

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Nachweis, klinische und pathogenetische Bedeutung von
funktionellen Antikörpern gegen den Gallensäuretransporter
bei Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen**

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

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

**vorgelegt von
Gaiser, Johannes Maria**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Löffler

Tag der Disputation: 02.02.2024

Für Tante Elisabeth und Oma

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Galle – Zusammensetzung und Aufgaben.....	1
1.2 Physiologie der Gallensalzexportpumpe	3
1.3 Pathologien der Galle und der BSEP: Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase	6
1.3.1 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 1	7
1.3.2 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 2.....	8
1.3.3 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 3.....	9
1.3.4 Weitere PFIC-Entitäten.....	9
1.4 Nachweis von Anti-BSEP-Autoantikörpern bei PFIC2 Patienten nach LTx	10
1.5 Autoimmunerkrankungen	14
1.5.1 Cholestatische Lebererkrankungen: Primär biliäre Cholangitis und Primär sklerosierende Cholangitis	14
1.5.2 Autoimmune Hepatitis.....	15
1.5.3 Kollagenosen: Systemischer Lupus Erythemathodes und Primäres Sjögren Syndrom.....	16
1.5.4 Alkoholische Lebererkrankung und -zirrhose.....	18
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Untersuchte Patienten und Kontrollen.....	20
2.2 Material	23
2.3 Methoden	30
2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum quantitativen Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern	30
2.3.2 Arbeit mit Zellkulturen, -Plasmamembranen und -Vesikeln	31
2.3.2.1 Kultivierung von Zellen	31
2.3.2.2 Stimulation der BSEP-Expression in Zellen.....	32
2.3.2.3 Plasmamembranisolation: Methode I	32
2.3.2.4 Plasmamembranisolation: Methode II	32

2.3.2.5	Inside-out-Vesikelpräparation mittels Sepharose-Behandlung der Zellvesikel.....	33
2.3.3	Gelelektrophorese/ SDS-PAGE zur Isolation der BSEP	33
2.3.4	Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern.....	34
2.3.4.1	Western Blot mit Meerrettichperoxidase zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern	34
2.3.4.2	Infrarotfluoreszenz Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern	35
2.3.5	Ammoniumsulfatfällung von Immunglobulinen zur Verwendung im funktionellen Assay	36
2.3.6	Funktioneller Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern und deren Auswirkung auf die Transportkapazität der BSEP	37
2.3.6.1	Allgemeine Durchführung des funktionellen Assays.....	37
2.3.6.2	BSEP-Transportkapazität unter Verwendung unterschiedlicher Substrate	38
2.3.6.3	Vergleich von Immunglobulin-Verdünnungskonzentrationen.....	39
2.3.6.4	Materialvariation und Verdünnungsreihe der BSEP-Vesikelmenge	39
2.3.6.5	Mehrfachbestimmungen von Immunglobulinisolaten im funktionellen Assay (Intraassay-Variationskoeffizient).....	39
2.3.6.6	Wiederholte Messungen eines funktionellen Assays.....	40
2.3.6.7	Auswirkung von Einfrier-Auftau-Zyklen auf die Funktionalität der Anti-BSEP-Antikörper	40
2.3.6.8	Bestimmung der Interassay-Varianz	40
2.3.6.9	Testreihe - funktionelle Auswirkung von Immunglobulinen auf die BSEP.....	40
2.3.6.10	Verwendung von selbsthergestellten Zellvesikeln im funktionellen Assay.....	41
2.3.6.11	Zellvesikel - Auswirkung der BSEP-Stimulation von HepG2- und Huh7-Zellen mittels CDCA auf die Transportkapazität im funktionellen Assay.....	41
2.3.7	Proteinbestimmung der Zellvesikel vor und nach Sepharosebehandlung nach Bradford-Methode	41
2.3.8	Auswertung und Statistik	41
2.3.8.1	Auswertung des ELISA.....	41
2.3.8.2	Auswertung des Western Blot	42
2.3.8.3	Auswertung des funktionellen Assays	42

2.3.8.4	Korrelation der Anti-BSEP-Antikörpernachweismethoden.....	43
2.3.8.5	Statistik.....	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Nachweis von Antikörpern gegen die erste extrazelluläre Schleife (ECL-1) der BSEP mittels ELISA	45
3.1.1	ELISA-Antikörperreaktivitäten im Verlauf von ausgewählten Patienten	50
3.1.2	Veränderung der Antikörperreaktivitäten gegen die ECL-1 der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach Lebertransplantation.....	53
3.1.3	Auswertung der Veränderung von Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen.....	54
3.2	Anti-BSEP-Antikörpernachweis im Western Blot.....	55
3.2.1	Anti-BSEP-Antikörpernachweis im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln	55
3.2.2	Anti-BSEP-Antikörpernachweis an BSEP-Vesikeln mittels Western Blot Odyssey.....	57
3.2.3	BSEP-Nachweis in Plasmamembranisolaten aus Zellvesikeln mittels Western Blot Odyssey	57
3.2.4	BSEP-Nachweis in inside-out Zellvesikeln mittels HRP-Western Blot und Western Blot Odyssey	58
3.2.5	Zellvesikel - CaCo2-Zellen.....	59
3.3	Anti-BSEP-Antikörpernachweis im funktionellen Assay	60
3.3.1	Nachweis mit BSEP-Vesikeln im funktionellen Assay.....	60
3.3.1.1	Gallensalz-Aufnahmeraten in BSEP- und Nicht-BSEP-Vesikel mit den Substraten ATP, AMP und CsA.....	60
3.3.1.2	Vergleich unterschiedlicher Immunglobulinkonzentrationen im funktionellen Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern	61
3.3.1.3	Materialvariation und Verdünnungsreihe der BSEP-Vesikel im funktionellen Assay zur Versuchsoptimierung	61
3.3.1.4	Bestimmung des Intraassay-Variationskoeffizienten im funktionellen Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern	62
3.3.1.5	Wiederholte Messungen der ausplattierten Ansätze des funktionellen Assays.....	62
3.3.1.6	Ergebnisse der Einfrier- und Auftau-Experimente der im funktionellen Assay verwendeten Immunglobuline	62
3.3.1.7	Bestimmung der Interassay-Varianz des funktionellen Assays .	64

3.3.1.8	Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay.....	66
3.3.2	Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern und BSEP-Nachweis im funktionellen Assay unter Verwendung von selbsthergestellten Zellvesikeln.....	69
3.3.2.1	Sepharose-behandelte inside-out Zellvesikel und Plasmamembranisolate im funktionellen Assay mit verschiedenen Substraten.....	69
3.3.2.2	Einfluss der Chenodesoxycholsäure-Behandlung der Zellkultur auf die Taurocholataufnahme in Zellvesikel im funktionellen Assay.....	72
3.3.2.3	Veränderung des Proteingehalts der Zellvesikel vor und nach Sepharosebehandlung.....	73
3.4	Korrelation der verwendeten Methoden zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern.....	73
3.4.1	Korrelation von ELISA und Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern.....	73
3.4.2	Korrelation von ELISA und funktionellem Assay zum Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern.....	73
3.4.3	Korrelation von Western Blot und funktionellem Assay zum Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern.....	74
3.4.4	Korrelation der Anti-BSEP-Antikörper-Nachweismethoden.....	74
3.5	Klinische und laborchemische Auffälligkeiten bei Patienten mit Anti-BSEP-Antikörpernachweis.....	74
3.5.1	Korrelation zwischen Anti-BSEP-Antikörpern und klinischer Aktivität der Patienten.....	74
3.5.2	Einfluss von Geschlecht, Alter, Erkrankungsdauer und Therapiezustand auf den Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern.....	77
3.5.3	Zusammenhang von Anti-BSEP-Antikörpernachweis und Laborchemie.....	78
4.	Diskussion	80
4.1	Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern.....	80
4.1.1	Anti-BSEP-Antikörpernachweis im ELISA.....	80
4.1.2	Anti-BSEP-Antikörpernachweis im Western Blot.....	82
4.1.3	Nachweis funktioneller Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assay.....	83
4.2	Anti-BSEP-Antikörper in verschiedenen Nachweismethoden.....	85

4.3	Zusammenhang von Anti-BSEP-Antikörpernachweisen und klinischer Aktivität, Laborchemie und weiteren Parametern der untersuchten Patienten.....	86
4.4	BSEP-Vesikel aus HepG2-, Huh7- und CaCo2- Zellen.....	88
4.5	Bedeutung des Anti-BSEP-Antikörpernachweises und mögliche pathophysiologische Erklärungsansätze	91
4.6	Schlussfolgerung.....	93
5.	Zusammenfassungen	95
5.1	Abstract.....	95
5.2	Zusammenfassung.....	97
6.	Literaturverzeichnis	99
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	110
8.	Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-binding Casette-Transporter
AEC-Tabletten	3-Amnio-9-ethylcarbazole-Tabletten
AIBD	Antikörper-induzierte BSEP Defizienz
AIH	Autoimmunhepatitis
ALD	Alcoholic liver disease, Alkoholische Lebererkrankung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMA	Anti-Mitochondriale Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ANA	Anti-Nukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser, H ₂ O
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary units, willkürliche Einheiten
BRIC	Benigne Rekurrente Intrahepatische Cholestase
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile salt export pump, Gallensalzexportpumpe
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CDCA	Chenodesoxycholsäure
CRP	C-Reaktives Protein
CsA	Ciclosporin A
DILI	Drug induced liver injury, Arzneimittel-induzierte-Leberverletzung
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL-1	Erste extrazelluläre Schleife der BSEP
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FT	Freeze-thaw-cycles, Einfrier-Auftau-Zyklen
FXR	Farnesoid X-Rezeptor

GGT	Gamma-Glutamyltransferase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig A/G/M	Immunglobulin der Klassen A/G/M
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
K1, K2, K3	Kontrolle 1/2/3
LPS	Lipopolysaccharide
LTx	Lebertransplantation
MDR	Multidrug-Resistance Protein
NTCP	Natrium-kotransportierendes Taurocholat Polypeptid
OATP	Organisches Anionen-transportierendes Polypeptid
OST	Organic solute transporter
pANCA	Perinukleäre Anti-Neutrophile Zytoplasmatische Antikörper
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Probenentnahme (=Blutentnahme)
PFIC	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PSS	Primäres Sjögren Syndrom
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLE	Systemischer Lupus Erythemathodes
SSA/SSB-Antikörper	Anti-Sjögrens-Syndrom-related Antigen A/B Autoantikörper
SVP	Serumverdünnungspuffer
Tab.	Tabelle
UDCA	Ursodesoxycholsäure
WP	Waschpuffer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Grundprinzip des funktionellen Assays anhand der Darstellung von outside-out und inside-out Vesikeln</i>	S. 37
Abbildung 2: <i>IgG-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen</i>	S. 46
Abbildung 3: <i>IgA-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen</i>	S. 47
Abbildung 4: <i>IgM-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen</i>	S. 48
Abbildung 5: <i>Exemplarische Anti-BSEP-ECL-1-IgG-Antikörperreaktivitäten-verläufe im ELISA bei einer PBC-Patientin (1) und einem PSC-Patienten (2)</i>	S. 51
Abbildung 6: <i>Exemplarische Anti-BSEP-ECL-1-IgG (1) und IgM (2) Antikörperreaktivitätenverläufe im ELISA bei einer AIH-Patientin</i>	S. 51
Abbildung 7: <i>Exemplarische ELISA-Antikörperreaktivitätenverläufe gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP einer PSS-Patientin</i>	S. 52
Abbildung 8: <i>Exemplarische ELISA IgG- (1) und IgM- (2) Antikörperreaktivitätenverläufe gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP einer SLE-Patientin</i>	S. 52
Abbildung 9: <i>Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach LTx</i>	S. 53
Abbildung 10: <i>ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten von AIH-Patienten (1) und PSS-Patienten (2) im Verlauf gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP</i>	S. 54

Abbildung 11: <i>Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen</i>	S. 56
Abbildung 12: <i>BSEP-Nachweise in BSEP-Vesikeln, Plasmamembranisolaten und inside-out Zellvesikeln im Western Blot Odyssey</i>	S. 58
Abbildung 13: <i>Reaktivität von Anti-BSEP-Antikörpern an Sepharose-behandelten CaCo2 inside-out Vesikeln im Western Blot Odyssey</i>	S. 59
Abbildung 14: <i>Mittelwerte der Gallensalz-Aufnahmeraten in BSEP- und Nicht-BSEP-Vesikel mit den Substraten ATP, AMP und CsA</i>	S. 60
Abbildung 15: <i>Verdünnungsreihe von BSEP-Vesikeln im funktionellen Assay zur Versuchsoptimierung mit und ohne Einsatz von Immunglobulinen</i>	S. 61
Abbildung 16: <i>Gallensalzaufnahmeraten-Verläufe in BSEP-Vesikel nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen der Immunglobulinisolate im funktionellen Assay</i>	S. 63
Abbildung 17: <i>ATP und AMP im funktionellen Assay nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen</i>	S. 64
Abbildung 18: <i>Mittelwerte der ATP-Ansätze (Standardwerte) ohne Zugabe von Immunglobulinisolaten in verschiedenen funktionellen Assays</i>	S. 65
Abbildung 19: <i>Verläufe von Kontrollimmunglobulinen im funktionellen Assay</i>	S. 65
Abbildung 20: <i>Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen</i>	S. 67
Abbildung 21: <i>Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen als Faktoren des Medians der gesunden Kontrollen</i>	S. 68

Abbildung 22: <i>Gallensalzaufnahme in inside-out Zellvesikel von HepG2-, Huh7-, CaCo2-Zellen und BSEP-Vesikel unter Verwendung verschiedener Substrate im funktionellen Assay</i>	S. 70
Abbildung 23: <i>Einfluss der CDCA-Stimulation von HepG2- und Huh7-Zellen auf die Taurocholataufnahme in inside-out BSEP-Zellvesikel im funktionellen Assay</i>	S. 72
Abbildung 24: <i>Vergleich der ELISA IgG-Anti-ECL-1-Reaktivitäten von Patienten in Remission versus Patienten mit klinischer Aktivität</i>	S. 75
Abbildung 25 (1): <i>Vergleich der Antikörperreaktivitäten der Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assays aller Kohorten nach CRP-Wert</i>	S. 79
Abbildung 25 (2): <i>Vergleich der ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten von Anti-BSEP-Antikörpern aller Kohorten nach Blutsenkungsgeschwindigkeit</i>	S. 79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Übersicht der untersuchten Patienten</i>	S. 21
Tabelle 2: <i>Hauptdiagnosen der Kinder vor und nach LTx</i>	S. 22
Tabelle 3: <i>Laborbedarf</i>	S. 23
Tabelle 4: <i>Geräte und Software</i>	S. 23
Tabelle 5: <i>Reagenzien und Chemikalien</i>	S. 24
Tabelle 6: <i>Puffer und Lösungen</i>	S. 26
Tabelle 7: <i>Puffer und Lösungen: ELISA</i>	S. 26
Tabelle 8: <i>Puffer und Lösungen: Western Blot</i>	S. 27
Tabelle 9: <i>Puffer und Lösungen: Western Blot Odyssey</i>	S. 27
Tabelle 10: <i>Sekundäre Antikörper</i>	S. 28
Tabelle 11: <i>BSEP-Vesikel, -Antigen und -Antikörper</i>	S. 28
Tabelle 12: <i>Zellen und Zellkultur</i>	S. 29
Tabelle 13: <i>Häufigkeit von Antikörpern gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen</i>	S. 45
Tabelle 14: <i>Vergleich der Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte</i>	S. 49
Tabelle 15: <i>Vergleich der Reaktivitäten von IgA-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte</i>	S. 49
Tabelle 16: <i>Vergleich der Reaktivitäten von IgM-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte</i>	S. 50
Tabelle 17: <i>Gegenüberstellung von Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach LTx</i>	S. 54
Tabelle 18: <i>Anti-BSEP-Antikörpernachweise im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen</i>	S. 55

Tabelle 19: <i>Intraassay-Variationskoeffizienten bei Mehrfachbestimmung im funktionellen Assay</i>	S. 62
Tabelle 20: <i>Häufigkeit stimulierender und inhibierender Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen</i>	S. 66
Tabelle 21: <i>Vergleich der Ergebnisse verschiedener Krankheitskohorten im funktionellen Assay unter Angabe der Signifikanzwerte</i>	S. 69
Tabelle 22: <i>Ergebnisse der selbsthergestellten inside-out Zellvesikel im funktionellen Assay unter Verwendung verschiedener Substrate und Vesikelkonzentrationen</i>	S. 71
Tabelle 23: <i>Vierfeldertafel der Anti-BSEP-Antikörpernachweise im Western Blot und ELISA</i>	S. 73
Tabelle 24: <i>Korrelationskoeffizienten (Spearman) der Anti-ECL-1-Antikörpernachweise im ELISA mit ausgewählten Parametern</i>	S. 76

1. Einleitung

1.1 Die Galle – Zusammensetzung und Aufgaben

Die Leber ist als größte Drüse des menschlichen Körpers eminent wichtig für eine Vielzahl an lebensnotwendigen Stoffwechselprozessen. Sie produziert die Galle, welche entscheidend für die Verdauung von Fetten, sowie die Ausscheidung lipophiler Substanzen ist. Die Gallenflüssigkeit besteht aus über 50% Gallensäuren, ca. 25% Phospholipiden, Cholesterin, Elektrolyten, konjugiertem Bilirubin, sowie Fremdstoffen, wie Xenobiotika und Toxinen, weiteren fettlöslichen Substanzen und Wasser [1, 2]. Die Gallensäuren liegen bei physiologischem pH als Anionen in Verbindung mit Natrium- oder Kaliumionen vor, weshalb korrekterweise von Gallensalzen gesprochen werden sollte. Gallensalze sind amphiphil, d.h. sie sind sowohl wasser- als auch fettlöslich (hydro- und lipophil) und bilden Mizellen. In den Mizellen bildet sich durch die Gallensalze ein lipophiler Kern, der die Aufnahme von fettlöslichen Stoffen wie konjugierten Xenobiotika oder Bilirubin zur Ausscheidung oder Cholesterinen und Fetten zur Verdauung ermöglicht [2]. Die hydrophile Außenseite ermöglicht die Löslichkeit der Mizellen in Wasser, bzw. die Bildung einer Emulsion. Die Sekretion der einzelnen Bestandteile der Galle in die von jeweils zwei Hepatozyten gebildeten Canaliculi erfolgt durch spezifische Transportproteine. Der Transport der Gallensalze wird an anderer Stelle ausführlich behandelt (s. 1.2 Physiologie der Gallensalzexportpumpe). Die Gallensalze werden in den Canaliculi durch Phospholipide gebunden, sonst würden sie als Detergenzien zytotoxisch auf die Hepatozyten wirken [1]. Durch den osmotischen Gradienten der Gallensalze, Phospholipide, Glutathion und Bikarbonat kommt es zum Einstrom von Wasser durch Aquaporine in den Tight-Junctions, welche die Zwischenräume zwischen den Hepatozyten verschließen [2]. Von den Canaliculi fließt die Galle durch den Ductus hepaticus und anschließend durch den Ductus cysticus in die Gallenblase. Auf diesem Weg wird die Galle fortschreitend modifiziert und in der Gallenblase durch den Entzug von Wasser und Elektrolyten konzentriert [2]. Durch das Hormon Cholezystokinin kontrahiert die Gallenblase und die Galle wird durch den Ductus choledochus ins Duodenum abgegeben.

Dort ermöglichen die durch Gallensalze entstandenen Mizellen die Fettverdauung durch Pankreasenzyme, sowie die Aufnahme und den Transport der Fette, des Cholesterins und fettlöslicher Vitamine in tieferliegende Darmabschnitte. Dort werden diese durch gesonderte Transportvorgänge von den Enterozyten aufgenommen. Gallensalze werden im Dünndarm durch Bakterien dekonjugiert und im terminalen Ileum mittels des apikalen Natrium-abhängigen Gallensäuretransporters (Apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) ebenfalls in die Enterozyten aufgenommen [3]. ASBT-Transporter kommen außerhalb des Ileums auch in den proximalen Tubuluszellen der Niere, in Cholangiozyten und in den Epithelzellen der Gallenblase physiologisch vor [4, 5]. Die Gallensalze verlassen die Enterozyten mittels des Organic solute transporter (OST) α/β -Dipeptids entsprechend ihres Konzentrationsgefälles ins Blut [3]. OST-Transportproteine wurden ebenfalls in der Niere und Cholangiozyten gefunden [6]. In der Leber werden die Gallensalze aus dem sinusoidalen Raum an der basolateralen Membran der Hepatozyten mittels sekundär-aktiven Transport durch das Natrium-kotransportierende Taurocholat Polypeptid (NTCP) und in deutlich kleineren Mengen Natrium-unabhängig mittels verschiedener organischer anionentransportierender Polypeptide (OATPs, u.a. OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1) aufgenommen [1]. In den Hepatozyten werden die Gallensalze erneut konjugiert, was den sogenannten enterohepatischen Kreislauf schließt. Die genauen Transportmechanismen in den Hepatozyten sind bisher häufig noch unbekannt und erst wenige Proteine wurden identifiziert [1, 7].

Bei den in der Leber produzierten Gallensalzen handelt es sich um primäre Gallensalze, die aus Cholesterin in mehreren Schritten synthetisiert werden [1]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gallensalzsynthese wird durch das Enzym Cytochrom P450 cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) vermittelt [8]. Zu den primären Gallensalzen gehören die Cholsäure, die Chenodesoxycholsäure (CDCA), sowie die mit den Aminosäuren Taurin und Glycin konjugierten Gallensäuren Taurocholsäure und Glycocholsäure. Von den Hepatozyten werden vornehmlich (>99%) konjugierte Gallensalze in die Galle sezerniert [9, 10]. Die im Darm dekonjugierten Gallensalze sind sekundäre

Gallensalze, wozu die Desoxycholsäure, sowie die Lithocholsäure gehören. Als tertiäre Gallensalze werden in Darm und Leber modifizierte sekundäre Gallensalze bezeichnet, wie die Sulfolithocholsäure und die Ursodesoxycholsäure (UDCA).

Der enterohepatische Kreislauf ist ein sehr effizientes System, welches es der Leber ermöglicht, mit einer Gesamtmenge von zwei bis vier Gramm Gallensalzen täglich die sechs- bis zehnfache Menge Gallensalze in der Gallenflüssigkeit zur Ausscheidung von Abbauprodukten oder Fremdstoffen, sowie zur Fettverdauung einzusetzen [5]. Der menschliche Körper verliert täglich nur ca. 0,5g Gallensalze, wodurch eine deutliche Energieersparnis durch eine reduzierte Gallensäuresynthese resultiert [1].

Der Gallefluss und die Produktion der Gallensalze wird durch sog. Choleretica, d.h. den Gallefluss fördernde Stoffe, stimuliert. Bei diesen handelt es sich um Gallensalze selbst [3]. Gallensalze greifen direkt in die Genexpression ein, z.B. durch die Interaktion mit dem Farnesoid X-Rezeptor (FXR) [11-13]. Es wurden bereits einige membrangebundene und kernvermittelte Ansatzpunkte der Gallensalze identifiziert [1]. Die Produktion und Sekretion der Gallensalze unterliegen einer zirkadianen Rhythmik [14, 15]. Der Transport der Gallensalze aus den Hepatozyten wird durch das Gallensalz-Exportpumpen-Protein (engl. Bile salt export pump, BSEP) vermittelt und im Weiteren detaillierter dargestellt.

1.2 Physiologie der Gallensalzexportpumpe

Die Gallensalzexportpumpe ist das Hauptprotein in Hepatozyten, welches Gallensalze in die Gallencanaliculi sezerniert [5]. Dies ist notwendig, da Gallensalze durch ihre negative Ladung die Zellmembran nicht passieren können [3]. Nur für wenige Gallensalze, etwa tetrahydroxylierte Gallensalze oder Taurolithocholat-3-Sulfat, konnte ein Transport über die Proteine Multidrug-Resistance Protein 1 (MDR-1) und Multidrug-Resistance Protein 2 (MDR-2) nachgewiesen werden [16, 17]. Der Gallensalzexport aus Hepatozyten mittels der BSEP ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des enterohepatischen Kreislaufs [18, 19]. Die Sekretion der Gallensalze erfolgt unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch gegen das Konzentrationsgefälle [20, 21].

Die BSEP erreicht eine Konzentration der Gallensalze in den Canaliculi, welche dem 100- bis 1.000-fachen der mikromolaren Konzentration in den Hepatozyten entspricht [22]. Es werden fast ausschließlich konjugierte Gallensalze von der BSEP transportiert [23], was in Studien an Patienten mit Defekten bei der Konjugation von Gallensalzen nachgewiesen werden konnte [24, 25]. Besonders gut transportiert wird Taurochenodesoxycholat, dann folgen in absteigender Reihenfolge Taurocholat, Tauroursodesoxycholat und Glycocholat [23].

Das BSEP-Protein wurde Anfang der Neunzigerjahre in Vesikeln aus apikalen, canaliculären Membranen von Rattenhepatozyten entdeckt und konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden [15, 20, 21, 26-28]. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zum P-Glykoprotein (=MDR1) wurde es zunächst als Schwester des P-Glykoproteins bezeichnet [29]. Heute trägt es den Namen Gallensalz-exportpumpe oder Gallensalz-Export-Protein, sowie nach seiner Familienzugehörigkeit den Namen ABCB11. Die BSEP ist das elfte Mitglied des ATP-binding Casette-Transporters (ABC-Transporter) der Subfamilie B. Sie ist auf Chromosom 2q24-31 lokalisiert und besteht aus 1321 Aminosäuren, 28 Exons und besitzt eine Masse von ca. 146 kDa [10]. Wie für ABC-Transporter typisch, besteht die BSEP aus zwei Transmembrandomänen, welche bei der Subfamilie B aus sechs membrandurchspannenden Helices bestehen, sowie zwei Nukleotid-bindenden Domänen [30]. Fünf der Helices bilden eine zytoplasmatische Domäne [30]. Die Transmembrandomänen binden die Gallensalze und führen die Translokation durch [30]. Die zwei Nukleotid-bindenden Domänen binden und hydrolysieren ATP, sie bestehen aus hochkonservierten Walker A und Walker B Motiven [30, 31].

Die BSEP wird in die apikale Membran der Hepatozyten im Bereich der Mikrovilli eingebaut [23]. In Experimenten zeigte sie eine Halbwertszeit von vier bis sechs Tagen und wies eine räumliche Zirkulation innerhalb der Hepatozyten auf [32, 33]. Neben ihrem Vorkommen in der apikalen Hepatozytenmembran wurde die BSEP im Golgi-Apparat des intrazellulären Raumes und in Endosomen unterhalb der apikalen Membran lokalisiert [34]. Je nach Erfordernissen können Hepatozyten so ihren Bedarf an BSEP-Proteinen exakt steuern und die Gallensalz-Sekretion anpassen [35]. In Experimenten wurde die Mehrheit der

BSEP in intrazellulären Endosomen nachgewiesen [33]. Durch Taurocholat kommt es über die EPAC/LKB1/AMPK Kinase-Kaskade, sowie über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) mittels PKA-abhängiger Mechanismen zum Einbau der BSEP aus intrazellulären Vesikeln [33, 36]. Auf Genebene obliegt dem FXR die Expressionskontrolle der BSEP [37], wobei der FXR durch Gallensalze beeinflusst wird – ein minutiöses Zusammenspiel, um einen fein aufeinander abgestimmten Gallensalz-Kreislauf zu ermöglichen.

BSEP-Proteine konnten bisher ausschließlich in der Leber nachgewiesen werden [30, 38], wobei die absolute Menge interindividuell stark verschieden sein kann [39]. In einigen Studien konnten größere BSEP-mRNA Mengen im Hoden, sowie kleinere Mengen in Nebennieren, Trachea, Prostata, Nieren, Darm, Thymus und Lunge [15, 38, 40] und während des ersten Trimesters in der Plazenta nachgewiesen werden [41]. Obwohl die BSEP ein stark konserviertes Protein darstellt, kann sie nur bedingt mit den BSEP-Transportern anderer Spezies verglichen werden. Bei Ratten konnte eine leicht unterschiedliche Substratnutzung [42, 43], wie auch eine vergleichbare, aber nicht identische Kinetik der BSEP nachgewiesen werden [25].

Die BSEP ist neben der Gallensalz-Sekretion besonders für Xenobiotika und Arzneimittel interessant, da diese zum Teil deutliche Stimulationen bzw. Inhibitionen des Transporters zeigen und vor allem als unerwünschte Arzneinebenwirkung von Bedeutung sind. Diese sind in ihrer schweren Ausprägung zwar selten [25], können aber relevant sein, da sie Auslöser für eine Arzneimittel-induzierte-Leberschädigung (Drug induced liver injury, DILI) sind und bis zum totalen Leberversagen mit Notfall-Lebertransplantation oder ggf. tödlichem Ausgang führen können. Bei der DILI geht man von einem Zusammenspiel von Umständen und Prädisposition aus, wobei die Inhibition der BSEP einen bedeutenden Faktor darstellt [44]. In einer Studie von Morgan et al. wurden fast ein Viertel von 200 häufig angewandten Medikamenten als inhibitorisch identifiziert und das bereits bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) von unter 100µM [45]. Zu erwähnen sind Ciclosporin A (CsA), sowie Rifampicin und Glibenclamid, die kompetitiv zu einer Hemmung der BSEP führen [10, 46, 47]. Auch Troglitazon, Cloxacillin, Bosentan und Estradiol-

17b-Glucuronid wirken inhibitorisch auf die BSEP [10, 46, 47]. Bereits kurz nach der ersten Klonierung der BSEP konnte die Inhibition durch CsA nachgewiesen werden [42]. Auch aberrante Gallensalze, wie sie vereinzelt durch Mutationen entstehen, können sich inhibitorisch auf die BSEP auswirken [48]. Es wurde nur für sehr wenige Medikamente, wie den Cholesterinsenker Pravastatin, den Mitosehemmer Vinblastin und das Antihistaminikum Fexofenadin ein Transport via BSEP zweifelsfrei nachgewiesen [49-51]. Vereinzelt Substanzen können sich stimulierend auf die BSEP auswirken, wobei zwischen einem vermehrten Einbau in die Membran und einer gesteigerten Genexpression unterschieden werden kann. Viele dieser sich noch im Experimentalstadium befindlichen Erkenntnisse sind nicht direkt auf den menschlichen Organismus übertragbar. CDCA scheint zu einer BSEP-Induktion zu führen [52]. Auch eine hypoosmolare Umgebung zeigte stimulierende Effekte [53]. Für Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol und CDCA konnte eine Stimulation des FXR als Mechanismus der BSEP-Stimulation nachgewiesen werden [37, 54, 55].

1.3 Pathologien der Galle und der BSEP: Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase

Bei Pathologien der Galle zeigt sich als Leitsymptom eine Cholestase. Diese kann als mangelnder oder eingeschränkter Galleabfluss und damit Galleaufstau verstanden werden, wobei die Ursache in den Hepatozyten und der Leber selbst (intrahepatisch) oder im Bereich der ableitenden Gallenwege (posthepatisch) lokalisiert sein können. Können Gallensalze nicht weiter in die Gallencanaliculi sezerniert werden, sammeln sie sich in den Hepatozyten an und greifen durch ihre detergentierende Wirkung u.a. die Mitochondrien an, was zu Leberschäden und Nekrosen führt [15, 56, 57]. Hepatozyten versuchen durch einen vermehrten Export der Gallensalze über die sinusoidale Membran (MDR3, MDR4, OST α/β [58]) die Gallensalzkonzentration intrazellulär zu senken. Auch die Anzahl weiterer Galle-exportierender Proteine in der canaliculären Membran wird erhöht [5]. Initial steigt der Gallensalzspiegel im Serum, bevor die Leberwerte (z.B. Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST)) aufgrund von Zelluntergängen ansteigen. Klinisch manifestiert sich eine Cholestase durch Ikterus, Pruritus, eine bräunliche Verfärbung des Urins und eine Entfärbung des

Stuhls, sowie eine mangelnde Fettverdauung und Aufnahme fettlöslicher Vitamine. Therapeutisch wird versucht den Galleabfluss wiederherzustellen.

Für eine Cholestase kommen verschiedene Ursachen in Frage, von Medikamentenwirkungen (s. DILI) über Gallensteine bis zu genetischen Ursachen, der sog. Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase (PFIC), zu denen verschiedene Defekte im Exportsystem der Hepatozyten gehören. Die PFIC soll an dieser Stelle genauer betrachtet werden. Zur Familie der PFIC gehören autosomal-rezessive Erkrankungen der direkt am Galleexport beteiligten Proteine, darunter Pathologien der BSEP. In den 1950er Jahren entdeckt [59] und ursprünglich auf PFIC 1-3 aufgeteilt, zeigen sich heute weitere, seltenere Entitäten, die allesamt direkt oder indirekt am Export der Gallensalze und Phospholipide in die Galle beteiligt sind. Die PFIC ist vor allem ein pädiatrisches Krankheitsbild [60]. Erkrankte mit PFIC1 oder 2 werden meist bereits in den ersten Lebensmonaten auffällig [61], Patienten mit PFIC3 oft erst nach 2-3 Lebensjahren [62]. Allen gemeinsam sind Symptome der Cholestase wie Pruritus, Ikterus und Gedeihstörungen [63]. Es können ebenfalls eine mangelnde Fettverdauung, Hepatomegalie oder, je nach Entität, extrahepatische Manifestationen vorkommen [63]. Bei der häufigsten Form, der PFIC2 [64], mündet die Cholestase rasch in eine Leberzirrhose mit konsekutivem Leberversagen, was häufig eine Lebertransplantation (LTx) erfordert. Mit ca. 12% der Kinder mit Cholestase und 10-15% der neonatalen Cholestasen ist die PFIC nicht unbedeutend, allerdings wurden genauere Inzidenzen bisher nicht systematisch erhoben [62, 65].

1.3.1 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 1

Die PFIC1 charakterisiert ein Defekt des Proteins ATP8B1, auch FIC1 genannt, ein Aminophospholipidtranslokator, genauer einer Flippase, in der canalikulären Membran. Ihre Aufgabe ist der Transfer von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin von der äußeren, canaliculär gelegenen, in die innere, zytoplasmatisch gelegene Membranseite. Dies erhält die Membranasymmetrie aufrecht, die eigene Lipid-Mikrodomänen schafft [66]. Diese Membranabschnitte zeichnet einen erhöhten Gehalt an Cholesterin, Caveolin-1 und Sphingomyelin aus [67, 68]. Zum einen schützt dies Hepatozyten vor der Wirkung der

Gallensalze [69], zum anderen zeigte sich, dass Lipid-Mikrodomänen entscheidend die Geschwindigkeit des Gallensalztransports der BSEP bei unveränderter Gallensalz-Affinität beeinflussen [15]. Außerdem scheint die veränderte Membranzusammensetzung Einfluss auf die Ausbildung der Mikrovilli zu haben [70], welches wiederum die Funktionalität und das Vorhandensein der BSEP beeinflusst (s.o.). FIC1 konnte nicht nur in hepatischem Gewebe, sondern auch in Pankreas- und Darmparenchym nachgewiesen werden. Im Darm scheint es für die Expression des ASBT und damit für die intestinale Aufnahme von Gallensalzen von Bedeutung zu sein [71].

Homozygote oder compound-heterozygote Mutationen des Proteins manifestieren sich unterschiedlich schwer, dementsprechend kann von der PFIC1 als Vollbild, ehemals als Byler-Erkrankung bezeichnet, auch die schwächere Variante der Benigen Rekurrenten Intrahepatischen Cholestase Typ 1 (BRIC1) differenziert werden. Bei dieser treten nur intermittierende cholestatische Episoden auf. Es zeigen sich klinisch die obig beschriebenen Symptome, aber auch wässrige Diarrhöen und Wachstumsretardierung sind typisch. Laborchemisch fallen erhöhte Bilirubin-, Gallensalz- und Transaminasenwerte auf. Die Gamma-Glutamyltransferase (GGT) liegt im Normbereich. Die Therapie ähnelt der PFIC2, allerdings kann es nach LTx noch zu Symptomen kommen, da FIC1 extrahepatische Manifestationen aufweist.

