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Immunpathologischen Labors insbesondere für ihre immer freundliche und geduldige Hilfestellung beim Erlernen und Durchführen der angewendeten Labormethoden. So möchte ich insbesondere Birgit Weber danken für die Einweisung in ELISA und Westernblot, sowie Tanja Flohr, Gülay Demirel, Radmilla Maksimovitch und Jochen Bellack für ihre Unterstützung in der Immunfluoreszenz. Diesbezüglich danke ich auch Susanne Duman, die mir sämtliche Kryostatschnitte für die Immunfluoreszenz zur Verfügung gestellt hat. Maja Wilczek und Silke Tamasi halfen mir stets in allen organisatorischen und sonstigen Fragen. Beate Preuss danke ich für die inhaltliche Fortführung der Arbeit im Rahmen ihrer Promotionsarbeit und Jörn Dengjel für die Proteinanalysen. Zuletzt danke ich meinem Mann Tobias für die Durchsicht des Manuskripts und seine ewigwährende Geduld, sowie meinen Eltern, die mich während meines Studiums stets großzügig finanziell unterstützt haben.

Teile der Doktorarbeit wurden als Poster präsentiert auf der EASL in Berlin (April 2004) (1) sowie dem 41. Kongress der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Oktober 2004, Friedrichshafen (2).

- 1) Feuchtinger M, Dengjel J, Stevanovic S, Klein R. Identification of F1-ATPase as a new target antigen of antimitochondrial antibodies (AMA) in primary biliary cirrhosis (PBC). J Hepatol 40, S1, 159 (2004).
- 2) Feuchtinger M, Dengjel J, Preuß B, Duman S, Stevanovic S, Klein R. F1-ATPase der inneren Mitochondrienmembran- ein neues Target-Antigen antimitochondrialer Antikörper (AMA) bei der primär-biliären Zirrhose (PBC). 41. Kongress Südwestdtsh Ges Inn. Med., Friedrichshafen, Oktober 2004.

Abstract:

Feuchtinger, Manon

Charakterisierung eines neuen mitochondrialen Antigen-Antikörper-Systems bei der primär-biliären Zirrhose – Isolierung und Charakterisierung eines 60 kD Antigens aus dem Überstand von submitochondrialen Partikeln

Hintergrund: Antimitochondriale Antikörper (AMA), insbesondere Anti-M2, gelten als pathognomonisch für die primär-biliäre Zirrhose (PBC). In der vorliegenden Arbeit werden neue mitochondriale Antigen-Antikörpersysteme vorgestellt, die bei Patienten mit klinisch/ histologisch hochgradigem Verdacht auf PBC und positiven AMA aber negativen Befunden für Anti-M2 zu beobachten waren.

Methoden und Ergebnisse: Es wurden 73 Anti-M2 negative Seren von Patienten mit PBC, 22 Anti-M2 positive Seren, insgesamt 88 Seren von Patienten mit anderen Autoimmun- oder Lebererkrankungen sowie 30 Seren von gesunden Blutspendern untersucht. Vierzehn von 43 (33%) Anti-M2 negativen Seren von Patienten mit PBC, die im Westernblot gegen einen 100 000g Überstand von submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz getestet wurden, reagierten mit einer Determinante bei 60 kD, die sich in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation bei 1,18-1,20 anreichern ließ. Nach Isolierung durch Elektroelution aus dem Gel konnten in dieser Bande mittels massenspektrometrischer Analysen F₁-ATPase und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette identifiziert werden. Von den Seren der Vergleichsgruppen reagierten auch 70% der Anti-M2 positiven Seren mit der 60 kD Bande. Seren von gesunden Probanden und Patienten mit anderen Erkrankungen waren dagegen vollständig negativ.

Schlussfolgerung: Die hier vorgelegten Untersuchungen lassen darauf schließen, dass es bei der PBC neben den Anti-M2 Antikörpern weitere spezifische antimitochondriale Antikörper gibt, die bisher allerdings ausschließlich im IFT und Westernblot nachgewiesen werden können. Diese Befunde tragen einerseits zur Verbesserung der serologischen Diagnostik bei, könnten aber auch neue Aspekte zur Aufklärung der Ätiopathogenese dieser chronischen Erkrankung eröffnen.

Abstract:

Feuchtinger, Manon

Characterization of a new mitochondrial antigen-antibody-system in Primary Biliary Cirrhosis – Isolation and Characterization of a 60 kd antigen found in supernatant of submitochondrial particels

Background: Antimitochondrial antibodies (AMA), especially anti-M2, are considered to be pathognomonic for primary biliary cirrhosis (PBC). In this work new mitochondrial antigen-antibody-systems are described which could be found in the sera of patients with clinically/ histologically defined PBC and presence of AMA in IFT but no reaction with the PBC-specific M2-antigen in ELISA and Western blotting.

Methods and results: 73 anti-M2 negative sera from patients with PBC, 22 anti-M2 positive sera from patients with PBC and all together 88 sera from patients with other autoimmune diseases or diseases of the liver, as well as 30 sera of healthy donors have been investigated. Fourteen of 43 (33%) anti-M2 negative sera from patients with PBC which had been tested against a 100 000 g supernatant of submitochondrial particels from beef heart (BH SMP SN) recognized an antigen of 60 kd. This antigen could be enriched by Sucrose Density Gradient Centrifugation at 1,18-1,20. After isolation by electroelution out of stained polyacrylamid gels, in this 60 kd band F₁-ATPase and complex III of the mitochondrial electron transport chain could be identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). In the control groups, 70 % of anti-M2 positive sera reacted as well with the 60 kd antigen, however none of the sera from healthy donors and patients with other diseases than PBC recognized the antigen.

Conclusion: These results suggest additional specific antimitochondrial antibodies other than anti-M2 antibodies in patients with PBC. These antibodies have been shown so far exclusively in IFT and Western blotting. Recognition of these antibodies may improve serologic diagnosis of PBC in the future as well as clarify the ethiopathogenetic understanding of this chronic disease.

Lebenslauf

- Geboren am 21. März 1973 in Scherzingen /Schweiz
- Schulbesuche in Heidelberg, Konstanz und Toronto; Abitur 1993 in Konstanz
- Vorklinisches Studium an der Philipps-Universität Marburg, Physikum 1995
- Klinisches Studium an der Universität Witten/Herdecke; Famulaturen in Münsterlingen (Schweiz), Kreuzlingen (Schweiz), Dortmund, Lesotho (Südafrika) und Bangalore (Indien); Drittes Staatsexamen am 10. Oktober 2000
- Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zelluläre Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ (Leitung Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee) der Eberhard Karls Universität Tübingen vom 15.01. bis 14.06.2003, anschließend assoziierte Kollegiatin vom 15.06.2003 bis 30.04.2004; Posterpreis des Graduiertenkollegs 10/03 (Titel: „F1-ATPase der inneren Mitochondrienmembran - ein neues Target-Antigen antimitochondrialer Antikörper (AMA) bei der primär-biliären Zirrhose (PBC)“)
- Kontaktstipendium im Rahmen des Hochschul- und Wissenschaftsprogramms für Frauen 08/2003 bis 07/2004
- Seit Februar 2005 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Fachklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Reutlingen (PPRT)
- Ich bin verheiratet und habe zwei Kinder (geboren 04/99 und 08/01)