

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II, (Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie,
klinische Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Identifizierung neuer Antigen-/
Antikörpersysteme bei Patienten mit autoimmuner
Hepatitis**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Daniel Jörg Kitterer
Aus
Ostfildern

2011

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Klein
2. Berichterstatter:	Professor Dr. U. Lauer

Gewidmet

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Verzeichnis verwendeter Abkürzungen.....	7
1 Einleitung.....	1
1.1 Geschichtlicher Hintergrund.....	1
1.2 Klinik und Vorkommen.....	2
1.3 Pathogenese und Genetik.....	3
1.3.1 Untergang von Hepatozyten.....	3
1.3.2 Bildung von Autoantikörpern.....	4
1.3.3 Natürliche Killer Zellen.....	4
1.3.4 Phagozytose und Präsentation von Autoantigenen durch APC.....	5
1.3.5 Induktion einer Autoimmunreaktion durch Molecular Mimicry.....	5
1.3.6 MHC II Moleküle auf Hepatozyten bei Patienten mit AIH.....	6
1.3.7 Entstehung autoreaktiver T-Zellen.....	6
1.3.8 PD-1-Pathway und Entstehung von regulatorischen T-Zellen.....	7
1.4 Diagnosekriterien und Einteilung.....	8
1.5 Autoantikörper.....	11
1.5.1 Antinukleäre Antikörper (ANA).....	13
1.5.2 Antikörper gegen glatte Muskelzellen (SMA).....	13
1.5.3 Antikörper gegen Leber- Nieren- Mikrosomen (LKM).....	14
1.5.4 Antikörper gegen Leber- Pankreas Antigen/lösliches Leberantigen (Anti-LP/SLA).....	15
1.6 Therapie und Verlauf.....	16
1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	17
2 Probanden, Material und Methoden.....	18
2.1 Probanden.....	18
2.1.1 Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (AIH).....	18
2.1.2 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC).....	20
2.1.3 Kontrollgruppe gesunder Blutspender.....	20
2.2 Materialien.....	21
2.2.1 Labormaterialien und Geräte.....	21
2.2.2 Reagenzien:.....	23

2.2.3	Pufferansätze und andere selbst hergestellte Lösungen	24
2.3	Methoden	25
2.3.1	Antigengewinnung	25
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	27
2.3.3	Gelelektrophorese und Immunoblotting	28
2.3.4	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	29
2.3.5	Immunpräzipitation.....	30
2.3.6	Molekulargewichtsbestimmung.....	30
2.3.7	Antigenkonzentrierung, Antigenisolierung, Antigenaufarbeitung Antigenidentifizierung	31
2.3.8	Antigenanalyse	32
2.3.9	Computergestützte Auswertung der Western Blots	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Analyse von Seren von Patienten mit AIH III und Patienten mit hochgradigem Verdacht auf AIH im Westernblot unter Verwendung eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber	33
3.2	Aufreinigung und Spezifizierung der relevanten Antigene.....	34
3.3	Austestung von Patientenseren gegen die Gradientenfraktion 1.14 ..	40
3.4	Auswertung der Reaktionen im Westernblot	43
3.5	Analyse der Reaktionen gegen den 1.14 Gradienten im Westernblot bei verschiedenen Patientengruppen	46
3.6	Verlaufsuntersuchungen	51
3.7	Ergebnisse der Immunpräzipitation.....	52
3.8	Massenspektrometrische Untersuchungen der verschiedenen Antigendeterminanten.....	54
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	55
4	Diskussion.....	56
4.1	Diskussion der Methodik.....	56
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	57
4.2.1	Auswahl des Gradientenantigens	57
4.2.2	Häufigkeit der neuen Determinanten	58
4.2.3	Nachweis der 66 kDa Reaktion durch Immunpräzipitation.....	58

4.2.4	Massenspektrometrische Analyse	59
4.3	Vergleich der beobachteten Antikörperreaktionen mit bereits publizierten Daten	59
4.3.1	Asialoglycoproteinrezeptor Protein (ASGPR) als Bestandteil von LSP einer Membranfraktion der Leber	59
4.3.2	Autoantikörper gegen Membranfraktionen der Leber bei Patienten mit AIH Typ I	60
4.3.3	Autoantikörper gegen ein rekombinantes SLA-Protein (SLA-p35) 62	
4.3.4	Auftreten von neuen Banden im Western Blot von Anti-LP/SLA- Seren mit einem 100 000g Überstand der Rattenleber	62
4.4	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	65
5	Abbildungen und Tabellen.....	67
5.1	Abbildungen	67
5.2	Tabellen	70
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang.....	88
8.1	Danksagung.....	88
8.2	Lebenslauf	90

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

γ -GT Gamma - Glutaryltransferase

AIH Autoimmune Hepatitis

Ak Antikörper

AMA antimitochondriale Antikörper

ANA antinukleäre Antikörper

AP Alkalische Phosphatase

APC Antigenpräsentierende Zellen

ARA American Rheumatological Association

ATPase Adenosin-5'-triphosphat Synthase

BSA bovines Serumalbumin

Da Dalton

kDa Kilodalton

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

GOT Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT Glutamat-Pyruvat-Transaminase

HLA human leucocyte antigen

HPV Humanes Papillomavirus

HSV Herpes simplex Virus

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

kDa Kilodalton

LKM Liver-kidney microsomes

LP Leber Pankreas Antigen

MALDI-TOF Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

Mb Morbus

MHC major histocompatibility complex

NC Nitrocellulose

PBC primär-biliäre Zirrhose

PBS Phosphate buffered saline

PSC primär-sklerosierende Cholangitis

RA Rheumatoide Arthritis

RI Rattenleber

RT Raumtemperatur

SD Standardabweichung

SDS sodium dodecyl sulfate

SLA Soluble Liver Antigen

SN Supernatant (engl.: Überstand)

Tris Tris[hydroxymethyl]aminomethane

WB Westernblot

WP Waschpuffer

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

1950 beschrieb der schwedische Physiologe Jan Waldenström erstmals sechs Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung, die neben den Zeichen der Leberzirrhose eine Hypergammaglobulinämie aufwiesen¹⁵². Die Mehrzahl der Patienten waren Frauen mit einer Amenorrhoe. 1951 wurde die Hypergammaglobulinämie bei jungen Frauen mit einer chronischen Lebererkrankung unklarer Genese auch von Kunkel et al. beschrieben⁸². Vier Jahre später entdeckten Joske und King eine Lupus erythematoses Zellreaktion im Blut einer Patientin mit einer aktiven Hepatitis und einer Hypergammaglobulinämie⁷¹. Die Lupus Zellen, welche aus neutrophilen Granulozyten mit basophilen Einschlusskörperchen bestehen, wurden 1948 als Antigene einer Antigen/Antikörper-Reaktion bei Patienten mit Lupus erythematoses von Hargraves publiziert⁵⁵. 1956 wies I.R. Mackay⁹⁴ bei 6 Patienten mit chronischer, aktiver Hepatitis so genannte Lupus Zellen mit der clotted-blot Methode⁹⁵ nach. Ihm gelang dadurch erstmals der Nachweis von antinukleären Autoantikörpern bei Patienten mit einer autoimmunen Hepatitis. Mackay klassifizierte diese Form der autoimmunen Hepatitis daher als „lupoide Hepatitis“. Die Klassifikation wird heutzutage nicht mehr verwendet, da die AIH nicht Teil einer Organmanifestation des Lupus erythematodes ist und daher als AIH Typ I definiert wird⁷⁹. 1965 und 1966 gelangen Johnson et al. und Whittingham et al. der Nachweis von Autoantikörpern gegen glatte Muskulatur bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis^{68,156}. 1960 führte Page die immunsuppressive Therapie mit Steroiden, bei Patienten mit einer Form der chronisch aktiven Hepatitis und begleitender Hypergammaglobulinämie ein. Cooke et al. bzw. Murray-Lyon et al. bestätigten die Effektivität dieser Therapie bei der AIH 1971 bzw. 1973 in klinischen Studien mit Cortikosteroiden bzw. Cortikosteroiden und Azathioprin^{28,113,106}.

1973 beschrieben Rizetto et al. mikrosomale Antikörper bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis, welche als „liver kidney microsomes“ (LKM)

Antikörper klassifiziert wurden und eine neue Subgruppe der AIH definierten¹²⁰. Fast zehn Jahre später wurden von Berg et al. bei Patienten mit Hypergammaglobulinämie und chronisch aktiver Hepatitis komplementbindende, Leber-Pankreas spezifische Antikörper nachgewiesen¹⁴. 1987 beschrieben Manns et al. bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis, bei denen sich keine antinukleären Antikörper bzw. Anti-liver-kidney-microsome (LKM) Antikörper nachweisen ließen, das Vorkommen von Antikörpern gegen ein lösliches Leberantigen (SLA)⁹⁶. Im Jahre 1993 beschrieben Stechemesser et al. ebenfalls eine Gruppe von Patienten mit AIH bei denen keine ANA bzw. LKM Antikörper nachweisbar waren sondern lediglich Anti-LP-Antikörper¹²⁸. Sieben Jahre später konnten Wies et al. zeigen, dass die Anti-LP bzw. Anti-SLA Autoantikörper gegen das gleiche Antigen gerichtet sind. Der Gruppe gelang die Klonierung des entsprechenden Proteins¹⁵⁷. Die Antikörper wurden als LP/SLA Autoantikörper zusammengefasst. Durch Strassburg und Manns wurde im Jahr 2002 schließlich vorgeschlagen, Patienten bei denen Autoantikörper gegen LP/SLA, jedoch keine Antikörper gegen ANA, SMA bzw. Aktin oder LKM vorkommen, als autoimmune Hepatitis Typ III zu klassifizieren¹³¹. Diese Klassifikation ist jedoch weltweit noch nicht anerkannt, da argumentiert wird, dass sich die AIH Typ I klinisch nicht von der AIH Typ III unterscheidet⁸.

1.2 Klinik und Vorkommen

Die Autoimmune Hepatitis ist eine chronische Erkrankung⁴³, die weltweit verbreitet ist und durch zunehmende Entzündung des Lebergewebes mit fortschreitender Leberzellnekrose gekennzeichnet ist. Normalerweise geht die Entzündungsreaktion mit einer Fibrose einher, welche bis zur Leberzirrhose und schlussendlich zum Leberversagen führt. Wenn die diagnostischen Kriterien⁴ der Autoimmunen Hepatitis erfüllt sind, geht diese Art der chronischen Hepatitis mit einer Sechs-Monate Sterblichkeit größer als 40 % einher¹²⁷, wenn nicht frühzeitig eine adäquate Therapie eingeleitet wird. Das Vorkommen von extrahepatischen Symptomen^{53,59,108} wie einer Autoimmunthyreoiditis, einer rheumatoiden Arthritis und eines Diabetes Mellitus Typ-I, sowie das Vorkommen von Autoantikörpern zusammen mit einer

Hypergammaglobulinämie^{82,152} und das Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie¹¹³ unterstützen die Hypothese eines autoimmunen Prozesses bei der Pathogenese der Erkrankung. Die Krankheit kommt gehäuft bei Frauen vor⁷⁰ und ist immunophänotypisch mit dem gehäuften Vorkommen der Allele HLA A1-B8-DR3 und DR4 assoziiert⁴⁹.

Klinisch kann sich die Erkrankung sehr variabel manifestieren. Selten stellt sich die AIH als akute Hepatitis dar¹⁰⁸. Meist jedoch geht sie mit unspezifischen Zeichen einer chronischen Lebererkrankung einher⁴³. Ein unspezifisches Frühsymptom ist häufig die Müdigkeit. Meist verläuft die Erkrankung schubweise und bei anikterischen Verläufen wird sie oft erst bei Spätsymptomen der Leberzirrhose, wie portokavalen Anastomosen, Aszites und Enzephalopathie klinisch auffällig. Histologisch kommen gehäuft lymphozytäre, plasmazelluläre Infiltrate in Periportalfeldern, sowie piecemeal Nekrosen vor^{4,69}.

Die AIH kommt mit einer Häufigkeit zwischen 0,1 und 1,9 Fällen pro 100 000 Einwohner in Westeuropa und Nordamerika in der weißen Bevölkerung vor. In Japan ist die Prävalenz mit 0,08 bis 0,015 pro 100 000 pro Jahr deutlich geringer^{17,109}.

In Relation zu allen chronischen Lebererkrankungen der weißen Bevölkerung in Westeuropa und Nordamerika hat die AIH einen Anteil von ca. 20 %. In Brasilien ist der Anteil mit 5 % bis 10 % nur halb so groß²³. Eine mögliche Ursache könnte das unterschiedliche Auftreten von HLA-Allelen darstellen. Wie eingangs beschrieben kommen in Europa und Nordamerika gehäuft die Allele HLA-DR3 und DR4 vor, in Südamerika kommt dagegen das HLA-Allel DR13 häufiger vor⁴⁰.

1.3 Pathogenese und Genetik

1.3.1 Untergang von Hepatozyten

Die Autoimmune Hepatitis ist eine Erkrankung, die durch die Zerstörung von Leberzellen durch autoreaktive, CD8 positive, zytotoxische T-Zellen (Tc) gekennzeichnet ist¹⁵⁴.

Die Zerstörung von Hepatozyten stellt dabei einen zentralen Schritt der immunologischen Reaktion gegen die Leber dar ¹⁴⁵. Durch den Zelluntergang werden inflammatorische Prozesse wie die Fibrosierung der Leber mit Ausbildung einer Zirrhose, sowie immunologische Epiphänomene ausgelöst.

1.3.2 Bildung von Autoantikörpern

Neben zytotoxischen T-Zellen sind Autoantikörper nachweisbar, die gegen leberspezifische Proteine gerichtet sind ^{67,93,100}. Darüber hinaus treten Autoantikörper auf, die nicht leberspezifisch sind, aber mit dem klinischen Bild einer autoimmunen Hepatitis assoziiert sind ^{39, 14,86,120}.

Vergani et al. konnten 1987 zeigen, dass Immunglobuline auf der Oberfläche von Hepatozyten mit dem Untergang von Leberzellen assoziiert sind ¹⁴⁶. Das Vorkommen von Autoantikörpern ist außer im Falle der Anti-LP/SLA Antikörper jedoch weder krankheitsspezifisch, noch konnte bisher gezeigt werden, dass Autoantikörper bereits vor Zerstörung der Hepatozyten gebildet werden. Die Autoantikörper sind daher eher als Epiphänomene des Zellunterganges zu betrachten.

1.3.3 Natürliche Killer Zellen

Eine Ursache für die Zerstörung von Leberzellen mit Freiwerden von autologen Proteinen könnten auch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass in einem Mausmodell für AIH (Concanavalin A induzierte Hepatitis ¹³⁶, natürliche Killerzellen durch Interleukin 4 (IL4) aktiviert werden und vermehrt Granzym B und Fas-Ligand exprimiert wird ^{72,135}.

Der Fas-Ligand interagiert mit dem Fas-Rezeptor, einem Mitglied der TNF-alpha Rezeptor Familie. Durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors kann Apoptose induziert werden ¹⁴². Durch eine gestörte Apoptose z.B. aufgrund von inhibierten Caspasen ^{11,116} kann eine sekundäre Nekrose ausgelöst werden, bei der autologe intrazelluläre Proteine frei werden. Diese Proteine können durch die Granzym-B-Protease der NK-Zellen fragmentiert werden ²⁴. Die Fragmentierung körpereigener, intrazellulärer Proteine, kann somit zu Bildung von Autoantigenen führen, die durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) phagozytiert werden ^{123,124}.

1.3.4 Phagozytose und Präsentation von Autoantigenen durch APC

Die Antigene werden dabei wie infektiöse Epitope behandelt^{3,65}. Normalerweise unterliegen die präsentierten Antigene der MHC-II-Restriktion und aktivieren somit keine passenden zirkulierenden T-Zellen. Existieren jedoch autoreaktive T-Zellen, die durch noch unbekannte Faktoren spezifisch für Leber Autoantigene sind und somit nicht der Selbsttoleranz unterliegen^{90,105,125}, kommt es zur Aktivierung von CD4 positiven T-Helferzellen mit Induktion der TH1 oder TH2 Antwort³⁴.

Bei einer nicht überschießenden Immunreaktion ist beim Kontakt der APC mit einer spezifischen, autoreaktiven T-Zelle ein zweites Signal als so genannter kostimulierender Faktor (B7-CD28) notwendig¹²⁶. Beim Fehlen des B7-CD28 Signals führt der Kontakt zwischen APC und T-Zelle zu einer Inaktivierung der autoreaktiven T-Zelle. Somit führt die Präsentation autologer Epitope zu einer peripheren Toleranz autoreaktiver T-Zellen. Dieser Schutzmechanismus kann aber durch bestimmte Ereignisse, die mit einer Hochregulation des Immunsystems einhergehen (Viren, Medikamente, Toxine), durch Überexpression von kostimulierenden Faktoren und Adhäsionsmolekülen aufgehoben werden³⁴. Somit können autoaggressive Mechanismen mit Bildung von zytotoxischen autoreaktiven T-Zellen entstehen^{92,103}.

Im Jahr 2008 ist es der Arbeitsgruppe Mix et al. gelungen, LP/SLA-Epitope von CD4 positiven T-Zellen zu identifizieren. Sie immunisierten dazu transgene Mäuse mit dem HLA Haplotyp DRB1-0301 mit LP/SLA Proteinen. Die identifizierten Epitope lagen dabei in der Nachbarschaft der von humanen Autoantikörpern erkannten Epitope. Es konnte also gezeigt werden, dass durch den Kontakt des Immunsystems mit dem LP/SLA-Antigen CD4 positive, spezifische T-Zellen entstehen können¹⁰³.

1.3.5 Induktion einer Autoimmunreaktion durch Molecular Mimicry

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion autoimmuner Prozesse ist die Hypothese des „Molecular Mimicry“. Man geht dabei davon aus, dass verschiedene infektiöse Antigene Epitope besitzen, welche eine Sequenzhomologie mit

autologen Peptiden besitzen. Durch die Ähnlichkeit körperfremder Epitope mit autologen Peptiden kann die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen durchbrochen werden^{2,22,122}.

Im Jahre 2002 konnte gezeigt werden, dass bei Proteinen des Herpes simplex Virus 6 (HSV6) und des humanen Papillomavirus (HPV) und dem LP/SLA Antigen Homologien vorkommen⁵⁷. Die entsprechenden Peptide wurden jedoch nicht durch Autoantikörper von AIH positiven Seren erkannt. Eine weitere Homologie konnten Herkel et al. zwischen Peptiden des Bakteriums *Methanococcus jannaschii* und dem LP/SLA Antigen nachweisen. Die Peptide konnten jedoch nur sehr schwache Reaktionen im Western Blot hervorrufen⁵⁷. Für die AIH Typ II konnten jedoch Kreuzreaktionen zwischen dem LKM1 Zielantigen CYP2D₆₁₉₃₋₂₁₂ und dem HCV₂₉₈₅₋₂₉₉₀ Antigen nachgewiesen werden, was stark für ein Molecular Mimicry bei Patienten mit AIH Typ II spricht^{75,144}.

1.3.6 MHC II Moleküle auf Hepatozyten bei Patienten mit AIH

Hepatozyten von Patienten mit AIH exprimieren im Gegensatz zu Hepatozyten gesunder neben HLA Klasse I Molekülen (HLA I) auch HLA Klasse II (HLA II) Moleküle⁹¹. Es könnte sich dabei um eine weitere Möglichkeit handeln, mit der die periphere Selbsttoleranz durch Umgehung des typischen APC, MHC-Klasse-II-Weges durchbrochen wird²⁶.

1.3.7 Entstehung autoreaktiver T-Zellen

Die Ursachen zur Entstehung von autoreaktiven T-Zellen^{90,105,125} werden kontrovers diskutiert. In erster Linie sollen genetische Polymorphismen in Allelen wie dem HLA Molekül, dem T-Zellrezeptor (TCR) sowie der „B and T lymphocyte attenuator“ (BTLA/CD272) Region verantwortlich sein. BTLA vermittelt ein inhibierendes Signal während der T-Zell-Aktivierung bei sowohl primär CD4 positiven T-Zellen als auch bei sekundär CD4 positiven bzw. CD8 positiven T-Zellen. Somit wird der BTLA vermittelten Inaktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Selbsttoleranz zugeschrieben^{111,112}.