1.3.2 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 2

Die PFIC2, ehemals Byler-Syndrom (cave: nicht zu verwechseln mit der Byler-Erkrankung), wird heute aufgrund genauerer Kenntnis ihres Pathomechanismus auch als BSEP-Defizienz bezeichnet [21, 72]. Das Ausmaß der BSEP-Expression ist mutationsabhängig, bei schweren PFIC2 Ausprägungen können nur noch ca. ein Prozent der Gallensalze in der Galle vorhanden sein [72]. Eine Aktivität der BSEP von ca. 25% gilt als Schwelle zur Pathologie [64]. Leichte Ausprägungen werden als BRIC2 (analog zur BRIC1) bezeichnet [73]. Eine Manifestation als intrahepatische Cholestase der Schwangerschaft ist bekannt [74], ebenso Übergänge von leichten zu schweren Verläufen [75]. Inzwischen wurden fast 300 verschiedene Mutationen berichtet [76]. Aufgrund seiner einzigartigen Aufgabe als Exporteur der Gallensalze macht sich ein Mangel an

BSEP oft bereits in der Neonatalperiode oder kurz darauf bemerkbar [61]. Es kommt zu Symptomen einer Cholestase, häufig mit Gedeihstörung und dominierendem Pruritus. Die PFIC2 zeigt einen raschen Progress, ferner ist eine Assoziation der PFIC2 mit Hepato- und Cholangiozellulären Karzinomen bei ca. 15% der Patienten bekannt [77]. Laborchemisch zeigen sich erhöhte Gallensalze im Serum, meist deutlich erhöhte Transaminasenwerte [78], sowie ein erhöhtes Alpha-Fetoprotein. Die GGT befindet sich wie bei der PFIC1 im Normbereich [79]. Die Bilirubinwerte sind meist unauffällig [1]. Therapeutisch wird häufig eine externe Galleableitung oder UDCA eingesetzt [79], eine LTx in jungen Jahren ist jedoch oft nicht vermeidbar. Eine LTx wird i.d.R. vertragen und führt aufgrund der rein intrahepatischen Expression der BSEP zur Heilung der Erkrankung [65].

1.3.3 Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase Typ 3

Der PFIC3 liegt ein Defekt des MDR3 (= ABCB4) zugrunde, welches als Floppase in der canaliculären Membran Phosphatidylcholin in die Galle exportiert. Eine Abwesenheit der einzig in Hepatozyten vorkommenden Floppase führt zur ausbleibenden Bildung von Mizellen, sodass Gallensalze Hepatozyten und Gallenwege angreifen. Damit führt die Erkrankung, von der verschiedene Abstufungen und Ausprägungen bestehen [60], indirekt über den Untergang der Gallenwege zur Cholestase [80]. Korrekterweise müsste von einer Cholangiopathie gesprochen werden [64]. Das konsekutive Eintreten der Cholestase führt im Mittel erst nach 3,5 Jahren zu Symptomen [60]. Laborchemisch fällt eine um das zehnfache erhöhte GGT, bei oft normalem Bilirubin und erniedrigten Phospholipiden in der Galle auf [60]. Therapeutisch hilft UDCA, die LTx bleibt jedoch als einzig heilender Therapieansatz von Bedeutung [60].

1.3.4 Weitere PFIC-Entitäten

In einigen wenigen Fallberichten wurden weitere, sehr seltene, der PFIC zugeordnete Erkrankungen identifiziert. Darunter Defekte des Tight-Junction Protein 2 (TJP2), welches für die Funktion der Zonulae occludentes und damit für die Abgrenzung der Gallewege vom Leberparenchym verantwortlich ist [81]. Auch Defekte des MYO5b-Proteins, welches den Transport der BSEP in die

Membran regelt, sind bekannt [82]. Beide Erkrankungen manifestieren sich in einer Cholestase ohne GGT-Erhöhung [69, 83]. Besonders selten kommen Defekte im NR1H4-Gen vor, welches für den FXR codiert, der die BSEP und das MDR3 reguliert [63]. Diese Entitäten sind für die geregelte Funktion des Gallensalzexports relevant und sollen nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

1.4 Nachweis von Anti-BSEP-Autoantikörpern bei PFIC2 Patienten nach LTx

Im Jahre 2009 wurde von Davit-Spraul et al. die Hypothese aufgestellt, dass es bei schweren BSEP-Mutationen im Rahmen einer PFIC2 zur Antikörperbildung nach LTx kommen könnte, wobei die gebildeten Antikörper die Erkrankung nachahmen würden [79]. Die Autoren erstellten diese Hypothese, ohne die Kenntnis eines kurzen Fallberichts, der 1995 erschienen war [79, 84]. In jenem waren Sturm et al. zwar überrascht über das erneute Auftreten der PFIC2 nach einer LTx, stellten jedoch weder Hypothesen über diesen Sachverhalt an, noch wurden Antikörper nachgewiesen [84]. 2009 wurden parallel von zwei Gruppen Fälle von „erneutem Auftreten“ einer PFIC2 in Patienten nach LTx (gleiche Symptome, gleiche Laborparameter) und Detektion von Anti-BSEP-Antikörpern in den Seren der Patienten berichtet [85, 86]. In den folgenden Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Fälle zusammengetragen, die von einigen Autoren als Antikörper-induzierte BSEP Defizienz (AIBD) bezeichnet wurden [87], sodass heute von mindestens 30 berichteten Fällen von AIBD ausgegangen werden kann [85-99]. Die Häufigkeit unter transplantierten Kindern mit PFIC2 liegt Schätzungen zufolge bei acht Prozent [89]. Bei anderen Erkrankungen der PFIC ist ein Wiederkehren der Erkrankung nach LTx bis dato nicht beschrieben worden [100].

Die verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedliche experimentelle Methoden, wobei oft die Sequenzierung des ABCB11-Gens, sowie der Ausschluss einer Abstoßungsreaktion vorausging, um andere Ursachen der Symptomatik auszuschließen. Die Erstbeschreiber verwendeten zur Anti-BSEP-Antikörperdetektion die Behandlung von Rattenlebern mit Patientenserum [85], indirekte Immunfluoreszenz [85] und das Western Blotting von BSEP-Protein

[86]. Es gelang der Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern [85, 86]. Jara et al. verwendeten einen funktionellen Assay, bei dem die Anti-BSEP-Antikörper auf ihre Hemmwirkung hin untersucht wurden [85]. Dazu wurde die Aufnahme von Tritium-markiertem Taurocholat in inside-out-Vesikel gemessen, wodurch die Aufnahme der Gallensalze – im Gegensatz zum physiologischen Export aus den Hepatozyten heraus – quantifiziert werden konnte. Bei den verwendeten inside-out-Vesikeln handelte es sich um Sf9-Insektenzellvesikel, welche humanes BSEP exprimierten [85]. Es wurde ein stark inhibitorischer Effekt der Anti-BSEP-Autoantikörper auf die BSEP nachgewiesen [85]. Die Applikation von polyklonalen Anti-BSEP-Antikörpern in lebende Ratten und die Untersuchung der Rattenlebern und des Rattenbluts 24 Stunden später zeigte eine verminderte Menge Gallensalze in der Galle, sowie deren Anstieg im Blut [85]. Von weiteren Gruppen wurde vorwiegend eine Immunhistochemie von Patientenleberbiopsien zum BSEP-Nachweis und ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis der Anti-BSEP-Antikörper durchgeführt [87, 88, 90, 92, 94, 95]. Dadurch konnte die Existenz von Anti-BSEP-Antikörpern in PFIC2-erkrankten Kindern nach LTx bestätigt werden. Auch Western Blots wurden zum Anti-BSEP-Antikörper-Nachweis erfolgreich eingesetzt [85-87, 90, 92, 95, 99]. Der bei Jara et al. angewandte funktionelle Assay wurde wiederholt und durch mehrmalige Einfrier- und Auftauschritte der Antikörper-Vesikel-Ansätze modifiziert [87, 100]. Auch in der modifizierten Durchführung war eine deutliche Hemmwirkung auf die BSEP erkennbar [87].

Die klinische Manifestation der Anti-BSEP-Antikörper war individuell verschieden. Die meisten Erkrankten zeigten das Bild einer rekurrenden PFIC2 mit Cholestase und deutlichem Pruritus, einzelne Patienten blieben trotz direktem Anti-BSEP-Antikörpernachweis oder Anti-BSEP-Antikörper-Titeranstieg symptomfrei [87, 92, 94, 96]. Andere Patienten zeigten bei nachgewiesener AIBD extrahepatische Symptome, welche sich schlecht in das Bild einer AIBD einfügten. Zu diesen Symptomen zählten Vorhofflimmern [88], Morbus Crohn [94] und eine nekrotisierende Pankreatitis [93].

Wegen des autoimmunen Ursprungs der AIBD wurde die Therapie auf eine verstärkte Immunsuppression hin ausgerichtet [85, 86, 88-97]. In einigen Fällen

genügte eine Erhöhung der immunsuppressiven Medikation, um zu einem Rückgang der Erkrankung zu führen [85, 88]. In den meisten Fällen wurde mittels Plasmapherese, intravenöser Immunglobulingabe (IVIg) oder Immunadsorption gezielt eine Verminderung der Anti-BSEP-Antikörper angestrebt [86, 87, 90-98]. Der Anti-CD20-Antikörper Rituximab, welcher zur Reduktion der Antikörperlast durch direkte Inhibition der B-Zellen bei verschiedenen Erkrankungen eingesetzt wird [101], wurde seit der Anwendung durch Lin et al. verwendet [87, 90-98]. Einige Forschungsgruppen postulierten anhand dieser Erkenntnisse eine Korrelation der Anti-BSEP-Antikörpertiter und der Symptomschwere einer AIBD [85, 92, 100, 102]. Aufgrund der oben genannten teilweise ausbleibenden Korrelation von Anti-BSEP-Antikörpernachweis/-Titer und Symptomschwere, wurden auch gegenteilige Ansichten vertreten [96]. Die Durchführung einer Stammzelltransplantation mit anschließender Heilung der AIBD bewies zusätzlich den autoimmunen Charakter der Erkrankung [96, 103]. Nicht alle Therapieversuche waren erfolgreich und nicht in allen Fällen wurde eine Symptombesserung durch Immunsuppression erzielt [86, 88, 89, 93, 96]. Relativ häufig schienen der AIBD Auslöser wie Virusinfektionen (Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis B-Virus), eine Verminderung der Immunsuppression oder eine Nahrungsmittelallergie vorauszugehen [85]. Der Abstand zur vorausgegangenen LTx betrug laut Siebold et al. ca. drei Jahre [89]. In der Gruppe der AIBD-Patienten schienen schwere BSEP-Mutationen, die zur vollständigen Abwesenheit des Proteins führen, deutlich häufiger aufzutreten [100]. Insgesamt gab es kaum Fälle, in denen ein Patient bei nachgewiesener AIBD trunkierende Reste der BSEP aufwies [87].

Bei den nachgewiesenen Anti-BSEP-Antikörpern handelte es sich um Immunglobuline der Klasse G (IgG) [85]. Der Transportmechanismus der gebildeten Anti-BSEP-Antikörper um von sinusoidal der Hepatozyten nach canaliculär zur BSEP zu gelangen ist noch unbekannt [104]. Durch Transportexperimente konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb von zehn Minuten Anti-BSEP-Antikörper aus dem Serum in die Canaliculi gelangten [86]. Dies lässt sich mit reiner Diffusion nicht erklären und auch Rezeptor-mediierten Transportmechanismen sind bisher nicht bekannt [104]. Von einem Rezeptor-

medierten Transport der Antikörper durch die Zelle, über den Transport der BSEP vom Golgi-Apparat zur basolateralen Membran, dem dortigen Binden der Anti-BSEP-Antikörper und der Rückverlagerung des Antikörper-BSEP-Komplexes in die apikale Membran, bis zu dem Transport durch Tight-Junctions, wurden verschiedene Hypothesen postuliert [100].

Eine interessante Fragestellung ist ferner das Epitop der Anti-BSEP-Antikörper. Stindt et al. konnten in Experimenten nachweisen, dass die N-terminale Hälfte des BSEP-Proteins von allen untersuchten Patientenseren und die C-Terminale Hälfte von einigen Seren erkannt wurden [87]. Bei genauerer Analyse wurde die erste extrazelluläre Schleife (ECL-1) des BSEP-Proteins als immundominantes Epitop identifiziert [86]. Dennoch gelang es nicht allen Anti-BSEP-Antikörpern, diese zu binden [87]. Bei nachgewiesener Polyklonalität [87] ist davon auszugehen, dass verschiedene Epitope erkannt werden. Die ECL-1 erscheint trotz dessen aufgrund ihrer Struktur als größte extrazelluläre Schleife ein wahrscheinliches Epitop der Antikörper zu sein [87]. Bei anderen hepatischen Erkrankungen, bei denen es zur vollständigen Abwesenheit eines intrazellulären Proteins kommt, wurden bisher keine Antikörper beschrieben [92]. Obwohl Antikörperantworten auf intra- und extrazelluläre Teile der BSEP gefunden werden konnten, sollte nur eine Inhibition der extrazellulären Anteile den Gallefluss reduzieren können [87]. Trotz der häufigeren vollständigen fehlenden Expression der BSEP bei PFIC2-Patienten, scheint die AIBD nicht allzu häufig zu sein [86].

1.5 Autoimmunerkrankungen

Das menschliche Immunsystem muss nicht nur fremde Organismen und Stoffe als solche erkennen, um sie zu bekämpfen, sondern auch den menschlichen Organismus und seine Kommensalen als körpereigen erkennen, um jene unbehelligt zu lassen. Dem liegen verschiedene Mechanismen zugrunde, wie z.B. die Auslese von T-Zellen im Thymus oder die Deletion von B-Zellen im Knochenmark, bei denen das Immunsystem eine Toleranz erwirbt. Wird diese Toleranz nicht erworben, kommt es zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung, gelegentlich auch Autoaggressionserkrankung genannt, wie am Beispiel der AIBD dargestellt. Im Folgenden sollen einige für diese Arbeit relevante Autoimmunerkrankungen und die nicht-autoimmun verursachte alkoholische Lebererkrankung vorgestellt werden.

1.5.1 Cholestatische Lebererkrankungen: Primär biliäre Cholangitis und Primär sklerosierende Cholangitis

Die Primär biliäre Cholangitis (PBC) ist eine Autoimmunerkrankung die T-Lymphozyten-mediiert zur Destruktion von Cholangiozyten führt [105]. Bei einem langsamen Progress der Erkrankung folgen vor allem Pruritus und verstärkte Müdigkeit, sog. Fatigue, als Hauptsymptome. Es kommt zu weiteren Cholestase-Symptomen, bis der ungehemmte Progress zur Zirrhose führen kann. Ein verstärktes Auftreten von Hepatozellulären Karzinomen (HCC) wurde beschrieben [106]. Durch die Infiltration der Gallenwege kommt es zunächst zur Destruktion der kleinsten Äste und die Erkrankten bleiben lange asymptomatisch. Diagnostisch sind Anti-Mitochondrialen Antikörper (AMA), sowie eine pathologische GGT und ein erhöhtes Immunglobulin M (IgM) bei initial normalen Bilirubinwerten wegweisend [105]. AMA kommen bei ca. 95% der Erkrankten vor [106]. Trotz Cholestase wird BSEP normal exprimiert [107], allerdings wurde das Auftreten verschiedener BSEP-Variationen bei der PBC beschrieben [108]. Epidemiologisch sind überwiegend Frauen betroffen (10:1); das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 55 Jahren [105]. Ein auffällig hoher Anteil der Erkrankten weist weitere Autoimmunerkrankungen auf. Dazu gehören das Sjögren-Syndrom, welches die häufigste Entität darstellt, sowie Schilddrüsenerkrankungen und die Systemische Sklerose [109]. Therapie der

Wahl ist UDCA, bei Zirrhose wird eine LTx angestrebt [105]. Alternativ wird vermehrt Obeticholsäure eingesetzt [110].

Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) ist wie die PBC eine cholestatische, wahrscheinlich autoimmune Lebererkrankung, bei der es durch eine noch ungeklärte Pathogenese zur Entzündung, Fibrose und Zerstörung von intra- und extrahepatischen Gallenwegen kommt [105, 111]. Pathophysiologisch scheint ein Zusammenspiel von genetischer Disposition und Umweltfaktoren die Erkrankung auszulösen [112]. Auffällig ist die gehäufte Komorbidität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die bei ca. zwei Drittel der PSC-Erkrankten auftreten, vor allem der Colitis ulcerosa [113]. Die meisten Patienten sind bei Diagnosestellung asymptomatisch oder geben als Hauptsymptome Bauchschmerzen oder Pruritus an [111]. Im weiteren Verlauf nehmen die Symptome einer Cholestase zu. Endstrecke ist für viele Erkrankte die Leberzirrhose. Cholangiozelluläre Karzinome und Kolonkarzinome treten gehäuft auf [114]. Die Diagnose wird über eine Endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikografie oder eine Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie gestellt [105]. Vorhandene perinukleäre Anti-Neutrophile Zytoplasmatische Antikörper (pANCA)-Antikörper sind unspezifisch, helfen aber bei der Diagnosestellung [111]. Wie bei der PBC wurden BSEP-Variationen bei der PSC beschrieben [108]. Die gestörte Gallen-Homöostase scheint zur Pathophysiologie beizutragen [111]. Epidemiologisch überwiegen Männer bei einem mittleren Erkrankungsalter von 30-40 Jahren [105]. Eine erfolgreiche Therapie besteht bisher nicht, auch Immunsuppressiva helfen trotz wahrscheinlicher autoimmuner Komponente nicht [110]. Bisher wird UDCA eingesetzt, was kontrovers diskutiert wird [110]. Trotz gegebener Rezidivwahrscheinlichkeit bleibt die LTx die einzige Möglichkeit der Heilung [110].

1.5.2 Autoimmune Hepatitis

Als autoimmune Lebererkrankung kommt es bei der Autoimmunen Hepatitis (AIH) T-Zell-mediiert zu Leberschäden, wobei das Ausmaß zwischen asymptomatisch und akutem Leberversagen variiert [115]. Bei der AIH handelt es sich um ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Die genaue Ätiologie ist unbekannt, eine multifaktorielle Genese mit genetischen, immunologischen und

Umweltkomponenten wird angenommen [116]. Die AIH wird anhand ihrer nachweisbaren Autoantikörper in zwei Gruppen aufgeteilt: AIH Typ 1 weist Antikörper gegen Zellkerne (ANA) und glatte Muskulatur (SMA) auf; dieser Typ kommt sowohl bei Erwachsenen als auch Kindern vor [115]. Bei Typ 2 sind Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosomen (LKM1) und Anti-Leber-Cytosol-Antikörper (LC1) nachweisbar, bei diesem Typus dominieren Kinder das Bild [115]. Es besteht eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und klinischer Manifestation der Erkrankten [115, 117]. Ein gehäuftes Auftreten von extrahepatischen Autoimmunerkrankungen ist bei der AIH bekannt [115].

Die klinische Präsentation zeigt sich heterogen und teilweise schwer von anderen Erkrankungen zu differenzieren [115]. Da ein Fortschreiten zu einer Zirrhose und Leberversagen, sowie zum HCC führen kann, sollte eine AIH möglichst früh erkannt werden [116]. Häufige Symptome sind Fatigue, Ikterus, Arthralgien und Amenorrhoe [115]. Diagnostisch ist die Gesamtkonstellation wegweisend, aber auch eine Leberbiopsie und eine serologische Untersuchung sollten durchgeführt werden [115]. Laborchemisch sind oft eine Hypergammaglobulinämie und erhöhte Transaminasen vorhanden [115]. Die AIH wird klassisch mittels Immunsuppressiva, vor allem Prednisolon und Azathioprin, behandelt [115]. Ein Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie kann diagnostisch gewertet werden. Mittels Immunsuppression lässt sich die AIH gut behandeln [115]. Ggf. kann eine LTx notwendig werden, wobei auch die Rekurrenz im Lebertransplantat beschrieben wurde [118, 119]. Epidemiologisch dominieren Frauen [115]. Das Erkrankungsalter ist zweigipflig: im jungen Erwachsenenalter, sowie in der Menopause tritt die AIH gehäuft auf [115].

1.5.3 Kollagenosen: Systemischer Lupus Erythemathodes und Primäres Sjögren Syndrom

Der zu den Kollagenosen gehörende Systemische Lupus Erythemathodes (SLE) zeigt in seiner klinischen Manifestation ein sehr heterogenes Bild, welches von einer einfachen Hautbeteiligung bis zu schweren multiplen Organschäden reichen kann und intraindividuell veränderlich ist [120]. Im Rahmen eines SLE kann es auch zu einem sekundären Sjögren-Syndrom kommen [121]. So heterogen wie die Klinik präsentiert sich die Pathophysiologie, die durch ein

Zusammenspiel von genetischer Disposition, Umweltfaktoren, Hormonen und Zytokinen polymodal den Lupus-Phänotyp verursacht [120]. Sowohl angeborener als auch erworbener Teil der Immunantwort sind mit T- und B-Zellen involviert [120]. Neben einer deutlichen Immunkomplexreaktion finden sich beim SLE Autoantikörper, wie Anti-Nukleäre- und Anti-Extrahierbare-Nukleäre-Antikörper (ANA, ENA) oder Anti-Doppelstrang-DNS- und Anti-Smith-Antikörper, wobei letztere eine sehr deutliche Spezifität zeigen [122]. Die Diagnostik erfolgt aus Klinik und serologischem Bild. Epidemiologisch dominiert das weibliche Geschlecht, besonders im fruchtbaren Alter der Frau [120]. Therapeutisch werden neben Hydroxychloroquin Immunsuppressiva, Steroide, Vitamin D und gezielte Antikörpertherapien (Biologicals) angewandt [120].

Das Primäre Sjögren Syndrom (PSS) oder Morbus Sjögren ist vom sekundären Sjögren Syndrom abzugrenzen. Sein Auftreten im Rahmen einer Autoimmunerkrankung gilt als sekundär; häufiger im Rahmen eines SLE oder einer Rheumatoiden Arthritis [123]. Das PSS ist eine Erkrankung der Drüsen und Schleimhäute. Xerostomie und Xerophthalmie, d.h. trockener Mund und trockene Augen, dominieren das klinische Bild [124]. Prinzipiell können alle Schleimhäute, sowie weitere Organe betroffen sein; eine Fatigue tritt häufig auf [124]. Bevorzugt betroffen sind die Haut und die Lunge [123]. Eine veränderte Leberfunktion tritt bei 50% der Patienten auf, doch nur ca. zehn Prozent der Sjögren-Patienten erkranken an Lebererkrankungen, wie der PBC oder AIH [124-126]. Alle extraglandulären Manifestationen sind vergleichbar milder ausgeprägt als beim SLE, allerdings besteht ein fünfprozentiges Risiko der Entwicklung eines Non-Hodgkin-Lymphoms [127]. Die Pathophysiologie ist unbekannt, genetische Faktoren werden neben immunologischen (besonders B-Zell-Aktivität) und Umweltfaktoren (v.a. EBV-Infektion) angenommen [124]. Diagnostiziert wird nach Klinik, spezifischen Tests und Biopsie oder Serologie [124]. Sjögren-Patienten zeigen häufig ANAs, Anti-Sjögren-Syndrom-related Antigen A und B Autoantikörper (SSA- und SSB)-Antikörper, sowie Rheumafaktoren [122]. Diese sind bereits bis zu 20 Jahre vor Erkrankungsbeginn nachzuweisen [128]. Epidemiologisch dominiert das weibliche Geschlecht, bei einem Verhältnis von Frauen zu Männern von 9:1 bis 19:1; mittleres Erkrankungsalter sind 56 Jahre

[123]. Mit einer Prävalenz von mindestens 0,4% ist das PSS eine häufige Erkrankung [129]. Trotz guter Prognose sind aktuell keine kausalen Medikamente vorhanden, sodass symptomatisch therapiert wird. In schwereren Fällen können krankheitsmodifizierende anti-rheumatische Medikamente eingesetzt werden, z.B. Hydroxychloroquin [123].

1.5.4 Alkoholische Lebererkrankung und -zirrhose

Übermäßiger Alkoholenuss schadet allen Organen des menschlichen Körpers, besonders der Leber. Über seine Toxinwirkung schädigt Ethanol nicht nur direkt Hepatozyten, sondern beeinflusst auch verschiedene Stoffwechselfvorgänge wie den Fettstoffwechsel und wirkt sich auf das Mikrobiom aus [130]. Im Verlauf verfettet die Leber, was in 25-30% der Fälle in eine alkoholische Steatohepatitis übergehen kann [131]. 75% der Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis weisen eine noch nicht diagnostizierte Leberzirrhose auf [130]. Die alkoholische Steatohepatitis ist mit einer hohen Mortalität verbunden und geht teilweise in Leberzirrhose, Leberversagen und HCC über. Diagnostisch fallen neben einer erhöhten GGT ein de-Ritis-Quotient größer eins (AST/ALT), sowie erhöhte Immunglobulin A (IgA)-Spiegel auf. Therapeutisch werden dieselben Methoden wie bereits seit 50 Jahren eingesetzt: Abstinenz, Kortikosteroide und eine hochkalorische Ernährung [132]. Bei einer Leberzirrhose muss eine LTx angestrebt werden, allerdings mit nicht geringem Rückfallrisiko [132]. Alkoholgeschädigte Lebern weisen eine verminderte BSEP-mRNA und -Proteinmenge auf [133].

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Jara et al. und Keitel et. al. konnten 2009 zum ersten Mal Anti-BSEP-Antikörper bei Patienten mit einer PFIC2 nach LTx nachweisen (s.o.). Schiller gelang es im Rahmen seiner Promotion im Immunpathologischen Labor Tübingen erstmals Anti-BSEP-Antikörper bei weiteren Erkrankungen nachzuweisen [134]. Dazu zählten unter anderem cholestatische Lebererkrankungen wie die PSC und PBC, aber auch weitere Autoimmunerkrankungen wie AIH, SLE oder PSS [134].

Um genauere Zahlen zum Vorhandensein von Anti-BSEP-Antikörpern bei ausgewählten Erkrankungen zu erhalten, soll mit dieser Arbeit das untersuchte Kollektiv erweitert werden. Besonders die Seren von Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen (PBC, PSC), sowie weiteren Autoimmunerkrankungen (AIH, sowie Patienten mit SLE, PSS) und Nichtautoimmunerkrankungen (Alkoholische Lebererkrankungen (ALD), gesunde Kontrollen) sollen auf Anti-BSEP-Antikörper hin untersucht werden. Die Auswirkung von Lebertransplantationen auf die Antikörperbildung erfolgt durch die Untersuchung von Seren von Kindern vor und nach LTx mit verschiedenen Grunderkrankungen. Die Bestimmung der Anti-BSEP-Antikörper erfolgt mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blot, sowie einem funktionellen Assay. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob und wie häufig inhibitorische, aber auch stimulierende Antikörper in den verschiedenen Kollektiven vorkommen. Mittels Zellkultur soll versucht werden, die bisher kommerziell bezogenen Zellvesikel selbst aus gezüchteten Zellen zu präparieren. Gleichzeitig sollen damit physiologischere Membranvesikel geschaffen werden.

Mit der Verknüpfung der Daten untereinander, sowie mit den Laborwerten und klinischen Zuständen der Patienten soll ein umfassenderes Bild über das Vorkommen, die Pathogenese und die klinische Bedeutung von Anti-BSEP-Antikörpern gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchte Patienten und Kontrollen

Die in den Experimenten verwendeten Blutseren stammten aus den Beständen des Immunpathologischen Labors Tübingen und wurden bei -20°C gelagert. Die Diagnosen basierten auf der typischen Klinik und den passenden Laborergebnissen der Patienten. Für die Verwendung der Seren im Rahmen dieser Experimente lag ein entsprechendes Ethikvotum vor (Projektnr. 681/2011BO2; 076/2012BO1).

Untersucht wurden Seren von 170 Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen (PSC n=55, PBC n=67, AIH n=48) sowie von 46 Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung. Alle Patienten wurden in der hepatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I (Prof. Dr. C. Berg) betreut. Ferner wurden Seren von 23 Kindern mit chronischen Lebererkrankungen vor LTx und von 14 Kindern nach LTx untersucht. Von sieben Kindern waren Seren vor und nach LTx vorhanden (Kinderklinik, PD Dr. E. Sturm). Des Weiteren wurden Seren von 105 Patienten mit Kollagenerkrankungen untersucht (SLE n=48, PSS n=57). Zur Kontrolle dienten die Seren von 71 gesunden Probanden.

Eine Übersicht über die verschiedenen Kollektive, deren Alter, Geschlecht, Therapiezustand, klinische Aktivität und Laborparameter findet sich in Tabelle 1. Als Laborparameter wurden das C-reaktive Protein (CRP), die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), die Aspartat-Aminotransferase (AST), die Alanin-Aminotransferase (ALT), die Alkalische Phosphatase (AP) und die γ -Glutamyltransferase (GGT) untersucht. Für die Kollagenosen (SLE, PSS) wurden keine Leberparameter ausgewertet. Die klinische Aktivität der Patienten wurde anhand der Arztbriefe den folgenden Kategorien zugeordnet: Remission der Erkrankung (1; Symptombfreiheit), stabile oder milde Ausprägung der Erkrankung (2; leichte Symptomatik ohne subjektive Einschränkung des Patienten), ausgeprägte Klinik (3; typische Symptomatik der Erkrankung mit subjektiver Beeinträchtigung) und stark ausgeprägte Klinik (4; Vollbild der Erkrankung, z.T. mit Begleit- und Folgeschädigungen). Die Hauptdiagnosen der Kinder vor und nach LTx sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Patienten

	PSC	PBC	AIH	ALD	Kinder vor LTx	Kinder nach LTx	SLE	PSS	Gesunde Kontrollen
Anzahl	55	67	48	46	23	14	48	57	71
Geschlecht in %									
<i>männlich</i>	64	13	35	63	48	29	8	7	38
<i>weiblich</i>	36	87	65	37	52	71	92	93	52
<i>unbekannt</i>									10
Jahre mit Diagnose ¹									
<i>Median</i>	5	5	7	1	0	4	10,5	6	-
<i>Range</i> ²	-2 -29	0 -18	-3 -39	0 -6	-4 -9	1 -5	-2 -37	0 -36	-
Alter bei PE in Jahren ¹									
<i>Median</i>	41	55	47	53	11	13,5	40,5	45	32
<i>Range</i>	17-65	18-84	20-76	28-72	0-21	3-19	17-71	14-78	16-69
Therapiezustand ³ (in %) ⁴									
<i>unter Therapie</i>	41 (75)	44 (66)	29 (60)	0	13 (57)	14 (100)	37 (77)	25 (44)	-
<i>keine Therapie</i>	11 (20)	15 (22)	7 (15)	41 (89)	5 (22)	0	9 (19)	27 (47)	-
<i>unbekannt</i>	3 (5)	8 (12)	12 (25)	5 (22)	5 (22)	0	2 (4)	5 (9)	-
Klinische Aktivität									
<i>stark ausgeprägt</i>	0	0	0	5 (11)	0	0	1 (2)	1 (2)	-
<i>ausgeprägt</i>	10 (18)	5 (7)	4 (8)	12 (26)	7 (30)	1 (7)	6 (13)	8 (14)	-
<i>stabil/mild</i>	16 (29)	24 (36)	15 (31)	16 (35)	9 (39)	7 (50)	19 (40)	25 (44)	-
<i>Remission</i>	15 (27)	21 (31)	13 (27)	2 (4)	1 (4)	6 (43)	12 (25)	10 (18)	-
<i>unbekannt</i>	13 (24)	17 (25)	16 (33)	11 (24)	6 (26)	0	10 (21)	13 (23)	-
Laborwerte ⁵									
<i>CRP in mg/dl</i>	0,37 0,01- 11,7	0,14 0-11	0,17 0,01- 5	0,69 0-5	0,33 0,01- 4,4	0,05 0,01- 0,7	0,26 0,01- 24	0,2 0,01- 6,1	-
<i>BSG in mm/1h</i>	13,5 1-109	17 4-77	8 2-96	22 6-75	39 1-77	-	16 5-99	19 5-120	-
<i>AST in U/l</i>	51,5 12- 858	29 12- 172	32,5 10- 424	58 16- 232	127,5 25- 1448	29 11-47	-	-	-
<i>ALT in U/l</i>	65 11- 525	27,5 9-467	39 11- 954	30,5 10- 207	91,5 13- 1266	28 13-73	-	-	-
<i>AP in U/l</i>	165 68- 2037	110 43- 533	79 30- 573	145 55- 333	301 75- 1165	208,5 47- 403	-	-	-
<i>GGT in U/l</i>	153 10- 2419	57,5 8-859	57,5 6-717	98 23- 1072	147 7-587	15,5 6-330	-	-	-

¹Beinhaltet nur Patienten mit vorhandenen Daten ²Bei negativen Werten wurden die untersuchten Seren vor Erstdiagnose abgenommen; ³Bedeutet explizit immunsuppressive Therapie bzw. Therapie mit UDCA; ⁴alle Werte in Klammern sind Prozentwerte; ⁵Laborwerte jeweils als Median mit Range; PE = Probenentnahme

Tabelle 2: Hauptdiagnosen der Kinder vor und nach LTx

Kinder vor LTx		Kinder nach LTx	
Hauptdiagnosen	N	Hauptdiagnosen	N
Autoimmunhepatitis	1	Alpha-1-Antitrypsinmangel	1
Akutes Leberversagen	2	Gallengangsatresie	3
Alagille Syndrom	2	Hepatisches Karzinom	1
Alpha-1-Antitrypsinmangel	1	Leberzirrhose	1
Autoimmunsklerosierende Cholangitis	1	Morbus Wilson	1
Caroli-Syndrom	2	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3	1
Extrahepatische Gallengangsatresie	2	Primär sklerosierende Cholangitis	2
Hepatisches Karzinom	1	Nicht näher bezeichnet/unklar	4
Leberzirrhose	1		
Morbus Wilson	2		
Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3	3		
Primär sklerosierende Cholangitis	1		
Systemische Oxalose	1		
Zystische Fibrose	2		
Nicht näher bezeichnet/unklar	1		

Im ELISA wurden Serenverläufe von 50 Patienten untersucht, darunter 13 PSC-Patienten, acht PBC-Patienten, 13 AIH-Patienten, sowie jeweils acht SLE und PSS-Patienten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden diese nach festen Zeitstaffelungen eingeteilt. In der ersten Einteilung wurden die getesteten Seren im Abstand von 1,2,3,4,6,8 und 10, sowie >10 Jahren vom ersten Serum gewählt, wobei Seren, die das erste Jahr überschritten, dem zweiten zugeteilt worden sind usw. Pro Zeitkategorie wurde stets das früheste verfügbare Serum gewertet. Um für die statistische Auswertung über möglichst viele Seren pro Zeitkategorie zu verfügen, wurden zwei weitere Einteilungen vorgenommen. In der zweiten Einteilung wurden die Zeiträume zu den Intervallen von 2,4,8 und >10 Jahren zusammengelegt. Bei der dritten vorgenommenen Einteilung wurden Zeiträume bis Ende 3. Jahr, bis Ende 8. Jahr und ab Beginn 9. Jahr verwendet.

2.2 Material

Die verwendeten Materialien, Reagenzien, Puffer, Antikörper und Zellen sind in den Tabellen 3-12 aufgeführt.