Genetische Polymorphismen im TCR können autoreaktive T-Zellen bilden, welche MHC II unabhängig mit leberspezifischen Proteinen reagieren und so zu einer MHC unabhängigen Zytotoxizität führen ¹⁵⁵. Patienten in Europa und Nordamerika mit den Haplotypen HLA DR3 und DR4 haben ein höheres Risiko an einer AIH Typ I zu erkranken, als Patienten mit anderen HLA-Subtypen. Bei Patienten mit AIH Typ II prädisponiert der Haplotyp HLA DR3 und DR7 ^{40, 47,49}. Die genetischen Polymorphismen im MHC-Komplex, welche durch Austausch einzelner Aminosäuren phänotypisch werden, können dazu führen, dass sich die dreidimensionale Struktur des Moleküls verändert. Die Konformationsänderung hat Auswirkungen auf den antigenbildenden Charakter des MHC-Komplex und die Interaktion mit dem TCR ⁴⁸.

1.3.8 PD-1-Pathway und Entstehung von regulatorischen T-Zellen

In einer Studie von Kido et al konnte 2008 erstmals ein Mausmodell etabliert werden, in dem eine AIH spontan, d.h. ohne den Einsatz z.B. von ConA entstand ¹³⁶. Dies gelang durch den Einsatz von thymektomierten PD-1(-/-) Knock out Mäusen ⁷⁶. Das „programmed cell death 1“ (PD-1,CD279) Gen ist Mitglied der Immunglobulin Gen Familie ⁶⁶ und codiert ein Transmembranprotein ¹. Das Transmembranprotein kommt sowohl auf B-Zellen, als auch auf T-Zellen vor ¹. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des entsprechenden Liganden Apoptose auslösen kann. Der PD-1 induzierten Apoptose wird dabei eine regulatorische Rolle bei der Entstehung autoreaktiver B- und T-Zellen zugeschrieben. Es gibt Hinweise darauf, dass Polymorphismen im PD-1-Gen mit der Entstehung von klassischen autoimmunen Erkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes, dem Diabetes mellitus Typ-1, der rheumatoiden Arthritis und dem Sjögren Syndrom assoziiert sind ^{80,87,107,110,117,147}.

Durch die Entfernung des Thymus und das Fehlen des PD-1 Gens entwickelten die Mäuse im Gegensatz zu den nur thymektomierten bzw. den Mäusen mit Thymus aber ohne PD-1 Gen einen Verlust an regulatorischen T-Zellen (CD4 pos. CD25 pos. T-Zellen). Dadurch entwickelte sich eine ANA positive Hepatitis mit einer Infiltration der Leber durch CD4/CD8 positive T-Zellen und lobulärer Nekrose ⁷⁶.

Fehlerhafte Apoptose autoreaktiver T-Zellen durch Polymorphismen im PD-1-Gen, kann somit auch bei der AIH einen Schritt in Richtung Autoimmunität darstellen⁷⁶.

1.4 Diagnosekriterien und Einteilung

Autoimmune Erkrankungen der Leber stellen eine heterogene Gruppe dar, die durch entzündliche Infiltration von Lebergewebe bzw. Gallengangsepithel gekennzeichnet sind. Die Entzündungsreaktion beruht - wie im oberen Abschnitt dargestellt - auf einem Verlust der Selbsttoleranz und ist durch die Abwesenheit von infektiösen Erregern gekennzeichnet. Die AIH muss sowohl von den viralen Hepatitiden, als auch von anderen autoimmunen Lebererkrankungen wie der primär-biliären Zirrhose (PBC) und der primär-sklerosierenden Cholangitis (PSC) abgegrenzt werden.

Die Erkrankungen unterscheiden sich nicht nur in ihrem klinischen Bild, sondern auch hinsichtlich des diagnostischen Vorgehens, der Behandlung und der Prognose. Darüber hinaus gibt es Unterschiede in der Assoziation mit weiteren immunologischen Erkrankungen und Symptomen, sowie der Häufigkeit des Vorkommens von Malignomen.

Die PBC ist eine Erkrankung der Gallenwege mit Cholestase. Es sind überwiegend Frauen betroffen⁷⁷ und die Erkrankung ist durch spezifische antimitochondriale Antikörper (AMA) definiert¹⁵³. Die Assoziation mit extrahepatischen immunologischen Erkrankungen ist hoch und die Erkrankung spricht nur schlecht auf immunsuppressive Therapie an^{56,88}. Ursodesoxycholsäure führt zu biochemischer Remission und zur Verbesserung klinischer Symptome. Ob ein Einfluss auf die Prognose oder die Histologie besteht ist noch unklar^{5,89,115}.

Die PSC betrifft überwiegend jüngere Männer²¹ und ist in 75 % der Fälle mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert²⁰. Es kommen keine spezifischen Autoantikörper vor⁶³. Die Diagnose wird durch den Nachweis perlschnurartiger Veränderungen der Gallengänge in der Cholangiographie^{6,25} und/oder Veränderungen der kleinen Gallengänge in der Leberhistologie^{7,15} gestellt. In ca. 15 % der Fälle kommt ein cholangiozelluläres Karzinom vor^{51,138},

seltener - meist in Begleitung einer Colitis ulcerosa -, ein kolorektales Karzinom²⁰.

Die immunsuppressive Therapie ist ebenso ineffektiv wie bei der PBC³⁰. Da die AIH im Gegensatz dazu durch ein sehr gutes Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie gekennzeichnet ist^{28,106,113} und nur die LP/SLA Autoantikörper der AIH Typ III krankheitsspezifisch sind⁷³, muss die Diagnose nach Ausschluss anderer chronischer Lebererkrankungen erfolgen. Umso wichtiger ist die Abgrenzung von den viralen Hepatitiden, toxischen Lebererkrankungen (Alkohol, Medikamente, chemische Noxen) und hereditären Erkrankungen (Morbus Wilson, Hämochromatose, Alpha-1-Anti-Trypsinmangel). Da es sich bei der AIH um eine schwierig zu diagnostizierende Erkrankung handelt (vorkommen typischer Autoantikörper, jedoch keine typische Histologie¹⁰, wurden 1992 von internationalen Experten, der internationalen AIH Gruppe (IAIHG) in Brighton (Großbritannien) Diagnosekriterien festgelegt. Basierend auf diesen diagnostischen Kriterien wurde ein Score gebildet, welcher 1999 von der IAIHG überarbeitet wurde⁴. Dieser Diagnose Score ist in Tabelle 1 dargestellt. Eine weitere diagnostische Herausforderung neben der Diagnose einer AIH ist die Diagnostik der so genannten Überlappungssyndrome. Beim Vorkommen von AIH-typischen Autoantikörpermustern und dem Nachweis von AMA, oder einer Hypergammaglobulinämie in Kombination mit AMA muss an ein AIH/PBC-Overlap-Syndrom gedacht werden^{33,130}. Werden AIH-typische Autoantikörperprofile in Kombination mit erhöhten Cholestasemarkern bzw. perlschnurartigen Veränderungen der Gallengänge in der Cholangiographie nachgewiesen, muss an ein AIH/PSC-Overlap-Syndrom, welches häufiger bei Kindern vorkommt, gedacht werden^{46,54,74,143,158}.

Die Sensitivität des Scores zur Diagnosestellung beläuft sich auf 97,3% - 100%. Die Spezifität liegt bei Patienten mit einer Hepatitis C Infektion, bei denen zusätzlich autoimmune Symptome vorkommen, zwischen 66,1 % und 92,0 %. Dahingegen liegt die Spezifität zur Abgrenzung gegen PBC und PSC nur bei 44,8 % bis 64,9 %^{4,16,18,31,44,104,139}.

<i>Parameter</i>	<i>Score</i>	<i>Parameter</i>	<i>Score</i>
Geschlecht		Medikamentenanamnese	
<i>Weiblich</i>	+2	<i>Positiv</i>	-4
<i>Männlich</i>	0	<i>Negativ</i>	+1
Biochemische Parameter		Alkoholkonsum (Mittelwert)	
<i>Alkalische Phosphatase / Aminotransferase</i>		< 25 g/Tag	+2
< 1,5	+2	> 60 g/Tag	-2
1,5 – 3,0	0	Vorliegen anderer	+2
> 3,0	-2	Autoimmunerkrankungen	
Immunglobuline, γ -Globuline oder IgG (Vielfaches des oberen Normwertes)		Leberhistologie	
> 2	+3	«interface» Hepatitis	+3
1,5 – 2,0	+2	überwiegend Lymphozyteninfiltrate	+1
1,0 – 1,5	+1	rosettierende Leberzellen	+1
< 1,0	0	keines der oben genannten Zeichen	-5
Autoantikörper (Titer im Immunfluoreszenztest an Gewebeschnitten) ANA, SMA oder LKM-1		Gallengangsveränderungen	-1
> 1:80		Andere Veränderungen	-1
1:80	+2	Zusätzliche Parameter	
1:40	+1	Seropositivität für andere definierte Autoantikörper	+2
< 1:40	0	HLA-DR3 oder DR4	+1
Antimitochondriale Antikörper		Therapieresponse	
<i>Positiv</i>	-4	Vollständig	+2
Virusmarker		Rezidiv nach Therapie und Remission	+3
<i>Positiv</i>	-3		
<i>Negativ</i>	+3		

Tab. 1.1: Score der „International Autoimmunen Hepatitis Group“ von 1999
(⁴) Darstellung der diagnostischen Kriterien mit den entsprechenden Bewertungsfaktoren. Nach Erhebung der Befunde erfolgt eine Addition der Parameterpunktwerte.

Interpretation AIH Score:

Vor Behandlung: > 15: sichere AIH 10–15: mögliche AIH

Nach Behandlung: > 17: sichere AIH 12–17: mögliche AIH

1.5 Autoantikörper

Autoantikörper spielen bei der Diagnostik der AIH eine übergeordnete Rolle. Beim Nachweis von typischen Autoantikörpern in Kombination mit einer Hypergammaglobulinämie, sowie dem Ausschluss infektiöser Ursachen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Vorliegen einer AIH ausgegangen werden. Als typische Autoantikörper für die AIH gelten Antikörper gegen Kerne (ANA), glatte Muskulatur (smooth muscle antibodies, SMA) und Leber-Nieren-Mikrosomen (liver/kidney microsomal antibodies, LKM) (Tabelle 1.2.).

Tab. 1.2: Einteilung der AIH in drei durch den Nachweis von Autoantikörpern definierten Subtypen ¹³².

AIH Typ	Häufigkeit	Diagnostischer Marker	Ziel Autoantigen	Erste Publikation
AIH I Lupoide Hepatitis	60 %	SMA, ANA	F-actin, Nucleoprotein	1950 Waldenström et al. 1951 Kunkel et al. 1956 Mackay et al.
AIH II LKM + Hepatitis	10 %	Anti LKM-1	Cytochrome P450IID6	1973 Rizetto et al.
AIH III LP/SLA + Hepatitis	30 %	Anti – LP/SLA		1981 Berg et al. 1987 Manns et al.

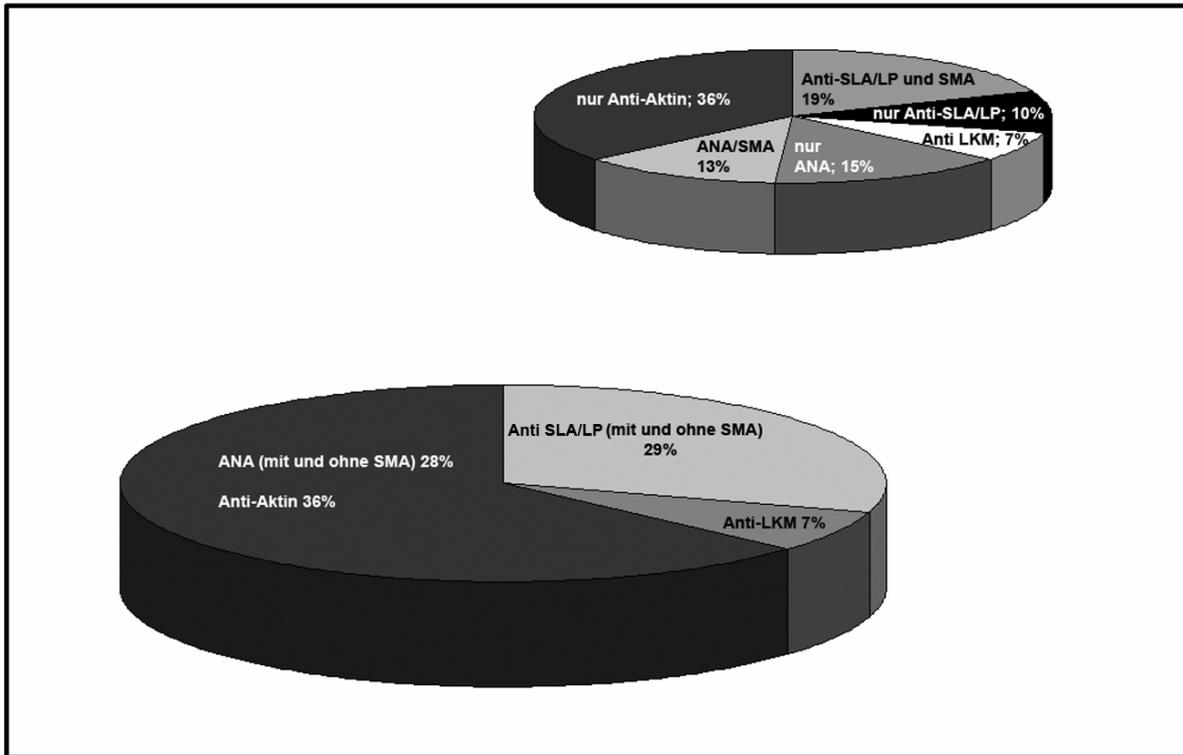


Abb. 1.1: Einteilung der AIH in drei Subgruppen und Häufigkeiten der typischen Autoantikörper. Nach Klein 1998⁷⁹, Stechemesser 1993¹²⁸.

Neben den typischen Autoantikörpern gibt es weniger häufige Antikörper, die zusätzlich bestimmt werden können. Dies sind Antikörper gegen ein zytosolisches Antigen (liver specific cytosolic antigen, Anti-LC-1)⁹⁸ und Autoantikörper gegen ein Leberspezifisches Protein (LSP), sowie Antikörper gegen den Asialoglycoproteinrezeptor (ASGP-R)^{67,99,101}. Diese Autoantikörper spielen jedoch in der Diagnostik der AIH eine untergeordnete Rolle.

1.5.1 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Die Antinukleären Antikörper kommen bei der AIH Typ I gehäuft vor und werden in Kombination mit den SMA Antikörpern mit Aktin-Spezifität zur Diagnose derselben verwendet. ANA sind nicht krankheitsspezifisch und kommen bei einer Reihe weiterer Autoimmunerkrankungen vor. Die Autoantikörper sind gegen Bestandteile des Zellkerns, der Kernmembran oder bestimmter Teile der DNA gerichtet^{37,39,129}.

Sie kommen ebenfalls beim Lupus erythematodes (LE), bei der progressiven Sklerodermie (PS), dem CREST-Syndrom (Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Ösophagusbeteiligung, Sklerodermie und Teleangiektasien) vor. Darüber hinaus kann man sie auch bei den weiteren autoimmunen Lebererkrankungen PBC und PSC nachweisen.

ANA treten auch bei 30 % der gesunden Frauen und bei 10 % der gesunden Männer auf. Sie können familiär gehäuft auftreten und kommen medikamenten- bzw. alkohol-induziert vor.^{27,52}

Die ANA werden bei den autoimmunen Lebererkrankungen durch den Immunfluoreszenztest an Rattenlebergewebe oder HepG2 Zellen nachgewiesen³⁹. Es wurde bisher noch kein leberspezifisches nukleäres Zielantigen der Antinukleären Autoantikörper entdeckt^{39,38,69,129}.

1.5.2 Antikörper gegen glatte Muskelzellen (SMA)

Anti-SMA-Antikörper mit Anti-Aktin Spezifität kommen zusammen mit den ANA gehäuft bei Patienten mit AIH Typ I vor^{45,83,86}. SMA mit Spezifität gegen weitere Cytoskelettbestandteile wie Tubulin, Vimentin, Desmin, Skeletin aber auch gegen Aktin treten bei Erkrankungen wie der Myasthenia gravis oder chronischen Virushepatitiden auf^{45,156,140}. SMA sind damit nicht spezifisch für die AIH, aber das Auftreten zusammen mit den ANA Antikörpern stellt einen wichtigen Schritt zur Diagnose der AIH Typ I dar⁴. Der Nachweis von SMA erfolgt ebenfalls durch einen indirekten Immunfluoreszenztest an Rattenmagengewebe.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen der SMA Antikörper mit den Haplotypen HLA-A1-B8-DR3 assoziiert sind. Diese Patienten sind jünger bei Erstmanifestation der Erkrankung und haben eine schlechtere Prognose³⁵.

Bei knapp der Hälfte der AIH Typ I Patienten aus Europa bzw. Nordamerika kommen SMA-Antikörper zusammen mit ANA Antikörpern vor. In ca. 35 % der Fälle treten sie isoliert auf und in ca. 15 % der Fälle treten nur ANA Antikörper auf³⁹. Die Antikörpertiter sinken unter immunsuppressiver Therapie, was aber keine direkte prognostische Relevanz hat³².

1.5.3 Antikörper gegen Leber- Nieren- Mikrosomen (LKM)

1973 wurden von Rizzetto et al. mikrosomale Antikörper bei Patienten mit chronischer aktiver Hepatitis nachgewiesen¹²⁰. Die Autoantikörper wurden als LKM-1-Antikörper klassifiziert und definieren die zweite Subgruppe der AIH⁶¹. Das Zielantigen der Autoantikörper ist das Cytochrom P450 2D6 (CYP 2D6)¹⁵⁹. Die Autoantikörper gegen CYP 2D6 reagieren im Westernblot als 50 kDa Determinante, verschiedene lineare Epitope konnten dabei identifiziert werden. Bei der chronischen Hepatitis C kommen ebenfalls Anti-LKM Antikörper vor, die jedoch mit anderen immundominanten Regionen reagieren als Seren von Patienten mit AIH II^{78,132,159}. In der Tabelle 1.3 sind die entsprechenden LKM-Autoantikörper mit ihren dazugehörigen immundominanten Epitopen aufgeführt. Die AIH Typ II manifestiert sich vor allem bei jungen Frauen und Kindern. Ihr klinischer Verlauf ist meist progredienter als der einer AIH Typ I oder Typ III⁵³. In Nordamerika kommt die AIH Typ II sehr selten vor, im Gegensatz dazu hat sie in Nordeuropa einen Anteil von ca. 10 % an den autoimmunen Hepatitiden

^{32,36}

Tab. 1.3: Darstellung der verschiedenen Anti-LKM-Autoantikörper (nach Berg, P. A. & Klein, R., Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis, 2002,¹³).

Subtypen	Zielantigen	Diagnostische Relevanz
Anti-LKM1	Cytochrom P450IID6: lineare Epitope 256–269, 196–218 [Klein R 1999, Yamamoto 1993,]	AIH Typ II
Anti-LKM2	Cytochrom P450IIC9 [Homburg 1984]	Tienilinsäure-induzierte Hepatitis
Anti-LKM3	Uridindiphosphat-Glucuronosyl-Transferase (UGT-1) [Strassburg 1996]	Hepatitis D
Anti-LKMx	Cytochrom P450IID6 (konformations-spezifisches Epitop) [Klein R 1999, Yamamoto 1993]	Hepatitis C

1.5.4 Antikörper gegen Leber- Pankreas Antigen/lösliches Leberantigen (Anti-LP/SLA)

Autoantikörper gegen Leber-Pankreas-Gewebe (LP) bei Patienten mit Hypergammaglobulinämie und chronisch aktiver Hepatitis wurden, wie eingangs dargestellt, 1981 von Berg et al. nachgewiesen¹⁴. Sie reagieren im Westernblot mit einem Zytoplasmaextrakt aus Rattenleber mit zwei Determinanten bei 52 und 48 kDa. Sechs Jahre später wurden von Manns et al. bei ANA negativer/Anit-LKM negativer AIH Antikörper gegen lösliches Leberantigen (SLA) beschrieben⁹⁶. Im Jahre 2000 stellte sich heraus, dass beide Autoantikörper gegen das gleiche Zielantigen gerichtet sind und somit die gleiche Subgruppe von Patienten mit AIH definieren¹⁵⁷. Die Anti-LP/SLA-Antikörper kommen mit einer Häufigkeit von bis zu 30 % bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis vor. In ca. 10 % Fälle treten die Anti-LP/SLA-Antikörper isoliert auf^{29,128,157}. Die Anti-LP/SLA Antikörper sind als hochspezifisch für eine AIH anzusehen^{8,128}. Durch ihren Nachweis kann aus wissenschaftlicher Sicht

eine dritte Subgruppe die AIH Typ III definiert werden. Inwieweit sich die AIH Typ III von der AIH Typ I klinisch unterscheidet ist bisher noch nicht abschließend geklärt ⁷³.