Tabelle 3: Laborbedarf

ELISA Platten Nunc-immuno Plate F96 cert.maxisorp	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Deepwell Platten MegaBlock 96 Well, 1.2ml	Sarstedt AG&Co. KG, Nürnberg, DE
Falcons 50ml	Corning Science, Reynosa, MEX
Nitrozellulosemembran	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Filterplatten MultiScreen Filter Plates Harvest FB	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, IRL
Viewseal Abdeckfolie	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
100kDa Filter Amicon Ultra 0,5ml	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, IRL
Küvetten 10x4x4,5mm	Sarstedt, Nürnberg, DE
Potter: Dounce Homogenisator S	LAT GmbH, Garbsen, DE
Ultra-clean UZ-Tube	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Mini Trans Blot Cell	Biorad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE

Tabelle 4: Geräte und Software

Magellan Reader Tecan Spectra III Microplate reader rainbow SLT	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Western Blot-Power Supply LKB Bromma 2301 Macrodrive1 Power Supply	LKB Vertriebs-GmbH, Wien, AT
Beta-Counter MicroBeta ² LumiJET	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Falcon Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf-Cup Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Brutschrank BB 15 CO ₂ Incubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Sorvall Zentrifuge Lynx 4000	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Sorvall WX Ultra Series	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Ultraschall Homogenisator Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Brookfield, CT, USA
Licor Odyssey scanner ODY-1910	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Photometer T70 UV/VIS Spectrometer	PG Instruments Ltd., Leicestershire, UK
Graph Pad Prism 9.1.2 (226)	Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA

Tabelle 5: Reagenzien und Chemikalien

Gibco Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 6,81g KH ₂ PO ₄ 43,83g NaCl 44,49g Na ₂ HPO ₄ In 5L destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst	VWR Chemicals, Darmstadt, DE/ BioFroxx, Darmstadt, DE
Bovines Serum Ablumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100	SERVA, Heidelberg, DE
o-Phenylendiamine dihydrochloride peroxidase substrate	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
H ₂ O ₂ 30%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Schwefelsäure (25%)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethylaminomethane)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA, Heidelberg, DE
N,N,N',N'Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	SERVA, Heidelberg, DE
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, DE

Isopropanol	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE
Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein	Biorad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
3-Amnio-9-ethylcarbazole (AEC)-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dimethylfomamid	SERVA, Heidelberg, DE
Essigsäure	VWR Chemicals, Darmstadt, DE
Na-Acetat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glutamin GlutaMax Gibco	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Chenodesoxycholsäure (>96%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethanol	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Puffer A (Teil des Vesicular Transport Assay Reagent Kit)	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Puffer B (Teil des Vesicular Transport Assay Reagent Kit)	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Adenosintriphosphat (ATP) (Teil des Vesicular Transport Assay Reagent Kit)	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Adenosinmonophosphat (AMP) (Teil des Vesicular Transport Assay Reagent Kit)	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Tritium-markiertes Taurocholat	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Ciclosporin A Ikervis 1mg/ml	Santen Oy, Tampere, FIN
Szintillationsflüssigkeit Microscint PS	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Beriglobin 2ml Fertigspritze	CLS Behring, Marburg, DE
Protein Kit	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hepes	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Proteaseinhibitor Complete mini	Roche, Basel, CH
Concanavalin A Sepharose: ConA Sepharose 4B	Cytiva, DE

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

SDS-2fach Ladepuffer	4,5ml 2M Tris pH6,8 20ml Glycerin 2g SDS 2ml 1%BPB 10ml beta-Mercapto EtOH in 100ml Aqua dest. gelöst
Tris 1M Lösung	60,57g Tris in 0,5L Aqua dest. gelöst
Tris 1,5M Lösungen	90,86g Tris in 0,5L Aqua dest. gelöst
APS 10%	1g APS Pulver + 9g Aqua dest.
Essigsäure 7%	Hergestellt aus 7ml 100% Essigsäure + 93ml Aqua dest.
Ammoniumsulfat 60%	In Aqua dest. gelöst
Ammoniumsulfat 100%	in Aqua dest. gelöst
Lysispuffer	10 mM Hepes-NaOH mit NaOH auf pH 7,4 10 mM EDTA

Tabelle 7: Puffer und Lösungen: ELISA

Bicarbonatpuffer (0,2M), ph 9,6	33,9g Natriumcarbonat 57,12g Natriumhydrogencarbonat 5L Aqua dest.
Citratpuffer (0,2M), pH 5,0	82,36g Natriumcitrat 25,2g Citronensäure 4L Aqua dest.
Serumverdünnungspuffer	1,5L PBS 1-2 große Spatel BSA 1,2ml Triton
Waschpuffer 1	5L PBS 25g BSA
Waschpuffer 2	5L PBS 12,5g BSA 10ml Triton

Tabelle 8: Puffer und Lösungen: Western Blot

Trenngel 8% (für 8 Gele)	39ml Aqua dest. Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 22,3ml Tris (1,5M, pH 8,8) 21ml 840µl 10% SDS-Lösung 840µl 10% APS-Lösung 84µl TEMED
Sammelgel 5% (für 8 Gele)	26,5ml Aqua dest. Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 6,6ml Tris (1,0 M; pH 6,8) 4,9ml SDS (10%) 390µl APS (10%) 390µl TEMED 39µl
Waschpuffer	4,9L PBS 2,5g BSA 2,5ml Tween-20
Probenverdünnungspuffer	100ml PBS 3g BSA
Elektrodenpuffer	5g SDS 30,25g Tris 112,5g Glycin 5L Aqua dest.
Transferpuffer	1g SDS 6,06g Tris 28,82g Glycin 1,2L Aqua dest. 800ml Methanol

Tabelle 9: Puffer und Lösungen: Western Blot Odyssey

Blockierlösung =3%BSA-Lösung	200ml PBS 6g BSA
Serumverdünnungspuffer	100ml 3% BSA-Lösung + 200µl Tween-20
Waschpuffer	2L PBS 2ml Tween-20 (=0,1%)

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM	Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgA	Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
Dako Polyklonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
Dako Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/HRP	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Pierce Goat anti-Human IgM Cross absorbed (DyLight 680) Secondary Antibody	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
IRDye 800CW Donkey anti-Human IgG Secondary Antibody	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA

Tabelle 11: BSEP-Vesikel, -Antigen und -Antikörper

Antigen: BSEP-Vesikel: Human BSEP, Proteingehalt 5mg/ml aus Spodoptera frugiperda Sf9-Zellvesikeln	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Kontrolle: Leer-Vesikel (Control)	Geno Membrane, Yokohama, JPN
Anti-BSEP-Antikörper: BSEP (F-6) sc-74500 mouse monoclonal IgG	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA
Antigen: 1st. Extracellular Loop of BSEP	NeoBiotech, Nanterre, FR

Tabelle 12: Zellen und Zellkultur

HepG2-Zellen	DSMZ Braunschweig, DE
Huh7-Zellen	CLS Cell Lines Service, Eppenheim, DE
CaCo2-Zellen	CLS Cell Lines Service, Eppenheim, DE
Medium Huh7: Gibco Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Medium HepG2: Gibco F-12 Nut Mix (Ham)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Medium CaCo2: Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Gentamicin 80mg 2ml Ampullen	Rotexmedica Phanpharma, Luitré-Dompierre, FR
Gibco Fetales Kälberserum	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco Trypsin-EDTA 0,05%	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco Trypsin 0,25%	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kleine Brutflasche Cellstar 250ml, 75cm ²	Greiner Bio GmbH, Frickenhausen, DE
Große Brutflasche Nunclon Delta Surface 175cm ²	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Fertiges Huh7 Medium	DMEM Medium 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 0,16mg/ml Gentamicin
Fertiges HepG2 Medium	F12 Medium, 10% FCS, 0,16mg/ml Gentamicin
Fertiges CaCo2 Medium	EMEM, 10% FCS, 2mM L-Glutamin

2.3 Methoden

2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum quantitativen Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Für den ELISA zum Anti-BSEP-Antikörpernachweis wurde das Peptid der ersten extrazellulären Schleife (ECL-1) der BSEP als Antigen verwendet. Die Durchführung der Versuche orientierte sich am hauseigenen Protokoll [135] und entsprach dem Vorgehen von Schiller [134].

Die 96-Well Platten wurden mit 3µg/ml Antigen in Bikarbonatpuffer beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Waschung der Platten mit Waschpuffer (WP) 1 und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Der WP wurde verworfen und die Serumendverdünnung (1:500 in Serumverdünnungspuffer (SVP)) als Doppelbestimmungen pipettiert. Als Kontrollen dienten vier Seren mit in Vorversuchen ermittelten Extinktionswerten. Nach 90-minütiger Inkubation bei RT folgte ein Waschschrift mit WP 2 und 15 Minuten Inkubation bei RT. Pro Platte wurden 3µl peroxidase-konjugierte Anti-Human-IgA-, 3,3µl Anti-IgG- oder 5µl Anti-IgM-Antikörper in jeweils 10ml WP 2 gelöst, 100µl Antikörperverdünnung pro Well hinzu pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Ein weiterer Waschschrift mit WP 2 und 15 Minuten Inkubationszeit bei RT schloss sich an. Für drei Platten wurden 25mg o-Phenylendiamin in 50ml Citratpuffer pH 5,0 gelöst und kurz vor Gebrauch 16,5µl Wasserstoffperoxid (30%) hinzugefügt. Den Platten wurde 150µl Substrat pro Well zugegeben. Sobald die Kontrollen die gewünschte Färbung erreichten, wurde die Reaktion mit je 50µl Schwefelsäure pro Well abgestoppt. Die Absorptionen wurden im ELISA-reader gemessen (Messwellenlänge 450nm, Referenzwellenlänge 620nm). Zur besseren Darstellung wurden die Messergebnisse der Absorptionen mit dem Faktor 1000 multipliziert. Anhand der Kontrollen 1-3 wurden Faktoren wie im Weiteren beschrieben bestimmt. Bei Kontrolle 4 handelte es sich um die Negativkontrolle. Aus allen Kontrollen 1-3 (z.B. alle Kontrollen 1) wurde ein Mittelwert gebildet und für jede Kontrolle der benötigte Faktor bestimmt, um diesen Mittelwert zu erreichen. Die drei erhaltenen Faktoren wurden gemittelt und alle Messwerte der zugehörigen Platte mit diesem Faktor multipliziert. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden als ‚Arbitrary Units‘

(AU) angegeben. Als Normalwerte wurden IgG/A/M-spezifisch die Werte der dreifachen Standardabweichung des Mittelwerts der Messwerte (AU) der gesunden Probanden definiert. Alle darüber liegenden Messwerte wurden als positiv gewertet. Alle Seren, die für Patientenverläufe oder Gegenüberstellungen der Kinder vor und nach LTx untersucht wurden, wurden auf derselben Platte bestimmt.

2.3.2 Arbeit mit Zellkulturen, -Plasmamembranen und -Vesikeln

2.3.2.1 Kultivierung von Zellen

Für die folgenden Experimente wurden Zellen der HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2, sowie der Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 kultiviert. Es wurde steril und unter dem Abzug gearbeitet. Die Zellkulturmedien wurden vor ihrer Verwendung im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Trypsin und HBSS wurden bei RT erwärmt.

Bei -80°C gelagerte Zell-Kryoröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in eine mit 25ml Medium befüllte Kulturflasche überführt. Der Wechsel des Nährmediums fand alle zwei bis drei Tage statt. Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht. Eine kleine Kulturflasche enthielt 25ml, eine große Kulturflasche 50ml Nährmedium. Bei konfluent bewachsenen Flaschenböden wurden die Zellen gesplittet. Nach dem Spülen mit 10ml HBSS wurde für kleine Kulturflaschen 1ml Trypsin (0,05%) und für große Kulturflaschen 3ml Trypsin (0,05%) zugegeben und die Zellen durch Klopfen abgelöst. Wenn notwendig wurde 1 ml zusätzliches Trypsin (0,25%) oder stärker konzentriertes Trypsin (0,25%) verwendet oder die Kulturflasche mit dem zugegebenen Trypsin fünf Minuten im Inkubator erwärmt. Die abgelösten Zellen wurden in ca. 10-15ml Nährmedium aufgenommen und halbiert oder gedrittelt auf neue Kulturflaschen verteilt. Für die Ernte der Zellen wurde das Splitten wiederholt, die erhaltene Lösung der Zellen in Nährmedium jedoch direkt in ein Falcon aufgenommen und bei 361g für zehn Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit HBSS gewaschen und für die Isolation von Plasmamembranen bei -20°C eingefroren.

2.3.2.2 Stimulation der BSEP-Expression in Zellen

Um die BSEP-Expression der Leberzellen zu steigern wurde CDCA verwendet. Für CDCA wurde eine stimulierende Wirkung auf die Expression der BSEP nachgewiesen [52]. Die Konzentration und Applikation orientierte sich an den Experimenten von Deng et al. 2007 [136]. Die Zellen wurden für 30 Stunden in Medium mit 10µM CDCA inkubiert und anschließend geerntet.

2.3.2.3 Plasmamembranisolation: Methode I

Die Isolation der Plasmamembranen von HepG2-, Huh7- und CaCo2-Zellen wurde entsprechend eines adaptierten Protokolls des Hauses vorgenommen [137]. Zur Vorbereitung wurde ein Falcon pro zwei bis drei Zellpellets pro Zelllinie mit 10ml HBSS gefüllt, eine Tablette Proteaseinhibitor zugegeben und auf Eis gekühlt. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut. Zwei bis drei Pellets einer Zelllinie wurden gemeinsam in das gekühlte HBSS aufgenommen und auf Eis zehnmal gepottert. Es folgte eine Beschallung mit Ultraschall, sechsmal für 15 Sekunden mit jeweils 15 Sekunden Pause [Setting: output 3, constant pulse]. Während der Beschallung verblieben die Proben auf Eis. Es schloss sich eine 15-Minütige Zentrifugation bei 4°C und 1.000g an. Ohne erkennbares Pellet folgte eine 30-Minütige Zentrifugation bei 4°C und 20.000g. Der Überstand wurde abpipettiert, das erhaltene Pellet in 500µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und bei -20°C eingefroren oder auf Eis gelagert direkt weiterverarbeitet.

2.3.2.4 Plasmamembranisolation: Methode II

Die zweite verwendete Methode der Plasmamembranisolation erfolgte ebenfalls nach einem adaptierten Protokoll des Hauses [137]. Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in kaltem Lysispuffer gelöst. Nach fünf Minuten Inkubation auf Eis wurden diese 20-mal gepottert. Es folgte eine Zentrifugation bei 21.000g und 4°C für 15 Minuten. Anschließend wurden 5,5ml Lysispuffer mit 60% Saccharose (w/v) in ein Ultra-clean UZ-tube pipettiert und mit 4,5ml Lysispuffer mit 35% Saccharose (w/v) vorsichtig überschichtet. Darüber wurden 2ml der Membranpräparation geschichtet. Die Tubes wurden auf der Balkenwaage exakt austariert und in der Ultrazentrifuge im Schwingrotor 150 Minuten bei 100.000g und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Banden wurden vorsichtig gepoolt, mit

etwas Lysispuffer verdünnt und für 30 Minuten bei 100.000g und 4°C pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde isoliert und in einem Eppendorf-Cup für 30 Minuten bei 15.500g und 4°C erneut pelletiert. Die erhaltenen Pellets wurden mit 100µl Tris-Lysispuffer verdünnt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.3.2.5 Inside-out-Vesikelpräparation mittels Sepharose-Behandlung der Zellvesikel

Ziel dieser Methode war es inside-out Vesikel, d.h. mit dem intrazellulären Membrananteil nach außen gewandte Vesikel, zu erhalten. Physiologische „right-side-out“ Vesikel weisen eine Glykokalyx auf und können über die Zugabe der Concanavalin A-Sepharose gebunden werden [138]. Es verbleiben physiologisch entstandene inside-out Vesikel, welche für die weiteren Experimente benötigt wurden. Das weitere Protokoll orientierte sich an Ishikawa et al. [139].

Für die Aufreinigung der Concanavalin A Sepharose wurden zu je 500µl Tris-HCl-Lösung (160mM pH 7,4) 120µl gelöste Concanavalin A Sepharose pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 490g und RT für 4 Minuten. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und 500µl Tris-HCl-Lösung pH 7,4 zugegeben. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Pro Ansatz wurden 100µl auf Eis aufgetaute Plasmamembranisolat-Lösung hinzu pipettiert und für 45 Minuten bei 4°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 490g und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und für 30 Minuten mit 1.550g und 4°C pelletiert. Das erhaltene Pellet, welches aus isolierten inside-out Vesikel bestand, wurde in 50µl 250mM Saccharoselösung aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.3.3 Gelelektrophorese/ SDS-PAGE zur Isolation der BSEP

Als Trenngel wurde ein achtprozentiges und als Sammelgel ein fünfprozentiges Polyacrylamid-Gel verwendet, orientiert an die Versuchsmethoden von Schiller [134, 140]. Für die Gelelektrophorese (Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) nach Laemmli [140] wurden als Antigene kommerziell erhältliche BSEP-Vesikel aus Sf9-Zellen, Nicht-BSEP-Kontrollvesikel oder Sepharose-behandelte inside-out Zellvesikel verwendet. In einem ersten Schritt wurden diese 1:5 in HBSS verdünnt. Die Antigenverdünnung

wurde in einem weiteren Schritt 1:2 mit dem Ladepuffer SDS 2-fach vermengt. Aus den Ergebnissen der Arbeit von Schiller [134] ging hervor, dass ein Kochen der Vesikel keine Verbesserung der Ergebnisse erzielte. Die Antigene wurden daher nicht erhitzt. Pro Gel wurden 3-5µl Molekulargewichtsmarker verwendet. Es folgten im Wechsel jeweils Probe und Kontrolle mit 20µl pro Tasche. Die Gelelektrophorese in der mit Elektrodenpuffer gefüllten Kammer wurde mit 50V für die ersten fünf Minuten gestartet. Für die folgenden zehn Minuten wurden 100V, anschließend 200V angelegt, solange bis die unterste Proteinbande das Gelende erreichte.

2.3.4 Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

An die SDS-PAGE schlossen sich zwei mögliche Western Blots an: die Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (HRP) nach der Methode von Laemmli [140] oder von Infrarot-Fluoreszenz-Sekundärantikörpern nach Protokollen der Herstellerfirma Li-Cor. In beiden Fällen erfolgte der Transfer im Tank Blot Verfahren mit einer Mini Trans-Blot Cell (Biorad) nach Herstellerangaben. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens 60 Minuten oder über Nacht unter Bewegung in der Blockierlösung inkubiert.

2.3.4.1 Western Blot mit Meerrettichperoxidase zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Seren wurden 1:50 und Anti-BSEP-Antikörper 1:500 im Probenverdünnungspuffer verdünnt. Die Nitrozellulosemembran wurde unter Bewegung für 45 Minuten mit Serum- bzw. Antikörperverdünnung inkubiert. Es folgten drei zehnminütige Waschschrte mit WP. Für die Sekundärantikörperverdünnung wurden Anti-Human-IgG- und Anti-Human-IgM-HRP-Antikörper jeweils 1:200 in WP verdünnt zugegeben. Für das Kontrollsheet wurden Anti-Maus-IgG-HRP-Antikörper 1:500 in WP verdünnt. Die Sekundärantikörper inkubierten unter Bewegung für 30 Minuten. Es folgten vier Waschschrte mit je fünf Minuten Inkubation. Für das Substrat wurden 95ml Aqua dest. im pH-Meter mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 3,5 gesenkt. Zwei in 5ml Dimethylfomamid gelöste AEC-Tabletten wurden zugegeben und ein pH von 3,5 eingestellt. Mittels Natriumacetat wurde der pH auf 5,0 gehoben. Zum Start der Reaktion wurde 50µl

Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Sheets wurden vom Substrat übergossen und mit siebenprozentiger Essigsäure abgestoppt, sobald deutliche Banden sichtbar waren. Die erhaltenen Western Blot-Sheets wurden über Nacht auf Filterpapier dunkel getrocknet.

Für die Versuche wurden insgesamt neun Seren gesunder Kontrollen, 48 Seren von PSC-Patienten, 27 Seren von PBC-Patienten, 24 Seren von AIH-Patienten, acht Seren von SLE-Patienten, fünf Seren von PSS-Patienten, sowie zwei Seren von ALD-Patienten auf den Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern hin überprüft. Auch HepG2- und Huh7- inside-out Vesikel wurden als Antigene mit Anti-BSEP-Antikörpern, fünf Seren von PSC-Patienten, sowie einem PBC- und einem AIH-Patientenserum auf Antikörper untersucht. Die HepG2- und Huh7-Zellvesikel wurden entsprechend der BSEP-Vesikel verwendet, was eine ursprüngliche unverdünnte Zellvesikelmenge von 2µl pro Tasche ergab.

2.3.4.2 Infrarotfluoreszenz Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Für den Infrarotfluoreszenz Western Blot (Western Blot Odyssey) wurden fluoreszierende Sekundärantikörper im nahen Infrarot verwendet. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Primärantikörpern 1:50 [Patientenserum] oder 1:500 [Anti-BSEP-Antikörper] in SVP für 60 Minuten inkubiert. Es folgten vier Waschschrte mit jeweils fünf Minuten Inkubation. Die Sekundärantikörper wurden lichtgeschützt 1:10.000 in SVP verdünnt. Anti-Human- bzw. Anti-Maus-IgG-Antikörper, sowie Anti-Human-IgM-Antikörper inkubierten lichtgeschützt 60 Minuten unter Bewegung. Es folgten vier Waschschrte mit je fünf Minuten Inkubationszeit. Anschließend wurden die Membranen in PBS geschwenkt und auf Filterpapier dunkel und kühl getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Odyssey Reader.

Zur Kontrolle wurden BSEP-Vesikel und Vesikel aus den Plasmamembranen von HepG2- und Huh7-Zellen, sowie inside-out-Vesikel von HepG2-, Huh7- und CaCo2-Zellen nur mit Sekundärantikörpern untersucht. Es wurden 14 bereits im HRP-Western Blot untersuchte Seren im Western Blot Odyssey betrachtet, darunter 13 Seren von PSC-Patienten und ein Serum eines gesunden Probanden. Für diese Seren wurden BSEP-Vesikel als Antigen verwendet.

Plasmamembranisolate von HepG2- und Huh7-Zellen, sowohl mit als auch ohne CDCA-Stimulation, wurden zu 2µl und 5µl unverdünnte Plasmamembranisolat pro Tasche untersucht. Zum BSEP-Nachweis wurden Anti-BSEP-Antikörper, sowie ein PSC-Patientenserum verwendet. Weitere Plasmamembranen von nicht-CDCA-behandelten Zellen wurden in den unverdünnten Mengen von 2µl, 5µ und 10µl Zellvesikel untersucht. Sepharose-behandelte inside-out HepG2- und Huh7-Zellvesikel wurden in den unverdünnten Vesikelmengen von 2µl mit 21 verschiedenen Seren (PSC, PBC, AIH, SLE und PSS) und Anti-BSEP-Antikörpern behandelt. Bei zwei PSC-Seren und Anti-BSEP-Antikörpern wurden unverdünnt 2µl, 5µl und 10µl pro Tasche verwendet. CaCo2-Zellen wurden als Plasmamembranisolate mit unverdünnt 5µl und 10µl Plasmamembranisolat pro Tasche, sowie als inside-out Zellvesikel mit unverdünnt 2, 5 und 10µl Vesikel pro Tasche im Western Blot Odyssey untersucht. Alle angegebenen unverdünnten Vesikelmengen wurden regulär nach Protokoll verdünnt eingesetzt.

2.3.5 Ammoniumsulfatfällung von Immunglobulinen zur Verwendung im funktionellen Assay

Zu jeweils 100µl schonend aufgetautem Serum wurden 100µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ammoniumsulfat-gefällten Seren wurden mit 5.000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500µl Ammoniumsulfatlösung (60%) hinzu pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5.000g und 4°C für 15 Minuten. Die Waschung mit Ammoniumsulfat (60%) mit anschließender Zentrifugation wurde wiederholt. Das in 400µl HBSS resuspendierte Präzipitat wurde in einem 100kDa Filter bei 14.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Mit 400µl HBSS aufgefüllt wurde erneut mit den gleichen Parametern zentrifugiert. Der Filter wurde mittels einer zweiminütigen Zentrifugation bei 1.000g und 4°C entleert. Die erhaltenen isolierten Antikörper wurden bei -20°C eingefroren.

2.3.6 Funktioneller Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern und deren Auswirkung auf die Transportkapazität der BSEP

2.3.6.1 Allgemeine Durchführung des funktionellen Assays

Der funktionelle Assay wurde nach einer Standardmethode basierend auf den Protokollen von Stindt et al. [87] und des Herstellers der Sf9-BSEP-Vesikel (GenoMembrane, Yokohama, JAP) durchgeführt. Bis auf eine Abwandlung der Konzentration wurde dieses Protokoll von Schiller angewandt und in dieser Arbeit übernommen [134]. Das Grundprinzip des Gallensalztransports im funktionellen Assay wird in Abbildung 1 dargestellt.

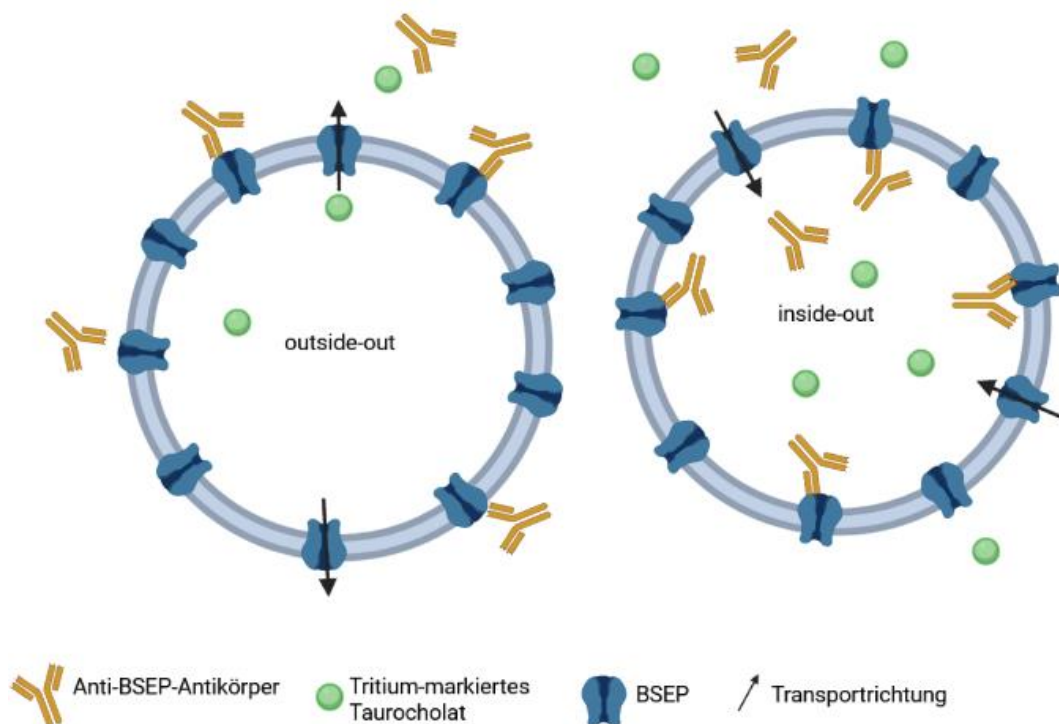


Abbildung 1: Grundprinzip des funktionellen Assays anhand der Darstellung von outside-out und inside-out Vesikeln

Im Gegensatz zu physiologischen outside-out Vesikeln kommt es bei inside-out Vesikeln zur Gallensalzaufnahme. Dies ermöglicht deren Quantifizierung und damit die Beobachtung der Auswirkung von Anti-BSEP-Antikörpern auf die BSEP. Grafik erstellt mit Biorender.

Puffer A, Puffer B und ATP, sowie ggf. AMP wurden zusammen mit den Vesikeln und den aus Patientenseren isolierten Antikörpern auf Eis aufgetaut. Die Immunglobuline wurden 1:2 mit HBSS verdünnt. 10µl Immunglobulin-Verdünnung wurden mit 10µl BSEP-Vesikeln vermengt. Mindestens einer Probe wurde statt Immunglobulin die korrespondierende Menge HBSS zugegeben. Bei

diesem Wert handelte es sich um den Referenzwert auf den sich alle weiteren Proben bei der Angabe ihres Ergebnisses beziehen (in Prozent des absoluten Werts des Referenzwerts). Konzentrierter Puffer B wurde 1:10 in Aqua dest. verdünnt und auf Eis gelagert. Für 24 Ansätze wurden ca. 55 ml unkonzentrierter Puffer B benötigt. Die Vesikel-Antikörper/HBSS-Ansätze wurden in drei Durchgängen für je 10 Sekunden in einem frischen Methanol-Trockeneis-Gemisch eingefroren und für 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde jedem Ansatz 12µl Puffer A zugegeben und alle Ansätze mit dem noch nicht hinzugefügten Assay Mix für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Der Assay Mix für 24 Ansätze setzte sich wie folgt zusammen:

750µl ATP + 375µl Gallensalzverdünnung + 37,5µl Puffer A

Die 375µl Gallensalzverdünnung bestand aus 1:100 in Puffer A verdünntem Tritium-markiertem Taurocholat, welches mittels Beta-minus-Zerfall zerfiel (Halbwertszeit 12,32 Jahre). Jeder Probe wurden 41,3µl Assay Mix zugegeben, diese im Wasserbad bei 37°C für fünf Minuten inkubiert und mit 266µl eiskaltem Puffer B pro Reaktionsansatz abgestoppt. Die Ansätze wurden als Doppelbestimmung auf eine mit je 100µl Puffer B pro Well vorbefeuchtete Filterplatte aufgetragen (150µl Probe/Well). Es folgten fünf Waschschriffe mit 100µl Puffer B pro Well. Die Flüssigkeiten wurden nach jedem Schritt des Pipettierens mittels Vakuums in und durch die Filterplatte gesogen. Die Filterplatten trockneten anschließend für mindestens zwei Tage. Die Auswertung erfolgte nach Zugabe von 25µl Szintillationsflüssigkeit und Abdeckung der Filterplatte mit einer Folie im Beta-Counter. Wenn im Folgenden nicht besonders gekennzeichnet, wurde dieses Protokoll angewandt.

2.3.6.2 BSEP-Transportkapazität unter Verwendung unterschiedlicher Substrate

Da die BSEP ein ATP-abhängiger Transporter ist, ist bei alleiniger Zugabe von AMP kein Taurocholattransport zu erwarten [20, 26, 28]. Bei Verwendung von Kontrollvesikeln, die keine BSEP enthalten, ist ebenfalls weder bei ATP- noch bei AMP-Zugabe eine nennenswerte Aufnahme zu erwarten. Der kompetitive BSEP-Inhibitor CsA sollte seinerseits den BSEP-medierten Transport vollständig inhibieren [45]. Diese Vorversuche überprüften das Vorhandensein von BSEP in

den BSEP-Vesikeln und die Transportkapazität der BSEP unter Verwendung unterschiedlicher Substrate. Dafür wurden verschiedene Assay Mixes hergestellt:

- 1.) ATP, dies entspricht der Normalvariante
- 2.) AMP; der AMP-Anteil ersetzte den ATP-Anteil
- 3.) ATP + CsA (100µM)
- 4.) AMP + CsA (100µM)

Die benötigte Menge CsA ersetzte den entsprechenden Anteil an Puffer A in der Gallensalzverdünnung.

2.3.6.3 Vergleich von Immunglobulin-Verdünnungskonzentrationen

In diesem Versuch wurde die Konzentration der Antikörper pro Ansatz aus den Protokollen von Schiller von 3,3µl Immunglobulin-Verdünnung pro 10µl BSEP-Vesikel (1:4) mit 10µl Immunglobulin-Verdünnung pro 10µl BSEP-Vesikel verglichen (1:2) [134].

2.3.6.4 Materialvariation und Verdünnungsreihe der BSEP-Vesikelmenge

Um Material zu sparen, wurden alle Materialmengen des Standardprotokolls halbiert, exklusiv des Puffers B.

Des Weiteren wurde bei normaler Materialmenge, die Menge der BSEP-Vesikel in jedem Ansatz bei gleichbleibendem Endvolumen reduziert, sodass sich eine Verdünnungsreihe von 1:2, 1:3, 1:6, 1:12 und 1:24 ergab. Der reduzierte BSEP-Vesikelanteil wurde durch HBSS ersetzt. Für die Verdünnungsreihe mit Patientenimmunglobulinen wurde die standardmäßige Menge der Immunglobulinverdünnung belassen und den verdünnten BSEP-Vesikeln hinzugefügt.

2.3.6.5 Mehrfachbestimmungen von Immunglobulinisolaten im funktionellen Assay (Intraassay-Variationskoeffizient)

Standardmäßig wurden alle Proben als Doppelbestimmungen gemessen, stammten jedoch aus einem Ansatz. Im Rahmen der Mehrfachbestimmung wurden einzelne Proben als Ansätze vervielfacht. Dazu wurden drei BSEP-

Ansätze mit HBSS, fünf Ansätze mit einem Immunglobulinisolat einer gesunden Kontrollperson und sechs Ansätze mit jeweils drei verschiedenen Patientenantikörperisolaten verwendet.

2.3.6.6 Wiederholte Messungen eines funktionellen Assays

Um etwaige Messfehler und den Einfluss der Szintillationsflüssigkeit auf die Messergebnisse zu prüfen, wurde die Filterplatte eines funktionellen Assays im Verlauf über fünf Wochen mindestens einmal wöchentlich gemessen.

2.3.6.7 Auswirkung von Einfrier-Auftau-Zyklen auf die Funktionalität der Anti-BSEP-Antikörper

Um die Auswirkungen von mehrmaligen Einfrier- und Auftauzyklen (engl. Freeze- & Thaw-cycles = FT) auf die Funktion der Anti-BSEP-Antikörper zu ermitteln, wurden neu isolierte Immunglobuline aliquotiert und unterschiedlich oft (1-7-mal) für 45 bis 90 Minuten auf Eis aufgetaut und erneut eingefroren. ATP und AMP wurden ebenfalls aliquotiert und ein- bis dreimal aufgetaut und wieder eingefroren. Zusätzlich wurden ATP- und AMP-Proben aus verschiedenen Chargen miteinander im funktionellen Assay verglichen.

2.3.6.8 Bestimmung der Interassay-Varianz

Für die Vergleichbarkeit der Assays und zur Bestimmung der Interassay-Varianz wurden initial zwei Seren, im Verlauf ein weiteres Serum als Kontrollen verwendet. Dasselbe Antikörperisolat wurde durchgehend verwendet und im Verlauf zweimal nachisoliert.

2.3.6.9 Testreihe - funktionelle Auswirkung von Immunglobulinen auf die BSEP

Für die Testreihe wurden 142 isolierte Immunglobuline von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen mit je 24 Ansätzen pro Durchlauf untersucht. Es wurden drei Kontrollimmunglobuline (K1, K2 und K3) verwendet. Alle Nicht-Kontrollimmunglobuline waren Erstisolate.

2.3.6.10 Verwendung von selbsthergestellten Zellvesikeln im funktionellen Assay

Im Folgenden wurden selbsthergestellte inside-out Vesikel und selbsthergestellte Plasmamembranisolate anstelle von BSEP-Vesikeln im funktionellen Assay verwendet. Die Zellvesikel wurden äquivalent zu den Versuchen 2.3.6.2 eingesetzt. Es wurden 10µl/Ansatz inside-out Vesikel als auch 10µl/Ansatz Plasmamembran-isolate untersucht. Inside-out Vesikel wurden außerdem mit den Vesikelmengen von 10µl zu 10µl HBSS und 20µl zu 10µl HBSS untersucht

2.3.6.11 Zellvesikel - Auswirkung der BSEP-Stimulation von HepG2- und Huh7-Zellen mittels CDCA auf die Transportkapazität im funktionellen Assay

Inside-out Zellvesikel von CDCA-behandelten HepG2- und Huh7-Zellen wurden mit inside-out Zellvesikeln von HepG2- und Huh7-Zellen, die simultan keiner CDCA-Behandlung unterzogen wurden, verglichen. Es wurden keine Antikörper eingesetzt.

2.3.7 Proteinbestimmung der Zellvesikel vor und nach Sepharosebehandlung nach Bradford-Methode

Nach den Herstellerangaben des ProteinKits für die Bradford-Methode wurden die zu untersuchenden Vesikel 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. 25µl davon wurden zu 1,25 ml Protein Kit in eine Küvette gegeben und gut vermengt. Als Leerwert wurden den 1,25ml Protein Kit 25µl Aqua dest. zugegeben. Die Lösungen wurden rasch im Photometer bei $\lambda = 595\text{nm}$ gemessen. Die Messergebnisse wurden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und der Proteingehalt aus eine Eichgeraden abgelesen.

2.3.8 Auswertung und Statistik

2.3.8.1 Auswertung des ELISA

Um die verschiedenen Erkrankungskohorten miteinander zu vergleichen, wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Werte wurden mithilfe des Anderson-Darling Tests, sowie des D'Agostino & Pearson Tests (omnibus K2) auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Mithilfe eines exakten Fisher-Tests wurden die Anzahl der positiven Ergebnisse einer Erkrankungsgruppe mit der

Anzahl der positiven Ergebnisse der gesunden Kontrollen verglichen. Für Patientenverläufe wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Test verwendet. Für eine Korrelation der Verläufe nach Spearman mit der Klinik der Patienten wurden 15 Verläufe betrachtet, wobei eine Korrelation ab $r > 0,5$ definiert wurde. Bei dem Vergleich der Kinder vor und nach LTx wurde ein Wilcoxon-Test verwendet.

2.3.8.2 Auswertung des Western Blot

Die Anzahl der positiven Western Blot Ergebnisse bei den verschiedenen Erkrankungen wurden anhand eines exakten Fisher-Tests mit der Anzahl der positiven Ergebnisse bei gesunden Kontrollen verglichen.