Das Zielantigen von Anti-LP/SLA ist das UGA-suppressor transfer RNA (tRNA)-associated protein (tRNP(Ser)Sec) Protein, welches an der posttranslationalen Modifikation von Selenozystein beteiligt zu sein scheint ^{29,58,157}. Untersuchungen mit einem rekombinanten UGA-suppressor transfer RNA (tRNA)-associated protein/LP/SLA-Antigen haben jedoch auch eine Reaktion bei Patienten mit chronischer Hepatitis C gezeigt ¹⁴⁸.

1.6 Therapie und Verlauf

Die Autoimmune Hepatitis ist eine Erkrankung, die immunsuppressiv behandelt wird. Die Prognose ist umso besser je früher, das heißt vor dem Zirrhosestadium der Leber, behandelt wird. Durch die Unterdrückung des Immunsystems mit Substanzen wie Prednisolon und Azathioprin kann die entzündliche Infiltration der Leber zurückgedrängt werden ^{28,97,113,106}. Die Autoantikörperprofile im Serum können sich normalisieren, was jedoch nicht immer mit der Krankheitsaktivität korrelieren muss ⁹⁷. Patienten mit histologisch nachgewiesener Leberzirrhose sprechen ebenso gut auf die immunsuppressive Therapie an wie Patienten ohne initiale Leberzirrhose ¹²¹.

Wenn die AIH früh genug durch ein entsprechendes Autoantikörperscreening erkannt wird und die Therapie früh eingeleitet wird, kann die Progression der Leberfibrose bis hin zur Zirrhose aufgehalten werden. Die Zehn-Jahresüberlebensrate liegt bei mehr als 90 % ⁴². Selten kann es bei der AIH notwendig sein, eine Lebertransplantation in Betracht zu ziehen. Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt dabei die letzte therapeutische Möglichkeit bei Zirrhose bedingten Komplikationen dar ^{81,137}.

Die Langzeitergebnisse von transplantierten AIH-Patienten sind mit einer Fünf-Jahresüberlebensrate von 92% gut. Ein Rezidiv nach Transplantation tritt in bis zu 35 % der Fälle auf ¹⁴⁹.

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Immunpathologische Labor der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum Tübingen ist eines von drei Laboratorien in Deutschland, die auf die Diagnostik autoimmuner Lebererkrankungen spezialisiert sind. Es werden jedes Jahr eine große Anzahl an Patientenseren auf die diagnostisch relevanten Autoantikörper, die bei der AIH vorkommen untersucht. Bei der Testung von Patientenseren gegen einen 100 000g Überstand der Rattenleber im Westernblot auf Anti-LP/SLA-Antikörper fielen in den letzten 10 Jahren verschiedene Reaktionsmuster auf, die sich nicht den bekannten Banden bei 52 kDa und 48 kDa zuordnen ließen¹²⁸. In dieser Arbeit wurden 130 Seren, die mit atypischen Mustern reagierten, ausgewählt. Die Patientenseren wurden erneut im Western Blot gegen einen 100 000g Überstand der Rattenleber ausgetestet. Ziel war es, bestimmte, sich wiederholende Determinanten zu identifizieren, die Reaktionsmuster zu klassifizieren und eine möglichst reine Antigenfraktion zu isolieren. Mit Hilfe der aufgereinigten Antigenfraktion sollte das entsprechende Zielantigen der beobachteten Autoantikörper isoliert werden.

2 Probanden, Material und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (AIH)

Patienten mit unterschiedlichen Formen einer AIH wurden analysiert: Die erste Gruppe bildeten Patienten mit klinisch, histologisch und serologisch gesicherter AIH Typ III (Anti-LP/SLA 52 kDa positiv; Gruppe A, n=11).

Die meisten der untersuchten Patienten wurden gemäß dem „International scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis“⁴ als definitive AIH eingestuft. Die Fälle, in denen keine Histologie durchgeführt worden war, wurden aufgrund der übrigen Datenlage bei entsprechender Klinik als „hochgradig wahrscheinlich für eine AIH“ eingestuft. Die zweite Gruppe (Gruppe B, n=27) bestand aus Patienten mit klinisch/histologisch hochgradigem Verdacht auf AIH (Erhöhung von IgG-Globulinen, Ausschluss viraler und toxischer Ursachen, erhöhte Transaminasen [GPT > 20 U/l, GOT > 20 U/l]), aber keinem eindeutigen Nachweis von Autoantikörpern (ANA, Anti-Aktin, Anti-LKM oder Anti-LP/SLA sowie antimitochondrialen Autoantikörpern). Geschlecht, Alter und - Laborwerte sind in Tabelle 2.1 bis 2.4 dargestellt.

Tab. 2.1: Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe A (n=11). (AIH Typ III)

	Anzahl	Mittleres Alter (In Jahren)	Bereich (Jahre)
Gesamt	11	54,82	35-75
Frauen	8	55,4	35-75
Männer	3	51,0	41-64

Tab. 2.2: Laborparameter bei Patienten der Gruppe A (n=11).

	AP (IU)	γ -GT (IU)	GOT (IU)	GPT (IU)	Bilirubin (mg%)
Mittelwert	234,60	149,60	79,60	100,40	1,45
SD	196,75	175,89	80,82	101,49	1,44
Median	166,00	123,00	55,00	85,00	1,00

Tab. 2.3: Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe B (n=27).

	Anzahl	Mittleres Alter (In Jahren)	Bereich (Jahre)
Gesamt	27	45,89	6-82
Frauen	23	42,32	6-82
Männer	4	41,50	30-66

Tab. 2.4: Laborparameter bei Patienten der Gruppe B (n=27).

	AP (IU)	γ -GT (IU)	GOT (IU)	GPT (IU)	Bilirubin (mg%)
Mittelwert	168,54	299,19	77,27	93,21	1,86
SD	71,59	731,58	92,67	93,71	1,73
Median	176,00	121,00	39,00	67,00	1,30

Ferner wurden Seren von 58 Patienten mit gesicherter autoimmuner Hepatitis Typ I (ANA, SMA/Anti-Aktin, und erhöhten IgG Immunglobulinen) analysiert (Gruppe C). Geschlecht, Alter und - Laborwerte sind in Tabelle 2.5 und 2.6 dargestellt.

Tab. 2.5: Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe C (n=58) (Patienten mit AIH Typ I).

	Anzahl	Mittleres Alter (In Jahren)	Bereich (Jahre)
Gesamt	58	50,67	7-83
Frauen	42	50,81	7-83
Männer	16	50,31	22-76

Tab. 2.6: Laborparameter bei Patienten der Gruppe C (n=58).

	AP (IU)	γ -GT (IU)	GOT (IU)	GPT (IU)	Bilirubin (mg%)
Mittelwert	213,74	263,54	347,88	440,88	2,64
SD	146,35	223,81	298,42	417,18	2,69
Median	169,00	236,00	241,00	256,00	1,55

2.1.2 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC)

Als Kontrollgruppe zu den AIH-Patienten wurden Seren von sechs Patienten mit klinisch, histologisch und serologisch (AMA/anti-M2 positiv) gesicherter PBC getestet. Geschlecht und Alter sind in Tabelle 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7: Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe mit PBC.

	Anzahl	Mittleres Alter (In Jahren)	Bereich (Jahre)
Gesamt	6	47,17	30-61
Frauen	4	48	38-57
Männer	2	45,5	30-61

2.1.3 Kontrollgruppe gesunder Blutspender

Als Kontrollgruppe dienen Seren von gesunden Blutspendern. Die Alters- und Geschlechtsverteilung ist in Tabelle 2.8 beschrieben.

Tab. 2.8: Alters- und Geschlechtsverteilung einer gesunden Kontrollgruppe (n=35).

	Anzahl	Mittleres Alter (In Jahren)	Bereich (Jahre)
Gesamt	35	43,26	22-56
Frauen	21	42,19	22-56
Männer	14	44,86	28-56

2.2 Materialien

2.2.1 Labormaterialien und Geräte

2.2.1.1 Materialien

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

Reaktionsgefäße ohne Deckel 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Super Frost Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Test tubes 14/100	Greiner-Bio one GmbH, Frickenhausen

2.2.1.2 Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Apple MacBookPro mit Mac OsX und Windows Xp	Apple, USA
Branson Sonifier B-12	Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA
Drucker: HP Laserjet 1200 series	HP, USA
Electro-Eluter Model 422	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia
Elisa-Reader: SLT Rainbow:	SLT Lab Instruments, Österreich
Easybase Software	SLT Instruments, Crailsheim
Gel-Dokumentationsanlage BioDoc	Biometra [®] , Göttingen
Gießvorrichtung für Gele	Amersham Biosciences Ltd. Uppsala, Sweden
Heat Sealer LKB Wallac	Wallac, Turku, Finnland
Lyophilisator Hetosicc FD 2.5	Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark
Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean [®] 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean [®] Multi-Casting Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mixer Ultra turrax	Janke und Kunkel, Staufen
MSE Zentrifuge	

pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten
Pipetboy IBS	Integra Biosciences
Scanner	HP, USA
Scanner, Laserbase MF 5750	Canon, USA
Schüttler SM 25	Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen
Sorvall-Centrifuge RC-5-Superspeed Refrigerated	DuPont Instruments
Spectrophotometer Ultraspec III	Pharmacia LKB
Ultracentrifuge TGA	Kontron [®] Instruments

2.2.2 Reagenzien:

Artikel	Bezugsquelle
AEC- (3-Amino-9-Ethylcarbazole-) Tablets	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH Steinheim
Ammonium persulfate, analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumbikarbonat (NH ₄ HCO ₃)	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bio-Beads SM2	Bio-Rad, Hercules, CA
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie® Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid research grade	SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg
Essigsäure 100% wasserfrei	Merck, Darmstadt

Glycerin 87% zur Analyse	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit, Pierce	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Methanol (CH_3OH), reinst	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat (CH_3COONa)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Seize® X Protein G Immunoprecipitation Kit Pierce	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

2.2.3 Pufferansätze und andere selbst hergestellte Lösungen

0,2 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6

1 M Trispuffer pH 6,8 (HCl)

10 %ige SDS-Lösung

10 mM Trispuffer pH 7,4

3 M Trispuffer pH 8,9 (HCl)

60 mM PBS, pH 7,4

BSA-Puffer (60 mM PBS, pH 7,4 plus 3% Rinderalbumin (BSA))

0,1M Citratpuffer, pH 5,0

Coomassie – Blue Proteinfärbelösung 0,1%ig

Elektrodenpuffer pH 8,3 nach Laemmli (Laemmli 1970)

ELISA-Waschpuffer I (PBS, 60mM, pH 7,4) plus 0,5% BSA)

ELISA-Waschpuffer II (WP I plus 0,2% Triton X 100)

Gel Entfärbelösung (65% Aqua dest., 25% Methanol, 10% konz. Essigsäure)

Mercaptoethanolpuffer nach Laemmli (Laemmli 1970)

Proteinelutionspuffer: 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer plus 0,1 % SDS

Transferpuffer pH 8,3 (Towbin 1979)

Westernblot Waschpuffer (60 mM PBS, pH 7,4 plus 0,25 % Rinderalbumin plus 0,25% Tween®-20)

0,5 M Natrium-Phosphat Puffer pH 7,0

2.3 Methoden

2.3.1 Antigengewinnung

Als Antigen zum Identifizieren von Seren mit atypischen Banden diene ein 100 000g Überstand aus Cytoplasmaextrakt der Rattenleber^{12,41, 96,128}. Dieses Antigen wird auch zum Nachweis von Antikörpern gegen die 52 kDa bzw. 48 kDa Banden des LP/SLA Proteins im Westernblot eingesetzt¹²⁸.

Die Lebern von getöteten Ratten werden reseziert und von umgebendem Fettgewebe befreit. Die Organe werden zerkleinert und in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, gewaschen, die Aufarbeitung findet bei 4° in einer Kühlkammer statt. Die aufgearbeiteten Lebern werden abgewogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -70° C eingefroren. Nach dem Auftauen des Gewebes werden etwa 250g Gewebe mit je 500 ml Tris-Puffer versetzt und in einem Küchenmixer auf höchster Stufe zerkleinert. Die verflüssigte Rattenleber wird im Anschluss mit 1400rpm (560g) 5 Min. lang in der MSE Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird dabei gesammelt und das Pellet verworfen. Der gesammelte Überstand wird in der Sorvall Zentrifuge erneut 15 Min. lang mit 8300rpm (7000g) zentrifugiert. Erneut wird der entstandene Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand aus dieser Fraktion wird erneut bei 100 000g über 30 Minuten zentrifugiert. Der 100 000g Überstand wird nun als Antigengemisch mit Bestandteilen des Lebercytoplasmas als „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ im Western Blot als Antigen verwendet. In Abbildung 2.1 ist die Antigengewinnung des Cytoplasmaextraktes aus Rattenleber wie von Berg 1967 beschrieben schematisch dargestellt.

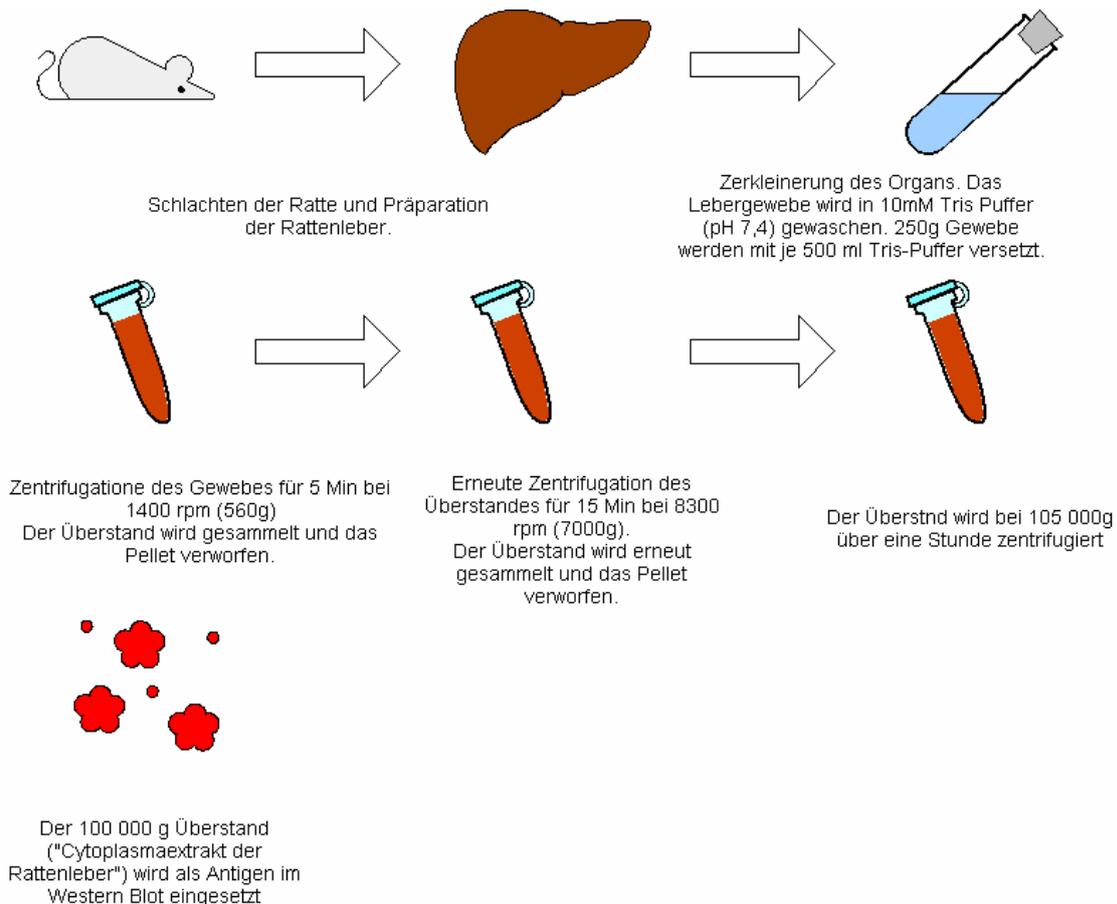


Abb. 2.1: Darstellung des Antigenes „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“

12,41,96,128
, , , .

2.3.1.1 Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose

Zur weiteren Auftrennung des „Proteingemisches“ Cytoplasmaextrakt der Rattenleber wurde das Verfahren der Saccharose Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Dabei werden 10 verschiedene Saccharoselösungen mit Konzentrationen zwischen 10% und 59% hergestellt (Siehe Tabelle 2.9). Die Stammlösungen können bei -20°C gelagert werden. Die verschiedenen Lösungen werden ihrem spezifischem Gewicht nach in Reagenzgläsern (Beckman ultra-clear™ centrifuge tubes), die in Eis eingebettet sind, übereinander geschichtet (pro Schicht 1 ml). Dabei wird nach jedem Pipettierschritt die jeweilige Schicht am Reagenzglas mit einem wasserfesten Stift markiert. Nachdem vorsichtig die 10 verschiedenen Schichten übereinander pipettiert wurden, werden 1,5 ml Cytoplasmaextrakt als oberste Schicht pipettiert. Nun folgt die Zentrifugation über 24 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ und 100 000g

(Schwingrotor Sw 40, Ultrazentrifuge RC-5.). Nach der Zentrifugation, wird jeweils 1 ml pro Schicht anhand der Markierungen abpipettiert. Somit stehen 10 verschiedene Gradientenantigene zur Verfügung, (im Folgenden G1 – G10 genannt, G1= 1,04, G2=1,08, G3=1,10, G4=1,12, G5=1,14, G6=1,16, G7=1,18, G8=1,20, G9=1,24, G10=1,28), die per Gelelektrophorese aufgetrennt werden und im Western Blot mithilfe bekannt reagierender Seren auf ihre Antigenreaktivität untersucht werden.

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

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

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Bradford-Methode (¹⁹) durchgeführt. Als Reagenzlösung wurde das BIOQUANT[®]-Reagenz verwendet. Alle Proben wurden bei 595 nm in Plexiglasküvetten im Spectrophotometer Ultraspec III

gemessen. Die notwendige Eichkurve wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit BSA erstellt. Es wurden jeweils 50 µl Probelösung und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz verwendet. Der Leerwert bestand aus 50 µl bidestilliertem Wasser und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz.

2.3.3 Gelelektrophorese und Immunoblotting

2.3.3.1 Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Laemmli⁸⁵ selbst gegossen, wobei ein 3,7%iges Sammelgel und ein homogen 10%iges Trenngel verwendet wurde. Es wurden dabei zwei verschiedene Systeme verwendet. Das erste System, mit dem alle Ergebnisse erstellt wurden, hatte eine lange Laufstrecke. Es basiert auf einer Gießvorrichtung von Amersham Biosciences Ltd. Die gegossenen Gele hatten eine Größe von 16 x 10 cm und eine Dicke von 0,5 cm. Als zweites System mit einer kurzen Laufstrecke wurde das Mini-Protean[®] 3 System von Bio-Rad verwendet. Je nach Versuch wurden 200 µg Cytoplasmaextrakt, zwischen 1 µg und 100 µg Gradienten Antigen, 25 µg Eluatantigen oder 5 -10 µl Molekularmarker (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range von Bio Rad) verwendet. Die SDS-Gele wurden entweder direkt mit Coomassieblau G-250 angefärbt oder für die Übertragung auf Nitrocellulosefolien weiterverwendet. Der Lauf der großen Gele mit langer Laufstrecke fand in einer Kühlkammer bei 4 ° C statt.