2.3.8.3 Auswertung des funktionellen Assays

Die Antikörperreaktivitäten der funktionellen Assays wurden in Prozent des ungehemmten HBSS-Werts desselben Ansatzes angegeben. Für die Mehrfachbestimmungen wurden die Antikörperreaktivitäten mit den Methoden nach Rout ($Q=1\%$) und Grubbs ($\alpha=0,05$) auf Ausreißer untersucht. Der Intra-assay-Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert) wurde berechnet. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen wurden mittels zweiseitigen Wilcoxon-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede hin verglichen. Für die Berechnung der Interassay- Varianzkoeffizienten wurden die Ergebnisse der Erstisolatmessungen der Kontrollseren herangezogen.

Die Antikörperreaktivitäten der Testreihe wurden ebenfalls auf Ausreißer kontrolliert und aus den verbliebenen gesunden Kontrollen ein Normalwert gebildet. Dieser wurde als zwei Standardabweichungen ober- und unterhalb des Mittelwerts definiert. Ein Wert oberhalb wurde als stimulierend, ein Wert darunter als inhibierend betrachtet. Mittels des Anderson-Darling Tests, sowie des D'Agostino & Pearson Tests wurden alle Ergebnisse auf eine Normalverteilung hin überprüft. Mit einem zweiseitigen Mann-Whitney-Test wurden die Kohorten untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede verglichen. Bei gepaarten Daten, wie Kindern vor und nach LTx mit passenden Serenpaaren wurde zusätzlich ein zweiseitiger Wilcoxon-Test verwendet. Die Anzahl der positiven Ergebnisse der einzelnen Erkrankungen, sowie deren stimulierende oder inhibierende Ergebnisse wurde mittels exaktem Fisher-Test mit den gesunden

Kontrollen verglichen. Um einzelne Ergebnisse besser mit den Werten der gesunden Kontrollen vergleichen zu können, wurden alle Werte durch den Median der gesunden Kontrollen geteilt. Dadurch entstand für jeden Prozentwert ein Faktor, der die Abweichung vom Median der gesunden Kontrollen angibt. Alle signifikanten Werte des funktionellen Assays wurden sowohl gemeinsam, wie auch getrennt, nach inhibierenden und stimulierenden Immunglobulinen gegen die nichtsignifikante Kohorte für die Berechnung von signifikanten Unterschieden der Parameter Geschlecht, Alter, Therapiezustand, klinischer Aktivität, Erkrankungsdauer und Laborwerte, sowie ELISA-IgG, -IgA und IgM-Werten und Western Blot Anti-BSEP-Antikörpernachweisen mittels Mann-Whitney-Test verwendet. Alle auffälligen Immunglobuline, wie auch getrennt inhibierende oder stimulierende Immunglobuline wurden mit selbigen Parametern auf eine Korrelation nach Spearman überprüft.

2.3.8.4 Korrelation der Anti-BSEP-Antikörpernachweismethoden

Anhand einer Vierfeldertafel der Anti-BSEP-Antikörpernachweise im Western Blot und ELISA wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson und ein exakter Fisher Test berechnet. Die ELISA-Ergebnisse wurden bei mindestens einem positiven Ergebnis in IgG oder IgM als positiv gewertet. Es wurden Vierfeldertafeln für die Gesamtheit der Ergebnisse, sowie für die Ergebnisse exklusive der gesunden Kontrollen und für die einzelnen Kohorten getrennt berechnet. Weitere Vierfeldertafeln wurden für die Ergebnisse von ELISA und funktionellem Assay, sowie funktionellem Assay und Western Blot erstellt. Die Antikörperreaktivitäten des funktionellen Assays wurden nach stimulierenden, inhibierenden und allgemein funktionell-wirksamen Antikörperreaktivitäten getrennt betrachtet. Des Weiteren wurden alle Ergebnisse des funktionellen Assays, sowie der eben genannten Subkohorten nach Spearman auf eine Korrelation mit den ELISA-Ergebnissen nach Antikörperklassen getrennt (G, A, M) untersucht. Eine Korrelation wurde ab einem $r > 0,5$ angenommen.

Von 50 Patienten lagen Ergebnisse zu allen drei Anti-BSEP-Antikörpernachweismethoden vor. Diese wurden nach ihrem Antikörpernachweis im Western Blot getrennt. Für beide Gruppen wurde anhand einer Vierfeldertafel der Ergebnisse des funktionellen Assays und des ELISA der Korrelationskoeffizient

nach Pearson berechnet. Ebenfalls wurden die Ergebnisse nach funktioneller Wirksamkeit (stimulierend/inhibierend/funktionell-wirksam) und nach Antikörperklasse im ELISA getrennt (IgG, A, M) betrachtet. Die Antikörperreaktivitäten der Immunglobulinklassen des ELISA wurden untereinander, sowie mit jenen des funktionellen Assays nach Spearman korreliert.

2.3.8.5 Statistik

Die ELISA-Antikörperreaktivitäten (nach Immunglobulinklassen) und jene des funktionellen Assays (alle/ funktionell-wirksame/ stimulierende/ inhibierende) wurden auf eine Korrelation nach Spearman mit dem Alter der Patienten, ihrer Krankheitsdauer, ihren Laborwerten und ihrer klinischen Aktivität (in Ziffern von 1-4), sowie nach Geschlecht und Therapiezustand untersucht. Auch die Verlaufsseren im ELISA wurden mit der klinischen Aktivität der Patienten nach Spearman korreliert. Die Anti-BSEP-Antikörpernachweise im Western Blot, sowie im funktionellen Assay wurden mittels Vierfeldertafel nach Pearson mit dem Geschlecht, der Therapie, der Klinik und den Laborwerten korreliert. Eine Korrelation wurde ab einem $r > 0,5$ angenommen.

Für die statistische Betrachtung auf Unterschiede zwischen den Kohorten wurden die ELISA-Antikörperreaktivitäten (nach Antikörperklassen) und die Antikörperreaktivitäten des funktionellen Assays, sowohl nach Erkrankungskohorten getrennt, als auch gemeinsam, in dichotome Gruppen aufgeteilt (weiblich: männlich, therapiert: nicht therapiert, klinische Remission: Klinik, Labor positiv: Labor negativ) und mittels zweiseitigem Mann-Whitney-Test untersucht. Die Western Blot Anti-BSEP-Antikörpernachweise wurden nach Western Blot Ergebnis stratifiziert und die klinische Aktivität und Labor mittels zweiseitigem Mann-Whitney-Test untersucht. Für das Geschlecht und den Therapiezustand wurde ein Exakter Fisher-Test angewandt. Alle Ergebnisse des funktionellen Assays wurden mittels exaktem Fisher Test auf signifikante Unterschiede der oben genannten Parameter untersucht.

Signifikanzniveau war bei allen statistischen Tests dieser Arbeit $\alpha=5\%$. Für die Laborparameter wurden die Grenzwerte nach den Bewertungsmaßstäben des Universitätsklinikums Tübingen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von Antikörpern gegen die erste extrazelluläre Schleife (ECL-1) der BSEP mittels ELISA

Anti-ECL-1-Antikörper konnten vor allem bei AIH-Patienten (25%) und bei ALD-Patienten (15%) nachgewiesen werden. Bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen waren sie nur in bis zu fünf Prozent nachweisbar. Interessanterweise gelang auch bei bis zu 35% der Patienten mit Kollagenosen der Anti-ECL-1-Antikörpernachweis (Tab. 13, Abb. 2). Die Reaktivität der IgG-Anti-ECL-1 Antikörper war bei allen Patientengruppen außer bei den Kindern vor und nach LTX signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (Abb. 2, Tab. 14).

Anti-ECL-1-Antikörper vom IgA-Typ ließen sich vor allem bei Patienten mit ALD und PSS beobachten (Tab. 13, Tab. 15, Abb.3), IgM-Antikörper konnten dagegen nur vereinzelt nachgewiesen werden (Abb. 4, Tab. 16).

Einen Überblick über die Signifikanzen zu Tab. 13 finden sich in Tab. 14, 15 und 16.

Tabelle 13: Häufigkeit von Antikörpern gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Erkrankungskohorte	Anzahl getestet	Anzahl (%) positiver Anti-BSEP-Antikörper		
		Immunglobulinklasse G	Immunglobulinklasse A	Immunglobulinklasse M
PBC	67	3 (4)	1 (1)	4 (6)
PSC	55	3 (5)	0	1 (2)
AIH	48	11 (23)	0	6 (12)
ALD	46	7 (15)	21 (46)	5 (11)
Kinder vor LTx	23	1 (4)	1 (4)	0
Kinder nach LTx	14	0	0	0
SLE	48	14 (29)	1 (2)	5 (10)
PSS	57	20 (35)	8 (14)	4 (7)
Gesunde Kontrollen	71	0	2 (3)	1 (1)

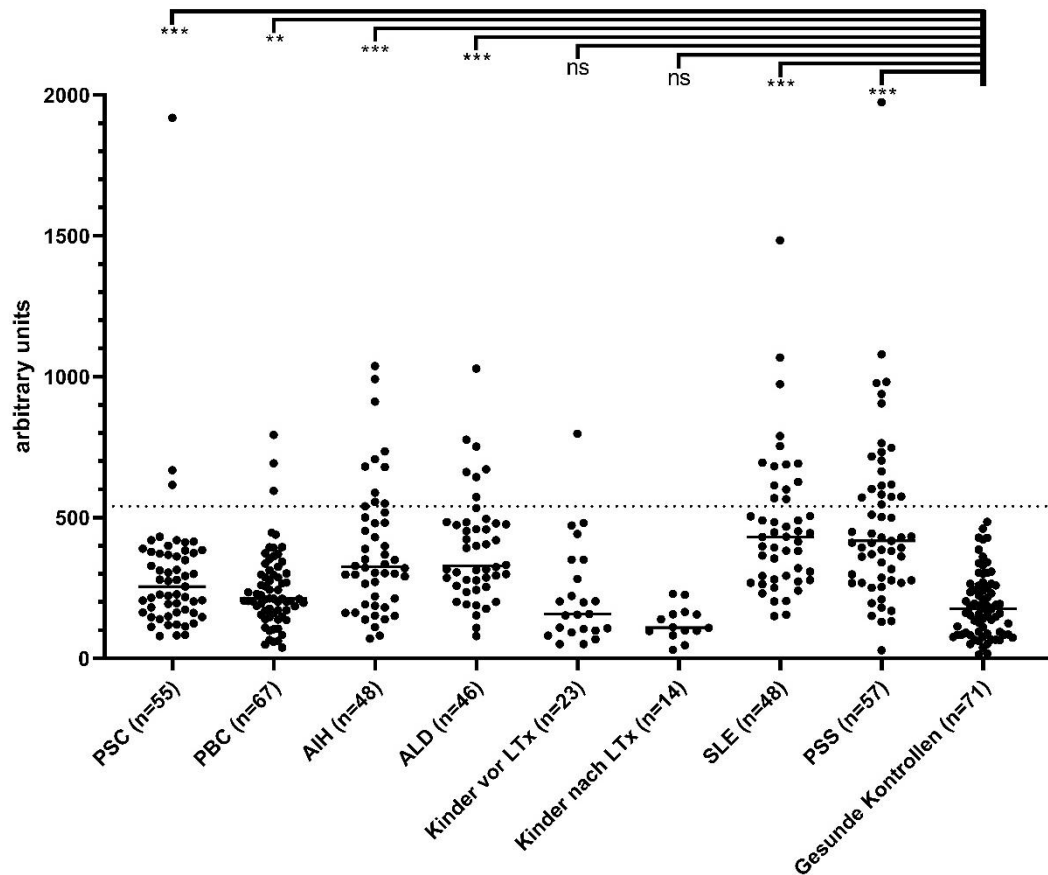


Abbildung 2: IgG-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen

Die ELISA-Antikörperreaktivitäten und der Median der untersuchten Patientenseren und gesunden Kontrollen (Abszisse) sind in Arbitrary Units (=AU, da mittels Faktoren aneinander angeglichen) aufgetragen (Ordinate). Signifikanzen gelten für den Vergleich mit den gesunden Kontrollen. --- = Normalwert (540 AU), ns = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

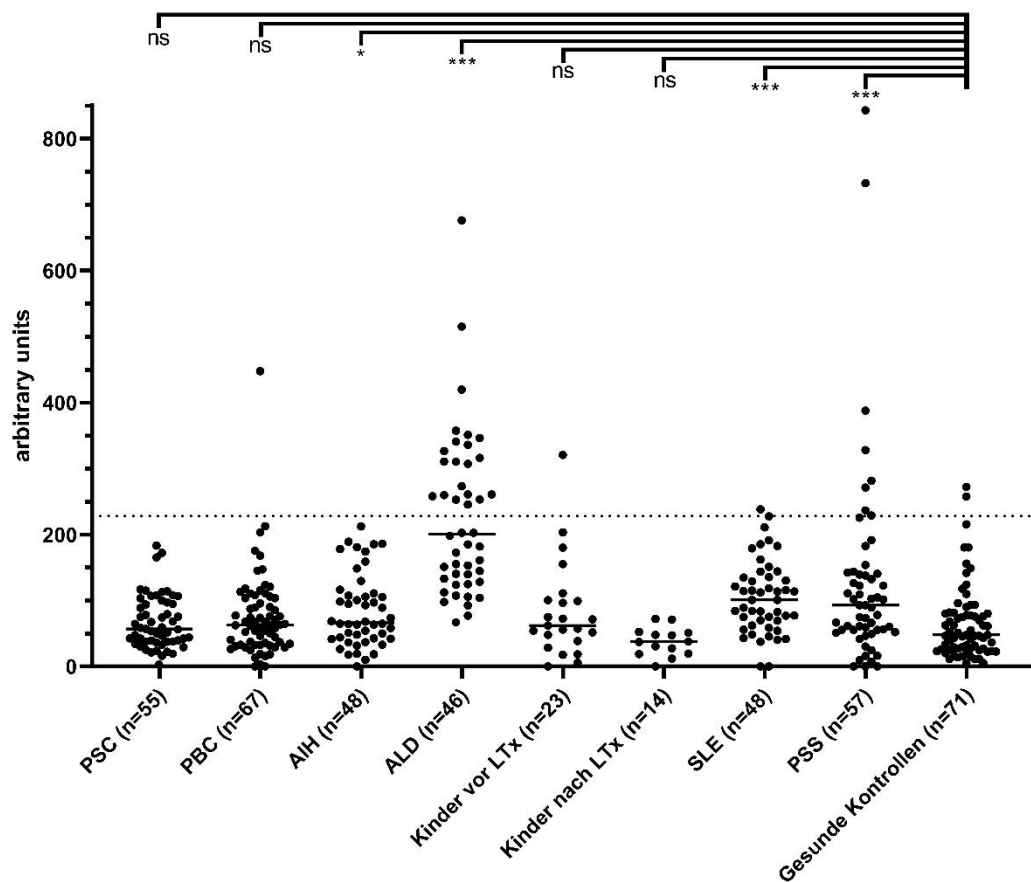


Abbildung 3: IgA-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen

Die ELISA-Antikörperreaktivitäten der untersuchten Patientenserum und gesunden Kontrollen (Abszisse) und ihr Median sind in Arbitrary Units (=AU) aufgetragen (Ordinate). Signifikanzen gelten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen. --- = Normalwert (228 AU), ns = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

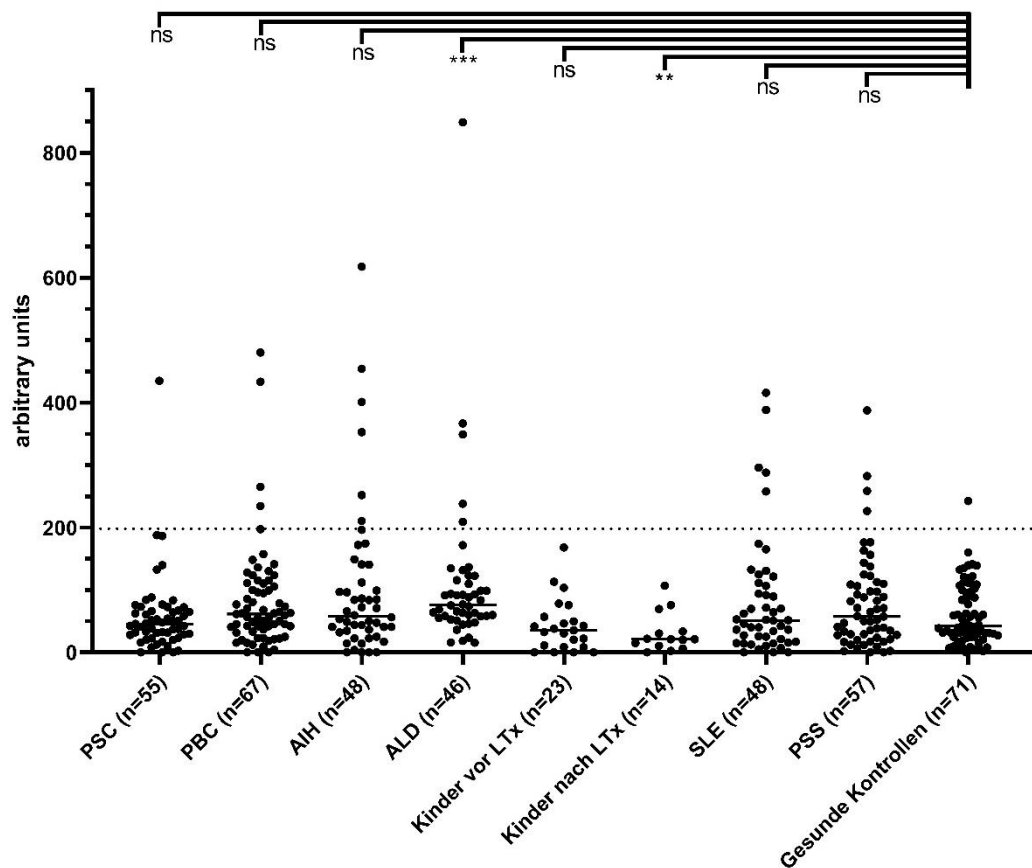


Abbildung 4: IgM-Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen

Die ELISA-Antikörperreaktivitäten und der Median der untersuchten Patientenserum- und gesunden Kontrollen (Abszisse) sind in Arbitrary Units (=AU) aufgetragen (Ordinate). Signifikanzen gelten für den Vergleich von gesunden Kontrollen und den weiteren Kohorten. --- = Normalwert (198 AU), ns = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tabelle 14: Vergleich der Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte

	PBC	PSC	AIH	ALD	Kinder vor LTx	Kinder nach LTx	SLE	PSS
PBC (n= 67)								
PSC (n= 55)	0,18							
AIH (n= 48)	0,0004 ***	0,02 *						
ALD (n= 46)	<0,0001 ***	0,001 **	0,72					
Kinder vor LTx (n= 23)	0,19	0,04 *	0,001 **	0,0002 ***				
Kinder nach LTx (n= 14)	0,0002 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,13			
SLE (n= 48)	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,05	0,11	<0,0001 ***	<0,0001 ***		
PSS (n= 57)	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,06	0,12	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,99	
Gesunde Kontrollen (n= 71)	0,009 ***	0,0003 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,63	0,08	<0,0001 ***	<0,0001 ***

Signifikante Werte: *p ≤ 0,05; sehr signifikante Werte: **p ≤ 0,01; höchst signifikante Werte: *** p ≤ 0,001

Tabelle 15: Vergleich der Reaktivitäten von IgA-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte

	PBC	PSC	AIH	ALD	Kinder vor LTx	Kinder nach LTx	SLE	PSS
PBC (n= 67)								
PSC (n= 55)	0,74							
AIH (n= 48)	0,30	0,19						
ALD (n= 46)	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***					
Kinder vor LTx (n= 23)	0,90	0,65	0,63	<0,0001 ***				
Kinder nach LTx (n= 14)	0,006 **	0,007 **	0,002 **	<0,0001 ***	0,01 *			
SLE (n= 48)	0,0006 ***	<0,0001 ***	0,03 *	<0,0001 ***	0,03 *	<0,0001 ***		
PSS (n= 57)	0,03 *	0,007 **	0,19	<0,0001 ***	0,16	0,0002 ***	0,65	
Gesunde Kontrollen (n= 71)	0,12	0,21	0,02 *	<0,0001 ***	0,23	0,11	<0,0001 ***	0,0008 ***

Signifikante Werte: *p ≤ 0,05; sehr signifikante Werte: **p ≤ 0,01; höchst signifikante Werte: *** p ≤ 0,001

Tabelle 16: Vergleich der Reaktivitäten von IgM-Antikörpern gegen die BSEP im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unter Angabe der Signifikanzwerte

	PBC	PSC	AIH	ALD	Kinder vor LTx	Kinder nach LTx	SLE	PSS
PBC (n= 67)								
PSC (n= 55)	0,04 *							
AIH (n= 48)	0,89	0,06						
ALD (n= 46)	0,05	<0,0001 ***	0,13					
Kinder vor LTx (n= 23)	0,006 **	0,19	0,01 *	<0,0001 ***				
Kinder nach LTx (n= 14)	0,001 **	0,03 *	0,003 **	<0,0001 ***	0,37			
SLE (n= 48)	0,41	0,46	0,38	0,01 *	0,08	0,02 *		
PSS (n= 57)	0,7	0,16	0,6	0,04 *	0,03 *	0,007 **	0,73	
Gesunde Kontrollen (n= 71)	0,1	0,68	0,12	0,0007 ***	0,12	0,009 **	0,63	0,33

Signifikante Werte: *p ≤ 0,05; sehr signifikante Werte: **p ≤ 0,01; höchst signifikante Werte: *** p ≤ 0,001

3.1.1 ELISA-Antikörperreaktivitäten im Verlauf von ausgewählten Patienten

Von 50 Patienten waren Verläufe der Anti-ECL-1-Antikörperreaktivitäten im ELISA vorhanden. Exemplarisch sind fünf Patienten dargestellt (Abb. 5-8).

Für die cholestatischen Lebererkrankungen sind die IgG-Antikörperreaktivitäten einer PBC-Patientin, sowie eines PSC-Patienten abgebildet (Abb. 5). Die Antikörperreaktivitäten der PBC-Patientin waren unter initialer Immunsuppression mittels CsA und Prednisolon positiv. Unter der Umstellung der Immunsuppression auf Leflunomid und Prednisolon zeigten sich negative Werte. Mit dem erneuten isolierten Anstieg der Antikörperreaktivitäten ging keine Veränderung der immunsuppressiven Therapie oder klinischen Manifestation der Erkrankung einher. Der dargestellte PSC-Patient zeigte unter Dauermedikation mit UDCA positive Antikörperreaktivitäten. Unter zusätzlicher Prednisolon-Gabe kommt es zum Verschwinden der Antikörper. Beide Patienten hatten keine nachweisbaren IgM- oder IgA-Anti-ECL-1-Antikörper.

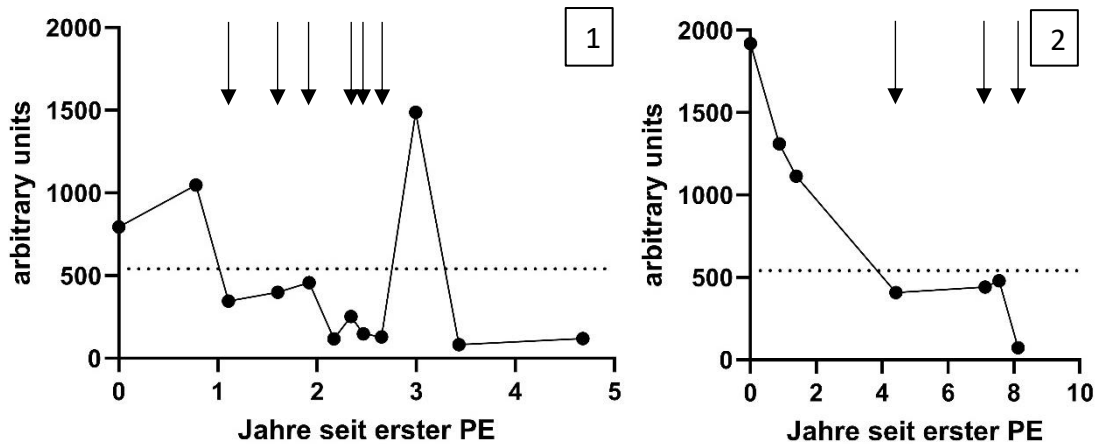


Abbildung 5: Exemplarische Anti-BSEP-ECL-1-IgG-Antikörperreaktivitätenverläufe im ELISA bei einer PBC-Patientin (1) und einem PSC-Patienten (2)

Im Verlauf der Jahre ab der ersten Probenentnahme (PE; Abszisse) in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate). --- = Normalwert (540 AU), ↓ = Veränderungen der initialen immunsuppressiven Therapie.

Die dargestellte AIH-Patientin zeigte initial positive IgG-Antikörperreaktivitäten, die binnen eines Monats negativ wurden (Abb. 6). Die gemessenen IgM-Antikörperreaktivitäten der Patientin zeigten sich bis auf eine Messung durchgehend positiv. Der initialen Kortisonstoßtherapie folgte eine Dauertherapie mit Kortison und CsA. Ein IgA-Antikörpernachweis gelang nicht.

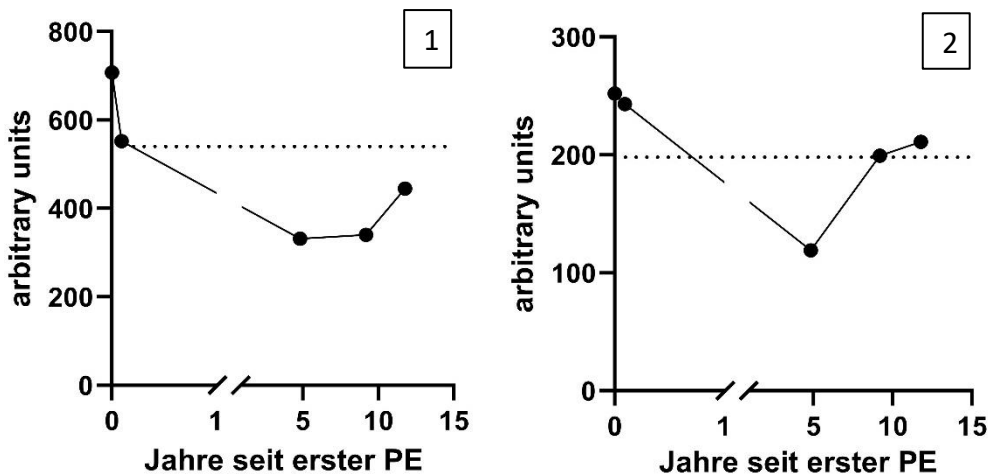


Abbildung 6: Exemplarische Anti-BSEP-ECL-1-IgG (1) und IgM (2) Antikörperreaktivitätenverläufe im ELISA bei einer AIH-Patientin

Im Verlauf der Jahre ab der ersten Probenentnahme (PE; Abszisse) in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate). --- = Normalwert (IgG: 540 AU, IgM: 198 AU). Immunsuppression mit initialer Kortisonstoßtherapie und folgender Kortison- und CsA-Therapie.

In Abb. 7 und 8 sind die Antikörperverläufe von zwei Patientinnen mit Kollagenerkrankungen dargestellt. Die dargestellte PSS-Patientin zeigte eine Abnahme der IgG-Anti-ECL-1 Reaktivität unter Therapie mit Prednisolon. Nach dem Absetzen der immunsuppressiven Therapie stiegen IgG- und IgA-Reaktivitäten erneut stark an (Abb. 7). IgM-Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden.

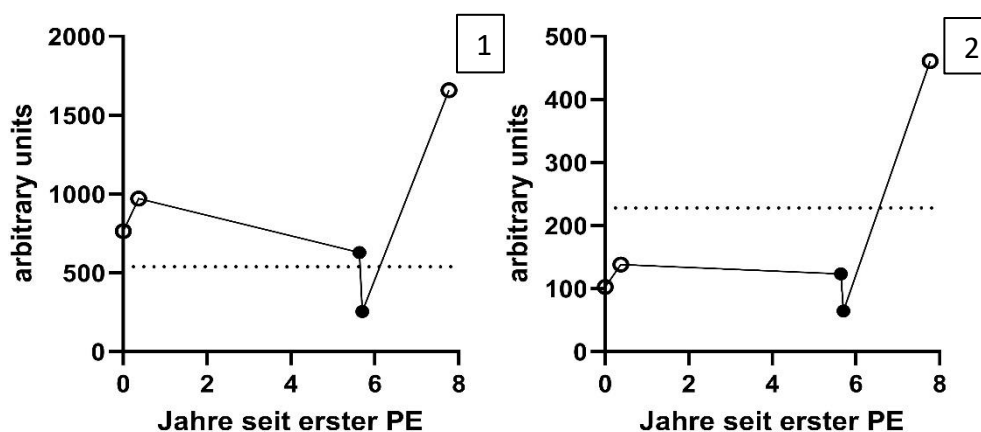


Abbildung 7: Exemplarische ELISA-Antikörperreaktivitätenverläufe gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP einer PSS-Patientin

1) IgG-Antikörperreaktivitäten, 2) IgA-Antikörperreaktivitäten. Im Verlauf der Jahre ab der ersten Probenentnahme (PE; Abszisse) in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate). --- = Normalwert (IgG: 540 AU, IgA: 228 AU). ○ Keine immunsuppressive Therapie, ● Prednisolon-Therapie.

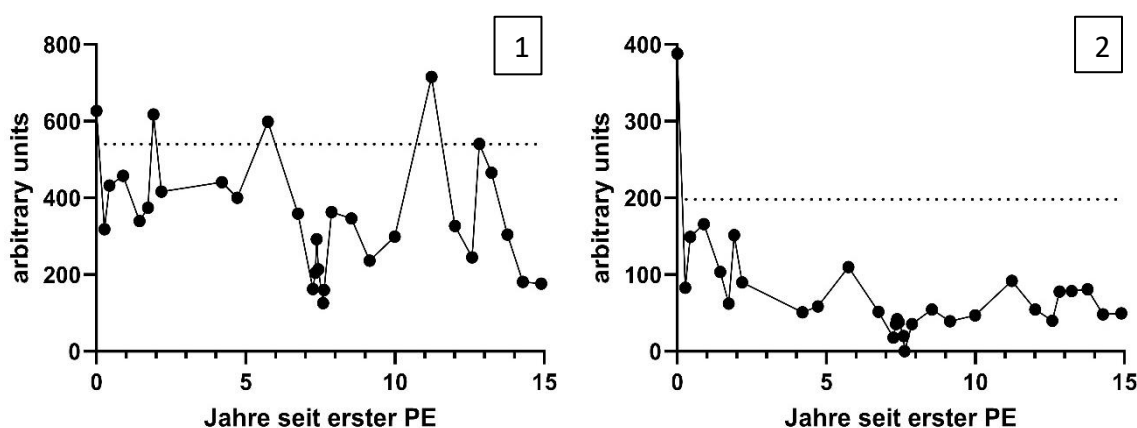


Abbildung 8: Exemplarische ELISA IgG- (1) und IgM- (2) Antikörperreaktivitätenverläufe gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP einer SLE-Patientin

Im Verlauf der Jahre ab der ersten Probenentnahme (PE; Abszisse) in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate). Die Patientin befand sich durchgehend unter immunsuppressiver Therapie. --- = Normalwert (IgG: 540 AU, IgM: 198 AU).

Bei einer SLE-Patientin konnte die Anti-ECL-1 Reaktivität über einen Zeitraum von 15 Jahren verfolgt werden (Abb. 8). Die Patientin befand sich unter dauerhafter immunsuppressiver Therapie mit wechselnden Immunsuppressiva. Ein Zusammenhang von Veränderungen der immunsuppressiven Therapie und den Antikörperreaktivitäten konnte nicht gezeigt werden. Ein IgA-Antikörnernachweis gelang nicht.

3.1.2 Veränderung der Antikörperreaktivitäten gegen die ECL-1 der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach Lebertransplantation

Von sieben Kindern lagen Blutseren vor und nach LTx vor (Abb. 9 und Tab. 17). Bei nur einem Patienten konnten vor Lebertransplantation Anti-ECL-1-Antikörper vom IgG- und IgA-Typ festgestellt werden. Nach Transplantation und der Aufnahme einer immunsuppressiven Therapie wurden diese negativ. Bei keinem anderen Patienten wurde nach Transplantation das Auftreten von Anti-ECL-1-Antikörpern beobachtet (Abb.9, Tab. 17).

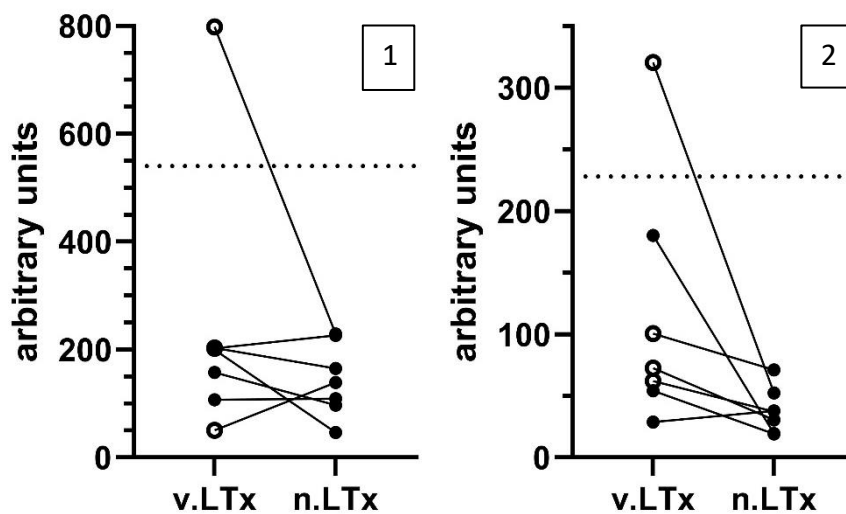


Abbildung 9: Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach LTx

1) IgG, 2) IgA. Gegenüberstellung der Antikörperreaktivitäten von sieben Kindern vor und nach Lebertransplantation (Abszisse) in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate). ○ zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestand keine Immunsuppression, ● Zustand unter Therapie. --- = Normalwert (IgG: 540 AU, IgA: 228 AU).

Tabelle 17: Gegenüberstellung von Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Seren von Kindern vor und nach LTx

Patient N°	Vor LTx			Nach LTx		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
1	29	107	46	38	109	21
2	320*	798*	113	52	229	76
3	73	203	42	31	165	20
4	100	51	50	71	139	30
5	62	202	38	37	226	69
6	54	157	32	19	97	22
7	180	199	0	19	47	0

Signifikant positive Werte sind mit * markiert. Alle Werte in AU.

3.1.3 Auswertung der Veränderung von Antikörperreaktivitäten gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP im ELISA bei Patienten verschiedener Erkrankungen

Eine Auswertung der Verläufe der Antikörperreaktivitäten ergab für PSS-Patienten und deren IgG-Antikörperreaktivitäten einen signifikanten Unterschied zwischen dem Ausgangswert und den Antikörperreaktivitäten innerhalb der ersten zwei Jahre, sowie für 13 AIH-Patienten zeigten eine signifikante Abnahme der Antikörperreaktivitäten nach acht Jahren (Abb. 10, beide $p = 0,031$).

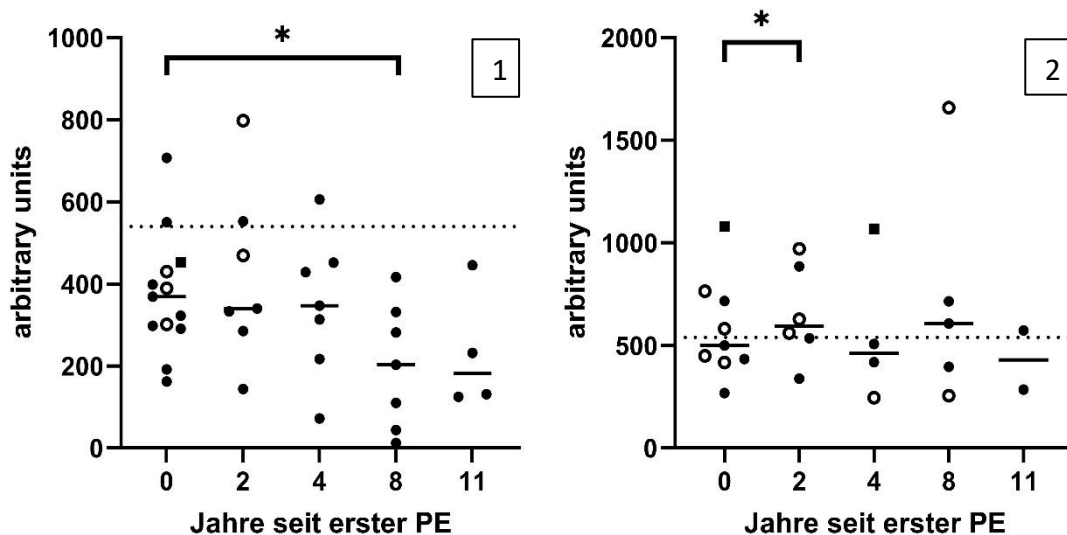


Abbildung 10: ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten von AIH-Patienten (1) und PSS-Patienten (2) im Verlauf gegen die erste extrazelluläre Schleife der BSEP

IgG-Antikörperreaktivitäten in AU (Ordinate) in den Jahren seit der ersten Probenentnahme (PE) dargestellt (Abszisse). Als gepaarte Werte berechnet. In beiden Fällen * $p = 0,0313$). ○ keine immunsuppressive Therapie, ● Immunsuppressive Therapie ■ Therapiezustand unbekannt

Eine Korrelation ($r > 0,8$) der klinischen Aktivität der Patienten mit ihren Antikörperreaktivitäten gegen die ECL-1 der BSEP in allen drei Antikörperklassen konnte in einem von 15 Fällen nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Antikörperreaktivitäten einzelner Antikörperklassen mit der Klinik der Patienten gelang bei sieben Patienten.

3.2 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im Western Blot

3.2.1 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln

Im Western Blot gelang der Nachweis einer spezifischen Reaktion unter der Verwendung von BSEP-Vesikeln sowohl mittels kommerziellen Anti-BSEP-Antikörpern als auch mit Patientenseren (Abb.11, Tab. 18).

Table 18: Anti-BSEP-Antikörpernachweise im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

	Anzahl untersuchter Seren	Anzahl (%) positiv
PSC	48	16 (33)
PBC	27	13 (48)
AIH	24	16 (67)
ALD	2	1 (50)
SLE	8	4 (50)
PSS	5	4 (80)
Gesunde Kontrollen	9	3 (33)
Total	115	51 (44)

Bei den Seren von AIH-Patienten, sowie den Seren von PSS-Patienten, konnte in der Mehrzahl der untersuchten Seren ein positives Ergebnis erzielt werden. Einschränkend gilt zu beachten, dass die Anzahl getesteter Seren in einigen Kohorten sehr klein war. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden.

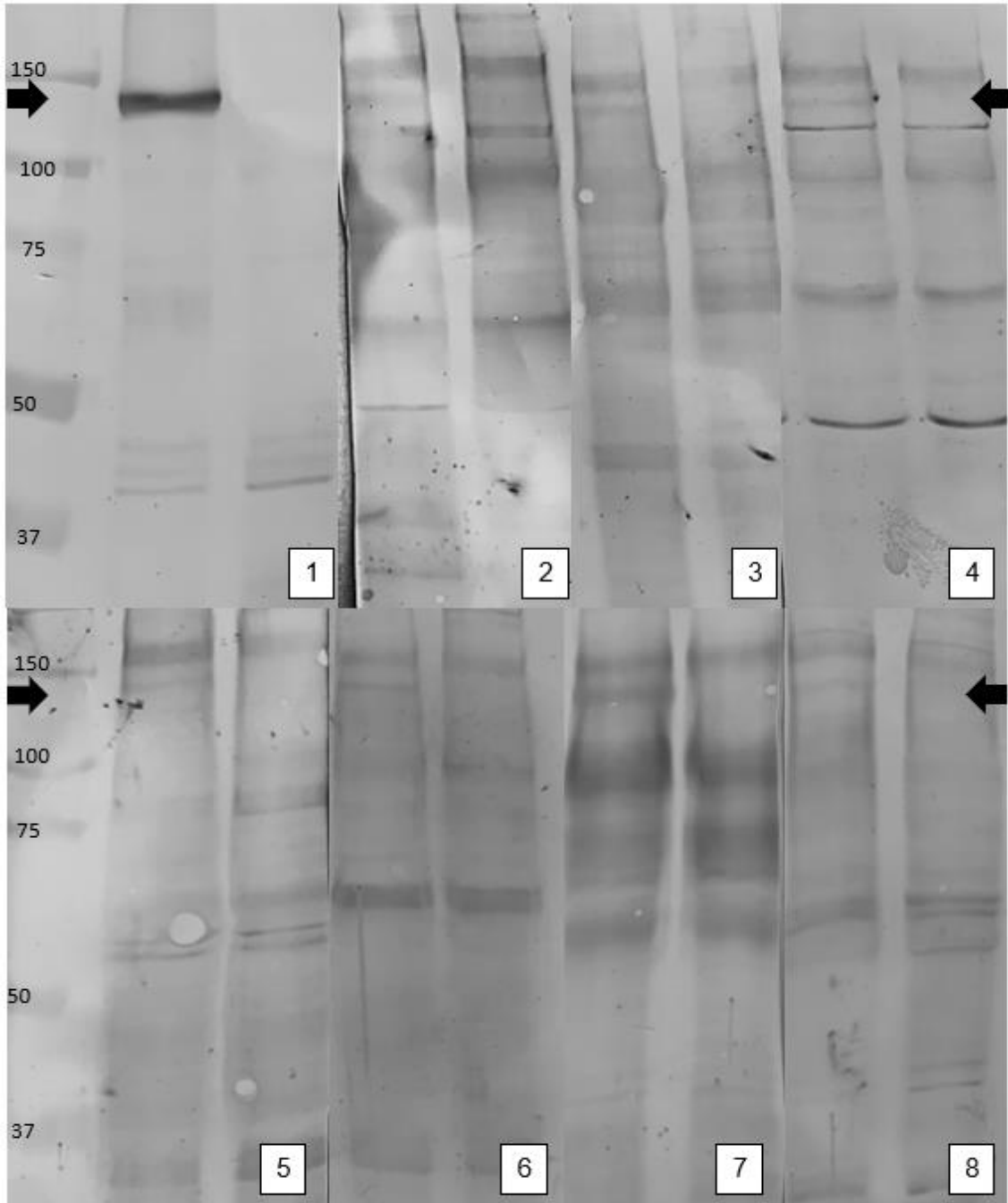


Abbildung 11: Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern im HRP-Western Blot mit BSEP-Vesikeln in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Von links nach rechts sind jeweils eine Spur Probe (BSEP-Vesikel) und eine Spur Kontrolle (Nicht-BSEP-Vesikel) aufgetragen. Angabe des Molekulargewichtsmarkers in kDa. Die BSEP-Antikörperreaktion befindet sich bei 140 kDa (→←).

Anti-BSEP-Antikörper sind in (1) dargestellt. (2) und (3) sind Seren von PSC-Patienten. (4) zeigt die Antikörperreaktion eines PBC-Serums, (5) und (6) zeigen AIH-Seren. (7) zeigt das Serum eines PSS-Patienten und die (8) das Serum eines SLE-Patienten.

3.2.2 Anti-BSEP-Antikörpernachweis an BSEP-Vesikeln mittels Western Blot Odyssey

Ein BSEP-Nachweis in BSEP-Vesikeln gelang mittels Anti-BSEP-Antikörpern (Abb. 12). Im Western Blot Odyssey wurden 14 Seren untersucht, welche im HRP-Western Blot voruntersucht worden waren, darunter 13 PSC-Seren und ein Serum einer gesunden Kontrolle. Es konnte keine Korrelation der Anti-BSEP-Antikörpernachweise beider Western Blot Methoden gezeigt werden.

3.2.3 BSEP-Nachweis in Plasmamembranisolaten aus Zellvesikeln mittels Western Blot Odyssey

Für die untersuchten Zelllinien HepG2 und Huh7 gelang ein BSEP-Nachweis. Bei CDCA-stimulierten HepG2-Zellen konnten in beiden untersuchten Konzentrationen sowohl mittels Anti-BSEP-Antikörper (Abb. 12) als auch mittels Patientenserum BSEP-Antikörperreaktionen nachgewiesen werden. Bei den nicht-CDCA-stimulierten HepG2-Zellen war dies in beiden Konzentrationen mittels Antikörper möglich, mittels Serums nur in der geringeren Konzentration. Die Darstellung von BSEP-Antikörperreaktionen bei Plasmamembranisolaten von Huh7-Zellen gelang bei CDCA-behandelten Huh7-Zellen in höherer Konzentration mittels Anti-BSEP-Antikörpern (Abb. 12.1). Bei nicht-CDCA-behandelten Plasmamembranen gelang der BSEP-Nachweis mittels Serums und Antikörper nur in der höheren Konzentration. Bei allen BSEP-Antikörperreaktionen handelte es sich um Reaktionen mit IgG-Antikörpern. Eine Reaktion mit IgM-Antikörpern konnte nicht nachgewiesen werden. Bei weiteren untersuchten nicht-CDCA behandelten HepG2-Plasmamembranisolaten konnte eine IgG-Antikörperreaktion erst bei 10µl Plasmamembranisolat festgestellt werden. Weitere Huh7-Plasmamembranisolate zeigten durchgehend positive IgG-Antikörperreaktionen.

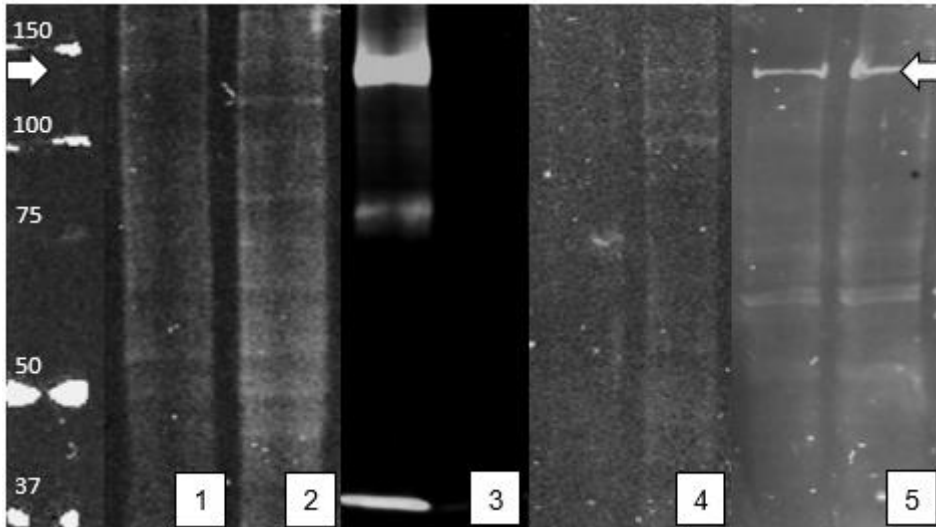


Abbildung 12: BSEP-Nachweise in BSEP-Vesikeln, Plasmamembranisolaten und inside-out Zellvesikeln im Western Blot Odyssey

Nachweise mit Molekulargewichtsmarker (in kDa). Die BSEP befindet sich bei 140kDa ($\rightarrow\leftarrow$). Die einzelnen Antikörperreaktionen sind teilweise nur zart darstellbar.

Die **Nummer 1** zeigt 5 μ l CDCA-behandelte Huh7-Plasmamembranisolate, welche mit Anti-BSEP-Antikörpern inkubiert wurden. Unter **2** sind mit Anti-BSEP-Antikörper inkubierte 2 μ l CDCA-behandelte HepG2-Plasmamembranisolate aufgetragen. Die deutliche Antikörperreaktion unter **3** zeigt Anti-BSEP-Antikörper mit BSEP-Vesikeln als Antigen. Die rechte abgebildete Spur ohne Antikörperreaktion zeigt die negative Kontrolle mit Kontroll-Vesikeln. Nummer **4** zeigt inside-out Vesikel von Huh7-Zellen, welche mit Anti-BSEP-Antikörpern inkubiert wurden, in der linken Spur mit 2 μ l Vesikel, rechts mit 5 μ l Vesikel. Nummer **5** zeigt inside-out Vesikel von HepG2-Zellen, welche mit dem Serum eines PSC-Patienten inkubiert wurden. Links wurden 2 μ l Vesikelmenge aufgetragen, rechts 5 μ l.

3.2.4 BSEP-Nachweis in inside-out Zellvesikeln mittels HRP-Western Blot und Western Blot Odyssey

Unter Verwendung von inside-out-Vesikeln, die mit einer Sepharose aufgereinigt wurden, waren im klassischen Western Blot für die untersuchten PBC, PSC und AIH-Seren keine BSEP-Antikörperreaktionen erkennbar, auch nicht bei Zugabe des Anti-BSEP-Antikörpers. Im fluoreszenzmarkierten Western Blot waren mittels Anti-BSEP-Antikörper BSEP-Antikörperreaktionen erkennbar (z.B. in Abbildung 12.4 Huh7- inside-out Vesikel (5 μ l)). Ein PBC-Serum zeigte sowohl bei HepG2- als auch bei Huh7-inside-out-Vesikeln in der 2 μ l Menge IgG-Antikörperreaktionen. Mit einem PSC-Serum konnten für alle HepG2-Vesikelkonzentrationen positive BSEP-Antikörperreaktionen nachgewiesen werden (Abb. 12.5), nicht jedoch bei Huh7-Zellvesikeln. Ein weiteres PSC-Serum

wies deutliche BSEP-Antikörperreaktionen in allen Huh7-Zellvesikelkonzentrationen, jedoch nicht bei den aufsteigenden HepG2-Vesikelmengen im Western Blot auf. Alle weiteren Seren zeigten keine Anti-BSEP-Antikörperreaktionen bei einer Vesikelmenge von 2 μ l.

3.2.5 Zellvesikel - CaCo2-Zellen

Bei Verwendung von CaCo2-Zellvesikeln konnte im Western Bot keine Reaktion mit Anti-BSEP-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 13).

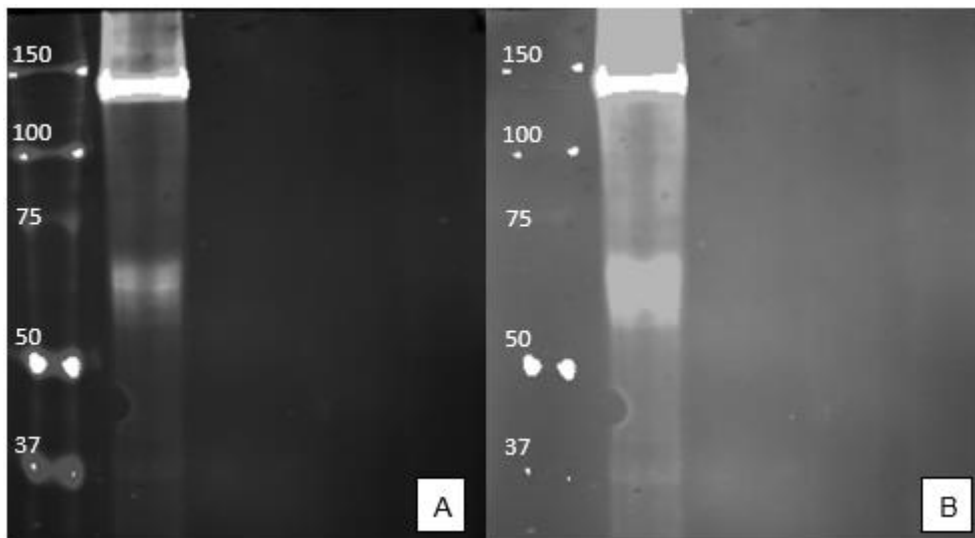


Abbildung 13: Reaktivität von Anti-BSEP-Antikörpern an Sepharose-behandelten CaCo2 inside-out Vesikeln im Western Blot Odyssey

Bei **A** und **B** handelt es sich um dieselbe Aufnahme unterschiedlich kontrastiert. In der ersten Spalte ist der Molekulargewichtsmarker (in kDa) dargestellt, es folgt die Positivkontrolle mittels BSEP-Vesikel, die CaCo2 inside-out Zellvesikel mit 2 μ l, 5 μ l und 10 μ l pro Tasche.

3.3 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im funktionellen Assay

3.3.1 Nachweis mit BSEP-Vesikeln im funktionellen Assay

3.3.1.1 Gallensalz-Aufnahmeraten in BSEP- und Nicht-BSEP-Vesikel mit den Substraten ATP, AMP und CsA

Die Gallensalzaufnahme im funktionellen Assay mit BSEP-Vesikeln unter ATP-Zugabe wurde als 100%-Wert definiert; dies wurde im weiteren Verlauf als Standardwert bezeichnet. Wurde statt ATP AMP zugegeben wurde ein deutlich geringerer Wert erreicht (7,4%, Abb. 14). Bei Verwendung von Kontrollvesikeln, die kein BSEP exprimierten, wurden sowohl unter ATP- als auch unter AMP-Zugabe niedrige Aufnahmeraten erzielt. Die Zugabe von 100 μ M CsA inhibierte die Gallensalzaufnahme in BSEP-Vesikel (7,8% mit ATP-Zugabe). Die Kombination von AMP und CsA verzeichnete den niedrigsten gemessenen Wert von 4,3%.

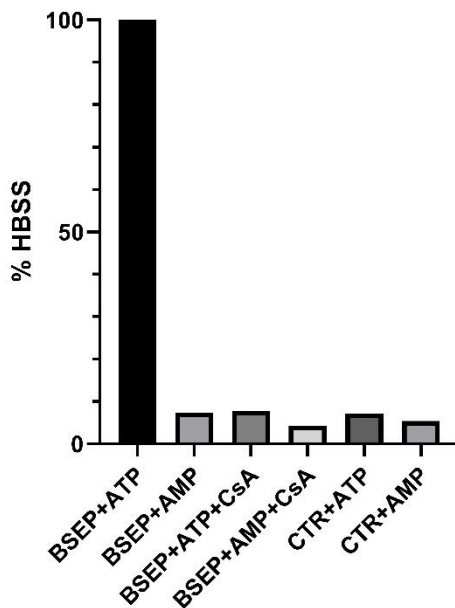


Abbildung 14: Mittelwerte der Gallensalz-Aufnahmeraten in BSEP- und Nicht-BSEP-Vesikel mit den Substraten ATP, AMP und CsA

Die Mittelwerte von Doppelbestimmungen der unterschiedlichen Versuchsanordnungen (Abszisse) sind in Prozent der Transportkapazität eines BSEP-Vesikels unter ATP-Zugabe (= % HBSS, per definitionem 100%) dargestellt (Ordinate). Kontrollvesikel (CTR) enthalten keine BSEP. Ciclosporin A (CsA) wurde in der Konzentration von 100 μ M angewandt, dies führt zu einer vollständigen Hemmung der BSEP. Die BSEP ist ein ATP-abhängiges Transportprotein.

3.3.1.2 Vergleich unterschiedlicher Immunglobulinkonzentrationen im funktionellen Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Durch eine Erhöhung der Antikörperkonzentration (Immunglobulinverdünnung 1:2 versus 1:4) konnte in allen Fällen eine stärkere inhibitorische Wirkung erreicht werden, durchschnittlich von +35%, bei einem Minimum von +13% und einem Maximum von +62%. Betrachtet man die Werte relativ zum Ausgangswert, betrug der Mittelwert +33% und die Spanne von 14-53%. Da eine höhere Antikörperkonzentration zu einer besseren Differenzierung der funktionellen Auswirkung der Anti-BSEP-Antikörper führte, wurde die höhere Konzentration in den weiteren Experimenten beibehalten.

3.3.1.3 Materialvariation und Verdünnungsreihe der BSEP-Vesikel im funktionellen Assay zur Versuchsoptimierung

Eine Halbierung der Materialmenge zeigte schwankende und nicht-reproduzierbare Ergebnisse. Die zunehmende Verdünnung der BSEP-Vesikel mit und ohne Patientenimmunglobulinen zeigte eine eingeschränkte Interpretation und Differenzierung der Ergebnisse ab einer 1:3 Verdünnung (Abb. 15). Daher wurden in den weiteren Experimenten die 1:2 Verdünnung der Vesikel und die standardmäßigen Mengen beibehalten.

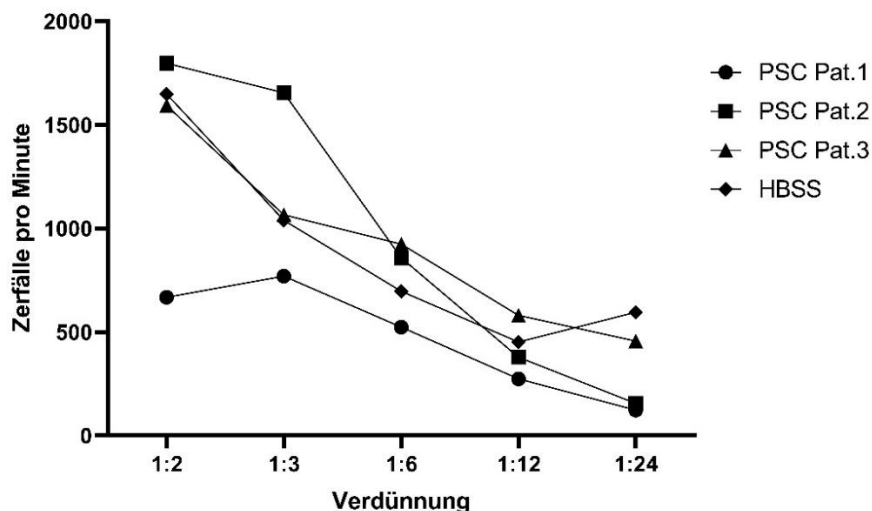


Abbildung 15: Verdünnungsreihe von BSEP-Vesikeln im funktionellen Assay zur Versuchsoptimierung mit und ohne Einsatz von Immunglobulinen

Die Verdünnung der BSEP-Vesikel in HBSS (Raute) oder Antikörperverdünnung (Pat. 1-3) ist in Vesikelmenge zu Verdünnungslösung bis zu einer Verdünnung von 1:24 angegeben (Abszisse). Die gemessenen Beta-Zerfälle pro Minute sind auf der Ordinate aufgetragen.

3.3.1.4 Bestimmung des Intraassay-Variationskoeffizienten im funktionellen Assay zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Anhand der Ergebnisse der Mehrfachbestimmungen wurden die Intraassay-Variationskoeffizienten errechnet (Tab. 19). Sowohl bei einem gesunden Probanden, als auch bei der untersuchten PSS-Serumprobe konnten Ausreißer identifiziert werden. Der Mittelwert der errechneten Variationskoeffizienten betrug 6,7%, bei einem Maximum von 10,5%. Somit kann von einer geringen Streuung der Ergebnisse innerhalb desselben Assays ausgegangen werden.

Tabelle 19: Intraassay-Variationskoeffizienten bei Mehrfachbestimmung im funktionellen Assay

HBSS (n=3)	10,5%
Gesunde Kontrolle 1 (n=4)	8,3%
Gesunde Kontrolle 2 (n=5)	4,5%
PSS-Patientin (n=5)	4,4%
SLE-Patientin (n=6)	6,1%

3.3.1.5 Wiederholte Messungen der ausplattierten Ansätze des funktionellen Assays

Die Auswertung der Mehrfachmessungen der ausplattierten Ansätze des funktionellen Assays über fünf Wochen hinweg ergab geringfügige prozentuale Abweichungen von 1% bis 2%, sowie eine einstellige Standardabweichung bei Nachmessungen. Die Medianwerte der Messungen fielen über die Zeit hinweg um 2-7% ab. Teilweise vorhandene statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten waren weder konsistent noch reproduzierbar. Eine nennenswerte Verfälschung der Messdaten über die Zeit hinweg lag nicht vor.

3.3.1.6 Ergebnisse der Einfrier- und Auftau-Experimente der im funktionellen Assay verwendeten Immunglobuline

Immunglobuline von vier Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wurden im funktionellen Assay nach mehrmaligen Einfrier-Auftau-(FT)-Zyklen der BSEP-Vesikel untersucht. Die Verlaufskurven zeigten deutliche Fluktuationen (Abb. 16). Initial stimulierende oder inhibierende Immunglobuline zeigten die größten Veränderungen, so ein initial stimulierendes SLE-Immunglobulinisolat (133%-

106%-97%-86%) oder ein initial inhibierendes PBC-Serum (26%-55%-61%-65%-68%). Den stärksten Abfall wies ein PSS-Immunglobulinisolat innerhalb eines FT-Zyklus auf (14%-89%). Nicht funktionelle Immunglobuline mit Gallensalzaufnahmeraten nahe dem ungehemmten HBSS-Wert zeigten die geringsten Schwankungen ihrer Ergebnisse über mehrere FT-Zyklen hinweg. BSEP-Vesikel zeigten im Verlauf eine leichte Abnahme der Zerfälle pro Minute. Da alle Proben derselben Charge entstammten und diese eine identische Anzahl an FT-Zyklen durchlief, hatte dies für diese Arbeit keine praktische Relevanz.

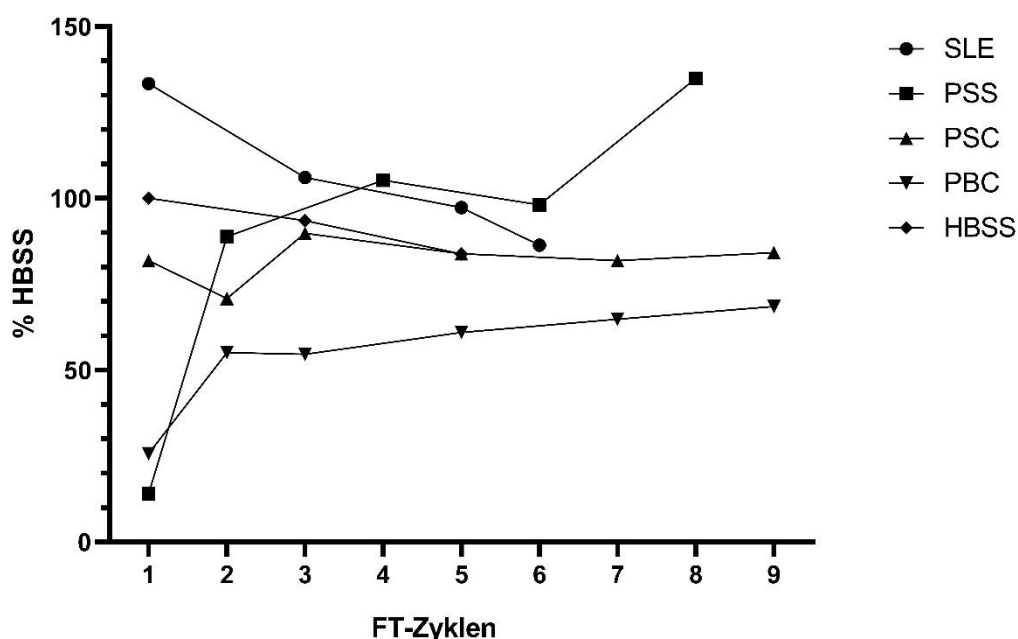


Abbildung 16: Gallensalzaufnahmeraten-Verläufe in BSEP-Vesikel nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen der Immunglobulinisolate im funktionellen Assay

Die untersuchten Immunglobuline durchliefen unterschiedlich häufig Einfrier- und Auftauzyklen (engl. Freeze-Thaw cycles = FT; Abszisse). Die Aktivität der BSEP-Gallesalzaufnahme ist in Prozent des ungehemmten Standardwerts angegeben (Ordinate).

ATP und AMP zeigten nach mehreren FT-Zyklen kein eindeutiges Bild (Abb. 17). Die ATP-Werte zeigten einen leichten Anstieg (+7 und +13%), die AMP-Werte eine leichte Abnahme (-4 und -7%). Der Vergleich zweier verschiedener ATP- und AMP-Chargen miteinander zeigte eine leichte Abweichung der Messwerte zwischen den Chargen. Da Chargen innerhalb eines Assays nicht gemischt wurden, hatte dies keine relevanten Auswirkungen auf diese Arbeit.

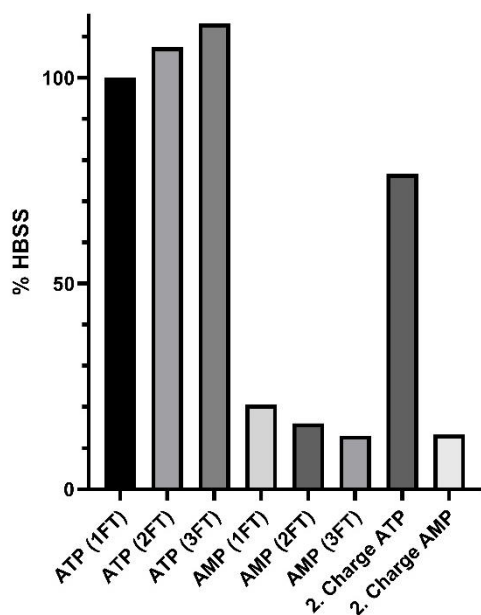


Abbildung 17: ATP und AMP im funktionellen Assay nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen

ATP- und AMP-Ansätze (Abszisse) wurden mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen (FT-Zyklen) unterzogen und als Doppelbestimmung pro Ansatz ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Prozent des ATP-Ansatzes angegeben (Ordinate, per definitionem 100%). Zusätzlich wurde innerhalb desselben Assays ATP- und AMP-Ansätze aus einer zweiten Charge mituntersucht.

3.3.1.7 Bestimmung der Interassay-Varianz des funktionellen Assays

Die Gallensalzauflösungen der ungehemmten HBSS-Ansätze über verschiedene Assays hinweg zeigten größere Schwankungen (Abb. 18). Da ungehemmte HBSS-Messwerte als 100% definiert wurden, wurden für die Bestimmung der Interassay-Varianz ausgewählte Immunglobulinisolate als Kontrollen über mehrere Assays hinweg verwendet (Abb. 19). Die Messergebnisse der Kontrollimmunglobuline schwankten im Verlauf über die funktionellen Assays ebenfalls. Wurde die Veränderung der Immunglobulinwirkung durch wiederholte FT-Zyklen berücksichtigt und nur Messwerte nach Erstisolation der Immunglobuline ausgewertet, ergaben sich konstante Antikörperreaktivitäten. Die Spannweiten der Kontrollen betragen zwischen 1% und 11%. Die Berechnung der Interassay-Variationskoeffizienten ergab für die Kontrolle 1 (K1) 5,9%, für K2 5,4% und für K3 3,6%. Bei Verwendung von Erstisolaten zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Verlauf. Die Ergebnisse zeigten äquivalent zu den Ergebnissen der Einfrier-Auftau-Experimente, dass bereits wenige FT-Zyklen zu einer veränderten Immunglobulinwirkung auf die BSEP führten.

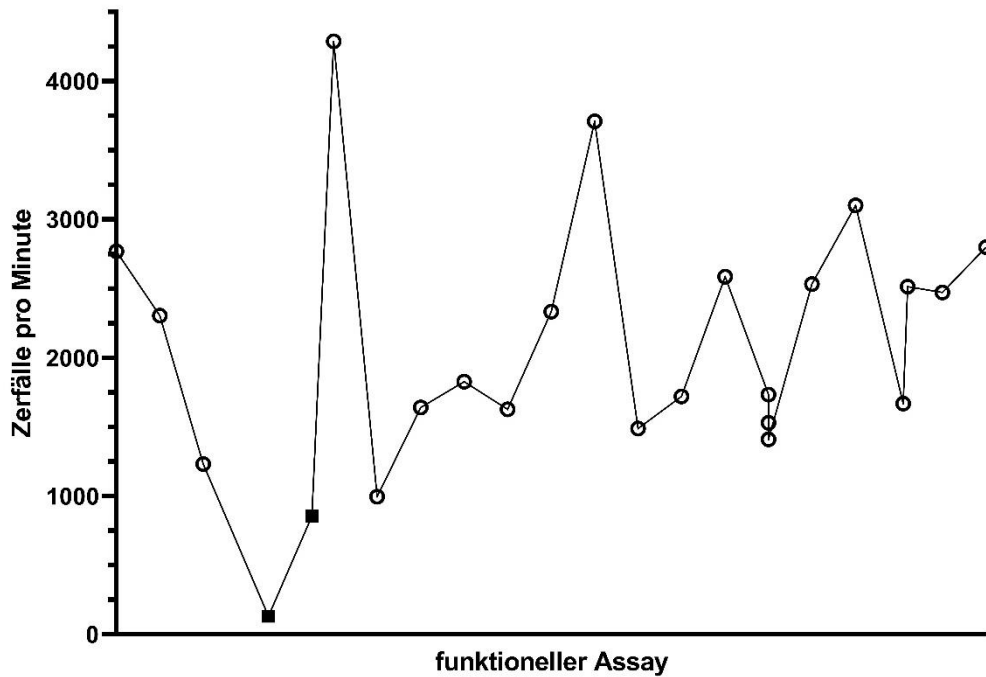


Abbildung 18: Mittelwerte der ATP-Ansätze (Standardwerte) ohne Zugabe von Immunglobulinisolaten in verschiedenen funktionellen Assays
 Verschiedene funktionelle Assays (Abszisse) in Zerfällen pro Minute (Ordinate).
 ○ einfache Vesikelmenge (= 10µl/Ansatz), ■ halbierte Vesikelmenge (= 5µl/Ansatz).

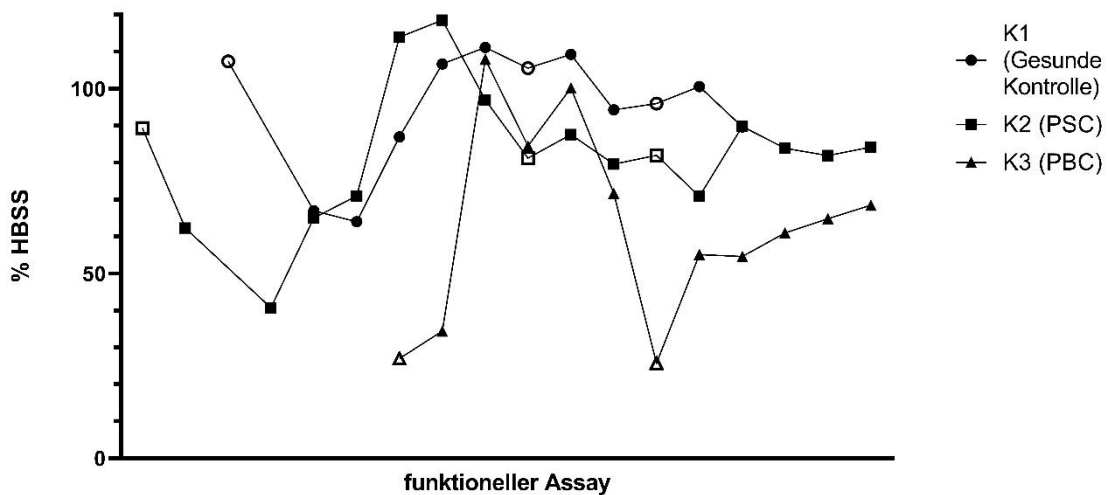


Abbildung 19: Verläufe von Kontrollimmunglobulinen im funktionellen Assay
 Nach funktionellem Assay (Abszisse) in Prozent der Gallensalzaufnahme des ungehemmten Transports (Ordinate).
 ○ Erstmessungen nach Antikörperisolation, ● Immunglobuline aus zuvor isolierten und wiederholt eingefrorenen und aufgetauten Aliquots.

3.3.1.8 Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay

Zur Detektion von funktionell wirksamen Anti-BSEP-Antikörpern wurden 128 Patientenproben mit verschiedenen Erkrankungen im funktionellen Assay untersucht (Abb. 20, Tab. 20). Basierend auf den Ergebnissen mit Seren gesunder Probanden wurden alle Werte oberhalb von 177% als stimulierend, alle Werte unterhalb von 71% als inhibierend gewertet. Insgesamt hatten Immunglobuline von zehn Patienten einen stimulierenden und von 29 Patienten einen inhibierenden Effekt. Es konnten in 30% der untersuchten Seren funktionell wirksame Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen werden.

Zur besseren Darstellung der Abweichung vom Median der gesunden Kontrollen wurden für alle Messwerte Faktoren berechnet (Abb. 21). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen wiesen vor allem Patienten mit AIH und PSC, aber auch Patienten mit SLE und PSS inhibierende Antikörper auf (Abb. 20, Tab. 20). Dies ließ sich auch mittels statistischer Auswertung verifizieren (Tab. 21).