2.3.3.2 Färbung der Gele

Die Gele wurden in 0,1 % Coomassie Blue Färbelösung gelegt und über Nacht bei Zimmertemperatur auf einen Rüttler gestellt. Am nächsten Tag wurden sie ebenfalls bei Zimmertemperatur in Entfärbelösung inkubiert. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals gewechselt, bis die Gele vollständig entfärbt waren. Alternativ wurde die Kolloidale Coomassie-Färbung Roti Blue der Firma Carl Roth nach Protokoll verwendet.

2.3.3.3 Transferbedingungen

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach der Wet-

Blot Methode auf eine Nitrocellulosemembran übertragen¹⁴¹. Die Gele wurden mit den Nitrocellulosesheets nach der Sandwichmethode luftblasenfrei übereinander geschichtet. Auf einer Halterung wurden die in Transferpuffer getränkten Bestandteile nach dem Schema: Schwamm - drei Lagen Filterpapier - Gel mit Nitrocellulosesheet - drei Lagen Filterpapier - zweiter Schwamm aufgeschichtet. In einer Transferkammer wurden die Proteine aus dem Gel bei 1500 mA über 3 Stunden bei den Gelen mit langer Laufstrecke und bei 100 V über 1 Stunde bei den Gelen mit kurzer Laufstrecke auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transferpuffer wurde bei beiden Systemen umgewälzt und gekühlt.

2.3.3.4 Inkubation und Anfärbung der Nitrocellulosemembranen

Zunächst wurden die Sheets mit BSA zum Blocken unspezifischer Bindungen inkubiert. Patienten- und Kontrollseren wurden dann 1:50 mit Serumverdünnungs-Puffer verdünnt. Danach wurden 6 ml der vorverdünnten Patientenseren bzw. 3 ml der Kontrollseren mit jeweils einem Streifen Nitrocellulosesheet bei Raumtemperatur (RT) über 45 min auf dem Rüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Sheets jeweils dreimal 10 Minuten lang mit Waschpuffer (60 mmol PBS plus 0,25% BSA plus 0,25% Tween®-20) gewaschen. Danach folgte die Inkubation der Sheets mit 1:200 verdünnten IgG und IgM-HRP Anti-Human-Antikörpern für 30 Min. auf dem Rüttler bei RT. Nach einem zweiten Waschschrift (5-mal je 7 Minuten) wurden die Membranen mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) angefärbt. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion mit 7% Essigsäure abgestoppt.

2.3.4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Mikrotiterplatten (Maxi-Sorp, Nunc) werden 16 Stunden bei +4°C mit in Bikarbonatpuffer (0,2M, pH 9,6) verdünnten Antigenen inkubiert. Danach folgt viermaliges Waschen über 15 Min. im ELISA-Waschpuffer (PBS, 60mM, pH 7,4 plus 0,5% Rinderalbumin (BSA)) zur Abdeckung noch freier Bindungsstellen auf der Platte. Anschließend werden je Loch 100 µl Serumverdünnung pipettiert und über 90 Min. bei RT inkubiert. Es folgt viermaliges Waschen über 15 Min. in ELISA- Waschpuffer II (WP I plus 0,2% Triton X 100). So werden nicht

gebundene Proteine entfernt, zugleich verhindert Triton X 100 unspezifische Bindungen. Peroxidase-konjugierte antihuman IgG- und IgM-Antikörper der Ziege werden mit WP II 1:3333 und je 100 µl/Loch über 60 Min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten wie oben beschrieben in WP II gewaschen. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von o-Phenylendiamin (gelöst in Citratpuffer 0,1M, pH 5,0) mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gestartet und nach guter Farbentwicklung der Positivkontrollen mit 25%iger Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Die Absorptionen werden im ELISA Einlesegerät (SLT rainbow) bei 450 nm gemessen (Easybase, SLT) und als ΔA/Min. angegeben. Die zu testenden Seren wurden im Verhältnis 1:500 verdünnt. Als Antigene wurden im ELISA entweder eluierte Banden aus der Gelelektrophorese oder verschiedene Fraktionen des Antigens Cytoplasmaextrakt, welches durch Saccharosegradientenzentrifugation aufgetrennt wurde, verwendet. Alle Antigene wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet.

2.3.5 Immunpräzipitation

Zur Identifikation von Antigenen wurde zusätzlich zur Bandenelution die Immunpräzipitation eingesetzt. Zwei kommerzielle Kits der Firma Pierce wurden verwendet. Mit dem Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit wurden IgG Antikörperfraktionen aus Patientenseren aufgereinigt und mit dem Seize® X Protein G Immunoprecipitation Kit wurde der eigentliche Immunpräzipitations (IP)-Ansatz durchgeführt. Beide Kits wurden nach den beiliegenden Protokollen verwendet.

2.3.6 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch wiederholtes Zuordnen der Bande gegenüber dem SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range Molekulargewichtsmarker von Bio Rad. Als Referenzproteine dienten folgende Marker: Myosin 200 000 d, β-galactosidase 116 250 d, Phosphorylase b 97 400 d, Serum Albumin 66 200 d, Ovalbumin 45 000, Carbonic anhydrase 31 000 d, Trypsin inhibitor 21 500 d, Lysozyme 14 400 d, Aprotinin 6 500 d

2.3.7 Antigenkonzentrierung, Antigenisolierung, Antigenaufarbeitung Antigenidentifizierung

2.3.7.1 Antigenisolierung: Bandenexzision und Elektroelution

Mit Hilfe der im Westernblot auftretenden Reaktionen wurden in den mit Coomassie Blue gefärbten Gelen Determinanten identifiziert, die den Banden auf den Sheets zugeordnet werden konnten. Die Banden auf den Gelen wurden dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und in kleine Würfel zerteilt (ca. 0,2 cm x 0,2 cm). Die Proteine wurden im Bio-Rad Electro Eluter Modell 422 nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung eines 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffers mit 0,1% SDS bei 60 mA über 4 Stunden eluiert. Zur Verminderung der SDS-Konzentration im Eluat wurde, wie vom Hersteller empfohlen, 30 Min. vor Ende der Elutionszeit der Elutionspuffer gegen SDS freien Elutionspuffer (50 mM Ammoniumbikarbonatpuffer) ausgetauscht. Jeweils 600 µl Antigeneluat wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen lyophilisiert und danach mit ca. 100 µl Aqua dest. resuspendiert.

2.3.7.2 Antigenaufarbeitung

Die elektroeluierten Proteine sollten als Antigene sowohl im Westernblot als auch im Elisa eingesetzt werden. Die Reaktionen der elektroeluierten Antigene im Elisa waren jedoch unbefriedigend. Unter der Annahme, dass für die schlechten Reaktionen der Elisaansätze zu hohe SDS-Konzentrationen der eluierten Antigene verantwortlich waren, wurde eine einfache und schnelle Möglichkeit gesucht, um die SDS-Konzentrationen in den Antigenen zu senken. Dabei wurde mithilfe der Bio-Beads® SM-2 (Bio-Rad, Hercules, CA), die als makroporöse Polystyrolkugeln nicht polare hydrophobe Substanzen binden sollen, versucht, freies SDS zu binden.

Die Methode wurde von Holloway eingeführt, indem er SM2 Bio-Beads benutzte, um Triton X-100 aus Proteinlösungen zu entfernen, um Interferenzen des Detergenz bei Proteinassays zu vermeiden⁶⁰. Rigaud et al. untersuchten die SM2 Bio-Beads systematisch und kam zu dem Schluss, dass dies eine effektive und einfache Methode sei, sowohl anionische wie auch ionische Detergenzien, unabhängig von ihrer kritischen mizellären Konzentration (CMC),

bei minimalem Proteinverlust zu binden ¹¹⁸. Lacapere et al. zeigten, dass auch die Entfernung von SDS aus Protein-Fett-Detergenz-Lösungen möglich ist ⁸⁴. Bei der Elektroelution mit Hilfe des Bio-Rad Electro-Eluter 422 wurden 600 µl Antigen eluiert. Diesem wurden 24 mg beads zugegeben (40 mg beads pro ml Antigen) ⁸⁴, die Mischung wurde bei 25°C über 4h auf dem Rüttler inkubiert ¹¹⁹. In einem zweiten Ansatz wurde den Eluaten unter der Vorstellung, dass Phosphationen gebundenes SDS mobilisierten, zusätzlich zu den Beads 1 ml 0,5M Natrium-Phosphat Puffer zugegeben ⁵⁰. Nach der Inkubation wurde die Proteinlösung vorsichtig abpipettiert, lyophilisiert und bei -70°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3.8 Antigenanalyse

Die Proteinidentifizierung wurde anhand von „peptide mass fingerprints“ durch die Massenspektrometrie (MALDI-TOF) freundlicherweise von der AG Prof. Stevanovic (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abtl. Immunologie) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Comassie-blue-gefärbte Proteinbanden aus SDS-Gel ausgeschnitten, entfärbt und drei Stunden lang einem Verdau mit Schweinetrypsin ausgesetzt. Die Peptidmixturen werden wiederum elektrophoresiert und mittels 1%iger Ameisensäure vom Gel extrahiert. So werden mehrere „Fingerabdrücke“ eines Proteins angefertigt und mehrere Fragmente des Verdau in der Massenspektrometrie sequenziert. In Kenntnis mehrerer Peptide kann über Protein-Datenbanken ein Molekül mit hoher Sicherheit identifiziert werden ¹¹⁴.

2.3.9 Computergestützte Auswertung der Western Blots

Die im Western Blot nachgewiesenen Determinanten wurden eingescannt und computergestützt mit der Software Lab Image der Firma Kapelan ausgewertet. Dabei wurde jede Bande markiert und umfahren. Das Programm berechnete das Integral der Helligkeit jedes Punktes der angegebenen Fläche. Von den gewonnen Werten wurde dann der zuvor festgelegte Hintergrundwert jedes Sheets abgezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Seren von Patienten mit AIH III und Patienten mit hochgradigem Verdacht auf AIH im Westernblot unter Verwendung eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber

Bei der Testung der Seren von 11 Patienten mit AIH Typ III (Gruppe A) im Westernblot fanden sich neben der typischen 52 kDa sowie der ebenfalls bereits bekannten 48 kDa Determinante zusätzliche Reaktionen bei 66 kDa, 60 kDa, 48 kDa, 45 kDa, 35 kDa und 30 kDa. Die häufigsten Muster bildeten die Gruppen 66 kDa, 48 kDa und 35 kDa. Ähnliche Reaktionen – außer der 52 kDa-Determinante – wurden bei Patienten der Gruppe B (hochgradiger Verdacht auf AIH) beobachtet (Abb. 3.1.).

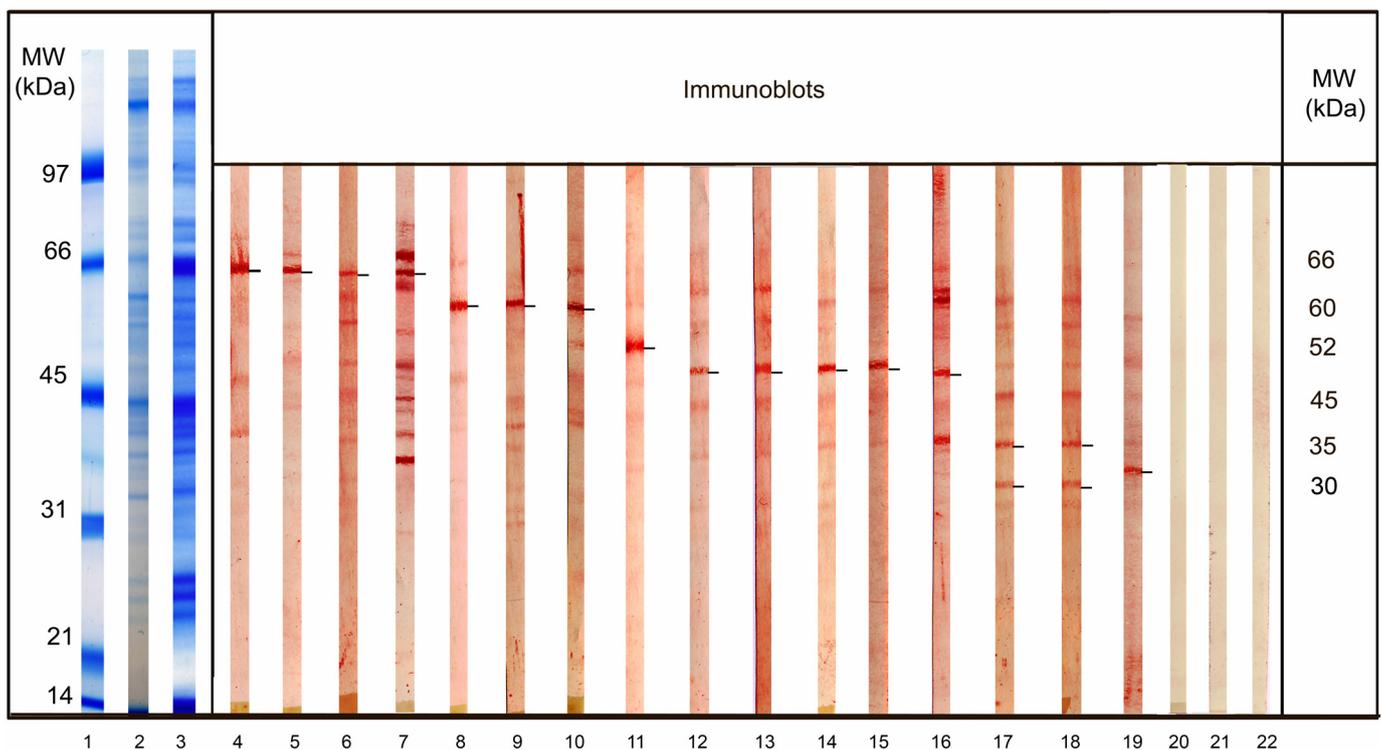


Abb. 3.1: Reaktion von Patientenseren mit AIH Typ III (n=11) und Patientenseren mit hochgradigem Verdacht auf AIH (n=27) im Westernblot mit einem 100 000g Proteinüberstandes aus der Rattenleber (Beispiele anhand von 16 Patienten (Nr. 4-19); und Seren von gesunden Kontrollen (Nr. 20-22), Coomassie-Färbung

(Nr.1 Molekulargewichtsmarker, Nr.2 Gradient 1,14, Nr. 3 Cytoplasmaextrakt).

3.2 Aufreinigung und Spezifizierung der relevanten Antigene

Es wurden zwei Strategien zur weiteren Aufreinigung der Antigenfraktion „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ verwendet. Als erstes wurde versucht, die Reaktionen im Western Blot den entsprechenden Banden im Coomassie gefärbtem Gel der Elektrophorese zuzuordnen. Vor allem die 66 kDa Bande entsprach einer stark gefärbten, scharfen Bande im Coomassie-Gel (Abbildung 3.2). Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden dann elektroeluiert, und das gewonnene Eluat wurde erneut als Antigen in der Elektrophorese bzw. im Western Blot eingesetzt. Die elektroeluierten Proteine ergaben aber nur sehr schwache Banden im Coomassie-Gel. Die entsprechenden Westernblot Bilder lieferten dementsprechend auch keine scharfen Determinanten (Siehe Abbildung 3.3.).

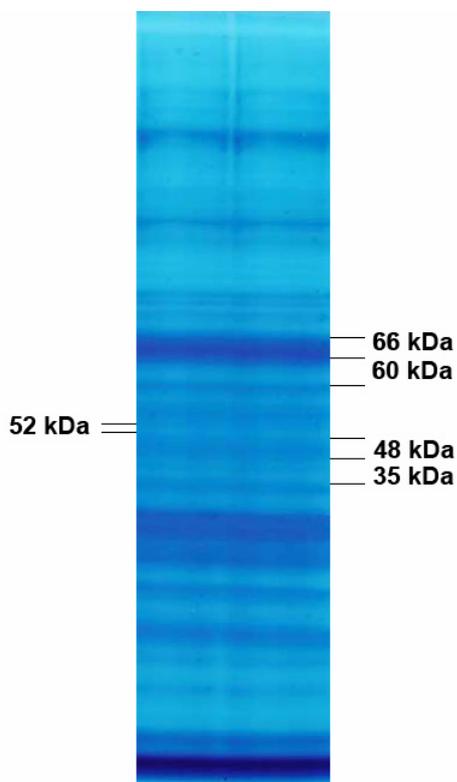


Abb. 3.2: Coomassie-Färbung einer Gelelektrophorese mit dem Antigen „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“.

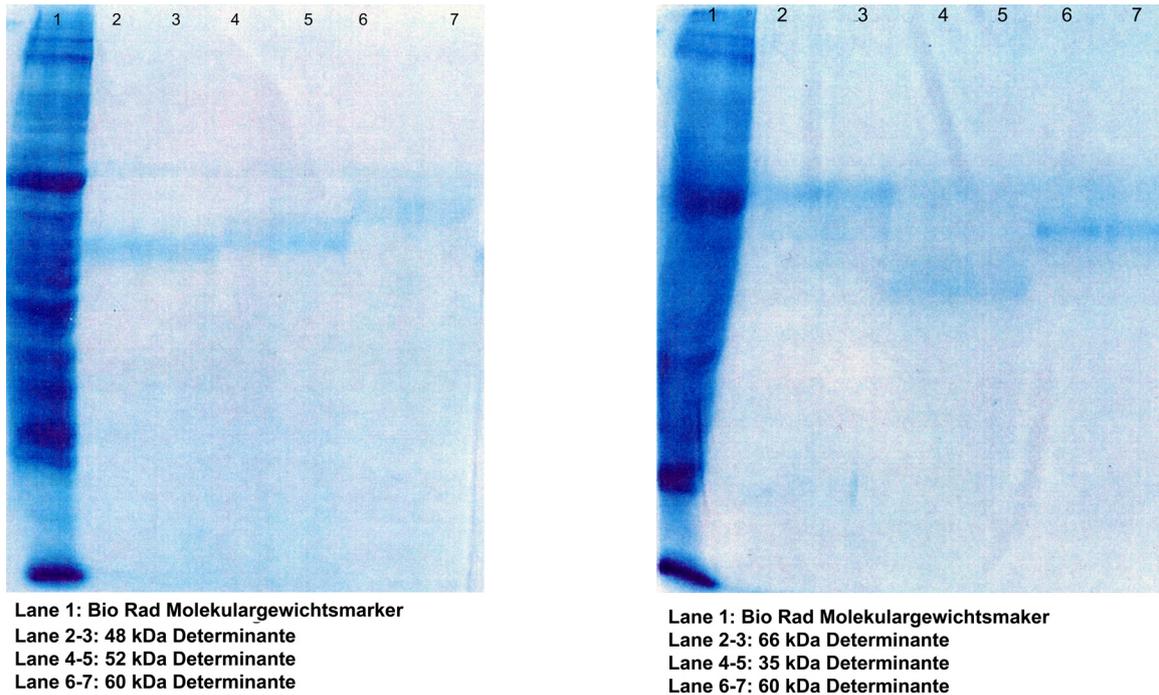
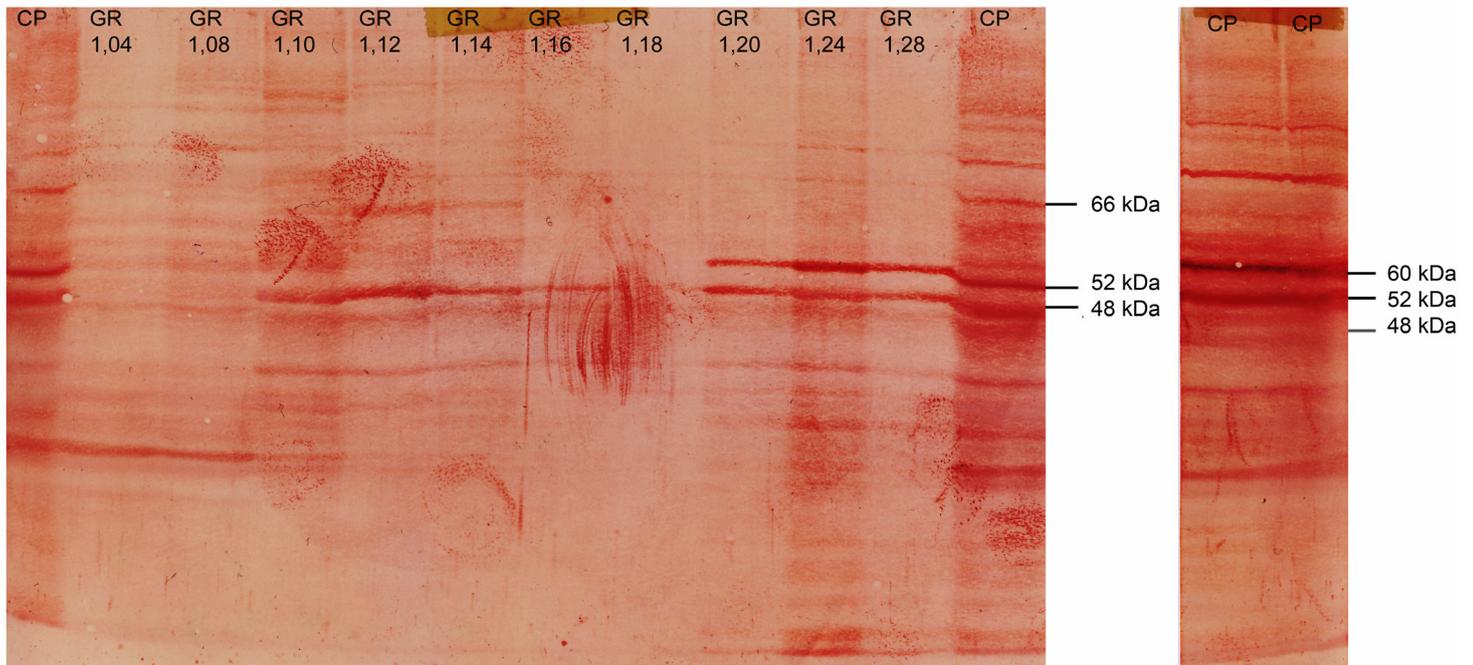


Abb. 3.3: Elektrophorese mit den eluierten Banden bei 66, 60, 48 und 35 kDa (s. Abb. 3.2.)

In einem zweiten Schritt wurde versucht, die Eluate auch als Antigene im ELISA einzusetzen. Die durch Elektroelution gewonnenen Antigene lieferten im ELISA aber keine verwertbaren Daten (Ergebnisse nicht dargestellt). Als zweite Strategie wurde die Antigenfraktion „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ mithilfe der Gradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Die somit gewonnenen Fraktionen wurden nebeneinander in der Gelelektrophorese als Antigene eingesetzt; nach Elektrotransfer wurden die Sheets mit Hilfe hochpositiver Seren im Western Blot ausgetestet. Dabei kamen drei hochpositive Seren mit Reaktionen im Bereich 66 kDa und 60 kDa bzw. mit beiden Reaktionen gegen die einzelnen Fraktionen des Gradientenantigens zum Einsatz (Abbildung 3.4 bis Abbildung 3.6). Die stärksten Reaktionen waren gegen die Determinante im Bereich von 66 kDa in der Fraktion 1,12 gerichtet.

In der Fraktion 1,14 war die Reaktion immer noch relativ stark. Zusätzlich fand sich in dieser Fraktion eine gute Reaktion mit der LP/SLA-Determinante bei 52 kDa und eine Reaktion mit der 48 kDa Determinante, Die stärksten Reaktionen

gegen die 52 kDa und die 48 kDa Banden zeigten sich mit den Gradienten 1,20-1,28. Allerdings waren in diesen Bereichen keine deutlichen Reaktionen im Bereich 66 kDa und 60 kDa darstellbar. Für weitere Analysen wurde daher die 1,14 Fraktion des Gradientenantigens als Antigenfraktion ausgewählt



Anti - LP - Kontrollserum

Abb. 3.4: Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfraktionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Westernblot. Zu erkennen sind positive Reaktionen mit einer 66 kDa Determinante in den Gradienten 1,12 und 1,14. Darüber hinaus sieht man die 52 kDa und 48 kDa Banden in den Gradienten 1,20-1,28. Die 48 kDa Reaktion zeigt sich zusätzlich in den Gradienten 1,10-1,16. CP=Cytoplasmaextrakt; GR=Gradient

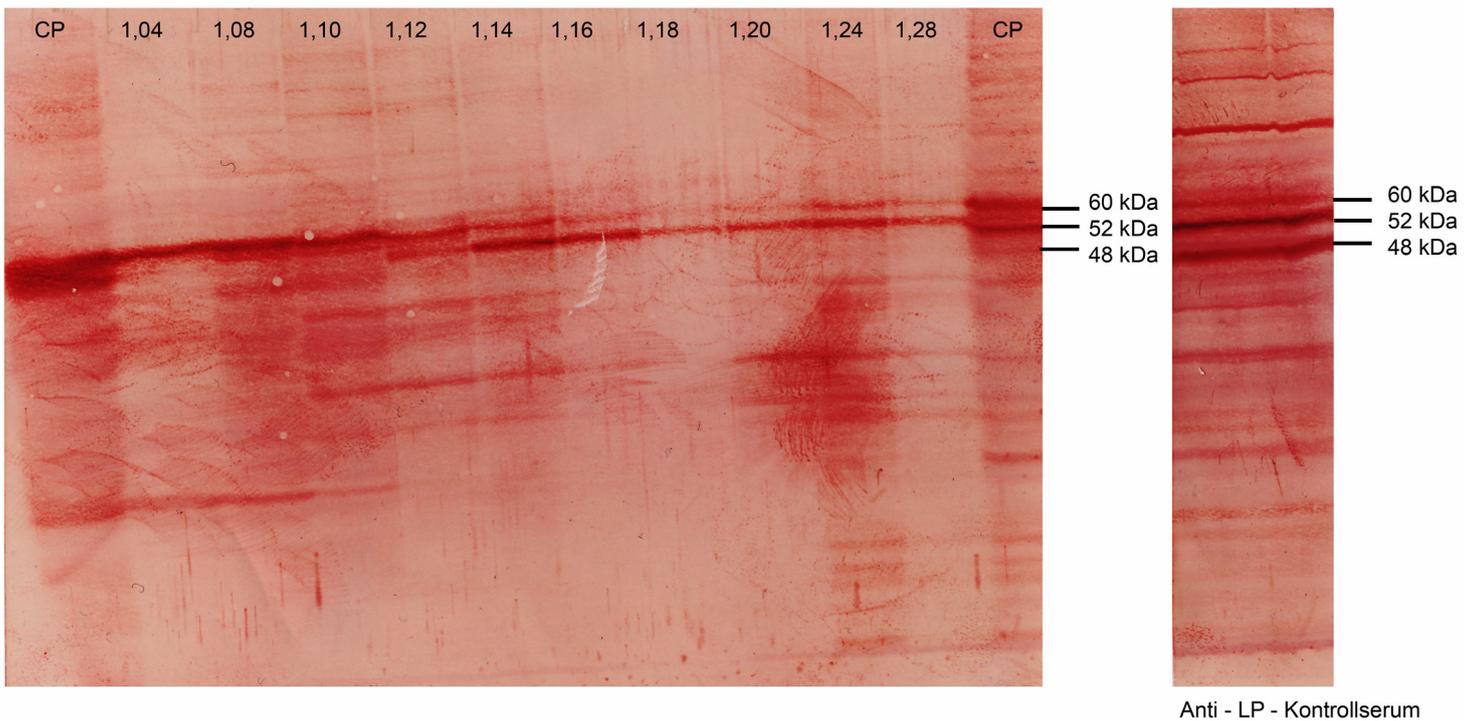
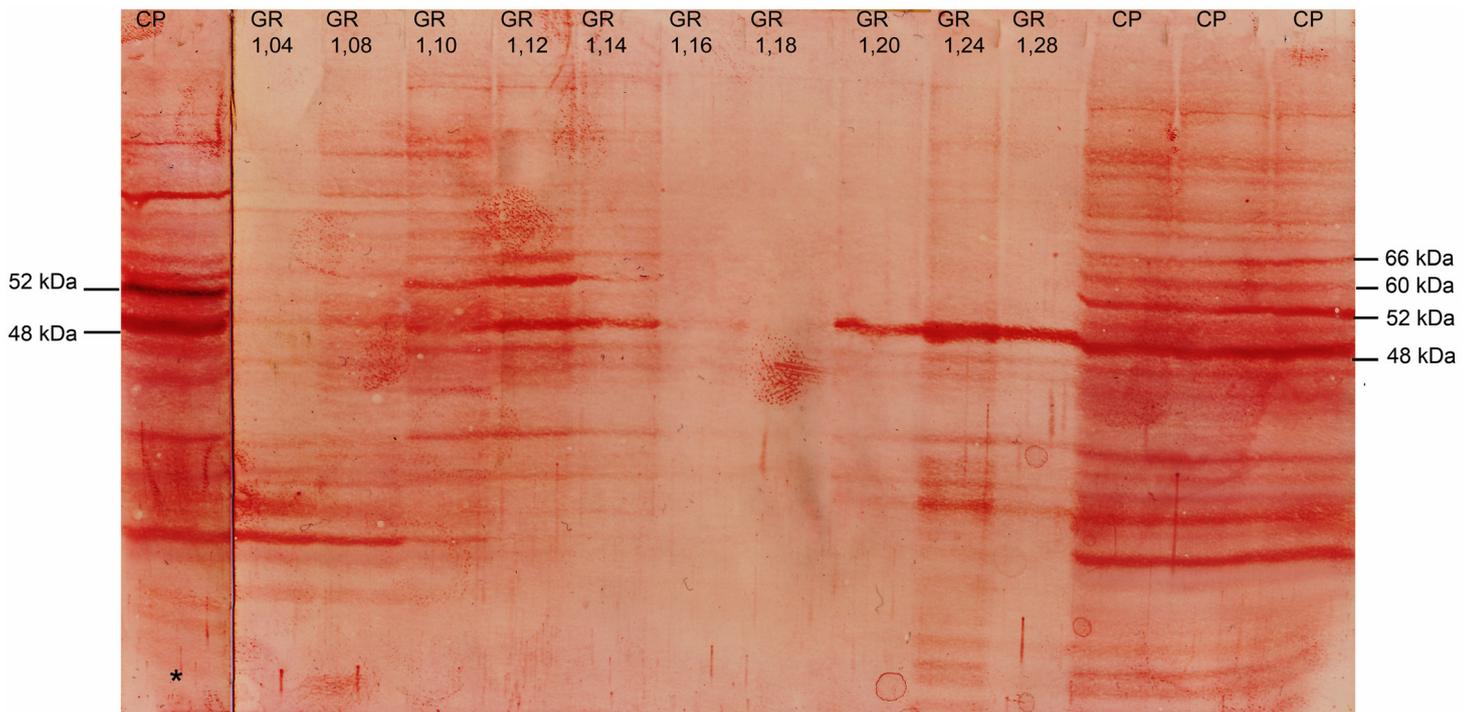


Abb. 3.5: Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfractionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Western Blot. Zu erkennen sind positiven Reaktionen mit einer 60 kDa Determinante in den Gradienten 1.04-1.16 sowie 1.24. Darüber hinaus sieht man die 52 kDa und 48 kDa Banden in den Gradienten 1,12-1,28. Die 48 kDa Reaktion zeigt sich zusätzlich in den Gradienten 1,08-1,10. CP=Cytoplasmaextrakt; GR=Gradient



* Anti - LP -Kontrollserum

Abb. 3.6: Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfractionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Western Blot. Zu erkennen sind positive Reaktionen mit einer 66 und einer 60 kDa Determinante in den Gradienten 1,10-1,14. Darüber hinaus sieht man die 48 kDa Bande in den Gradienten 1,20 bis 1,28. Das Serum reagiert nicht mit der 52 kDa Determinanten, CP=Cytoplasmaextrakt; GR=Gradient

In Abbildung 3.7 sind die Proteinbanden im Coomassie-Gel dargestellt. Zu sehen sind die Elektrophoresemuster der einzelnen Fraktionen des Gradientenantigens aufgetrennt in einem großen Gel mit langer Laufstrecke. Weiterhin ist Fraktion 1,14 aufgetrennt in einem Gel mit langer Laufstrecke und in einem Gel mit kurzer Laufstrecke zu sehen

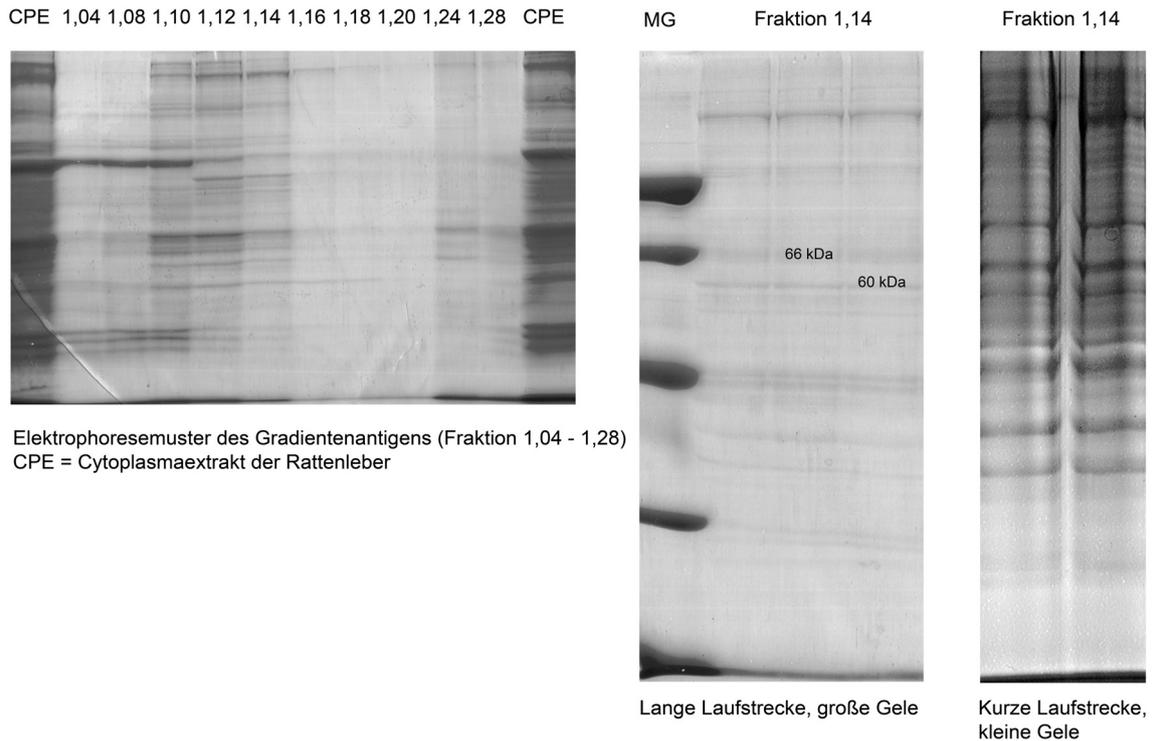


Abb. 3.7: Elektrophoresemuster des Antigens „100 000 g Überstand der Rattenleber (Cytoplasmaextrakt der Rattenleber = CPE) im Vergleich zum Antigen „Gradientenantigen Fraktion 1,14“ bzw. „Fraktion 1,04 – 1,28“. Markiert sind die beiden Determinanten 66 kDa und 60 kDa, welche als Proteinbanden im Western Blot (Coomassiefärbung) anhand der Reaktion mit Patientenseren im entsprechenden Sheet (Immunoblot) auffindig gemacht wurden (vergleiche Abb. 3.1 und Abb. 3.8) .

Darüber hinaus sind die unterschiedlichen Elektrophoresemuster in Abhängigkeit der Laufstrecke im Gel dargestellt (1,14 Fraktion des Gradientenantigens einmal im großen Gel mit langer und einmal im kleinen Gel mit kurzer Laufstrecke aufgetrennt).

Die Abkürzung CPE steht dabei für „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“, die einzelnen Gradientenfraktionen entsprechen den Bezeichnungen GR 1,04–GR 1,28. MG steht für den Molekulargewichtsmarker.

3.3 Austestung von Patientenseren gegen die Gradientenfraction 1.14

Für weitere Untersuchungen wurde der 1.14 Gradient als Antigenfraktion ausgewählt, da er die relevanten Proteine bei 66, 60, 48, 45, 35 enthielt. In den Reaktionsmustern der Gradientenantigene (Abb. 3.4 und Abb. 3.6) schien es so als ob sich die 52 kDa Reaktion im Gegensatz zur 48 kDa Reaktion schwächer darstellte. Die 52 kDa Determinante reagierte jedoch (wie in Abb. 3.5 gezeigt) auch mit 52 kDa positiven Seren in der 1,14 Fraktion deutlich. Ebenso die 48 kDa Determinante (Siehe Abb. 3.6). Dies zeigte sich so auch in der Auswertung der Reaktionsmuster der Gruppe A (Siehe Tab. 3.1).

Seren der Patientengruppen A-C sowie der gesunden Kontrollen wurden im Westernblot gegen diese Antigenfraktion getestet. Ausgewählte Beispiele sind in Abb. 3.8. und 3.9. dargestellt.

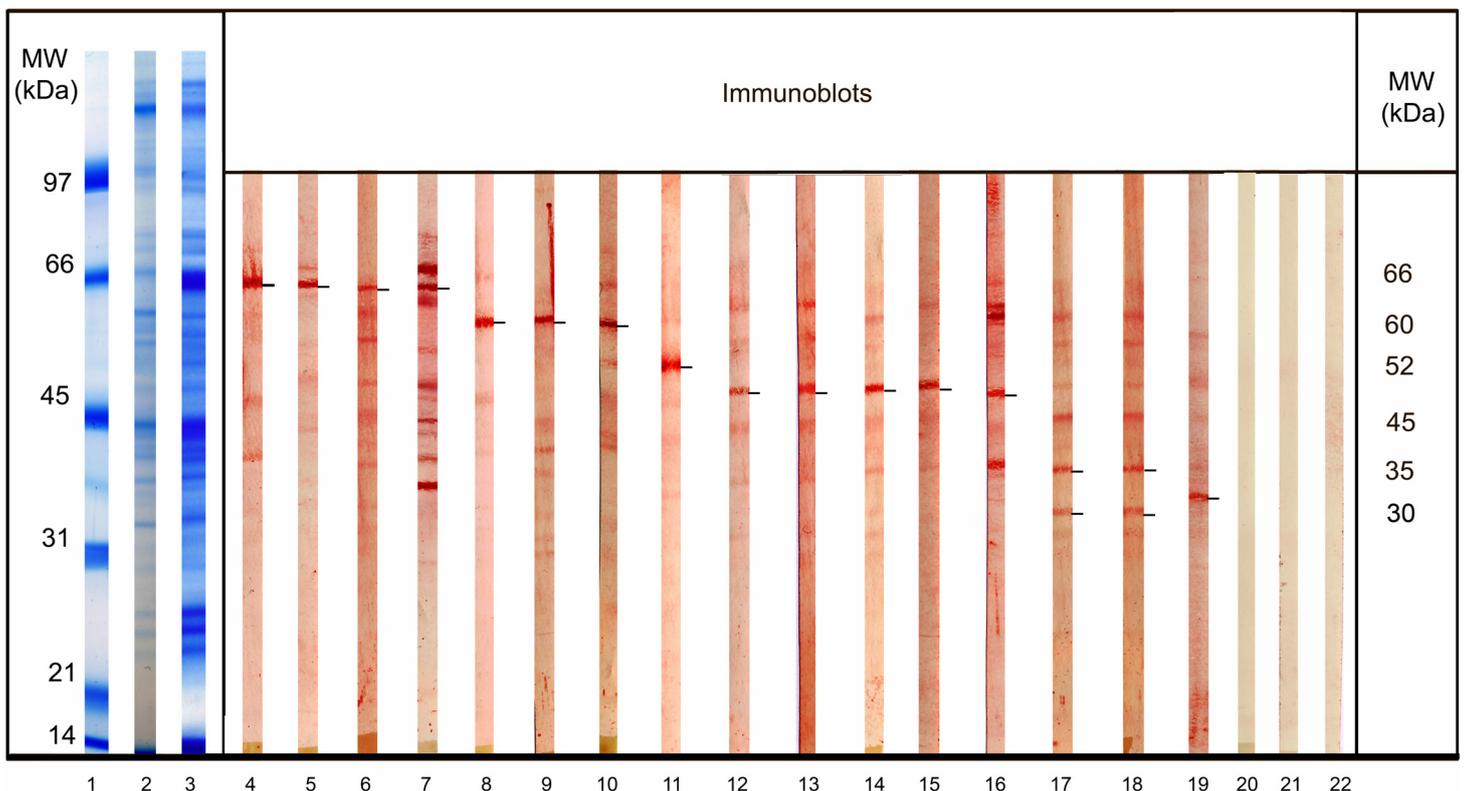


Abb. 3.8: Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A und B sowie von gesunden Kontrollen mit dem 1,14 Gradienten im Westernblot

Fortsetzung Legende Abb. 3.8

- Nr. 1 Molekulargewichtsmarker, Coomassie-Färbung
- Nr. 2 1,14 Fraktion des Gradientenantigen, Coomassie-Färbung
- Nr. 3 Cytoplasmaextrakt der Rattenleber, Coomassie-Färbung
- Nr. 4-7 Seren mit Reaktionen im Bereich der 66 kDa Bande,
- Nr. 8-10 Seren mit Reaktionen im Bereich der 60 kDa Bande
- Nr. 11 positives Anti LP/SLA Serum mit einer Reaktion bei 52 kDa
- Nr. 12-16 Seren mit Reaktionen im Bereich 48 / 45 kDa
- Nr. 17-19 Seren mit Reaktionen im Bereich 35 kDa
- Nr. 20-22 Seren von gesunden Blutspendern

Die Reaktionen oberhalb der bekannten 52 kDa Bande des LP/SLA Antigens im Bereich 66 kDa bzw. 60 kDa bildeten die häufigste Gruppe. Im Bereich der 52 kDa Bande kamen auch Reaktionen bei ca. 50 kDa vor, welche aber aufgrund der Nähe zur bekannten 52 kDa Bande nicht sicher als Anti-LP/SLA negativ gewertet werden konnten. Daher wurde diese Reaktion nicht gesondert ausgewertet. Unterhalb der 52 kDa Banden kamen Determinanten im Bereich 45 kDa vor. Am häufigsten wurde dabei eine Reaktion in Höhe von 48 kDa beobachtet, welche mithilfe 48 kDa positiver Anti-LP/SLA-Seren¹²⁸ zugeordnet werden konnten. Eine weitere Reaktion konnte auf Höhe von 35 kDa beobachtet werden. Die Determinanten wurden dabei im Bereich 30 kDa bis 40 kDa zusammengefasst.