Tabelle 20: Häufigkeit stimulierender und inhibierender Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

	Anzahl untersuchter Seren	Anti-BSEP-Antikörper	
		stimulierend Anzahl (%)	Inhibierend Anzahl (%)
PSC	13	0	5 (38)
PBC	15	3 (20)	3 (20)
AIH	20	0	10 (50)
Kinder vor LTx	18	1 (6)	0
Kinder nach LTx	14	2 (14)	0
SLE	17	1 (6)	6 (35)
PSS	15	1 (7)	5 (33)
Gesunde Kontrollen	16	2 (12)	0
Total	128	10 (8)	29 (23)

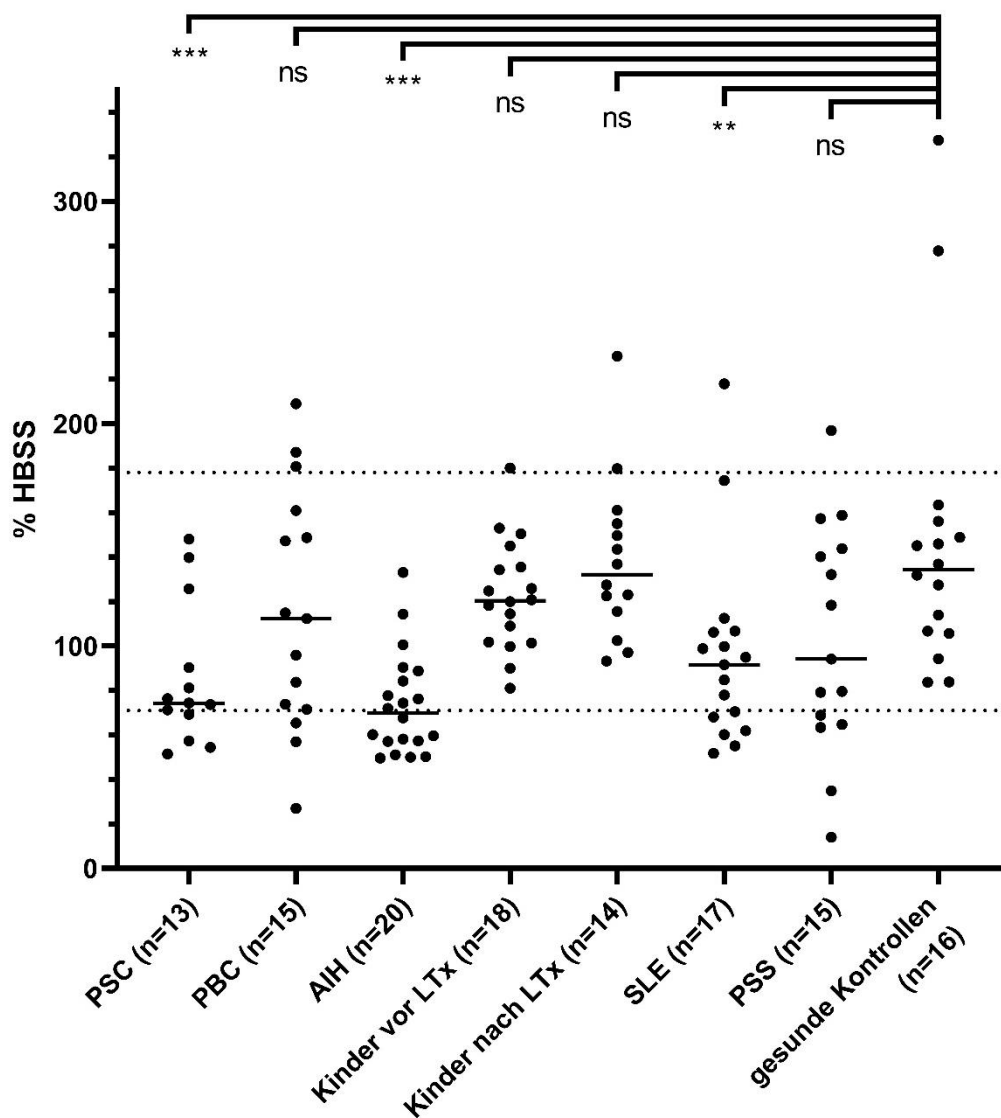


Abbildung 20: Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Die Ergebnisse von 128 Immunglobulinisolaten verschiedener Kohorten (Abszisse) sind in Prozent der Gallensalzaufnahme des ungehemmten Transports (Standardwert) angegeben (Ordinate). Für jede Kohorte ist der spezifische Medianwert dargestellt. --- = Normalwert (71% und 177% des HBSS-Werts, entspricht der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert der gesunden Kontrollen). Signifikanzen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen (inkl. auffälliger Werte). ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

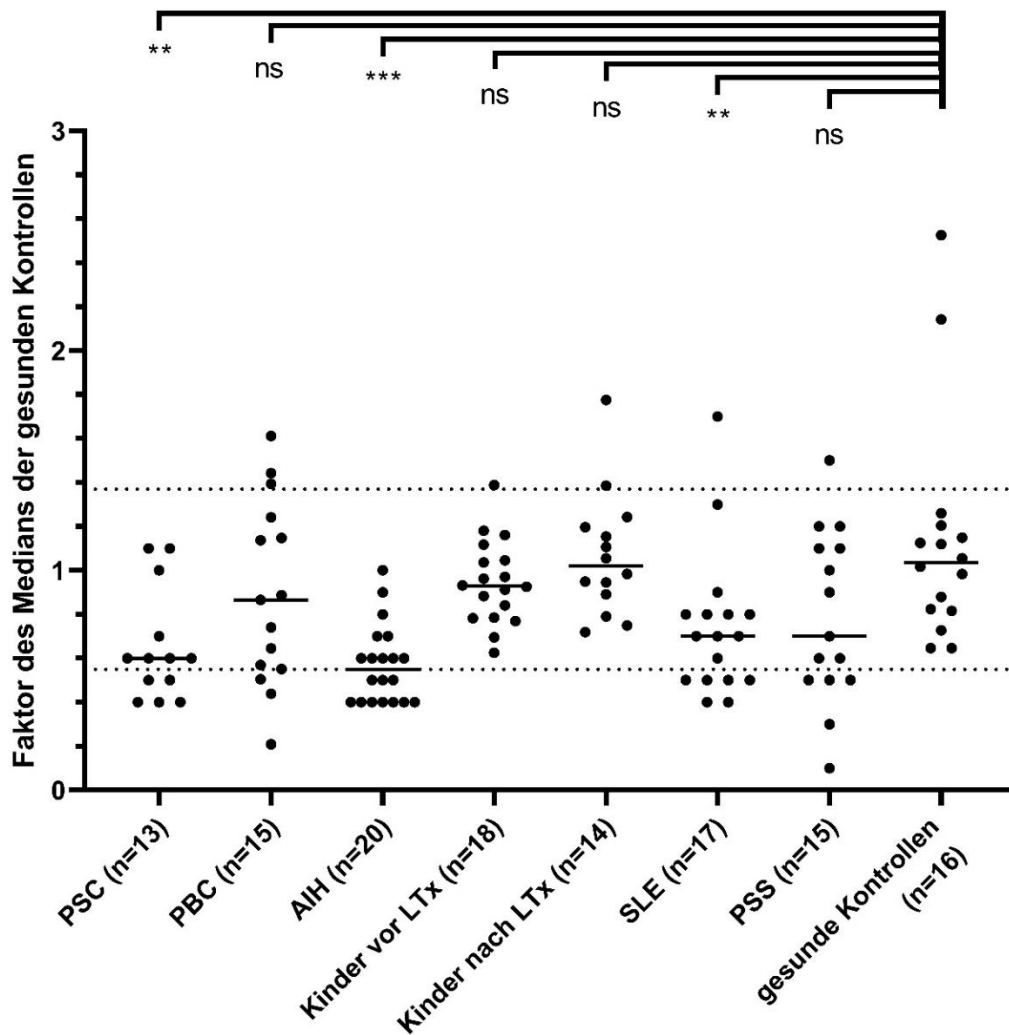


Abbildung 21: Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern mittels funktionellem Assay bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen als Faktoren des Medians der gesunden Kontrollen

Nach Kohorten getrennt (Abszisse) als Faktor-Wert wiedergegeben (Ordinate). Dieser errechnet sich durch Division des Messwerts mit dem Median-Wert der gesunden Kontrollen. In jeder Kohorte ist der Mittelwert angegeben. Gestrichelten Linien geben die Normalwerte nach oben und unten an, welche einer zweifachen Standardabweichung des Mittelwerts der gesunden Probanden entsprechen. Signifikanzen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen (inkl. auffälliger Werte). ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tabelle 21: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Krankheitskohorten im funktionellen Assay unter Angabe der Signifikanzwerte

	PSC	PBC	AIH	Kinder vor LTx	Kinder nach LTx	SLE	PSS
PSC (n=13)							
PBC (n=15)	0,12						
AIH (n=20)	0,31	0,02*					
Kinder vor LTx (n=18)	0,002**	0,53	<0,0001***		0,31 ¹		
Kinder nach LTx (n=14)	0,0005***	0,2	<0,0001***	0,21 ²			
SLE (n=17)	0,46	0,28	0,04*	0,001**	0,001***		
PSS (n=15)	0,34	0,51	0,04*	0,24	0,08	0,6	
³ Gesunde Kontrollen (n=14)	0,001**	0,57	<0,0001***	0,46	0,69	0,009**	0,19

Signifikante Werte: *p ≤ 0,05; sehr signifikante Werte: **p ≤ 0,01; höchst signifikante Werte: ***p ≤ 0,001;

¹nur gepaarte Daten; ²alle Daten ungepaart gerechnet; ³Gesunde Kontrollen ohne Ausreißer

3.3.2 Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern und BSEP-Nachweis im funktionellen Assay unter Verwendung von selbsthergestellten Zellvesikeln

3.3.2.1 Sepharose-behandelte inside-out Zellvesikel und Plasmamembranisolate im funktionellen Assay mit verschiedenen Substraten

Äquivalent zu BSEP-Vesikeln wurden Plasmamembranisolate und Sepharose-behandelte inside-out Zellvesikel im funktionellen Assay mit den verschiedenen Substraten ATP, AMP und CsA untersucht (Abb. 22, Tab. 22). HepG2- und Huh7-inside-out Zellvesikel zeigten bei ATP-Zugabe eine sehr niedrige Gallensalzaufnahme, die zwischen vier und 18% des Transports von BSEP-Vesikel betrug (Tab. 22). Ansätze mit der Zugabe von AMP übertrafen in ihren Gallensalzaufnahmen die Werte unter ATP-Zugabe, sowohl bei HepG2- (280% des ATP-Werts) als auch bei Huh7-Zellen (308%). Die Zugabe von CsA zu ATP oder AMP führte bei allen Zellgruppen zu einer Abnahme der Werte deutlich unter den initialen ATP-Messwert.

Inside-out CaCo2-Zellvesikel wiesen mit 19% des HBSS-Werts der BSEP-Vesikel den höchsten gemessenen Wert unter ATP-Zugabe auf. Sie zeigten unter AMP-Gabe einen Anstieg (233% ihres ATP-Werts), unter CsA-Zugabe

einen Abfall unter den ATP-Wert. Die Verdopplung der Vesikelmenge im funktionellen Assay zeigte für alle Zelltypen korrespondierende Ergebnisse (Tab. 22). Im Vergleich zu kommerziellen BSEP-Vesikeln unter ATP-Zugabe konnten selbsthergestellte inside-out Zellvesikel keine äquivalenten Werte erzielen. Die Gallensalzauflnahmen der Plasmamembranisolate zeigten im funktionellen Assay ein sehr heterogenes und uneindeutiges Bild (Tab. 22). Im Vergleich zu Sepharose-behandelten inside-out Vesikel zeigte sich kein äquivalentes Verhalten der unterschiedlichen Zelltypen und eingesetzten Substrate. Äquivalent zu den inside-out Zellvesikeln fielen erhöhten AMP-Messwerte auf.

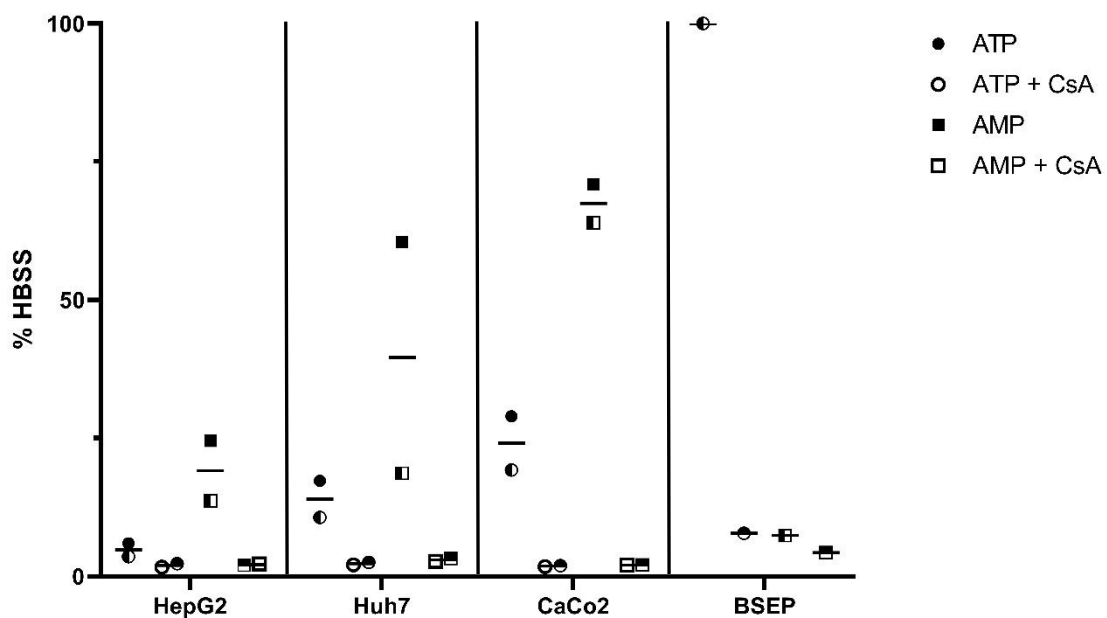


Abbildung 22: Gallensalzaufnahme in inside-out Zellvesikel von HepG2-, Huh7-, CaCo2-Zellen und BSEP-Vesikel unter Verwendung verschiedener Substrate im funktionellen Assay

In Prozent der Gallensalzaufnahme der BSEP-Vesikel unter ATP-Zugabe (Ordinate). Pro Ansatz ist der Mittelwert angegeben. Je inside-out Ansatz wurde jeweils eine Messung mit einfacher (10µl, halbierte Symbole), sowie mit doppelter Vesikelkonzentration (20µl, volle Symbole) untersucht.

Tabelle 22: Ergebnisse der selbsthergestellten inside-out Zellvesikel im funktionellen Assay unter Verwendung verschiedener Substrate und Vesikelkonzentrationen

		Sepharose-behandelte inside-out-Vesikel (10µl)			
		ATP	ATP + CsA	AMP	AMP + CsA
HepG2	% des HBSS	3,6	2,3	13,7	2,0
	% des ATP	100	64,8	383,1	56,3
Huh7	% des HBSS	10,6	2,5	18,6	3,3
	% des ATP	100	23,6	175	30,7
CaCo2	% des HBSS	19,2	1,9	64	2,1
	% des ATP	100	10	333,1	10,7

		Sepharose-behandelte inside-out-Vesikel (20µl)			
		ATP	ATP + CsA	AMP	AMP + CsA
HepG2	% des HBSS	6	1,7	24,5	2,2
	% des ATP	100	27,8	408,7	37,4
Huh7	% des HBSS	17,3	2	60,5	2,7
	% des ATP	100	11,9	349,8	15,5
CaCo2	% des HBSS	28,9	1,7	70,9	2
	% des ATP	100	6,1	245,1	6,9

		Plasmamembranisolate (10µl)			
		ATP	ATP + CsA	AMP	AMP + CsA
HepG2	% des HBSS	7,1	7,1	11	9
	% des ATP	100	100	154,9	126,8
Huh7	% des HBSS	1,9	1,3	7	1,3
	% des ATP	100	70,3	378,4	67,6
CaCo2	% des HBSS	25,9	3	19,8	1,4
	% des ATP	100	11,4	76,2	5,6

3.3.2.2 Einfluss der Chenodesoxycholsäure-Behandlung der Zellkultur auf die Taurocholataufnahme in Zellvesikel im funktionellen Assay

Inside-out Zellvesikel von Huh7- und HepG2-Zellen wurden aus CDCA-behandelten und nicht-CDCA-behandelten Zellen hergestellt und mit verschiedenen Substraten im funktionellen Assay auf ihre Taurocholataufnahme hin untersucht (Abb. 23). Huh7-Zellvesikel ohne CDCA-Stimulation zeigten unter ATP- oder AMP-Zugabe eine höhere Taurocholataufnahme als mit CDCA-Stimulation. HepG2-Zellvesikel verhielten sich unter CDCA-Stimulation gegensätzlich, unter ATP- und AMP-Zugabe nahmen CDCA-stimulierte Zellen mehr Taurocholat auf. Für beide Zelllinien konnten deutlich erhöhte Aufnahmeraten unter AMP- gegenüber der ATP-Zugabe festgestellt werden. Die Behandlung mit dem BSEP-stimulierenden Agens CDCA zeigte damit keinen eindeutigen Effekt.

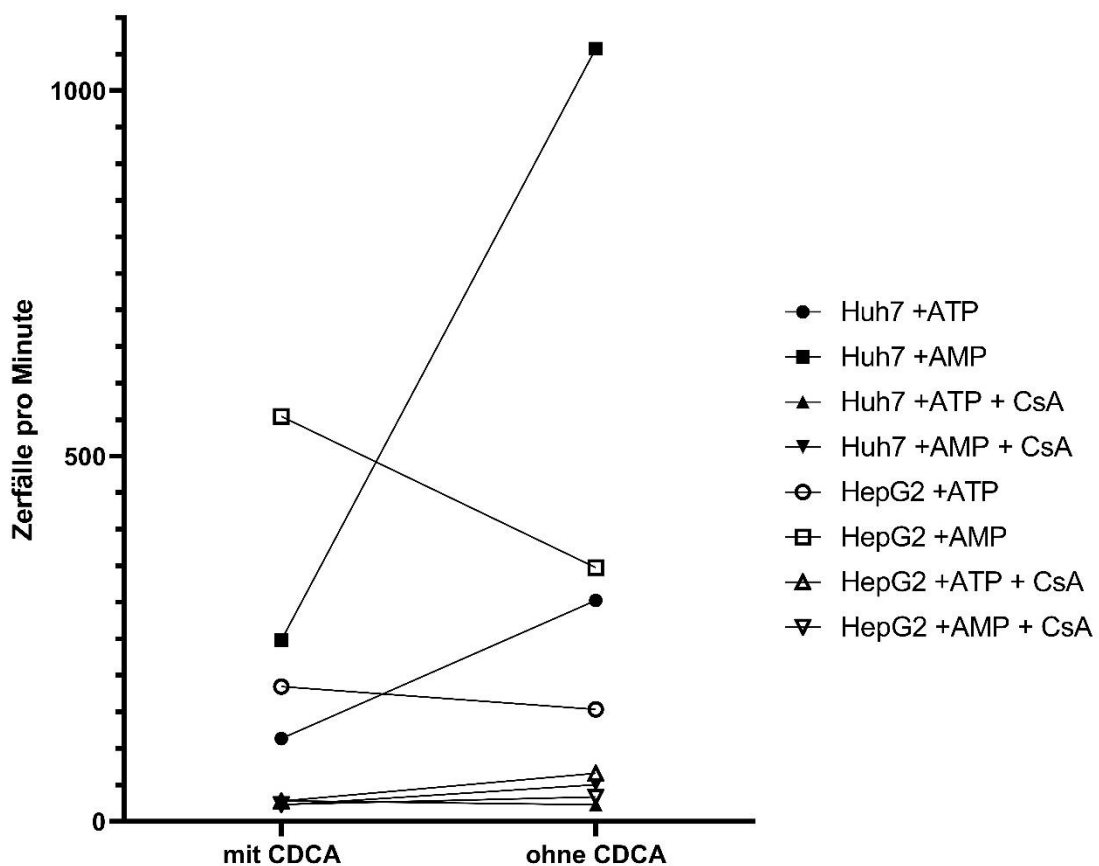


Abbildung 23: Einfluss der CDCA-Stimulation von HepG2- und Huh7-Zellen auf die Taurocholataufnahme in inside-out BSEP-Zellvesikel im funktionellen Assay
Gegenüberstellung (Abszisse) in Zerfällen pro Minute (Ordinate).

3.3.2.3 Veränderung des Proteingehalts der Zellvesikel vor und nach Sepharosebehandlung

Nach Sepharosebehandlung der Plasmamembranisolate zeigte sich eine deutliche Abnahme der Proteinkonzentration der HepG2- und der Huh7-Zellvesikel. Die Proteinkonzentration der HepG2-Zellen fiel um ca. 5mg/ml auf 0,95mg/ml und die der Huh7-Zellen um 5mg/ml auf 1,35mg/ml. Die CaCo2-Zellen zeigten einen geringeren Abfall, die Proteinmenge verringerte sich um 0,6mg/ml auf 3,7mg/ml.

3.4 Korrelation der verwendeten Methoden zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

3.4.1 Korrelation von ELISA und Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Eine Korrelation der ELISA- und Western Blot Anti-BSEP-Antikörpernachweise (Tab. 23) konnte nicht gezeigt werden. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Table 23: Vierfeldertafel der Anti-BSEP-Antikörpernachweise im Western Blot und ELISA

Anzahl (Prozent)	ELISA positiv	ELISA negativ
Western Blot positiv	12 (10)	43 (36)
Western Blot negativ	10 (8)	55 (46)

3.4.2 Korrelation von ELISA und funktionellem Assay zum Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern

129 Patientenseren wurden mittels ELISA und funktionellem Assay auf Anti-BSEP-Antikörper untersucht, wobei keine Korrelation der Methoden festgestellt wurde. Die gesunden Kontrollen zeigten eine Korrelation von funktionellem Assay und den IgM-Antikörperreaktivitäten im ELISA ($r = 0,58$). Für das PSS-Kollektiv konnte ebenfalls eine Korrelation ($r = 0,5$, nicht signifikant, a.e. wegen geringem Stichprobenumfang) von Antikörperreaktivitäten im IgA-ELISA und im funktionellen Assay festgestellt werden. In den Vierfeldertafeln konnten vereinzelte signifikante Unterschiede festgestellt werden, so etwa zwischen den positiven ELISA-Antikörperreaktivitäten und den inhibitorischen Antikörper-

reaktivitäten des funktionellen Assays ($p = 0,021$), den positiven IgM-ELISA-Antikörperreaktivitäten und den positiven Antikörperreaktivitäten des funktionellen Assays ($p=0,025$) und zwischen den IgG- und IgM-positiven ELISA-Antikörperreaktivitäten und den inhibitorischen Antikörperreaktivitäten des funktionellen Assays ($p=0,015$).

3.4.3 Korrelation von Western Blot und funktionellem Assay zum Nachweis von funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern

Die Nachweise funktioneller Anti-BSEP-Antikörper mittels funktionellem Assay und Western Blot zeigten keine signifikante Korrelation, auch statistisch signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt.

3.4.4 Korrelation der Anti-BSEP-Antikörper-Nachweismethoden

Eine Korrelation von ELISA, Western Blot und funktionellem Assay konnte nicht gezeigt werden.

Innerhalb des ELISA zeigten die IgA- und IgG-Antikörperreaktivitäten eine Korrelation ihrer Ergebnisse ($r = 0,567$). Für die Kohorten der Kinder vor und nach LTx konnten teilweise höhere Korrelationen festgestellt werden. Die deutlichste Korrelation wurde zwischen den IgA- und IgG-Antikörperreaktivitäten von ALD-Patienten festgestellt ($r = 0,764$).

3.5 Klinische und laborchemische Auffälligkeiten bei Patienten mit Anti-BSEP-Antikörpernachweis

3.5.1 Korrelation zwischen Anti-BSEP-Antikörpern und klinischer Aktivität der Patienten

Die im ELISA nachgewiesenen Anti-ECL-1-Antikörper zeigten bei Betrachtung aller Erkrankungen keine Korrelation mit der klinischen Aktivität der Patienten. Einzelne Kohorten schon (Tab. 24), darunter die Kinder vor LTx und nach LTx. Eine Korrelation zwischen Antikörperreaktivitäten im funktionellen Assay und klinischem Zustand ergab sich nur für die PSC-Patienten ($r = 0,7$). Es gilt allerdings zu beachten, dass nur eine inverse Korrelation (z.B. $r = -0,8$) einen Zusammenhang von ausgeprägter Klinik und inhibierenden Antikörpern im funktionellen Assay wiedergeben würde. Für die Western Blot Methode konnte

keine Korrelation von klinischer Aktivität und Anti-BSEP-Antikörpernachweis gezeigt werden.

Im ELISA zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Patienten ohne und mit vorhandener Klinik der Grunderkrankung und deren IgG-Antikörperreaktivitäten ($p = 0,017$; Abb. 24). Für IgA-Antikörperreaktivitäten zeigte sich ein Unterschied zwischen Patienten mit unterschiedlicher klinischer Aktivität (p stets $< 0,005$), im Speziellen ebenfalls für die Subgruppen der PSC- und AIH-Patienten. Bei IgM-Antikörperreaktivitäten fiel ein Unterschied zwischen ALD-Patienten, sowie Kindern nach LTx ohne klinische Beschwerden und mit ausgeprägter Klinik auf. Im funktionellen Assay zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit unterschiedlicher klinischer Präsentation.

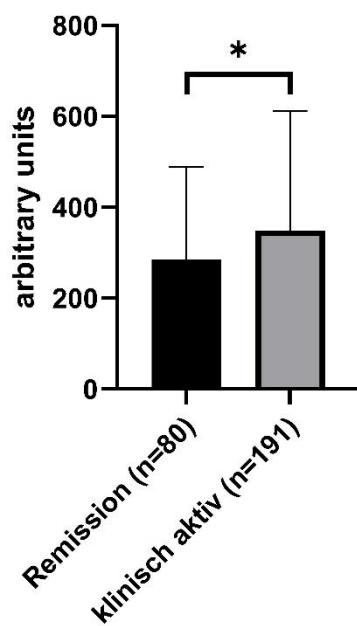


Abbildung 24: Vergleich der ELISA IgG-Anti-ECL-1-Reaktivitäten von Patienten in Remission versus Patienten mit klinischer Aktivität

Die Ergebnisse mit Mittelwert und Standardabweichung sind in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate) angegeben. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,017$).

Tabelle 24: Korrelationskoeffizienten (Spearman) der Anti-ECL-1-Antikörpernachweise im ELISA mit ausgewählten Parametern

Korrelation mit		Alter	Erkrankungsjahre	Therapie	Klinik	CRP	BSG	AST	ALT	AP	GGT
PSC	IgG	0,04	-0,04	0,08	0,15	0,21	0,32	-0,05	-0,16	-0,01	-0,10
	IgA	0,28	0,11	0,3	0,37	0,48	0,38	0,02	-0,19	0,11	-0,11
	IgM	0,10	0,18	0,37	0,17	-0,15	0,19	0,14	0,03	0,00	-0,15
PBC	IgG	-0,01	-0,28	-0,10	0,18	0,00	0,32	0,16	0,07	0,03	0,10
	IgA	0,16	-0,22	-0,13	0,04	-0,08	0,21	0,21	0,21	0,06	0,16
	IgM	0,01	0,05	0,14	0,15	0,04	0,62*	0,22	-0,01	0,19	0,29
AIH	IgG	-0,05	0,04	-0,42	0,29	0,21	0,63*	0,69*	0,58*	0,11	0,21
	IgA	-0,16	0,04	-0,22	0,37	0,23	0,42	0,57*	0,43	0,26	0,28
	IgM	0,05	0,19	0,01	0,22	0,01	0,35	0,11	0,12	0,03	0,11
ALD	IgG	0,02	0,33	-	-0,04	0,05	0,14	0,32	0,02	0,39	-0,13
	IgA	0,05	0,44	-	-0,02	0,13	0,02	0,24	-0,09	0,41	-0,3
	IgM	0,11	0,18	-	-0,05	0,06	-0,16	0,21	-0,08	0,07	0,15
Kinder vor LTx	IgG	0,22	0,24	0,04	0,32	0,23	-	-0,15	-0,14	-0,58#	-0,13
	IgA	0,26	0,2	-0,2	0,60*	0,57*	-	0,18	0,12	-0,34	-0,09
	IgM	0,34	0,32	-0,16	0,36	0,19	-	-0,13	-0,08	-0,54#	-0,23
Kinder nach LTx	IgG	0,39	-0,50	-	0,28	0,22	-	-0,17	-0,06	0,13	0,22
	IgA	0,35	-1,00#	-	0,33	-0,04	-	-0,2	-0,07	0,48	0,1
	IgM	0,41	-0,50	-	0,54*	0,37	-	-0,26	0,09	0,07	0,21
SLE	IgG	-0,32	-0,06	-0,28	-0,03	-0,08	0,37	-	-	-	-
	IgA	0,08	0,04	-0,09	0,21	0,18	0,33	-	-	-	-
	IgM	-0,25	-0,18	-0,11	0,20	0,47	0,18	-	-	-	-
PSS	IgG	-0,19	-0,21	-0,36	-0,13	-0,17	0,20	-	-	-	-
	IgA	0,23	0,11	-0,29	0,07	0,07	0,33	-	-	-	-
	IgM	-0,11	-0,03	-0,07	-0,35	0,10	0,11	-	-	-	-
Gesamt	IgG	0,03	-0,03	-0,27	0,14	0,14	0,33	0,23	0,05	-0,08	0,09
	IgA	0,22	-0,03	-0,34	0,31	0,27	0,33	0,3	0,07	0,06	0,17
	IgM	0,03	0,00	-0,10	0,10	0,16	0,19	0,10	-0,03	-0,01	0,14

*Korrelation ($r \geq 0,5$); #inverse Korrelation ($r \leq -0,5$)

3.5.2 Einfluss von Geschlecht, Alter, Erkrankungsdauer und Therapiezustand auf den Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

Es bestand keine Korrelation von Anti-BSEP-Antikörperreaktivitäten im ELISA und im funktionellen Assay mit dem Alter oder dem Geschlecht der untersuchten Patienten. Die Erkrankungsdauer korrelierte im funktionellen Assay für PBC-Patienten mit der stimulierenden Wirkung von Anti-BSEP-Antikörpern ($r = 0,87$), sowie invers mit den Anti-BSEP-IgA-Antikörperreaktivitäten der Kinder nach LTx im ELISA ($r = -1$, nicht signifikant, a.e. wegen des geringen Stichprobenumfangs). Der Therapiezustand korrelierte nur mit den Antikörperreaktivitäten des funktionellen Assays für stimulierende Anti-BSEP-Antikörper und therapierte PBC-Patienten ($r = 0,53$, nicht signifikant, a.e. wegen des geringen Stichprobenumfangs), Kinder vor LTx ($r = 0,68$), sowie für AIH-Patienten mit funktionell inhibierenden Anti-BSEP-Antikörpern ($r = 1$ bei $n = 13$).

Signifikante Unterschiede ließen sich für die IgG-Anti-ECL-1-Reaktivitäten aller Patienten im ELISA und deren Geschlecht feststellen ($p = 0,048$), jedoch nicht für einzelne Kohorten. Zwischen therapierten und nichttherapierten Patienten zeigten sich höchst signifikante Unterschiede bezüglich ihrer IgG- und IgA-Antikörperreaktivitäten im ELISA ($p < 0,0001$). Weitere signifikante Unterschiede zwischen therapierten und nichttherapierten Patienten zeigten das PSC-Kollektiv bezüglich der ELISA-IgA- und IgM-Antikörperreaktivitäten, das PBC-Kollektiv bezüglich der ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten und das PSS-Kollektiv bezüglich der ELISA-IgG- und IgA-Antikörperreaktivitäten. Die Kohorte der Kinder vor LTx wies im funktionellen Assay signifikante Unterschiede zwischen therapierten und nicht-therapierten Kindern auf ($p = 0,012$). AIH-Patienten mit und ohne inhibierende Anti-BSEP-Antikörper waren in ihrem Therapiezustand ebenfalls signifikant verschieden ($p = 0,0007$).

Patienten des funktionellen Assays mit signifikanten inhibierenden Immunglobulinen wiesen neben einem signifikant höheren Alter bei Probenentnahme (im Mittel 44 Jahre statt 34 Jahre) einen signifikanten Unterschied in deren ELISA-IgG- ($p=0,0006$) und IgM-Antikörperreaktivitäten ($p=0,001$) gegenüber Patienten mit nicht inhibierenden Immunglobulinen auf. Weitere Auffälligkeiten ergaben sich nicht.

3.5.3 Zusammenhang von Anti-BSEP-Antikörpernachweis und Laborchemie

In Zusammenschau aller Patienten bestand keine Korrelation zwischen laborchemischen Parametern und den ELISA-Antikörperreaktivitäten.

Für den Entzündungsparameter CRP zeigten sich signifikante Unterschiede der Anti-BSEP-Antikörperreaktivitäten im IgA-ELISA ($p = 0,002$) und im funktionellen Assay ($p = 0,009$; Abb. 25 (1)) für Patienten mit erhöhten und nicht erhöhten Werten. Auch zwischen Patienten mit erhöhten und unauffälligen BSG-Werten zeigten sich signifikante Unterschiede der Antikörperreaktivitäten im ELISA. Für die Klassen G und A waren diese höchst signifikant ($p < 0,0001$; Abb. 25 (2)).

Die untersuchten Leberwerte (ohne jene von Kollagenosepatienten) zeigten vereinzelte Auffälligkeiten. Zwischen Patienten mit normalen und erhöhten AST-Werten ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich ihrer ELISA-IgG- ($p = 0,001$) und IgA-Antikörperreaktivitäten ($p < 0,0001$). Zwischen Patienten mit normalen und erhöhten GGT-Werten zeigten sich signifikante Unterschiede in den ELISA-IgA ($p = 0,005$) und IgM-Antikörperreaktivitäten ($p = 0,037$). Patienten mit auffälligen (inhibierenden und stimulierenden) Immunglobulinen im funktionellen Assay zeigten im exakten Fisher Test signifikante Unterschiede in ihren AP-Werten ($p = 0,005$). Dies konnte auch isoliert für Patienten mit inhibierenden Anti-BSEP-Antikörpern ($p = 0,03$) beobachtet werden.

Unter den untersuchten Lebererkrankungen wiesen die Kinder vor LTx eine Korrelation des Entzündungsparameters CRP und den ELISA-IgA-Antikörperreaktivitäten auf ($r = 0,565$). Signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit erhöhtem und nicht-erhöhtem CRP-Wert zeigten sich bei PSC-Patienten und Kinder vor LTx und ihren Anti-BSEP-Antikörperreaktivitäten im IgA-ELISA. BSG-Werte korrelierten bei AIH-Patienten mit den ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten ($r = 0,63$). Für Patienten der cholestatischen Lebererkrankung PBC zeigte sich eine Korrelation der BSG-Werte mit den ELISA-IgM-Antikörperreaktivitäten ($r = 0,62$), sowie den inhibierenden funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern ($r = -0,59$, nicht signifikant). Signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit erhöhten und nicht-erhöhten BSG-Werten zeigten sich für die Antikörperreaktivitäten im ELISA der PSC- (IgG), AIH- (IgG) und PBC-Patienten (IgG, IgM). Die untersuchten

Lebererkrankungen zeigten teilweise Korrelationen ihrer Anti-ECL-1-Antikörperreaktivitäten im ELISA und ihrer Leberwerte. AIH-Patienten korrelierten mit ihren ALT- (IgG) und AST-Werten (IgG, IgA). Gleichzeitig zeigten die AIH-Patienten signifikante Unterschiede zwischen AST-positiven und negativen Patienten (IgG, IgA). Die Kinder vor LTx wiesen eine inverse Korrelation der ELISA-IgG- und IgM-Antikörperreaktivitäten und ihren AP-Werten auf. PBC-Patienten waren zwischen AST- und ALT-positiven und -negativen Patienten signifikant verschieden in ihren ELISA-IgA-Antikörperreaktivitäten, gleichzeitig wiesen sie signifikante Unterschiede der GGT-positiven und GGT-negativen Antikörperreaktivitäten im IgM-ELISA auf ($p = 0,045$).

Für die Kollagenosen konnten bei SLE-Patienten signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit erhöhten und nicht-erhöhten BSG-Werten und ihren Anti-ECL-1-Antikörperreaktivitäten im IgG- und IgA-ELISA gezeigt werden, sowie bezüglich ihrer CRP-Werte und Antikörperreaktivitäten im IgM-ELISA.