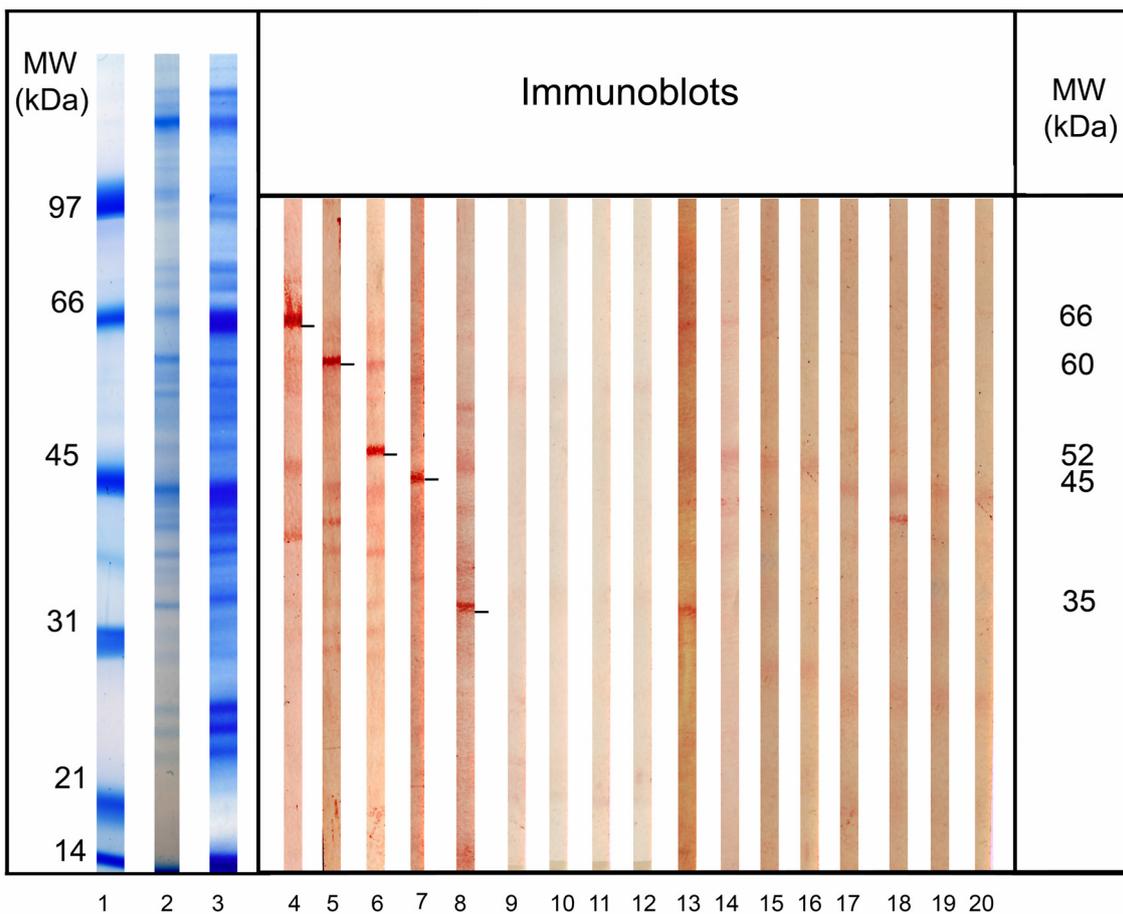


Abb. 3.9: Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A-C sowie von gesunden Kontrollen mit dem 1,14 Gradienten im Westernblot

Nr. 1 Molekulargewichtsmarker, Coomassie-Färbung
 Nr. 2 1,14 Fraktion Gradientenantigen, Coomassie-Färbung
 Nr. 3 Cytoplasmaextrakt der Rattenleber, Coomassie-Färbung
 Nr. 4 Serum mit Reaktion im Bereich der 66 kDa Bande,
 Nr. 5 Seren mit Reaktionen im Bereich der 60 kDa Bande
 Nr. 6 positives Anti LP/SLA Serum mit einer Reaktion bei 52 kDa
 Nr. 7 Seren mit Reaktionen im Bereich 48 / 45 kDa
 Nr. 8 Seren mit Reaktionen im Bereich 35 kDa
 Nr. 9-10 Seren von gesunden Blutspendern
 Nr. 11-12 Seren von Patienten mit AIH Typ I
 Nr. 13-16 Seren von gesunden Blutspendern, sichtbar sind hier schwache Reaktionen der 52 kDa, 66 kDa und 35 kDa Bande.
 Nr. 17-20 Seren von Patienten mit AIH Typ I, sichtbar sind hier

ebenfalls schwache 52 kDa, 66 kDa und 35 kDa Banden

3.4 Auswertung der Reaktionen im Westernblot

Die Reaktionen im Immunoblot wurden mit Hilfe des Computerprogramms Labimage ausgewertet. Von jeder Bande wurde die optische Dichte des Scans bestimmt. Schwache Reaktionen, die auch in den Kontrollgruppen gesunder Blutspender oder bei Patienten mit AIH Typ I vorkamen, wurden ebenso bestimmt (siehe Abbildung 3.11). Es wurde dabei ein Cut off festgelegt, der dem Mittelwert der Reaktionen der Kontrollgruppe plus der zweifachen Standardabweichung entsprach. Alle Werte unterhalb des Cut off wurden als nicht positiv gewertet, so dass sehr schwach positive Seren nicht ausgewertet wurden. Der Cut-off-Wert lag bei 30 Intensitätspunkten. In Abbildung 3.10 und 3.11 sind die Häufigkeiten positiver Reaktionen mit den jeweiligen Determinanten bei den verschiedenen Patientengruppen dargestellt.

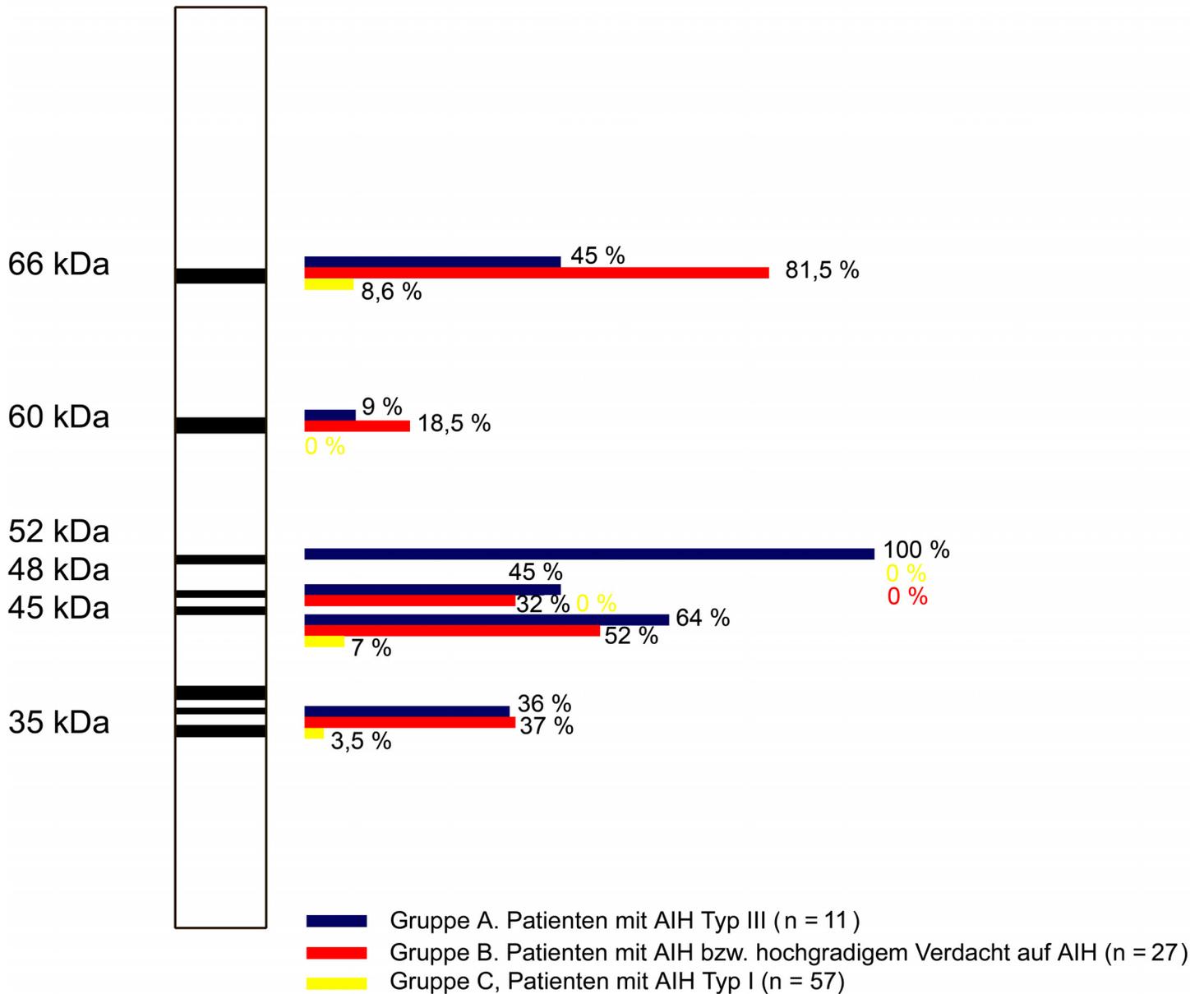
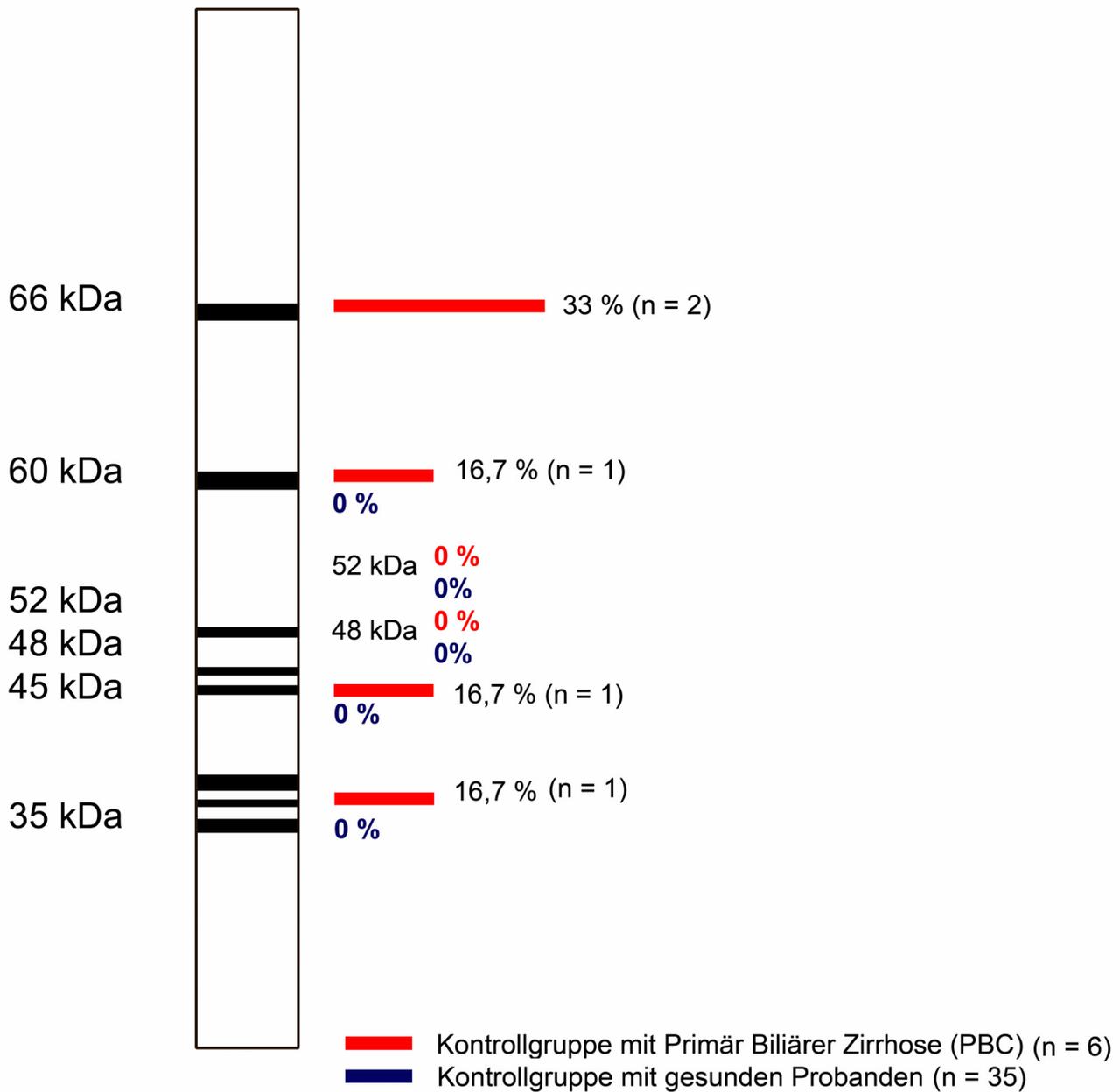


Abb. 3.10 Analyse von Seren von Patienten mit AIH (Gruppe A-C) im Westernblot unter Verwendung des 1.14 Gradienten. Dargestellt sind die Häufigkeiten positiver Reaktionen in Prozent



Bei dem PBC Serum mit den Reaktionen:
 66 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 35 kDa pos. besteht der Verdacht
 auf ein Overlap Syndrom mit einer AIH Typ I.
 (IgG erhöht, AMA + SMA/Aktin pos., M4, M9 pos.)

Abb. 3.11: Analyse von Seren von Patienten mit PBC und gesunden Kontrollen im Westernblot unter Verwendung des 1.14 Gradienten. Dargestellt sind die Häufigkeiten positiver Reaktionen in Prozent

3.5 Analyse der Reaktionen gegen den 1.14 Gradienten im Westernblot bei verschiedenen Patientengruppen

Wie bereits im Abschnitt 3.4 graphisch dargestellt, ergaben die Analysen der Reaktionsmuster, dass Seren von Patienten der Gruppe A in dem 1.14 Gradienten neben der 52 kDa (52 kDa positive Seren von Patienten mit AIH Typ III) weitere Determinanten bei 48 kDa, 66kDa und 35 kDa erkannten. Die Häufigkeit ist in Tab. 3.1 und 3.2 dargestellt.

Tab. 3.1: Gruppe A, Patienten mit AIH Typ III (n = 11).

66 kDa	60 kDa	52 kDa	48 kDa	45 kDa	35 kDa	Anzahl	Prozent
+	-	+	+	+	+	1	9%
+	-	+	-	+	+	2	18%
-	-	+	-	+	+	1	9%
-	-	+	-	-	-	2	18%
-	-	+	+	-	-	1	9%
-	+	+	+	-	-	1	9%
-	-	+	-	+	-	1	9%
+	-	+	+	+	+	2	18%
						n=11	

Es lassen sich neben der 52 kDa Bande weitere Determinanten nachweisen. Die wesentlichen Reaktionen sind die 48 kDa, 66kDa, 35 kDa Band.

Tab. 3.2: Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A (n=11) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten

Determinanten (Molekulargewicht)	Anzahl positiv	Prozent positiv
48kDa	5	45%
66kDa	5	45%
35kDa	6	55%
52 kDa	11	100%

Bei der Analyse von Seren von 27 Patienten mit hochgradigem v.a. AIH ohne Nachweis der 52 kDa Reaktion (Gruppe B) ergab sich ebenfalls eine Häufung der Reaktionen mit den Determinanten 48, 66 und 35 kDa (Tab. 3.3, 3.4)

Tab. 3.3: Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit dem 1.14 Gradienten

66 kDa	60 kDa	52 kDa	48 kDa	45 kDa	35 kDa	Anzahl	Prozent
+	-	-	-	+	+	4	15%
-	-	-	-	+	-	2	7%
-	-	-	-	-	-	1	4%
+	-	-	-	-	-	2	11%
+	+	-	-	-	-	1	4%
-	+	-	-	+	-	1	4%
+	-	-	-	+	-	3	11%
+	+	-	-	-	+	1	4%
+	-	-	-	-	-	2	7%
+	-	-	+	-	-	3	11%

+	+	-	+	+	-	1	4&
-	-	-	+	-	-	1	4&
+	-	-	+	+	+	2	7%
+	+	-	+	+	+	1	4&
+	-	-	+	-	+	2	7%
						n=27	

Die wesentlichen Determinanten in dieser Gruppe waren die 48kDa, 66kDa und 35kDa Bande.

Tab. 3.4: Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten

Banden	Anzahl positiv	Prozent positiv
48kDa	10	37%
66kDa	22	81%
35kDa	10	37%
52 kDa	0	0%

Von den 58 Patienten mit AIH I (Gruppe C) hatten nur 5 (9 %) Antikörper gegen die 66, 45 oder 35 kDa Determinante, Reaktionen mit der 52 oder 48kD Bande wurden – per definitionem – nicht beobachtet (Tab. 3.5, 3.6).

Tab. 3.5: Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit dem 1.14 Gradienten

66 kDa	60 kDa	52 kDa	48 kDa	45 kDa	35 kDa	Anzahl	Prozent
-	-	-	-	-	-	53	91 %
+	-	-	-	-	+	1	2 %
+	-	-	-	+	-	3	5 %
+	-	-	-	+	+	1	2 %

Tab. 3.6: Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten

Banden	Anzahl positiv	Prozent positiv
48kDa	0	0%
66kDa	5	9%
35kDa	2	3%
52 kDa	0	0%

Neben den drei Gruppen von Patienten mit autoimmuner Hepatitis wurden Seren von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose, sowie Seren von gesunden Blutspendern als Kontrollen gegen den 1,14 Gradienten im Westernblot getestet. Von den 6 PBC-Patienten hatten zwei (33%) Antikörper gegen den 1.14 Gradienten, Seren der gesunden Kontrollen waren negativ (Tab. 3.7, 3.8; Abb. 3.11)

Tab. 3.7: Reaktionsmuster von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit dem 1.14 Gradienten

66 kDa	60 kDa	52 kDa	48 kDa	45 kDa	35 kDa	Anzahl	Prozent
-	-	-	-	-	-	4	67
+	-	-	-	-	-	1	17
+	+	-	-	+	+	1	17

Tab. 3.8: Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten

Banden	Anzahl positiv	Prozent positiv
48kDa	1	17%
66kDa	2	33%
35kDa	1	17%
52 kDa	0	0%

3.6 Verlaufsuntersuchungen

Von einigen AIH-Patienten standen mehrere Seren im Verlauf der Erkrankung zur Verfügung. In Abb. 3.12 ist der Verlauf der Antikörperreaktionen gegenüber verschiedenen Proteinen des 1.14 Gradienten bei einem Patienten mit AIH III dargestellt.

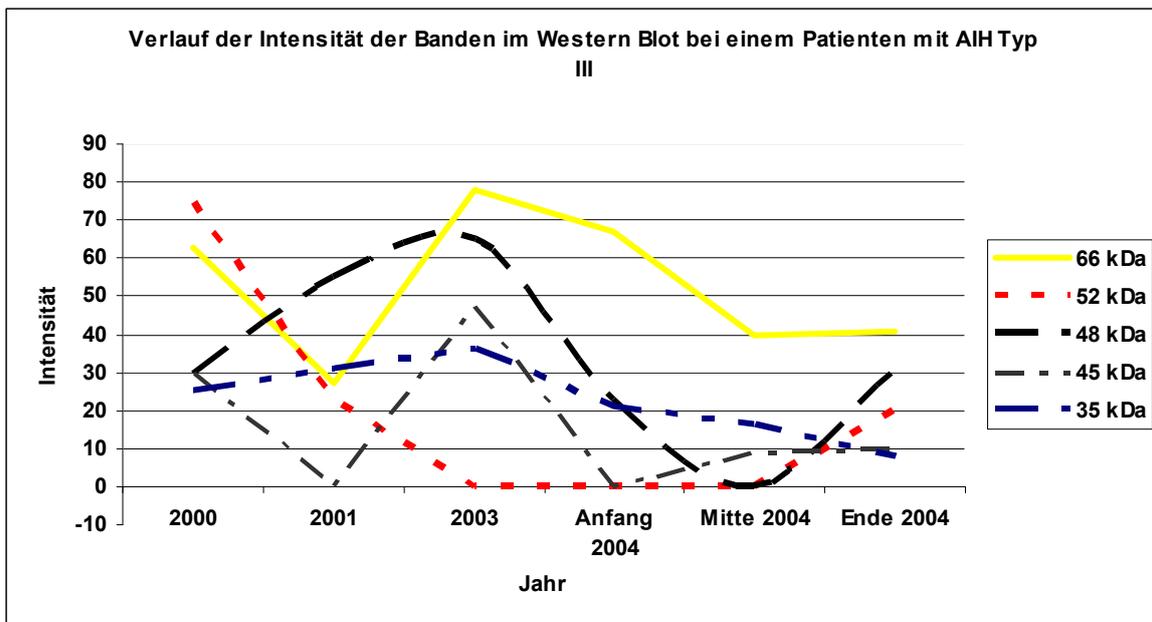


Abb. 3.12: Verlauf der Antikörperreaktionen gegenüber verschiedenen Proteinen in dem 1.14 Gradienten im Westernblot bei einem Patienten mit AIH III über 4 Jahre

Sechs Seren des Patienten standen im Zeitraum 2000 bis Ende 2004 zur Verfügung. Die Reaktionsmuster im Westernblot wurden mit dem gleichen computergestützten System (Lab image, Kapelan GmbH, Cut Off Wert bei einer Intensität von 30), ausgewertet. Initial hatte der Patient hochtitrige Antikörper gegen die LP/SLA-spezifische 52 kDa Determinante. Die 48 kDa Bande war im Jahr 2000 noch nicht als positiv zu werten. Zusätzlich war eine Reaktion des Serums mit der 66kDa Determinante zu beobachten. Im Jahre 2001 änderte sich das Reaktionsmuster, Die Reaktion mit der 48kDa Bande nahm zu, während die mit der 52 und 66 kDa Bande schwächer bzw. negativ wurde. Im Jahre 2003 waren zusätzliche Reaktionen im Bereich 66 kDa, 45 kDa und 35 kDa nachweisbar. Die 52 kDa Reaktion war weiterhin negativ. Die nächste

Untersuchung wurde unter einer immunsuppressiven Therapie (Steroide plus Azathioprin) durchgeführt. Mit allen Determinanten außer der 66kDa Bande fielen die Reaktionen auf Werte unterhalb des Intensitätsbereiches von 30 ab.

3.7 Ergebnisse der Immunpräzipitation

Nach Auswertung der Reaktionsmuster der Seren gegen das 1.14-Gradientenantigen wurde - wie eingangs beschrieben – versucht, das Antigengemisch weiter aufzureinigen. Die Elektroelution von ausgeschnittenen Banden im Coomassie-Gel war wie in Abb. 3.2 gezeigt nicht erfolgreich. Als alternative Strategie wurde daher versucht, die 66 kDa Bande mit Hilfe der Immunpräzipitation weiter aufzureinigen. Dazu wurde ein Serum ausgewählt, welches stark mit der 66 kDa Determinante reagierte ohne dabei weitere Reaktionsmuster im Westernblot zu zeigen (Abb. 3.13).

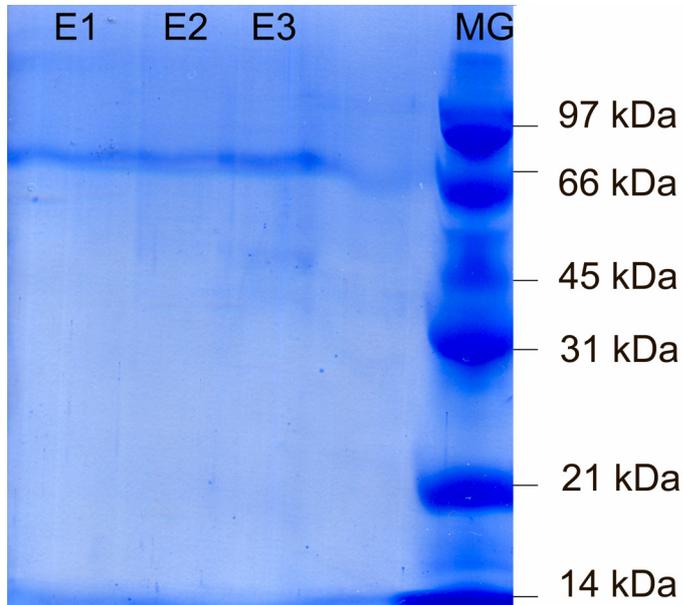


Abb. 3.13: Nachweis einer Reaktion bei 66 kDa im Westernblot unter Verwendung des 1,14 Gradienten mit einem hochpositiven Serum aus der Gruppe B (hochgradiger Verdacht auf AIH n=27). Das Serum zeigt eine isolierte starke Reaktion gegen die 66 kDa Determinante.

Aus dem hochpositiven Serum (Vergleiche Abb. 3.13) wurden mithilfe des Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit die IgG-Globuline isoliert und diese mit dem passenden Immunpräzipitationskit Seize® X Protein G Immunoprecipitation Kit an eine Säule gebunden. Über diese Säule wurde nach dem entsprechenden Protokoll eine verdünnte Probe des 1,14-Gradientens gegeben und das gebundene Antigen durch drei Waschschriffe (E1-E3) wieder entfernt. Diese Eluate E1-E3 wurden anschließend im Westernblot ausgetestet. In der Abbildung 3.14 sind die entsprechenden Ergebnisse im Coomassie-Gel bzw. im Westernblot dargestellt.

A.

Darstellung des von der Säule eluierten 66kDa Antigens im Gel mit Hilfe der Coomassie-Färbung.



B.

Darstellung der gleichen Bande in der entsprechenden Westernblot Reaktion.



Abb. 3.14: Ergebnisse der Immunpräzipitation mit einem AIH-Serum mit Antikörpern gegen die 66 kDa Determinante . E1-E3 sind die Eluationsfraktionen der Säule. MG = Molekulargewichtsmarker

Die in der Abb. 3.14 A. dargestellte 66 kDa Bande wurde mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Untersuchung unterworfen (s.u.).

3.8 Massenspektrometrische Untersuchungen der verschiedenen Antigen determinanten

Die Reaktionen im Immunoblot des Gradientenantigens der Fraktion 1,14 (Abb. 3.8) wurden den entsprechenden Determinanten im Coomassie-Gel zugeordnet. Die Banden wurden wie für die Elektroelution mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die in der Abb. 3.14 gezeigte Reaktion gegen eine mithilfe der Immunpräzipitation aufgereinigten für die 66 kDa Determinante spezifischen Antigenfraktion wurde ebenfalls aus dem Coomassie-Gel mit dem Skalpell

ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden dann zur MALDI-TOF Analyse eingeschickt. Leider konnten aus keiner der ausgeschnittenen Banden - weder aus dem 1,14-Gradienten-Ansatz noch aus dem Immunpräzipitationsansatz - verwertbare Aminosäuresequenzen abgeleitet werden.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind zusammenfassend nochmals in Tab. 3.9. dargestellt. Antikörper gegen die ‚neuen‘ Determinanten bei 66 kDa, 48 kDa und 35 kDa kommen vor allem bei Patienten mit AIH Typ III (Anti-LP/SLA-Reaktion bei 52k kDa im Western Blot) und bei Patienten, bei denen ein hochgradiger Verdacht auf eine autoimmune Hepatitis besteht vor. Seren von Patienten mit AIH Typ I zeigen sehr selten Reaktionen gegen die beschriebenen Banden im Western Blot, Seren von gesunden Kontrollen sind negativ. Ein Patient mit PBC hat Antikörper gegen die 66 kDa Determinante, ein zweiter gegen die Proteine bei 66 kDa, 60 kDa, 52 kDa, 48 kDa, 45 kDa und 35 kDa. Bei beiden Patienten liegt klinisch/histologisch mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Overlap-Syndrom PBC/AIH vor (erhöhte Gammaglobuline, ANA, Anti-SMA-, Anti-LP/SLA, Anti-M2, Anti-M4 positiv).

Tab. 3.9: Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Reaktionen gegenüber der 1.14 Gradientenfraction im Westernblot bei Patienten mit AIH, PBC und gesunden Probanden.

	Anzahl Patienten getestet	Reaktionen mit Antigen determinanten bei				
		66 kDa	52 kDa	48 kDa	52 kDa + 48kDa	35 kDa
		Häufigkeit in Prozent				
AIH Typ I	58	8,6	0	0	0	3,5
AIH Typ III	11	45	100	45	45	55
v.a. AIH	27	81	0	37	0	37
PBC	6	33	0	0	0	16,7
Gesunde	35	0	0	0	0	0

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden neue Antigen-Antikörpersysteme beschrieben, die sich im Westernblot unter Verwendung eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber nachweisen lassen und insbesondere eine Subgruppe von Patienten zu charakterisieren scheinen, die alle klinischen/histologischen/laborchemischen Kriterien einer AIH erfüllen, bei denen aber die bisher bekannten Autoantikörper fehlen. Ausgangspunkt war, dass bei einigen Patienten mit einer klassischen AIH III im Westernblot bei routinemäßigen Testungen neben der Anti-LP/SLA spezifischen Reaktion bei 52 kDa, zusätzliche Determinanten mit unterschiedlichen Molekulargewichten beobachtet worden waren. Bei Nachtestung dieser Patienten konnten jetzt vor allem Proteine mit Molekulargewichten von 48 kDa, 66 kDa und 35 kDa als Targetantigene identifiziert werden. Dieselben Proteine wurden von Seren von Patienten mit der oben genannten ‚atypischen‘ AIH in bis zu 81% erkannt, so dass es sich hierbei möglicherweise um neue diagnostische Marker für eine AIH handeln könnte.

4.1 Diskussion der Methodik

Alle in dieser Arbeit angewendeten immunologischen Verfahren wie ELISA, Gelelektrophorese und Westernblot wurden nach Protokollen durchgeführt, die seit Jahren in der Routinediagnostik des Immunpathologischen Labors Tübingen angewendet werden. Bei anderen Methoden wie Elektroelution, Lyophilisierung, Immunpräzipitation wurde streng nach den Herstellerangaben der verwendeten Geräte bzw. Kits gearbeitet. Die Ergebnisse der Elektroelution waren nicht zu verwerten. Trotz einer Antigenkonzentrierung durch Lyophilisierung war die Proteinkonzentration bei Messungen nach Bradford zu gering. Ebenso stellten sich in der Gelelektrophorese keine ausreichend gefärbten bzw. scharfen Banden in der Coomassie-Färbung dar (Siehe Abbildung 3.4). Die massenspektrometrischen-Analysen verschiedenster Proben ergaben aus unbekanntem Gründen keine verwertbaren Aminosäuresequenzen.

Die Austestung der verschiedenen Fraktionen 1,04–1,28 des Gradientenantigens, der elektroeluierten Banden aus Gelen mit dem Antigen Cytoplasmaextrakt und das Antigen „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ im Elisa lieferten keine verwertbaren Ergebnisse. Es zeigte sich eine sehr große Streubreite der Grenzwerte sowie der positiven Reaktionen. Insbesondere gab es auch keine Korrelation mit den im Western Blot beobachteten und dort sehr gut reproduzierbaren Reaktionen. Es kann daher angenommen werden, dass die oben verwendeten Antigene sich nicht für den Nachweis von Antikörpern gegen die 66 kDa, 60 kDa, 52 kDa, 48kDa, 45kDa und 35 kDa Proteine im ELISA eignen. Bei den elektroeluierten Antigenen könnten - wie bereits im Falle der Gelelektrophorese bzw. im Western Blot beschrieben - die niedrigen Antigenkonzentrationen der Proben für die große Streubreite bzw. die fehlerhafte Korrelation von positiven Reaktionen verantwortlich sein. Eventuell könnten durch eine weiter aufgereinigte Form des Zielantigens reproduzierbare Ergebnisse im ELISA geliefert werden. Darüber hinaus kann spekuliert werden, dass es sich bei den antigenen Epitopen der neu beobachteten Reaktionen um lineare Antigene handelt. Das würde bedeuten, dass die Epitope im Western Blot durch die entsprechende Auftrennung für eine Antigen-Antikörper-Bindung zur Verfügung stehen, im Elisa aber, bedingt durch die weitere Faltung in eine Sekundär oder Tertiärstruktur, nicht für Antikörper erreichbar sind.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Auswahl des Gradientenantigens

Zur weiteren Aufreinigung des Proteingemisches „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ (100 000g Überstand ^{12,41,96,128} wurde die Sucroedichtegradientenzentrifugation eingesetzt (vgl. Kap. 3.12). In der ausgewählten 1,14 Fraktion des Gradientenantigen zeigten sich die bekannten Reaktionen bei 52 kDa (100 % der Fälle) und 48 kDa (45% der Fälle), sowie neue Reaktionsmuster gegen die wesentlichen ‚neuen‘ Determinanten bei 66 kDa und 35 kDa.

4.2.2 Häufigkeit der neuen Determinanten

Elf Anti-LP/SLA Seren wurden gegen den 1,14 Gradienten im Westernblot ausgetestet. Die Reaktionsmuster wurden mithilfe des Computerprogramms LabImage der Firma Kapelan vermessen (vgl. Kap 2.3.10). Als positiv wurden Reaktionen gewertet deren Intensität über einem entsprechenden Referenzwert lag, der sich aus schwachen Reaktionen der Kontrollgruppen ergab (vgl. Abb. 3.9 und Kap. 3.1.4). Die 66 kDa Bande fand sich bei 45% aller Anti-LP/SLA Seren. Die 35 kDa Determinante trat bei 55% auf. Als weitere Gruppe wurden Patienten getestet, bei denen klinisch/laborchemisch der hochgradige Verdacht auf eine autoimmune Hepatitis bestand (vgl. Kap. 2.1.2). Die Seren zeigten keine Reaktionen im Bereich der 52 kDa Bande und waren somit als Anti-LP/SLA negativ einzustufen. In dieser Gruppe (n=27) kamen Reaktionen gegen die 66 kDa Bande in 81% der Fälle vor, die 48 kDa Determinante reagierte mit einer Häufigkeit von 37%, die 35 kDa Bande stellte sich ebenfalls in 37% der Fälle positiv dar.

4.2.3 Nachweis der 66 kDa Reaktion durch Immunpräzipitation

Da die Aufreinigung der untersuchten Antigene durch die Elektroelution wie eingangs beschrieben nicht gelang, wurde eine Immunpräzipitation zur Isolierung des 66 kDa Proteins durchgeführt mit Hilfe eines Anti-66kDa positiven AIH-Serums.

Der Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten Kits bestand darin, dass der verwendete Antikörper kovalent an die Protein G Sepharose in der Säule gebunden wird. Somit kommt es zu keiner Verunreinigung des gewonnenen Antigens durch Immunglobuline. Da in dieser Arbeit weder der Antikörper noch das Antigen bekannt sind, war die Durchführung der Immunpräzipitation entsprechend erschwert. Es konnten mit dem Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit der Firma Pierce jedoch die Immunglobuline vom Typ IgG des Serums isoliert werden. Diese wurden dann mit dem zweiten Kit an die Immunpräzipitationssäule gebunden. Als Antigen wurde der Gradient 1,14 verwendet. Das von der Säule eluierte Antigen konnte nach erneuter Elektrophorese mittels Coomassie-Färbung bei 66 kDa sichtbar gemacht

werden. Auch nach Transfer auf Nitrozellulose-Sheets konnte mit anti-66kDa positiven Seren die entsprechende Reaktion nachgewiesen werden. Die Abwesenheit anderer Reaktionsmuster des Serums, sowie anderer Banden in der Coomassie-Färbung ließ den Schluss zu, dass die 66 kDa Bande spezifisch isoliert wurde.

4.2.4 Massenspektrometrische Analyse

Die Identifizierung von Zielantigenen durch eine entsprechende Sequenzierung der Banden war bisher leider nicht möglich. Weder direkt ausgeschnittene Determinanten aus Gelen, die durch den Einsatz von Cytoplasmaextrakt der Rattenleber bzw. des 1.14 Gradienten gewonnen worden waren, noch das mittels Immunpräzipitation gewonnene Antigen lieferten - trotz scharfer Banden in der Elektrophorese – verwertbare Ergebnisse in der Massenspektrometrie. Es wurde von der ausführenden Arbeitsgruppe vermutet, dass eventuell das Gel-zu-Protein-Verhältnis aufgrund der Dicke der Gele mit langer Laufstrecke die Reaktion stören könnte. Allerdings lieferte auch die direkt ausgeschnittene Bande aus der Immunpräzipitation keine Ergebnisse in der MALDI-TOF Analyse obwohl hierfür ein Standardsystem zur Gelelektrophorese angewendet wurde (Gele mit kurzer Laufstrecke, Bio Rad System). Letztlich bleibt unklar, warum in den Proben keine Aminosäuresequenzen identifiziert werden konnten.

4.3 Vergleich der beobachteten Antikörperreaktionen mit bereits publizierten Daten

4.3.1 Asialoglycoproteinrezeptor Protein (ASGPR) als Bestandteil von LSP einer Membranfraktion der Leber

1971 isolierte die Arbeitsgruppe von Meyer zum Büschenfelde erstmals eine Antigenfraktion der Leber, die Membranbestandteile enthielt, mit der Seren von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen reagierten. Ausgangsmaterial war ein löslicher 150 000g Überstand aus humanem Lebergewebe^{62,102}. Die Methode wurde 1976 von McFarlane weiterentwickelt unter Verwendung eines 105 000g Überstandes aus humanem Lebergewebe¹⁰¹.

Später konnte gezeigt werden, dass eines der Targetantigene in dieser LSP-Fraktion das Asialo-Glycoprotein-Rezeptor-Protein war; dieses Antigen war spezies-unspezifisch ¹⁰⁰.

Dieses Protein von 45 kDa im Westernblot wurde aber nicht nur von Seren von Patienten mit AIH erkannt, sondern auch von Seren von PBC-Patienten ¹⁶⁰.