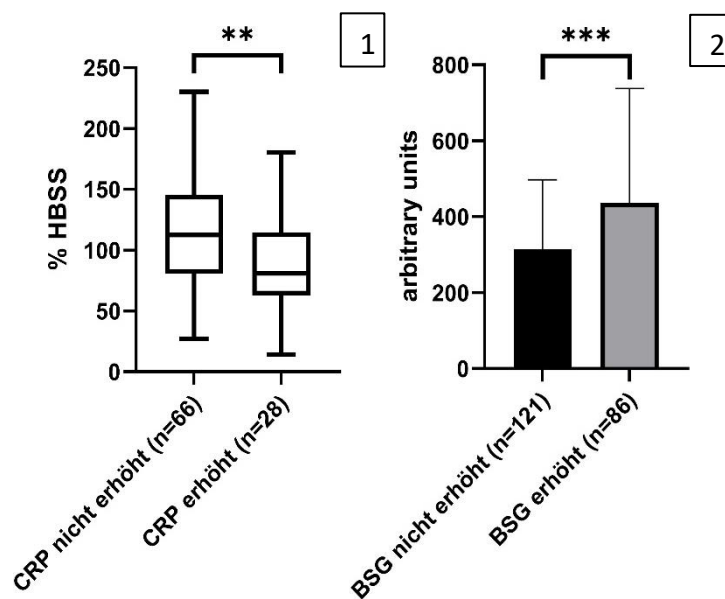


Abbildung 25 (1): Vergleich der Antikörperreaktivitäten der Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assays aller Kohorten nach CRP-Wert

Gegenübergestellt je nach Erhöhung des CRP-Werts (Abszisse). Der Medianwert mit Minimal- und Maximalwert ist in Prozent des Standardwerts angegeben (Ordinate). ** $p = 0,0097$.

Abbildung 25 (2): Vergleich der ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten von Anti-BSEP-Antikörpern aller Kohorten nach Blutsenkungsgeschwindigkeit

Gegenübergestellt je nach Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG; Abszisse). Der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung ist in willkürlichen Einheiten (AU; Ordinate) angegeben. *** $p < 0,0001$.

4. Diskussion

Dies ist die erste Arbeit, in welcher der Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern mittels verschiedener Methoden bei einer größeren Anzahl von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, sowie verschiedenen Kontrollkollektiven untersucht wurde.

4.1 Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern

4.1.1 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im ELISA

Es gelang für alle drei untersuchten Antikörperklassen (IgG, A und M) Anti-BSEP/ECL-1-Antikörper im ELISA nachzuweisen. Unter den cholestatischen Lebererkrankungen hatten PSC-Patienten positive IgG- und IgM-Antikörper, PBC-Patienten zeigten in allen drei Antikörperklassen positive Antikörperreaktivitäten. Patienten der nicht-cholestatischen Lebererkrankung AIH zeigten positive IgG- und IgM-Antikörpernachweise. Bei ALD-Patienten konnten für alle drei Antikörperklassen signifikante Antikörperreaktivitäten nachgewiesen werden. Das heterogene Kollektiv der Kinder vor LTx zeigte jeweils ein positives Ergebnis in den IgA- und IgM-Antikörperreaktivitäten. Jenes der Kinder nach LTx war in allen Antikörperklassen negativ. Für die untersuchten Kollagenosen konnten bei SLE- und PSS-Patienten Antikörper aller drei Klassen nachgewiesen werden. Auch für gesunde Kontrollen wurden positive IgA- und IgM-Ergebnisse erzielt. Damit konnten in fast allen untersuchten Kohorten Anti-ECL-1-Antikörper der Antikörperklassen IgG, A und M nachgewiesen werden. Der Nachweis von Anti-ECL-1-Antikörpern in Patientenseren mittels ELISA gelang bereits Kubitz et al. 2015 [100]. Die Bindungsstelle der Anti-BSEP-Antikörper wurde von Keitel et al. in der ECL-1 des BSEP-Proteins lokalisiert [86]. Stindt et al konnten bei sechs der sieben untersuchten AIBD PFIC2-Patienten IgG-Antikörper gegen die ECL-1 nachweisen [87]. Quintero et al. postulierten vier Jahre später, dass es je nach Paratop der Antikörper zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Klinik der AIBD-Patienten kommen könnte [97]. Der in dieser Arbeit durchgeführte ELISA wies durch die Verwendung der ECL-1 der BSEP als Antigen nur entsprechend konfigurierte Anti-BSEP-Antikörper nach. Dadurch konnten keine Antikörper gegen andere Epitope der BSEP nachgewiesen

werden, obwohl deren Existenz bekannt ist [87]. Die ECL-1 als einzige Bindungsstelle von Anti-BSEP-Antikörpern ist damit anzuzweifeln. Das als synthetisch hergestellte lineare Aminosäuresequenz verwendete Antigen gibt des Weiteren nicht den physiologischen Zustand der BSEP wieder. Die Verwendung synthetischer Antigene erlaubt es meist nicht, Antikörper nachzuweisen, die gegen konformationsspezifische Epitope gerichtet sind.

Anders als Keitel et al. und Stindt et al., welche nur IgG-Antikörper nachgewiesen haben [86, 87], konnten anhand dieser Versuche sowohl IgA- und IgM-Antikörper, als auch die bereits beschriebenen IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Das mittels ELISA erhobene Vorkommen von Anti-BSEP-Antikörpern bei den untersuchten Kohorten entsprach den Ergebnissen von Schiller [134].

Das Vorkommen der Anti-BSEP-Antikörper im ELISA deckte sich in den meisten Fällen mit dem typischen Auftreten von Hypergammaglobulinämien bei den untersuchten Erkrankungen. PSC-Patienten zeigen oft eine IgG- und eine IgM-Erhöhung [109] bei positiven IgG- und IgM-Antikörperreaktivitäten im ELISA. PBC-Patienten weisen typischerweise erhöhte IgM-Werte auf [109] und zeigten die Mehrzahl an positiven Antikörperreaktivitäten im ELISA für Antikörper der IgM-Klasse. Bei AIH-Patienten liegt typischerweise eine IgG-Hypergammaglobulinämie vor [116], was auch für den ELISA zutrifft. ALD-Patienten mit gewöhnlich erhöhten IgA-Spiegeln [141] zeigten im ELISA die höchste Anzahl an positiven Antikörperreaktivitäten in der IgA-Antikörperklasse. Diese Beobachtung konnte äquivalent bei den untersuchten Kollagenosen gemacht werden, für die eine Hypergammaglobulinämie ebenfalls typisch ist [142]. Patienten mit einem SLE oder PSS zeigten im ELISA die meisten positiven Antikörperreaktivitäten für Antikörper der IgG-Klasse. Für die Kinder vor und nach LTx konnten aufgrund ihrer heterogenen Krankheitsentitäten keine Vergleiche angestellt werden.

Das Auftreten von Anti-BSEP-Antikörpern gemäß dem typischen Hypergammaglobulinämien der jeweiligen Erkrankungen könnte durch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Antikörperbildung gegen Antigene allgemein für diese Antikörperklassen erklärt werden. Der Anteil der Antikörper mit zufällig passendem Epitop wäre hierbei erhöht. Nicht zu vergessen wäre in diesem Kontext das Auftreten von natürlich vorkommenden Autoantikörpern. So kann es

durchaus zur Bildung von Autoantikörpern kommen, ohne dass daraus eine pathophysiologische Konsequenz für den Gesamtorganismus entsteht [143].

4.1.2 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im Western Blot

Anti-BSEP-Antikörper konnten in den Seren aller untersuchten Krankheitsgruppen nachgewiesen werden. Dazu zählten Patienten mit den cholestatischen Lebererkrankungen PSC und PBC, den nicht-cholestatischen Lebererkrankungen AIH und ALD, sowie den Kollagenosen SLE und PSS und gesunden Kontrollen. Im Vergleich zur Arbeit von Schiller [134] wurde das Spektrum der Erkrankungen, bei denen Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen werden konnten, um die Lebererkrankungen PSC, AIH und ALD, die Kollagenosen SLE und PSS, sowie den Nachweis bei gesunden Kontrollen erweitert. Für die PBC konnte der Antikörpernachweis von Schiller bestätigt werden [134]. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen Methode finden sich in der Literatur unterschiedliche Methoden mit verschiedenen Antigenen und Verdünnungen. Sowohl Jara et al. als auch Lin et al. und Stindt et al. verwendeten BSEP-Sf9-Vesikel als Antigene, wobei Jara et al., sowie Lin et al. 30µg Vesikel und Stindt et al. 10µg Vesikel verwendeten [85, 87, 90]. Die Antigenmenge dieser Arbeit korrespondierte mit jener von Stindt et al. [87], wobei in dieser Arbeit eine geringere Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörpern verwendet wurde. Insgesamt nutzten die unterschiedlichen Studien verschiedene, stets höhergradige Verdünnungen als in dieser Arbeit [85-87, 90, 92]. Dies könnte zum Erfolg des Anti-BSEP-Antikörpernachweises in dieser Arbeit beigetragen haben. Keitel et al., Kubitz et al. und Stindt et al. verwendeten als Antigen Plasmazellisolate von transfizierten Zellen [86, 92, 99], womit der Vergleich zwischen den Methoden erschwert wird. Weiterhin verwendete die Mehrheit äquivalent zu dieser Arbeit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper [85-87, 92, 99], jedoch nicht alle [90, 95]. Die Verwendung von IgG- und IgM-Sekundärantikörpern wie in dieser Arbeit wurde nicht in der Literatur beschrieben, es wurde ausschließlich nach IgG-Antikörpern gesucht [86, 87, 90, 92, 95, 99].

Ein weiterer wichtiger Unterschied betrifft die Auswahl der Kontrollen. In der Literatur wurden mehrheitlich Kinder mit nachgewiesener PFIC2 gewählt, bei

denen keine AIBD vorlag [85, 87, 90]. Jara et al. untersuchten zusätzlich die Seren von Kindern mit Gallengangsatresie [85], Kubitz et al. eine nicht weiter erläuterte Kontrolle [92] und Prusinskas et al. gar keine Kontrollseren [95]. Mit Ausnahme von Keitel et al. verwendete keine Gruppe mehr als 5 Kontrollseren [85, 87, 90, 92]. Keitel et al. wiesen mit 28 Kontrollseren aus den Kohorten von AIH, PFIC2, PFIC3 und gesunden Kontrollen die am ausführlichsten untersuchten Kontrollen auf [86]. Damit wurden viele Patientengruppen dieser Arbeit erstmalig auf Anti-BSEP-Antikörper untersucht.

Zusammenfassend könnte die Verwendung von IgG- und IgM-Sekundärantikörpern, sowie die Erweiterung der Kontrollseren und -erkrankungen und eine geringere Verdünnung der Patientenseren zu einem gelungenen Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern beigetragen haben. Eine weitere Optimierung der Nachweismethodik könnte perspektivisch zu einem besseren und sensitiveren Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern führen.

4.1.3 Nachweis funktioneller Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assay

Im Rahmen dieser Arbeit konnten im funktionellen Assay Immunglobulinisolate von 29 Patienten als inhibitorisch wirksam auf die BSEP identifiziert werden, darunter von zehn an AIH-, fünf an PSC-, drei an PBC-, sechs an SLE- und fünf an PSS-Erkrankten. Des Weiteren wurden stimulierende Anti-BSEP-Antikörper bei drei PBC-Patienten, einem Kind vor, sowie zwei Kindern nach LTx, einer SLE- und einer PSS-Patientin, sowie zwei gesunden Kontrollen identifiziert.

Funktionelle Anti-BSEP-Antikörper wurden sowohl bei Patienten mit typischen Lebererkrankungen, als auch bei Kollagenosen und Gesunden ohne Leberpathologien, nachgewiesen. Funktionelle Anti-BSEP-Antikörper scheinen gelegentlich aufzutreten, ein Nachweis gelang in 30% der Fälle. Zwischen den verschiedenen Kohorten zeigten sich deutliche Häufigkeitsunterschiede, von sechs Prozent bei Kindern vor LTx und zwölf Prozent bei gesunden Kontrollen bis zu jedem zweiten untersuchten AIH-Serum. Weiterhin auffällig ist der Nachweis von funktionell unterschiedlich wirksamen Anti-BSEP-Antikörpern in verschiedenen Kohorten. So konnten für PSC- und AIH-Patienten nur inhibierende Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen werden, für Kinder vor und nach LTx und gesunde Kontrollen nur stimulierende Anti-BSEP-Antikörper. Nur bei PBC-Patienten konnten in gleichem

Maße stimulierende wie inhibierende Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten Patienten mit funktionell wirksamen Anti-BSEP-Antikörpern ein tendenziell höheres Alter als die übrige Studienpopulation. Weitere deutliche Zusammenhänge zu Geschlecht, Therapiezustand, klinischer Aktivität oder der Dauer der Erkrankung ließen sich nicht feststellen. Patienten mit inhibierenden Anti-BSEP-Antikörpern zeigten signifikante Unterschiede im Nachweis positiver ELISA-IgG- und -IgM-Antikörperreaktivitäten. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass die nachgewiesenen funktionellen Antikörper teilweise gegen die ECL-1 gerichtet sind und eher zu den Immunglobulinklassen IgG und IgM gehören.

Mit diesen Ergebnissen konnte die Funktionalität der Anti-BSEP-Antikörper auf die BSEP bestätigt werden, was zuvor bereits Jara et al., Kubitz et al. und Stindt et al., sowie Schiller nachweisen konnten [85, 87, 92, 134]. Das Spektrum der Erkrankungen mit Nachweis funktioneller Antikörper konnte von PFIC2-Patienten [85, 87, 92] und PSC-, PSS-Patienten und Kinder vor und nach LTx [134] um die Erkrankungen PBC, AIH, SLE und den Nachweis bei gesunden Kontrollen erweitert werden. Die Nachweise bei PSS-Patienten und Kindern vor und nach LTx konnten bestätigt werden. Als Novum zu den bereits beschriebenen Arbeiten, gelang es stimulierende Immunglobuline nachzuweisen. Genauere Zusammenhänge von funktionell wirksamen Anti-BSEP-Antikörpern und deren klinische Auswirkungen bleiben jedoch weiterhin unvollständig.

Methodisch orientierte sich diese Arbeit vor allem bezüglich der Verwendung von Einfrier-Auftau-Zyklen zur Penetration der Antikörper in die inside-out Vesikel und der restlichen Gestaltung des Versuches an den Arbeiten von Schiller, Kubitz et al. und Stindt et al., [87, 92, 134]. An der Versuchsdurchführung wurden einige Anpassungen vorgenommen, was bessere Ergebnisse bei weitergehender Optimierung der Versuche wahrscheinlich macht. Besonders zu beachten sei in diesem Zusammenhang die nachgewiesene Wirkungsabschwächung der Immunglobulinisolate bei mehrmaligen Einfrier-Auftau-Zyklen, weshalb diese unbedingt vermieden werden sollten. Der funktionelle Assay zeigte sich gut replizierbar mit guten Werten der Inter- und Intraassay-Variationskoeffizienten. Die reine Verwendung von IgG-Antikörpern wie sie bei Kubitz et al. und Stindt et

al. untersucht wurde [87, 92], fand bei dieser Arbeit nicht statt. Die Konzentration der Immunglobuline fiel höher aus als bei Schiller, jedoch nicht höher als in den Versuchen von Kubitz et al. und Stindt et al. [87, 92, 134]. Ein Vergleich der Antikörperkonzentration mit der Arbeit von Jara et al. fällt schwer, da diese Patientenseren anstatt isolierter Immunglobuline verwendeten [85]. Auch sonst zeigen sich deutliche Differenzen in der Methodik [85]. Die Verwendung von isolierten Immunglobulinen anstatt Patientenseren erscheint vorteilhafter, allerdings wurden beide mögliche Ansätze nicht vergleichend betrachtet. Ebenfalls wurde bisher äquivalent zur Literatur keine Kontrolle des funktionellen Assays mit Nicht-BSEP-Kontrollvesikeln und Patientenimmunglobulinen durchgeführt, um mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen. Dies wäre für weitere Arbeiten anzustreben.

Im Gegensatz zur Literatur wurde im Rahmen dieser Arbeit eine größere Anzahl an Nicht-AIBD-Patienten im funktionellen Assay untersucht. Bei Jara et al. kamen drei PFIC2-Seren ohne AIBD, sowie ein gepooltes Serum zweier Kinder mit Gallengangsatresie als Kontrollen zum Einsatz [85], Kubitz et al. verwendeten kein Kontrollimmunglobulin und Stindt et al. eine einzelne Kontrolle [87, 92]. Schiller untersuchte 30 Proben [134]. Die deutlich höhere Zahl von 128 untersuchten Nicht-AIBD-Immunglobulinen in dieser Arbeit erhöhte die Wahrscheinlichkeit, mögliche inhibitorische oder stimulierende Seren zu identifizieren.

4.2 Anti-BSEP-Antikörper in verschiedenen Nachweismethoden

Der Vergleich der verschiedenen Methoden zeigte Unterschiede im Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern und sich teilweise widersprechende Ergebnisse auf. Die Ergebnisse der drei verwendeten Methoden korrelierten nicht miteinander. Ein Zusammenhang konnte nur für inhibitorisch wirksame Anti-BSEP-Antikörper im funktionellen Assay und positive ELISA-IgG- und IgM-Antikörperreaktivitäten ausgemacht werden. Die Patientenzahlen je Methode zeigten große Unterschiede (ELISA >> funktioneller Assay > Western Blot), wodurch nur ein Teil der (positiven) Ergebnisse von ELISA und funktionellem Assay für die Korrelationsberechnungen verwendet werden konnten. Zusätzlich muss das

verwendete Antigen berücksichtigt werden (s. 4.1.1 Anti-BSEP-Antikörpernachweis im ELISA). Zusammenfassend gelingt mittels ELISA, Western Blot und funktionellem Assay durch die bestehenden methodischen Limitationen nur sehr eingeschränkt ein übereinstimmender Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern. Ein Anti-BSEP-Antikörpernachweis oder der Nachweis von Antikörpern gegen nicht notwendigerweise physiologisch vorkommende BSEP-Teilstücke muss nicht mit der Detektion von funktionell relevanten Antikörpern verbunden sein. Hierbei könnte das Vorkommen von funktionslosen Anti-BSEP-Antikörpern oder von Antikörpern gegen lineare, nicht physiologische Paratope der BSEP eine Rolle spielen. Der funktionelle Assay bildet somit nur einen Teil der Anti-BSEP-Antikörper ab. Durch die Verwendung von BSEP-exprimierenden Sf9-Insektenzellvesikeln ist ebenfalls nicht abschließend sicherzustellen, dass es sich um eine physiologische BSEP handelte. Entsprechende BSEP-Nachweise mittels tierischer Anti-BSEP-Antikörper legen dies allerdings nahe.

Ob ein Zusammenhang zwischen den funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern und der Pathogenese oder der klinischen Aktivität der Erkrankung besteht, ist weiterhin offen. In der Zusammenschau scheint eine Kombination von funktionellem Assay und IgG-/IgM-ELISA am ehesten für die Detektion von Anti-BSEP-Antikörpern geeignet.

4.3 Zusammenhang von Anti-BSEP-Antikörpernachweisen und klinischer Aktivität, Laborchemie und weiteren Parametern der untersuchten Patienten

Eine deutliche Korrelation der klinischen Aktivität der Patienten mit den Ergebnissen von ELISA und funktionellem Assay über die verschiedenen Erkrankungen und größere Patientenzahlen hinweg konnte nicht gezeigt werden. Dies könnte in den methodischen Einschränkungen des ELISA, sowie in den vergleichsweise geringeren Fallzahlen im funktionellen Assay begründet liegen. Über alle untersuchten Patienten hinweg zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den nach ihrer klinischen Aktivität getrennten Gruppen, was für einen allgemeinen Zusammenhang zwischen der klinischen Aktivität und dem Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern spricht. In der Literatur wurden bei AIBD-Patienten Zusammenhänge von klinischer Präsentation und Anti-BSEP-

Antikörpern beschrieben [85, 90, 92, 95], aber auch von Patienten berichtet, bei denen trotz Antikörpernachweis keine passende Klinik bestand [87, 92, 94, 96]. Die absolute Menge der Anti-BSEP-Antikörper, welche für Auswirkungen auf die klinische Aktivität der Patienten ursächlich ist, könnte hierbei eine Rolle spielen [144]. Für die Auswirkung einer adäquaten Therapie auf Anti-BSEP-Antikörper fehlte eine klare Korrelation, wenngleich für einzelne Kohorten und die Grundgesamtheit aller Patienten je nach Therapiezustand signifikante Unterschiede bestanden. Verläufe der ELISA-IgG-Antikörperreaktivitäten von AIH-Patienten zeigten einen signifikanten Abfall der IgG-Antikörperreaktivitäten über die Zeit hinweg. Alle involvierten AIH-Patienten befanden sich unter Therapie, womit ein Einfluss der Therapie auf die Anti-BSEP-IgG-Antikörperbildung bei diesen AIH-Patienten angenommen werden darf. Eine Therapie der Grunderkrankung könnte somit Einfluss auf das Auftreten von Anti-BSEP-Antikörpern haben. In der Literatur findet in der Mehrzahl eine Reduktion der Anti-BSEP-Antikörper unter Therapie statt [85, 90, 92, 93, 95], allerdings sind hierbei Limitationen wie das häufige Fehlen von Verlaufsbeobachtungen oder gezielten Anti-BSEP-Antikörpernachweisen zu beachten. Teilweise kam es trotz Therapie nicht zu einer Verringerung der Anti-BSEP-Titer [96, 97]. Die weiteren biografischen Merkmale wie Geschlecht und Erkrankungsdauer scheinen weniger relevant für die Ausbildung der Anti-BSEP-Antikörper zu sein. Patienten mit funktionell wirksamen Anti-BSEP-Antikörpern scheinen etwas älter als Patienten ohne funktionell wirksame Anti-BSEP-Antikörper zu sein. Vergleiche in der Literatur finden sich dazu nicht. Der höhere Frauenanteil erklärt sich über das häufigere Auftreten der meisten untersuchten Autoimmunerkrankungen bei Frauen [105, 115, 120, 123]. Auffälligkeiten der Leberwerte wie signifikante Unterschiede der ELISA IgG- und IgA-Antikörperreaktivitäten für Patienten mit pathologischer AST verglichen mit unauffälliger AST zeigten sich sonst unzusammenhängend unter den Kohorten. Vor allem AIH-Patienten zeigten hierbei eine Korrelation von Transaminasen und ELISA IgG- oder IgA-Antikörperreaktivitäten. Die Ursache könnte vielmehr an einer Hypergammaglobulinämie bei Krankheitsaktivität als in spezifischen Anti-BSEP-Antikörpern liegen. GGT-Werte sollten pathophysiologisch eine Erniedrigung

unter Einfluss von Anti-BSEP-Antikörpern aufweisen, da eine Inhibition der BSEP normalerweise nicht zu einem GGT-Anstieg führt [79]. Die PBC-Kohorte, sowie die Grundgesamtheit der Patienten zeigte jedoch signifikant erhöhte GGT-Werte für IgM- und IgA-Antikörperreaktivitäten im ELISA (letztere nicht bei PBC-Patienten). Dies lässt sich nicht über eine inhibitorische Funktion der Anti-BSEP-Antikörper erklären. In der Literatur sind Zusammenhänge von Anti-BSEP-Nachweis/ -Titer und Laborwerten kaum vorhanden. Jara et al., sowie Kubitz et al. konnten ein gemeinsames Absinken der Leberwerte und Anti-BSEP-Titer feststellen [85, 92]. Die Entzündungszeichen CRP und BSG zeigten in mehreren Kohorten, sowohl für ihre Antikörperreaktivitäten im ELISA als auch im funktionellen Assay Zusammenhänge. Es muss allerdings die geringere Verfügbarkeit des BSG-Werts bei Patienten beachtet werden, ebenso wie die bereits angeführten Zusammenhänge von Hypergammaglobulinämie und Krankheitsaktivität, welche selbst häufig mit erhöhten Entzündungswerten einhergehen. Zusammenfassend zeigt sich kein deutlicher Zusammenhang von Anti-BSEP-Antikörpernachweisen und Therapiezustand oder klinischer Präsentation der Patienten. Ein Zusammenhang von laborchemischen oder biografischen Merkmalen der Patienten ist teilweise vorhanden, scheint bis dato aber vernachlässigbar.

4.4 BSEP-Vesikel aus HepG2-, Huh7- und CaCo2- Zellen

Der Versuch inside-out Vesikel aus den HCC-Zelllinien HepG2 und Huh7, sowie aus der Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2 zu gewinnen, hatte das Ziel physiologischere Versuchsbedingungen als mittels BSEP-Vesikel aus Human-BSEP-exprimierenden Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* zu erhalten. Die BSEP konnte in den Plasmamembranen von HepG2- und Huh7-Zellen, nicht aber in CaCo2-Zellen nachgewiesen werden. In der Literatur werden Huh7-Zellen den humanen Hepatozyten ähnlicher als HepG2-Zellen beschrieben [145, 146], dennoch wurde nur in geringem Umfang BSEP nachgewiesen [145-148]. Der Nachweis von BSEP in Huh7-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Bei HepG2-Zellen scheint eine BSEP-Expression unüblich zu sein, in wissenschaftlichen Arbeiten findet sich i.d.R. kein BSEP-Nachweis [148,

149]. In einer Studie von Wisniewski et al. konnte BSEP in HepG2-Zellen nachgewiesen werden, allerdings in 100-fach geringerer Konzentration als in Hepatozyten [150]. Damit gelang in dieser Arbeit der seltene Nachweis der BSEP-Expression in HepG2-Zellen. Die BSEP wird nachgewiesenermaßen nicht in CaCo2-Zellen exprimiert [151], was im Western Blot dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Für alle BSEP-Nachweise aus Zellvesikeln ist anzumerken, dass der Nachweis nur im fluoreszenzmarkierten Western Blot gelang. Dies ist mit der verringerten Expression von BSEP in HepG2- und Huh7-Zellen in Einklang zu bringen. Der BSEP-Nachweis in dieser Arbeit gelang nicht nur mittels kommerziell erworbenem Anti-BSEP-Antikörper, sondern auch mit Anti-BSEP-Antikörpern aus PSC- und PBC-Patientenseren.

Die Isolation von inside-out Vesikeln aus Hepatozyten findet sich bereits in der Literatur [139]. Ob eine Isolation von inside-out Vesikeln in der hier vorliegenden Arbeit gelang, ließ sich nicht überprüfen. Zum einen ließen sich in der Gallensalzaufnahme des funktionellen Assays mit selbst hergestellten inside-out Vesikel nur für Huh7-Zellen eine größere Aufnahme als bei reinen Plasmamembranisolaten nachweisen, obwohl eine höhere Konzentration an inside-out Vesikel im Ansatz der Sepharose-behandelten Zellvesikel als in dem der Plasmamembranisolate zu finden sein sollte. Zum anderen finden sich nur geringe Differenzen in der Gallensalzaufnahme zwischen Plasmamembranisolaten und inside-out Vesikeln, welche sich teilweise im Bereich der Werte von den nicht-BSEP-Kontrollvesikeln und CsA-gehemmten BSEP-Vesikeln befanden. Für das Vorliegen von inside-out Vesikeln spricht, dass auch Gallensalzaufnahmeraten im Bereich der regulären BSEP-Vesikel erzielt wurden. Dies wäre durch das Auftragen auf eine Filtermembran und das gründliche Waschen beim Fehlen von inside-out schwierig zu erklären. Die Messergebnisse der selbsthergestellten inside-out Zellvesikel zeigten für alle Zelltypen eine klare Hemmbarkeit durch CsA, sowie für alle Zelltypen ein höheres Messergebnis unter AMP-Zugabe als unter ATP-Zugabe. Für die nicht-Sepharose-behandelten Plasmamembranisolate ist dieselbe Tendenz erkennbar, wenn auch nicht in allen Fällen. BSEP wird durch CsA inhibiert [46], eine stärkere Taurocholataufnahme unter AMP als ATP besteht allerdings nicht [20, 26, 28]. Ebenso wenig vereinbar

ist die Taurocholataufnahme von CaCo2-Zellvesikeln [151], welche im Western Blot nachweislich BSEP negativ waren. Mögliche Ursachen in der Methodik, wie ein mangelndes Herauswaschen des Taurocholats aus der Filtermembran, eine fehlende Gallensalzdepletion der Immunglobulinisolate [99] oder die schwankende Konzentration der Zellvesikel in den Ansätzen durch die Sepharose-Behandlung erklären nicht die deutlich erkennbaren Tendenzen von höheren AMP- als ATP-Werten bei allen drei Zelltypen. Somit käme theoretisch ein weiterer, in HepG2-, Huh7- und CaCo2-Zellen exprimierter und CsA-hemmbarer, nicht ATP-abhängiger Gallensalztransporter in Frage, da auch Mechanismen, die eine intakte Zelle benötigen, durch die stattgefundenen Plasmamembranisolation ausgeschlossen werden können. Eine genauere Betrachtung aller gallensalztransportierenden Proteine (NTCP, OST, MDR3, MDR4, ASBT und OATPs) zeigt für die Transporter MDR3 und MDR4 ATP-abhängige Transportmechanismen [152, 153]. NTCP und ASBT sind durch ihren Natrium-gekoppelten Transport indirekt ATP-abhängig, sowie zelleinwärts gerichtet [5], was sie ungeachtet ihres Vorkommens als mögliche Transporter unwahrscheinlich macht. Dagegen weisen manche OATP- und OST-Transporter einen bidirektionalen Gallensalztransport auf [147, 154]. Weder OST, welches mittels erleichterter Diffusion Gallensalze transportiert [5], noch OATP-Transporter, welche als Anionenaustauscher fungieren [155], zeigen als nicht-ATP-abhängige Transporter unter AMP eine höhere Gallensalzaufnahme als unter ATP [1, 5]. Um die genaue Ursache für die erhöhte Gallensalzaufnahme unter AMP-Gabe zu eruieren sind weitere Versuche notwendig. Eine Erhöhung der inside-out Vesikelkonzentration wäre für ein deutlicheres Messergebnis hilfreich. Auch das eingeschränkte Vorkommen der BSEP in HepG2- und Huh7-Zellen könnte sich in den schwachen und uneindeutigen Messergebnissen des funktionellen Assays niederschlagen. Die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme in der Eigenherstellung von inside-out Vesikeln, sowie die nur in geringen Mengen vorhandene BSEP in HepG2- und Huh7-Zellen legen nahe, warum von den meisten Arbeitsgruppen BSEP-transfizierte Zellen präferiert wurden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, würde seinerseits jedoch einen erfolgversprechenderen Ansatz zur Isolation von inside-

out Vesikeln liefern. Zusammenfassend gelang ein BSEP-Nachweis aus HepG2- und Huh7-Zellen im Western Blot mittels Antikörper und Patientenserum. Die Verwendung der inside-out Vesikel im funktionellen Assay warf dagegen weitere Fragen auf und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5 Bedeutung des Anti-BSEP-Antikörpernachweises und mögliche pathophysiologische Erklärungsansätze

Der mit verschiedenen Methoden realisierte Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, die im Rahmen dieser Arbeit und teilweise bereits in der Arbeit von Schiller identifiziert werden konnten, geht über das bisher bekannte und publizierte Wissen hinaus [134]. Damit stellen sich neue Fragen über das Vorkommen und die Bedeutung dieser Antikörper. Über die Pathogenese der Anti-BSEP-Antikörper kann an dieser Stelle nur gemutmaßt werden. Die typischen cholestatischen Lebererkrankungen PBC und PSC sind am leichtesten mit der cholestatischen Wirkung von inhibitorischen Anti-BSEP-Antikörpern vereinbar. Bei beiden Erkrankungen sind antikörperproduzierende kurzlebige Plasmablasten und langlebige Plasmazellen im Lebergewebe bekannt und eine Cholestase charakteristisch für diese Krankheitsbilder [156]. Gerade Plasmablasten in der Leber könnten den Hauptproduktionsort von Autoantikörpern darstellen [156]. Auch für die nicht cholestatische AIH sind intrahepatische Plasmazellen bekannt [157]. Cholestatische Zustände, vor allem bei der AIH Typ 1, sind bekannt [115]. Kollagenosen wie der SLE zeigen teilweise Beeinträchtigungen der Leber bei voranschreitender Krankheitsaktivität, die zu einer sog. „lupoiden Hepatitis“ führen können und auch Cholangitiden sind beschrieben [158]. Das PSS als zweite untersuchte Kollagenose weist häufiger Verbindungen mit Lebererkrankungen auf. So treten etwa eine PBC, AIH oder eine nichtalkoholische Fettleber durchaus als Begleiterkrankung zum PSS auf [125]. Umgekehrt weisen 18-36% der PBC-Patienten ein PSS auf [125]. Ein Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen, vor allem in der Pathogenese, in welcher beide als „Autoimmune Epitheliitis“ zusammengefasst werden können, erscheint wahrscheinlich [159]. Auch histologisch ähneln sich PSS und PBC sehr [158]. Der zu Anti-BSEP-Antikörpern führende

Pathomechanismus könnte daher bei beiden Erkrankungen derselbe sein. Verschiedene Erklärungsansätze für die Existenz von Autoantikörpern gegen die BSEP wurden diskutiert. Kubitz et al. erörterten einige Ansätze, wobei die fehlende Immuntoleranz eines Kindes mit PFIC2 als Hauptgrund genannt wird [100]. Siebold et al. wiesen jedoch darauf hin, dass es bisher noch unbekannt sei, ob eine Autotoleranz des Körpers gegenüber der BSEP bestünde [89]. Auch eine lebenslang wirksame Toleranzbildung durch eine BSEP-Präsentation in der Plazenta wäre denkbar [89], würde allerdings der Bildung von Anti-BSEP-Antikörpern generell widersprechen. Eine Ähnlichkeit mit anderen Strukturen kann als Ursache weitestgehend ausgeschlossen werden. Am ähnlichsten zur hochkonservierten Struktur der BSEP ist das MDR1, bekannt als P-Glykoprotein [30]. Anti-MDR1-Autoantikörper wurden bei AIH-Patienten und bei Patienten mit PSS nachgewiesen [160]. Diese sind allerdings selten und richten sich gegen eine Struktur des MDR1 [161], welche mit dem möglichen Paratop der Anti-BSEP-Antikörper, der ECL-1, und anderen Teilen der BSEP nur wenige Gemeinsamkeiten aufweist. Die Annahme einer fehlenden Toleranz gegenüber dem BSEP-Protein [89] bedarf dennoch eines Mechanismus wie ein Kontakt der BSEP mit Immunzellen ermöglicht wird. Möglich wäre der Untergang von Hepatozyten durch Abstoßung oder Infektion [86, 88]. Erkrankungen, die mit einem ungeordnetem Leberzelluntergang einhergehen, würden wahrscheinlicher zu einer Anti-BSEP-Antikörperbildung führen. Dies wäre auf Erkrankungen wie die PSC, PBC, AIH oder bei alkoholischen Leberschäden zutreffend. Auch bei Kollagenosen, welche häufig Autoantikörper gegen intrazelluläre Bestandteile ausbilden, spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle [162], jedoch nicht primär jene von Hepatozyten. Eine weitere Möglichkeit, vor allem bei Kollagenosen, wäre eine vermehrte Durchlässigkeit der Tight Junctions, welche den canaliculären Raum zum restlichen Leberparenchym abdichten. Eine vermehrte Durchlässigkeit der Tight Junctions konnte bei PSS-Patienten nachgewiesen werden und könnte zur Pathogenese beitragen [163, 164]. Es ist bekannt, dass diese durch Entzündungsfaktoren gefördert wird bzw. die Zellbarriere durch jene gestört ist [165, 166] und es zum Eindringen von Immunzellen in die zuvor abgedichteten Räume kommt [165]. Dies wurde

zunächst für das PSS bei Speicheldrüsen nachgewiesen und wäre im Sinne der Epitheliitis auch auf die Leber übertragbar. Kubitz et al. bedachten ebenfalls Tight Junctions als möglichen Zugangsweg der Anti-BSEP-Antikörper in den canaliculären Raum für den Fall der AIBD [100]. Dazu passend finden sich Störungen der Tight-Junction-Barriere bei der PSC und PBC [167, 168], wo sie als relevant für die Pathogenese eingestuft werden [167]. Eine weitere Beobachtung stellen Lipopolysaccharide (LPS) dar, welche durch Bakterien bei Infektionen in den Körper gelangen und zu einer gesteigerten interzellulären Permeabilität führen können [169]. Es gelang Chan et al. durch die Behandlung von Ratten, die einer 70-prozentigen Hepatektomie unterzogen wurden, mit LPS die Bildung von Anti-BSEP-Antikörpern zu induzieren [144]. Dies war für die untersuchten Kontrollgruppen nicht der Fall [144]. Gegebenenfalls muss Infektionen eine größere Bedeutung als bisher zugestanden werden. Vielleicht könnte die Ursache der Anti-BSEP-Antikörperbildung durchaus in einer verminderten Zellbarriere bei physiologisch fehlender Autotoleranz zu finden sein, allerdings sind andere Pathomechanismen auch nicht von der Hand zu weisen. Hierzu müssen weitere Studien Klarheit schaffen.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit gelang es, Anti-BSEP-Autoantikörper, welche bereits bei Patienten mit PFIC2 nach LTx beschrieben wurden [85-97] auch bei weiteren Erkrankungen, wie den cholestatischen Lebererkrankungen PSC und PBC, den nicht cholestatischen Lebererkrankungen AIH und ALD, bei Kindern vor und nach LTx, den Kollagenosen SLE und PSS, sowie bei Gesunden nachzuweisen. Damit konnte die Arbeit von Schiller [134] bestätigt und ergänzt werden. Im ELISA wurden mit Patientenseren Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen, die gegen lineare Epitope der ersten extrazellulären Domäne der BSEP gerichtet sind. Unter Verwendung von BSEP-haltigen Insektenzellvesikeln gelang der Nachweis von funktionellen Autoantikörpern, die den Gallesalztransport inhibieren oder stimulieren. Bei diesen funktionellen Anti-BSEP-Antikörpern kann von Antikörpern gegen die physiologische Struktur der BSEP ausgegangen werden. Diese konnten bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen

werden, wobei nicht nur Patienten mit Lebererkrankungen wie PSC, PBC und AIH, sowie Kindern vor LTx und nach LTx mit sehr heterogenen Krankheitsbildern, sondern auch Patienten mit Kollagenerkrankungen (SLE und PSS) und Gesunde betroffen waren. Ein eindeutiger Zusammenhang der Antikörper mit Klinik und Laborparametern konnte nicht aufgezeigt werden. Die pathogenetische Bedeutung dieser Antikörper ist weiterhin unklar, wie auch die Ursache ihrer Stimulation. Das simultane Vorkommen von Anti-BSEP-Antikörpern bei PSS und PBC könnte einen ähnlichen Pathomechanismus nahelegen. Auch die Relevanz der gefundenen Anti-BSEP-Antikörper bei den beschriebenen Erkrankungen sollte weiter untersucht werden. Studien am Beispiel der AIBD bei PFIC2 Patienten zeigen, welchen positiven Effekt eine Antikörperreduktion mittels Plasmapherese, Immunadsorption, IVIG oder Rituximab auf die Klinik der Patienten haben kann, wenn die Antikörper direkt an der Pathophysiologie der Erkrankung beteiligt sind [85, 88, 90-92, 94-97]. Für weitere Versuche wäre eine Adaptation der Methodik sinnvoll, so scheint der funktionelle Assay als Methode besser geeignet, um pathologische Anti-BSEP-Antikörper nachzuweisen, als der ELISA. Auch die Verwendung von inside-out Zellvesikeln aus HCC-Zelllinien könnte optimiert werden und dadurch eine physiologischere Testung auf Anti-BSEP-Antikörper ermöglichen.

Insgesamt bleiben Anti-BSEP-Antikörper aufgrund ihrer Funktionalität spannend für weitere Forschung, wobei auch der Zusammenhang zur klinischen Situation im Vordergrund stehen sollte.

5. Zusammenfassungen

5.1 Abstract

The Bile Salt Export Pump (BSEP) is the major hepatocyte protein for transportation of bile salts into bile. Anti-BSEP-antibodies have been first described in children suffering from Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 2 (PFIC2) due to a genetically determined defect in BSEP-expression after liver transplantation. Recently, these antibodies were also detected in patients with cholestatic liver diseases and further autoimmune diseases. In some instances, anti-BSEP-antibodies were shown to have a functional inhibitory effect. Further knowledge about their functionality and occurrence within different diseases is lacking.

Within this project sera of patients with several diseases were examined including cholestatic liver diseases as primary sclerosing cholangitis (PSC) and primary biliary cholangitis (PBC). Furthermore, patients with other liver diseases as autoimmune hepatitis (AIH) and alcoholic liver disease (ALD), and children before and after liver transplantation varying in pathogenesis, as well as patients with connective tissue diseases as systemic lupus erythematosus (SLE) and primary sjögren's syndrome (PSS) and healthy controls were tested.

For a quantitative antibody detection including the antibody classes IgG, A and M an ELISA was performed. The first extracellular loop of BSEP was used as antigen. By examining 429 sera, anti-BSEP-antibodies were detected within 14% of IgG-sera, 8% of IgA-sera and 6% of IgM-sera concerning all collectives except of sera of children after liver transplantation. Between the different collectives several statistically significant differences were shown. For instance, six of eight cohorts were significantly different to the healthy controls in their IgG-ELISA results. Follow-up samples of patients with AIH and PSS showed significant changes over time in their ELISA-IgG results (both $p=0,03$).

Western Blots using Sf9-BSEP-vesicles and plasma membrane isolates of human HCC-cellines Huh-7 and HepG2 as antigens were performed to search for anti-BSEP-antibodies including different epitopes. In 44% of 115 examined

sera antibodies were detected. This included all examined sera (no children sera were tested).

To examine the functionality of anti-BSEP-antibodies, a functional assay was performed. Inside-out Sf9-BSEP-vesicles, tritium-labelled Taurocholic acid and isolated immunoglobulins were used in an uptake assay. Of 128 tested patients, 29 had inhibitory and 10 stimulatory antibodies. There was no correlation to any patient laboratory value or any specific parameter except patient's age. Stimulatory antibodies were found in patients with PBC, SLE and PSS, as well as in children before and after liver transplantation and healthy controls. Inhibitory antibodies were found in patients with PSC, PBC, AIH, PSS and SLE.

Unfortunately, self-made inside-out vesicles isolated from HepG2- and Huh7-cells did not provide reliable data. Increasing BSEP-concentration using chenodesoxycholic acid did not improve these results.

No correlation was observed between the three different methods. A significant difference between functionally inhibitory sera and non-inhibitory sera was shown for their ELISA IgG and IgM results ($p \leq 0,001$). Furthermore, the statistical evaluation including clinical activity, as well as laboratory and other parameters only showed few significant findings without a consistent pattern.

In this thesis the presence of anti-BSEP-antibodies in non-PFIC2 patients as previously shown by Schiller was confirmed. Additionally, the spectrum of diseases analyzed for these antibodies as well as the methods used for their detection were extended. Moreover, not only inhibitory anti-BSEP-antibodies but also stimulating antibodies were detected.

Only little is known about these patients. Further research, especially about the clinically relevant impact of stimulating or inhibiting anti-BSEP-antibodies, needs to be conducted.

5.2 Zusammenfassung

Die Gallensalzexportpumpe (BSEP) ist als Hauptprotein für den Export von Gallensalzen aus Hepatozyten in die Galle verantwortlich. Bei Kindern mit einer Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase Typ 2 (PFIC2), bei denen die BSEP aufgrund eines genetischen Defekts fehlt, konnte in mehreren Fällen nach Lebertransplantation (LTx) ein Auftreten von Anti-BSEP-Antikörpern gezeigt werden. In einer neueren Arbeit konnten funktionell hemmende Anti-BSEP-Antikörper auch bei cholestatischen Lebererkrankungen und weiteren Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Genauere Untersuchungen zu deren Funktionalität und Vorkommen bei weiteren Kollektiven stehen noch aus.

In dieser Arbeit wurden die Seren von Patienten mit den cholestatischen Lebererkrankungen der primären cholestatischen Sklerose (PSC) und der primären biliären Cholestase (PBC), sowie von Patienten mit autoimmuner Hepatitis (AIH) und alkoholischer Lebererkrankung (ALD) untersucht. Zusätzlich wurden Seren von Kindern vor und nach LTx bei unterschiedlicher Pathogenese, Seren von Patienten mit Kollagenerkrankungen (systemischer Lupus Erythematodes (SLE), primäres Sjögren Syndrom (PSS)) und von gesunden Kontrollen analysiert. Es erfolgte ein ELISA mit der ersten extrazellulären Schleife der BSEP als Antigen zum quantitativen Anti-BSEP-Antikörper-Nachweis in den drei Antikörperklassen IgG, A und M. Bei 429 getesteten Seren gelang ein Antikörpernachweis in 14% der IgG-, 8% der IgA- und 6% der IgM-Seren über alle Kohorten, außer für Kinder nach LTx. Statistisch kam es häufig zu signifikanten Unterschieden zwischen den ELISA-Antikörperreaktivitäten der verschiedenen Kohorten, so zeigten 6 von 8 Patientenkohorten signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollen im IgG-ELISA. Für Patienten mit Serenverläufen ergaben sich für AIH-Patienten signifikante Veränderungen der Antikörperreaktivitäten zwischen Erstmessung und nach 8 Jahren, sowie für PSS-Patienten zwischen Erstmessung und nach 2 Jahren (beide $p=0,03$).

Um Anti-BSEP-Antikörper unabhängig vom Epitop darzustellen, wurde ein Western Blot unter Verwendung von Sf9-BSEP-Vesikeln und Plasmamembranisolaten der humanen HCC-Zelllinien Huh-7 und HepG2 als Antigen durchgeführt. Anti-BSEP-Antikörper konnten für 44% der 115 untersuchten

Seren nachgewiesen werden. Anti-BSEP-Antikörpernachweise gelangen für alle untersuchten Kollektive (ohne Kinder vor und nach LTx).

Um die Funktionalität der Antikörper auf die BSEP zu prüfen, wurde ein funktioneller Assay mit inside-out Sf9-BSEP-Vesikeln, Tritium-markiertem Taurocholat und Immunglobulinisolaten aus Patientenseren vorgenommen. Von 128 untersuchten Patienten hatten 29 inhibitorische und zehn Patienten stimulierende Anti-BSEP-Antikörper. Ein erkennbarer Zusammenhang mit der Klinik, Laborchemie oder weiteren Patientencharakteristika gelang nicht. Die funktionell inhibitorischen Antikörper konnten bei PSC-, PBC- und AIH-Seren, sowie bei SLE- und PSS-Seren nachgewiesen werden. Stimulierende Antikörper wurden bei PBC-, SLE- und PSS-Seren, sowie den Seren von Kindern vor und nach LTx und gesunden Probandinnen nachgewiesen.

Ein funktioneller Assay aus HepG2- und Huh7-Zellen hergestellten inside-out-Vesikeln gelang wahrscheinlich aufgrund der geringen BSEP-Dichte nicht. Auch eine Stimulation der BSEP in den untersuchten Zelllinien mittels Chenodesoxycholsäure erbrachte keine besseren Ergebnisse.

Die drei verwendeten Methoden zum Anti-BSEP-Nachweis ließen sich nicht miteinander korrelieren, allerdings zeigten funktionell inhibierende Seren signifikante Unterschiede zu nicht-inhibierenden Seren in ihren ELISA-IgG- und IgM-Antikörperreaktivitäten ($p \leq 0,001$). Die statistische Auswertung nach klinischer Aktivität, Laborchemie und weiteren Parametern zeigte nur isolierte Auffälligkeiten für einzelne Kohorten ohne erkennbares Muster.

Mit dieser Arbeit gelang es, sowohl das Vorkommen von Anti-BSEP-Antikörpern in Nicht-PFIC2-Kollektiven aus der Promotion von Schiller zu bestätigen, als auch den Antikörpernachweis in den o.g. Kollektiven und mittels der o.g. Methoden auszuweiten. Neben der Entdeckung von inhibitorischen Anti-BSEP-Antikörpern bei weiteren Kollektiven, konnten erstmals stimulierende Anti-BSEP-Antikörper nachgewiesen werden. Eingeschränkte Informationen über die auffälligen Patienten und der geringe Stichprobenumfang erschweren weitere Erkenntnisse. Weiterführende Forschung und die Frage nach einer klinisch relevanten Auswirkung von stimulierenden oder inhibierenden Anti-BSEP-Antikörpern bleiben weiter notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. Nicolaou, M., et al., *Canalicular ABC transporters and liver disease*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 300-15.
2. Reshetnyak, V.I., *Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(42): p. 7341-60.
3. Kusters, A. and S.J. Karpen, *Bile acid transporters in health and disease*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 1043-71.
4. Wong, M.H., et al., *Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1340-7.
5. Dawson, P.A., T. Lan, and A. Rao, *Bile acid transporters*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2340-57.
6. Ballatori, N., et al., *OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia*. Hepatology, 2005. **42**(6): p. 1270-9.
7. Agellon, L.B. and E.C. Torchia, *Intracellular transport of bile acids*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 198-209.
8. Russell, D.W., *Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism*. Cell, 1999. **97**(5): p. 539-42.
9. Russell, D.W. and K.D. Setchell, *Bile acid biosynthesis*. Biochemistry, 1992. **31**(20): p. 4737-49.
10. Byrne, J.A., et al., *The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1649-58.
11. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
12. Wang, H., et al., *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR*. Mol Cell, 1999. **3**(5): p. 543-53.
13. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
14. Nakano, A., P.S. Tietz, and N.F. LaRusso, *Circadian rhythms of biliary protein and lipid excretion in rats*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 1): p. G653-9.
15. Stieger, B., *The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation*. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): p. 205-59.
16. Akita, H., et al., *Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1511**(1): p. 7-16.
17. Lam, P., R. Wang, and V. Ling, *Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice*. Biochemistry, 2005. **44**(37): p. 12598-605.
18. Reichen, J. and G. Paumgartner, *Uptake of bile acids by perfused rat liver*. Am J Physiol, 1976. **231**(3): p. 734-42.

19. Suchy, F.J., C.J. Sippel, and M. Ananthanarayanan, *Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane*. *FASEB J*, 1997. **11**(4): p. 199-205.
20. Adachi, Y., et al., *ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles*. *Hepatology*, 1991. **14**(4 Pt 1): p. 655-9.
21. Strautnieks, S.S., et al., *A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Nat Genet*, 1998. **20**(3): p. 233-8.
22. Trauner, M. and J.L. Boyer, *Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(2): p. 633-71.
23. Gerloff, T., et al., *The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 10046-50.
24. Carlton, V.E., et al., *Complex inheritance of familial hypercholelanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT*. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 91-6.
25. Stieger, B., *Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis*. *Drug Metab Rev*, 2010. **42**(3): p. 437-45.
26. Müller, M., et al., *ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 110-kDa glycoprotein binding ATP and bile salt*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(28): p. 18920-6.
27. Nishida, T., et al., *Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(15): p. 6590-4.
28. Stieger, B., B. O'Neill, and P.J. Meier, *ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles*. *Biochem J*, 1992. **284** (Pt 1)(Pt 1): p. 67-74.
29. Childs, S., et al., *Identification of a sister gene to P-glycoprotein*. *Cancer Res*, 1995. **55**(10): p. 2029-34.
30. Sohail, M.I., et al., *The Bile Salt Export Pump: Molecular Structure, Study Models and Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inherited BSEP Deficiencies*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
31. Schmitt, L. and R. Tampé, *Structure and mechanism of ABC transporters*. *Curr Opin Struct Biol*, 2002. **12**(6): p. 754-60.
32. Soroka, C.J. and J.L. Boyer, *Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations*. *Mol Aspects Med*, 2014. **37**: p. 3-14.
33. Kipp, H., N. Pichetshote, and I.M. Arias, *Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(10): p. 7218-24.
34. Wakabayashi, Y., J. Lippincott-Schwartz, and I.M. Arias, *Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(7): p. 3485-96.
35. Lu, X., et al., *The Role of the Sodium-taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP) and Bile Salt Export Pump (BSEP) in Related Liver Disease*. *Curr Drug Metab*, 2019. **20**(5): p. 377-389.

36. Homolya, L., et al., *LKB1/AMPK and PKA control ABCB11 trafficking and polarization in hepatocytes*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91921.
37. Plass, J.R., et al., *Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 589-96.
38. Langmann, T., et al., *Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues*. Clin Chem, 2003. **49**(2): p. 230-8.
39. Ho, R.H., et al., *Polymorphic variants in the human bile salt export pump (BSEP; ABCB11): functional characterization and interindividual variability*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(1): p. 45-57.
40. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
41. Patel, P., et al., *Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta*. Placenta, 2003. **24**(1): p. 39-44.
42. Stieger, B., et al., *Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver*. Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 422-30.
43. Hayashi, H., et al., *Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and tauroolithocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1738**(1-3): p. 54-62.
44. Kenna, J.G., et al., *Can Bile Salt Export Pump Inhibition Testing in Drug Discovery and Development Reduce Liver Injury Risk? An International Transporter Consortium Perspective*. Clin Pharmacol Ther, 2018. **104**(5): p. 916-932.
45. Morgan, R.E., et al., *Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development*. Toxicol Sci, 2010. **118**(2): p. 485-500.
46. Suchy, F.J. and M. Ananthanarayanan, *Bile salt excretory pump: biology and pathobiology*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **43** Suppl 1: p. S10-6.
47. Horikawa, M., et al., *Potential cholestatic activity of various therapeutic agents assessed by bile canalicular membrane vesicles isolated from rats and humans*. Drug Metab Pharmacokinet, 2003. **18**(1): p. 16-22.
48. Stieger, B., et al., *Differential interaction of bile acids from patients with inborn errors of bile acid synthesis with hepatocellular bile acid transporters*. Eur J Biochem, 1997. **244**(1): p. 39-44.
49. Matsushima, S., et al., *Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1474-83.
50. Hirano, M., et al., *Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(2): p. 876-82.
51. Lecureur, V., et al., *Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(1): p. 24-35.

52. Cheng, X., D. Buckley, and C.D. Klaassen, *Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **74**(11): p. 1665-76.
53. Warskulat, U., et al., *Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes*. *Biol Chem*, 1999. **380**(11): p. 1273-9.
54. Deng, R., et al., *Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol induces the expression of the bile salt export pump through nuclear receptor farnesoid X receptor but not liver X receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **317**(1): p. 317-25.
55. Ananthanarayanan, M., et al., *Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 28857-65.
56. Krähenbühl, S., et al., *Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria*. *Hepatology*, 1994. **19**(2): p. 471-9.
57. Sokol, R.J., et al., *"Let there be bile"--understanding hepatic injury in cholestasis*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006. **43 Suppl 1**: p. S4-9.
58. Zollner, G., et al., *Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations*. *Mol Pharm*, 2006. **3**(3): p. 231-51.
59. AHRENS, E.H., R.C. HARRIS, and H.E. MACMAHON, *ATRESIA OF THE INTRAHEPATIC BILE DUCTS*. *Pediatrics*, 1951. **8**(5): p. 628-647.
60. Morotti, R.A., F.J. Suchy, and M.S. Magid, *Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type 1, 2, and 3: a review of the liver pathology findings*. *Semin Liver Dis*, 2011. **31**(1): p. 3-10.
61. Davit-Spraul, A., et al., *ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history*. *Hepatology*, 2010. **51**(5): p. 1645-55.
62. Baker, A., et al., *Systematic review of progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2019. **43**(1): p. 20-36.
63. Henkel, S.A., et al., *Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis*. *World J Hepatol*, 2019. **11**(5): p. 450-463.
64. Bull, L.N. and R.J. Thompson, *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*. *Clin Liver Dis*, 2018. **22**(4): p. 657-669.
65. Mehl, A., et al., *Liver transplantation and the management of progressive familial intrahepatic cholestasis in children*. *World J Transplant*, 2016. **6**(2): p. 278-90.
66. Paulusma, C.C., et al., *Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport*. *Hepatology*, 2006. **44**(1): p. 195-204.
67. Paulusma, C.C., et al., *Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(15): p. 9947-54.
68. Guyot, C. and B. Stieger, *Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains*. *J Hepatol*, 2011. **55**(6): p. 1368-76.

69. Amirneni, S., et al., *Molecular overview of progressive familial intrahepatic cholestasis*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(47): p. 7470-7484.
70. Verhulst, P.M., et al., *A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells*. Hepatology, 2010. **51**(6): p. 2049-60.
71. van der Mark, V.A., et al., *The lipid flippase heterodimer ATP8B1-CDC50A is essential for surface expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT) in intestinal Caco-2 cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(12 Pt A): p. 2378-86.
72. Jansen, P.L., et al., *Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1370-9.
73. van Mil, S.W., et al., *Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 379-84.
74. Dixon, P.H. and C. Williamson, *The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016. **40**(2): p. 141-53.
75. Pauli-Magnus, C., et al., *Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis*. J Hepatol, 2005. **43**(2): p. 342-57.
76. Kubitz, R., et al., *The bile salt export pump (BSEP) in health and disease*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(6): p. 536-53.
77. Knisely, A.S., et al., *Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 478-86.
78. Chen, H.L., et al., *FIC1 and BSEP defects in Taiwanese patients with chronic intrahepatic cholestasis with low gamma-glutamyltranspeptidase levels*. J Pediatr, 2002. **140**(1): p. 119-24.
79. Davit-Spraul, A., et al., *Progressive familial intrahepatic cholestasis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 1.
80. de Vree, J.M., et al., *Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 282-7.
81. Sambrotta, M. and R.J. Thompson, *Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease*. Tissue Barriers, 2015. **3**(3): p. e1026537.
82. Girard, M., et al., *MYO5B and bile salt export pump contribute to cholestatic liver disorder in microvillous inclusion disease*. Hepatology, 2014. **60**(1): p. 301-10.
83. Gonzales, E., et al., *MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease*. Hepatology, 2017. **65**(1): p. 164-173.
84. Sturm E, L.A., Drews D, et al. , *Case report: recurrence of progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) in a living related liver transplant*. AASLD Hepatol. **1995;22:207A**: p. 101.
85. Jara, P., et al., *Recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation*. N Engl J Med, 2009. **361**(14): p. 1359-67.

86. Keitel, V., et al., *De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 510-7.
87. Stindt, J., et al., *Bile salt export pump-reactive antibodies form a polyclonal, multi-inhibitory response in antibody-induced bile salt export pump deficiency*. Hepatology, 2016. **63**(2): p. 524-37.
88. Maggiore, G., et al., *Relapsing features of bile salt export pump deficiency after liver transplantation in two patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2*. J Hepatol, 2010. **53**(5): p. 981-6.
89. Siebold, L., et al., *Recurrent low gamma-glutamyl transpeptidase cholestasis following liver transplantation for bile salt export pump (BSEP) disease (posttransplant recurrent BSEP disease)*. Liver Transpl, 2010. **16**(7): p. 856-63.
90. Lin, H.C., et al., *Rituximab as therapy for the recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation*. Liver Transpl, 2013. **19**(12): p. 1403-10.
91. Grammatikopoulos, T., et al., *Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Functional Bile Salt Export Pump Deficiency After Liver Transplantation*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2015. **60**(6): p. e50-3.
92. Kubitz, R., et al., *High affinity anti-BSEP antibodies after liver transplantation for PFIC-2 - Successful treatment with immunoadsorption and B-cell depletion*. Pediatr Transplant, 2016. **20**(7): p. 987-993.
93. Masahata, K., et al., *Recurrence of Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 2 Phenotype After Living-donor Liver Transplantation: A Case Report*. Transplant Proc, 2016. **48**(9): p. 3156-3162.
94. Patel, K.R., et al., *Post-transplant Recurrent Bile Salt Export Pump Disease: A Form of Antibody-mediated Graft Dysfunction and Utilization of C4d*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2017. **65**(4): p. 364-369.
95. Prusinskas, B., et al., *Cholestasis After Pediatric Liver Transplantation-Recurrence of a Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Phenotype as a Rare Differential Diagnosis: A Case Report*. Transplant Proc, 2017. **49**(7): p. 1628-1633.
96. Krebs-Schmitt, D., et al., *Alloimmunity and Cholestasis After Liver Transplantation in Children With Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2019. **68**(2): p. 169-174.
97. Quintero, J., et al., *Successful Treatment with Rituximab and Immunoadsorption for an Auto-Antibody Induced Bile Salt Export Pump Deficiency in a Liver Transplanted Patient*. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2020. **23**(2): p. 174-179.
98. Wischlen, E., et al., *Iterative antibody-induced bile salt export pump deficiency after successive liver transplantations successfully treated with plasmapheresis and rituximab*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2023. **47**(6): p. 102139.
99. Stindt, J., et al., *Cell-based BSEP trans-inhibition: A novel, non-invasive test for diagnosis of antibody-induced BSEP deficiency*. JHEP Rep, 2023. **5**(7): p. 100690.

100. Kubitz, R., et al., *Autoimmune BSEP disease: disease recurrence after liver transplantation for progressive familial intrahepatic cholestasis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2015. **48**(2-3): p. 273-84.
101. Treon, S.P. and K.C. Anderson, *The use of rituximab in the treatment of malignant and nonmalignant plasma cell disorders*. Semin Oncol, 2000. **27**(6 Suppl 12): p. 79-85.
102. Stindt J, K.S., Dröge C, Keitel V, Engelmann G, Ganschow R, Knisely AS, Häussinger D, Kubitz R *Acquired BSEP disease due to post-LTX auto-reactive antibody development in PFIC-2 patients*. Hepatology, 2013. **58**(4):**119A**, Ref Type: Abstract(S1 AASLD Abstracts).
103. Brinkert, F., et al., *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation eliminates alloreactive inhibitory antibodies after liver transplantation for bile salt export pump deficiency*. J Hepatol, 2018. **69**(4): p. 961-965.
104. Telleman, P. and R.P. Junghans, *The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile*. Immunology, 2000. **100**(2): p. 245-51.
105. Sarcognato, S., et al., *Autoimmune biliary diseases: primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis*. Pathologica, 2021. **113**(3): p. 170-184.
106. Carey, E.J., A.H. Ali, and K.D. Lindor, *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2015. **386**(10003): p. 1565-75.
107. Zollner, G., et al., *Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2003. **38**(6): p. 717-27.
108. Telbisz, Á. and L. Homolya, *Recent advances in the exploration of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) function*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(4): p. 501-14.
109. Mago, S. and G.Y. Wu, *Primary Sclerosing Cholangitis and Primary Biliary Cirrhosis Overlap Syndrome: A Review*. J Clin Transl Hepatol, 2020. **8**(3): p. 336-346.
110. Hasegawa, S., et al., *Cholestatic Liver Disease: Current Treatment Strategies and New Therapeutic Agents*. Drugs, 2021. **81**(10): p. 1181-1192.
111. Rabiee, A. and M.G. Silveira, *Primary sclerosing cholangitis*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2021. **6**: p. 29.
112. Jiang, X. and T.H. Karlsen, *Genetics of primary sclerosing cholangitis and pathophysiological implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(5): p. 279-295.
113. Hirschfield, G.M., et al., *Primary sclerosing cholangitis*. Lancet, 2013. **382**(9904): p. 1587-99.
114. Bergquist, A., et al., *Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2002. **36**(3): p. 321-7.
115. Terziroli Beretta-Piccoli, B., G. Mieli-Vergani, and D. Vergani, *Autoimmune hepatitis*. Cell Mol Immunol, 2021: p. 1-19.
116. Covelli, C., et al., *Pathology of autoimmune hepatitis*. Pathologica, 2021. **113**(3): p. 185-193.

117. Terziroli Beretta-Piccoli, B., G. Mieli-Vergani, and D. Vergani, *The clinical usage and definition of autoantibodies in immune-mediated liver disease: A comprehensive overview*. J Autoimmun, 2018. **95**: p. 144-158.
118. Faust, T.W., *Recurrent primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis after transplantation*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(4): p. 481-95.
119. Richter, A., et al., *Clinical relevance of autoantibodies after pediatric liver transplantation*. Clin Transplant, 2007. **21**(3): p. 427-32.
120. Fava, A. and M. Petri, *Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management*. J Autoimmun, 2019. **96**: p. 1-13.
121. Pasoto, S.G., V. Adriano de Oliveira Martins, and E. Bonfa, *Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: links and risks*. Open Access Rheumatol, 2019. **11**: p. 33-45.
122. Aggarwal, A., *Role of autoantibody testing*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2014. **28**(6): p. 907-20.
123. Stefanski, A.L., et al., *The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome*. Dtsch Arztebl Int, 2017. **114**(20): p. 354-361.
124. Negrini, S., et al., *Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease*. Clin Exp Med, 2021.
125. Ebert, E.C., *Gastrointestinal and hepatic manifestations of Sjogren syndrome*. J Clin Gastroenterol, 2012. **46**(1): p. 25-30.
126. Patel, R. and A. Shahane, *The epidemiology of Sjögren's syndrome*. Clin Epidemiol, 2014. **6**: p. 247-55.
127. Nishishinya, M.B., et al., *Identification of lymphoma predictors in patients with primary Sjögren's syndrome: a systematic literature review and meta-analysis*. Rheumatol Int, 2015. **35**(1): p. 17-26.
128. Theander, E., et al., *Prediction of Sjögren's Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(9): p. 2427-36.
129. Westhoff, G. and A. Zink, *[Epidemiology of primary Sjörgren's syndrome]*. Z Rheumatol, 2010. **69**(1): p. 41-9.
130. Gougol, A., et al., *Alcoholic Hepatitis*. Clin Liver Dis (Hoboken), 2021. **18**(2): p. 90-95.
131. Poynard, T., et al., *A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases*. J Hepatol, 2003. **38**(3): p. 257-65.
132. Singh, S., N.A. Osna, and K.K. Kharbanda, *Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(36): p. 6549-6570.
133. Zollner, G., et al., *Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases*. Hepatology, 2001. **33**(3): p. 633-46.
134. Schiller, J., *Bedeutung von Autoantikörpern gegen die Gallensalzexportpumpe bei Patienten mit autoimmunen und anderen chronischen Lebererkrankungen*, in *Medizinische Fakultät*. 2021, Eberhard Karls Universität Tübingen: Tübingen.
135. Klein, R., et al., *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): p. 119-28.
136. Deng, R., et al., *The hypolipidemic agent guggulsterone regulates the expression of human bile salt export pump: dominance of transactivation over farnesoid X receptor-mediated antagonism*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(3): p. 1153-62.
 137. Henn, F.A., H.A. Hansson, and A. Hamberger, *Preparation of plasma membrane from isolated neurons*. *J Cell Biol*, 1972. **53**(3): p. 654-61.
 138. Kondo, T., G.L. Dale, and E. Beutler, *Simple and rapid purification of inside-out vesicles from human erythrocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **602**(1): p. 127-30.
 139. Ishikawa, T., et al., *ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(31): p. 19279-86.
 140. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 141. McFarlane, I.G., *Autoantibodies in alcoholic liver disease*. *Addict Biol*, 2000. **5**(2): p. 141-51.
 142. Ehrenstein, M.R. and D.A. Isenberg, *Hypergammaglobulinaemia and autoimmune rheumatic diseases*. *Ann Rheum Dis*, 1992. **51**(11): p. 1185-7.
 143. Lacroix-Desmazes, S., et al., *Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals*. *J Immunol Methods*, 1998. **216**(1-2): p. 117-37.
 144. Chan, K.M., et al., *De Novo Endotoxin-Induced Production of Antibodies against the Bile Salt Export Pump Associated with Bacterial Infection following Major Hepatectomy*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 6197152.
 145. Kang, H.E., et al., *Optimization of Canalicular ABC Transporter Function in HuH-7 Cells by Modification of Culture Conditions*. *Drug Metab Dispos*, 2019. **47**(10): p. 1222-1230.
 146. Guo, L., et al., *Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes*. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(3): p. 528-38.
 147. Malinen, M.M., et al., *Protein expression and function of organic anion transporters in short-term and long-term cultures of Huh7 human hepatoma cells*. *Eur J Pharm Sci*, 2019. **130**: p. 186-195.
 148. Chen, Y., et al., *Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2013. **57**(4): p. 1530-41.
 149. Lee, T.K., C.L. Hammond, and N. Ballatori, *Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. **174**(3): p. 207-15.
 150. Wiśniewski, J.R., et al., *In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes*. *J Proteomics*, 2016. **136**: p. 234-47.

151. Maubon, N., et al., *Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007. **21**(6): p. 659-63.
152. van der Blik, A.M., et al., *Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein*. *Gene*, 1988. **71**(2): p. 401-11.
153. Russel, F.G., J.B. Koenderink, and R. Masereeuw, *Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(4): p. 200-7.
154. Mahagita, C., et al., *Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G271-8.
155. Stieger, B. and B. Hagenbuch, *Organic anion-transporting polypeptides*. *Curr Top Membr*, 2014. **73**: p. 205-32.
156. Chung, B.K., et al., *Phenotyping and auto-antibody production by liver-infiltrating B cells in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cholangitis*. *J Autoimmun*, 2017. **77**: p. 45-54.
157. Cabibi, D., et al., *Intrahepatic IgG/IgM plasma cells ratio helps in classifying autoimmune liver diseases*. *Dig Liver Dis*, 2010. **42**(8): p. 585-92.
158. De Santis, M., C. Crotti, and C. Selmi, *Liver abnormalities in connective tissue diseases*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2013. **27**(4): p. 543-51.
159. Selmi, C., P.L. Meroni, and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis and Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis*. *J Autoimmun*, 2012. **39**(1-2): p. 34-42.
160. Shinoda, M., et al., *High levels of autoantibodies against drug-metabolizing enzymes in SLA/LP-positive AIH-1 sera*. *Autoimmunity*, 2004. **37**(6-7): p. 473-80.
161. Mizutani, T. and A. Hattori, *New horizon of MDR1 (P-glycoprotein) study*. *Drug Metab Rev*, 2005. **37**(3): p. 489-510.
162. Racanelli, V., et al., *Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role*. *Autoimmun Rev*, 2011. **10**(8): p. 503-8.
163. Sandhya, P., et al., *Update on Pathogenesis of Sjogren's Syndrome*. *Curr Rheumatol Rev*, 2017. **13**(1): p. 5-22.
164. Barrera, M.J., et al., *Sjögren's syndrome and the epithelial target: a comprehensive review*. *J Autoimmun*, 2013. **42**: p. 7-18.
165. Cong, X., et al., *Disruption of endothelial barrier function is linked with hyposecretion and lymphocytic infiltration in salivary glands of Sjögren's syndrome*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. **1864**(10): p. 3154-3163.
166. Ewert, P., et al., *Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjögren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(5): p. 1280-9.
167. Rao, R.K. and G. Samak, *Bile duct epithelial tight junctions and barrier function*. *Tissue Barriers*, 2013. **1**(4): p. e25718.

168. Sakisaka, S., et al., *Alterations in tight junctions differ between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. *Hepatology*, 2001. **33**(6): p. 1460-8.
169. Sheth, P., et al., *Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G308-18.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Immunpathologischen Labor der Inneren Medizin 2 des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Reinhild Klein durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Herrn J. Schiller und Frau Dr. B. Preuss) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 28.07.2023

8. Danksagung

Für diese Doktorarbeit zu forschen und diese Doktorarbeit zu schreiben war ein nicht unerheblicher Aufwand an Arbeit, Zeit und Kraft. Ohne die Hilfe und Unterstützung von Vielen wäre dies nicht möglich gewesen.

Allem Voran danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Reinhild Klein. Zum einen für dieses spannende Forschungsfeld für meine Promotion, welches mir eine sehr schöne und interessante Zeit im Labor beschert hat, zum anderen für Ihre hervorragende Betreuung und Ihr stets offenes Ohr für alle Fragen und Probleme dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Beate Preuß für Ihre unermüdliche und intensive Unterstützung bei dieser Arbeit danken, sowohl für Ihre geduldige Hilfe bei allen Labortätigkeiten als auch für die Unterstützung bei den Korrekturen der Verschriftlichung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt Johannes Schiller für seine freiwillige und ausführliche Einführung in die Thematik und Methodik, sowie für seine Hilfsbereitschaft, wann immer ich Fragen hatte.

Auch bedanken möchte ich mich für die Unterstützung und unzähligen beantworteten Fragen durch die Impala-Damen: Vielen Dank an Sandra, Silke, Tina, Ute, Susi, Elwira, Gülay und Maja. Mein Dank gilt ebenfalls Melek mit der ich gemeinsam meine Laborzeit verbringen durfte und dabei viel Freude bei der Laborarbeit hatte.

Weiterhin will ich mich auch beim Promotionskolleg Tübingen bedanken, die durch die Förderung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die nicht nur Verständnis für mich hatten, sondern mir auch hilfreich zur Seite gestanden sind. Ganz besonders bedanken will ich mich dabei bei meiner Mutter und Luise für Ihre vollumfassende und immerwährende Unterstützung und Motivation bei dieser Arbeit und darüber hinaus.