Hubbard et al stellten 1983 eine Methode vor, mit der es möglich war, die Plasmamembranfraktion aus Hepatozyten der Rattenleber anzureichern. Die Autoren beschrieben eine Fraktion, die durch die Anreicherung von drei Plasmamembranmarkern (5'Nucleotidase, Alkalische Phosphodiesterase, ASGPR) charakterisiert war ⁶⁴.

4.3.2 Autoantikörper gegen Membranfraktionen der Leber bei Patienten mit AIH Typ I

Swansons et al. beschrieben 1990 eine Reaktion von Seren mit ANA positiver AIH Typ I mit Proteinen in einer Membranfraktion aus humanem Lebergewebe bzw. gegen Lebergewebe der Maus mit einem Molekulargewicht von 66 kDa, 60 kDa, und 45 kDa. Die 45 kDa Reaktion wurde allerdings auch bei gesunden Probanden nachgewiesen. Die Western Blots der AIH Seren gegen humanes Lebergewebe und Aktin zeigten die gleiche Determinante bei 45 kDa. Es wurde daher das Vorkommen von „natürlichen Anti-Aktin-Autoantikörpern“ vermutet ¹³³. In einer neueren Untersuchung von Tahiri et al ¹³⁴ wurde nach der Methode von Hubbard et al ⁶⁴ aus der Rattenleber eine Plasmamembranfraktion extrahiert. Aufgrund der eingangs gemachten Überlegungen besteht die Möglichkeit, dass die isolierten Proteine der Plasmamembranfraktion auch im 100 000g Überstand der Rattenleber zu finden sind. In der Untersuchung wurden Determinanten im Bereich von 95 kDa, 70 kDa, 62 kDa, 52kDa, 50 kDa, 48 kDa und 38 kDa gefunden. Diese ähneln den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reaktionsmustern. Die Autoren konnten über eine MALDI-TOF-Analyse der genannten Determinanten für die 52 kDa Bande und die 48 kDa Bande als Zielantigen Cytokeratin 8 (Swiss Prot Entry: Q80WH8_9MURI Primary accession number Q80WH8) bzw. Cytokeratin 18 (Swiss Prot Entry: P97598_RAT Primary accession number P97598) identifizieren ¹³⁴. Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18 wurden 1990 schon einmal als Zielantigen einer Reaktion

gegen eine 52 kDa bzw. 48 kDa Bande im Western Blot beschrieben¹⁵¹. Damals wurde angenommen, dass Cytokeratin 8 bzw. Cytokeratin 18 das Targetantigen der Anti-LP/SLA Antikörper sei. Diese Annahme wurde 1993 durch Stechenmesser et al und im Jahre 2000 durch Wies et al. widerlegt^{128, 157}. Im Rahmen der Untersuchungen von Wies et al an knock out Mäusen gelang es der Arbeitsgruppe, das Targetantigen der Anti-LP/SLA Antikörper als UGA-suppressor transfer RNA-associated Protein zu identifizieren. Der Nachweis von Cytokeratin 8 und 18 durch Banden in Höhe von 52 kDa und 48 kDa bei Patienten mit AIH Typ I im Western Blot gegen eine Membranfraktion der Rattenleber, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass der 100 000g Überstand gleiche Proteine enthält wie die von Tahiri et al. verwendete Fraktion^{64, 134}.

Das Protein im Bereich 62 kDa wurde von Tahiri et al. als Epitop des Hitze Schock Protein 60 (HSP 60, Swiss prot Entry: CH60_RAT Primary accession number P63039) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 60,9 kDa identifiziert. Das Protein im Bereich 38 kDa, als „Leber Arginase“ (Swiss Prot Entry: ARG11_RAT Primary accession number P07824) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 35 kDa und das Protein bei 70 kDa als Hitze Schock Protein 70 (ähnlich dem HSP 70 der Maus, Swiss Prot Entry: HSP7C_MOUSE Primary accession number P63017). Die 95 kDa Reaktion wurde als Hitze Schock Protein 90 (HSP 90 der Maus, Swiss Prot Entry: Q91V38_MOUSE Primary accession number Q91V38) und als ‚unnamed protein product‘, welches zu 99 % mit dem Valosin-containing Protein (VCP Swiss Prot Entry: TERA_MOUSE Primary accession number Q01853) übereinstimmt, beschrieben. Allerdings handelt es sich bei Antikörpern gegen Hitzeschockproteine um natürlich vorkommende Antikörper, die nicht spezifisch sind für die AIH und bei einer Reihe von anderen Erkrankungen vorkommen. Insofern dürfte es sich bei Tahiri et al um andere Antigene handeln, als bei den in dieser Arbeit beschriebenen Proteinen, gegen die ausschließlich bei AIH-Patienten Autoantikörper zu beobachten waren, zumal das Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Antigene unterschiedlich war (Plasmamembranfraktion vs. 100 000g Überstand aus Rattenleber nach Entfernung der Plasmamembranen

4.3.3 Autoantikörper gegen ein rekombinantes SLA-Protein (SLA-p35)

Volkman et al. isolierten im Jahre 2001 ein rekombinantes 35 kDa Protein, welches sie zuvor durch das Screenen einer humanen Leber cDNA Bank als Untereinheit des LP/SLA-Antigens (UGA-suppressor transfer RNA (tRNA)-associated protein (tRNP(Ser)Sec) Protein,¹⁵⁷ identifiziert hatten¹⁵⁰. 75–85 % der Anti-LP/SLA-Seren zeigten Reaktionen gegen dieses p-35 Protein.

4.3.4 Auftreten von neuen Banden im Western Blot von Anti-LP/SLA-Seren mit einem 100 000g Überstand der Rattenleber

In einer Publikation aus dem Jahre 2003 wurde einem Ansatz nachgegangen, der dem dieser Arbeit ähnelt. Ballot et al. testeten Seren von 44 Patienten mit Anti-LP/SLA positiver autoimmuner Hepatitis (AIH III) gegen einen 100 000g Überstand der Rattenleber⁹. Neunundzwanzig Prozent dieser Seren reagierten mit einem Antigen im Bereich von 58 kDa, 68 % mit einem 50 kDa und 9 % mit einem 42 kDa Protein. Ebenfalls 29 % der AIH III-Seren reagierten mit einer Determinante im Bereich von 35 kDa und 36 % mit einer Bande zwischen 25 und 27 kDa. In dieser Publikation konnten also zwei Reaktionen (bei ca. 60 kDa und 35 kDa), die auch in der hier vorgelegten Arbeit beobachtet wurden, bei Patienten mit AIH Typ III identifiziert werden.

In der hier vorgelegten Arbeit kam die Reaktion mit einer Determinante im Bereich 60 kDa bei 9% und mit der Determinante bei 35 kDa bei 36% der 11 Patienten mit AIH Typ III vor. Die Häufigkeitsverteilungen gegen diese zwei Banden lassen sich aufgrund verschiedener Faktoren nicht direkt vergleichen. In der Studie von Ballot et al. wurde als Antigen der 100 000g Überstand der Rattenleber eingesetzt (Vergleiche Abschnitt 2.3.1). In der hier vorgelegten Arbeit wurde der 100 000g Überstand nur zum Screening und zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der neuen Banden eingesetzt. Die Ergebnisse beruhen auf einer Austestung gegen die 1,14 Fraktion des Gradientenantigens. Die Reaktion im Bereich von 60 kDa kommt bei Anti-LP/SLA-Seren die gegen die 1,14-Antigenfraktion des Gradientenantigens getestet werden seltener vor, als bei Anti-LP/SLA-Seren die gegen einen 100 000g Überstand der Rattenleber („Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“) getestet werden. Die Reaktionen im

Bereich von 35 kDa die in der hier vorgelegten Arbeit beschrieben wurden, richten sich gegen einen Bereich von ca. 30 bis 40 kDa (Vergleiche Abschnitt 3.1.3). Die 35 kDa Determinante kommt daher in dieser Arbeit, im Gegensatz zu der Publikation von Ballot et al., häufiger vor.

Ballot et al. konnten verschiedene Zielantigene der beobachteten Reaktionen durch eine MALDI-TOF-Analyse identifizieren. Das 60 kDa Protein wurde als Catalase (Swiss Prot Entry: CATA_RAT Primary accession number P04762) identifiziert, das 35 kDa Protein als HAST-1 (Sulfotransferase, Swiss Prot Entry: ST1C1_RAT Primary accession number P50237).

Zusätzlich wurde eine Reaktion im Bereich von 50 kDa beobachtet, welche als alpha-Enolase (Swiss Prot Entry: ENOA_RAT Primary accession number P04764) identifiziert wurde.

Die drei Arbeiten von Tahiri et al. 2008, Volkmann et al. 2001 und Ballot et al. 2003 stellten jeweils bei Patienten mit AIH Typ I bzw. Patienten mit AIH Typ III Reaktionen gegen bisher nicht ausreichend klassifizierte Determinanten im Western Blot dar. Tahiri et al. verwendete in seiner Arbeit eine Membranfraktion der Rattenleber als Antigen zur Austestung von Patienten Seren mit AIH Typ I, die auch Anti-LP/SLA-Antikörper enthielten¹³⁴. Unter Annahme der im Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2 gemachten Überlegungen, dass das Antigengemisch „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“^{12,41} Proteine aus dem Antigengemisch „Membranfraktion der Rattenleber“⁶⁴ enthalten könnte bzw. unter der Annahme, dass eine isolierte Membranfraktion der Rattenleber gegebenenfalls durch andere hepatische Zellorganellen verunreinigt sein könnte, können die gefundenen Reaktionen mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Bezug gesetzt werden. Weitere Hinweise darauf ergeben sich aus den in der Publikation von Tahiri et al. beschriebenen Zielantigenen. Die Reaktionen im Bereich 52 kDa, 50 kDa und 48 kDa, welche als Cytokeratin 8 und 18 identifiziert wurden, sind in der Vergangenheit schon einmal bei Patienten mit AIH Typ III, die gegen einen 100 000g Überstand der Rattenleber ausgetestet wurden, beschrieben worden¹⁵¹. Andere identifizierte Proteine wie die Leber Arginase und die Hitze Schock Proteine sind bisher noch nicht als Membran-Assoziiert beschrieben worden,

was für eine eventuelle Verunreinigung der verwendeten Membranfraktion durch Antigene aus anderen Zellkompartimenten sprechen könnte.

Es könnte sich daher bei der von Tahiri et al. beschriebenen 70 kDa (HSP 70) Bande um die in dieser Arbeit beschriebene 66 kDa Reaktion handeln. Die von Tahiri et al. dargestellte 60 kDa (HSP 60) Bande könnte mit der in dieser Arbeit beschriebenen 60 kDa Reaktion übereinstimmen.

Das von Volkmann et al. gegen Anti-LP/SLA-Seren eingesetzte rekombinante SLA-p35 Protein könnte darauf hinweisen, dass sich ein weiteres Epitop des LP/SLA-Antigens, welches von Wies et al. im Jahre 2000 identifiziert wurde, in einer Reaktion gegen eine 35 kDa Bande findet. Dies wäre dann neben der von Wies et al. identifizierten 52 kDa Reaktion und der von Stechemesser et al. beschriebenen Reaktion gegen eine 48 kDa Bande, eine dritte Reaktion von Anti-LP/SLA-Seren im Western Blot ^{128,150,157}.

Die Ergebnisse von Ballot et al., welche am besten mit der hier vorgelegten Arbeit aufgrund des ähnlichen Ausgangsantigens verglichen werden können, stimmen mit den beschriebenen Banden in Höhe von 60 kDa, 35 kDa überein ⁹. Das Zielantigen für die 60 kDa Determinante, welches Ballot et al. als das Enzym Catalase identifizieren konnte, steht damit im Widerspruch zu dem Zielantigen HSP 60 welches in der Arbeit von Tahiri et al. für die 60 kDa Bande beschrieben wurde. Für die 35 kDa Bande, welche weder in der Arbeit von Tahiri et al., noch in der Arbeit von Ballot et al. beschrieben wurde, stimmen die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse ebenfalls nicht überein. Ballot et al. beschreiben in ihrer Arbeit neben den identifizierten Banden eine weitere Determinante die sich über einen Bereich von 25 kDa bis 27 kDa zu ziehen scheint. Eventuell ist die Reaktion, welche für die Anti-LP/SLA-Seren mit einer Häufigkeit von 36 % angegeben wurde, Bestandteil der 35 kDa Bande aus dieser Arbeit (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Im Widerspruch dazu stehen aber die Reaktionen der Patienten mit AIH Typ I bzw. die Reaktionen der gesunden Probanden gegen die 35 kDa Bande. In der hier vorgelegten Arbeit reagierten aus der Gruppe C 3,5 % der Seren mit der 35 kDa Determinante. Es zeigten sich in der Gruppe der gesunden Blutspender überhaupt keine Reaktionen in

diesem Bereich. Bei Ballot et al. reagierten 21 % der Kontrollgruppe mit einer Bande im Bereich 25 kDa bis 27 kDa im Western Blot.

Tahiri et al. identifizierten als Zielantigen für die 35 kDa Reaktion ein Leberenzym, die Leber Arginase. Ballot et al. identifizierten ebenfalls ein hepatisches Enzym, die Sulfotransferase (HAST1). Beides sind Enzyme die im Zytoplasma der Leber vorkommen. Es könnte daher sein, dass diese hepatischen Enzyme in dem Reaktionsbereich auf Höhe von 35 kDa im Western Blot enthalten sind.

In der Zwischenzeit konnte aber ausgeschlossen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Seren von Patienten mit hochgradigem Verdacht auf AIH mit einem der von Ballot et al postulierten Antigen reagieren, da die Verwendung der entsprechenden (kommerziell erhältlichen) rekombinanten Antigene im ELISA keine Korrelation mit den im Westernblot beobachteten Reaktionen ergab (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Reinhild Klein).

4.4 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Ein wichtiges Ziel weiterer Arbeiten ist die Identifizierung der in der hier vorgelegten Arbeit beschriebenen Antigene auf molekularer Ebene, um spezifischere Antigene einsetzen zu können. Dies könnte über weitere Aufreinigungen der Antigene, z.B. über Säulenchromatographie oder nochmalige Immunpräzipitation und nachfolgende massenspektrometrische Untersuchungen möglich sein. Auch der Einsatz einer 2D-Elektrophorese könnte weiterführen.

Wichtig ist aber auch die Überprüfung der Spezifität der entsprechenden Reaktionen im Westernblot oder mit spezifischen Antigenen für die autoimmune Hepatitis anhand zusätzlicher Tests bei einer größeren Anzahl an Patienten mit autoimmuner Hepatitis, weiteren autoimmunen Lebererkrankungen wie PBC und PSC, sowie weiteren autoimmunen Erkrankungen und gesunden Probanden. Gerade die Anti-66 kDa Antikörper könnten dann möglicherweise zur Definition einer neuen Subgruppe einer AIH beitragen.

Im Abschnitt 3 ist die Verlaufsbeobachtung eines Patienten mit AIH Typ III, bei dem mehrere Messungen der neuen Determinanten durchgeführt wurden (Vergleiche Abbildung 3.20) dargestellt. Die Persistenz der 66 kDa Reaktion auch unter immunsuppressiver Therapie, könnte - sollte sich die Reaktion in größeren Kollektiven verifizieren lassen - ein Marker für immunsuppressiv anbehandelte Patienten darstellen.

Mit Hilfe der ‚neuen‘ Determinanten mit ihren entsprechenden Reaktionen im Western Blot könnte daher künftig eine Subgruppe von Patienten mit chronischer Lebererkrankung unklarer Genese (kryptogen) eventuell als „autoimmun“ klassifiziert werden.

5 Abbildungen und Tabellen

5.1 Abbildungen

Abb. 1.1:	Einteilung der AIH in drei Subgruppen und Häufigkeiten der typischen Autoantikörper. Nach Klein 1998 ⁷⁹ , Stechemesser 1993 ¹²⁸	12
Abb. 2.1:	Darstellung des Antigens „Cytoplasmaextrakt der Rattenleber“ 12,41,96,128 , , ,	26
Abb. 3.1:	Reaktion von Patientenseren mit AIH Typ III (n=11) und Patientenseren mit hochgradigem Verdacht auf AIH (n=27) im Westernblot mit einem 100 000g Proteinüberstandes aus der Rattenleber (Beispiele anhand von 16 Patienten (Nr. 4-19); und Seren von gesunden Kontrollen (Nr. 20-22), Coomassie-Färbung (Nr.1 Molekulargewichtsmarker, Nr.2 Gradient 1,14, Nr. 3 Cytoplasmaextrakt).....	33
Abb. 3.2:	Coomassie-Färbung einer Gelelektrophorese mit dem Antigen.....	34
Abb. 3.3:	Elektrophorese mit den eluierten Banden bei 66, 60, 48 und 35 kDa (s. Abb. 3.2.).....	35
Abb. 3.4:	Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfractionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Western Blot.....	36
Abb. 3.5:	Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfractionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Western Blot.....	37
Abb. 3.6:	Reaktionsmuster eines Anti-LP/SLA positiven Serums mit den Sucrose-Gradientenfractionen 1.04-1.28 eines 100.000 g Überstandes aus Rattenleber im Western Blot.....	38
Abb. 3.7:	Elektrophoresemuster des Antigens „100 000 g Überstand der Rattenleber (Cytoplasmaextrakt der Rattenleber = CPE) im Vergleich zum Antigen „Gradientenantigen Fraktion 1,14“ bzw. „Fraktion 1,04 – 1,28“. Markiert sind die beiden Determinanten 66	

	kDa und 60 kDa, welche als Proteinbanden im Western Blot (Coomasiefärbung) anhand der Reaktion mit Patientenseren im entsprechenden Sheet (Immunoblot) ausfindig gemacht wurden (vergleiche Abb. 3.1 und Abb. 3.8)	39
Abb. 3.8:	Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A und B sowie von gesunden Kontrollen mit dem 1,14 Gradienten im Westernblot	40
Abb. 3.9:	Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A-C sowie von gesunden Kontrollen mit dem 1,14 Gradienten im Westernblot	42
Abb. 3.10	Analyse von Seren von Patienten mit AIH (Gruppe A-C) im Westernblot unter Verwendung des 1.14 Gradienten. Dargestellt sind die Häufigkeiten positiver Reaktionen in Prozent.....	44
Abb. 3.11:	Analyse von Seren von Patienten mit PBC und gesunden Kontrollen im Westernblot unter Verwendung des 1.14 Gradienten. Dargestellt sind die Häufigkeiten positiver Reaktionen in Prozent.....	46
Abb. 3.12:	Verlauf der Antikörperreaktionen gegenüber verschiedenen Proteinen in dem 1.14 Gradienten im Westernblot bei einem Patienten mit AIH III über 4 Jahre.....	51
Abb. 3.13:	Nachweis einer Reaktion bei 66 kDa im Westernblot unter Verwendung des 1,14 Gradienten mit einem hochpositiven Serum aus der Gruppe B (hochgradiger Verdacht auf AIH n=27). Das Serum zeigt eine isolierte starke Reaktion gegen die 66 kDa Determinante.....	53
Abb. 3.14:	Ergebnisse der Immunpräzipitation mit einem AIH-Serum mit Antikörpern	54
Tab. 1.1:	Score der „International Autoimmun Hepatitis Group“ von 1999 ⁽⁴⁾ Darstellung der diagnostischen Kriterien mit den entsprechenden Bewertungsfaktoren. Nach Erhebung der Befunde erfolgt eine Addition der Parameterpunktwerte. 10	70
Tab. 1.2:	Einteilung der AIH in drei durch den Nachweis von Antikörpern definierten Subtypen	11
Tab. 1.3:	Darstellung der verschiedenen LKM-Autoantikörper 15	70
Tab. 2.1:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe A 18.	70

Tab. 2.2:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe A 19.....	70
Tab. 2.3:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe B 19.	70
Tab. 2.4:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe B (n=27). 19	70
Tab. 2.5:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe C 20	70
Tab. 2.6:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe C 20	70
Tab. 2.7:	Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe mit PBC. 20	70
Tab. 2.8:	Alters- und Geschlechtsverteilung einer gesunden Kontrollgruppe (n=35). 21	70
Tab. 2.9:	Spezifische Gewichte von wässrigen Saccharose-Lösungen (4°C), (Nach Lange, N.A. (Hrsg.), Handbook of Chemistry, Sandusky (1956); und Hodgman et al. (Hrsg.), Handbook of Chemistry and Physics, 1958/59, 40.Aufl., Cleveland (1958). 28	70
Tab. 3.1:	Gruppe A, Patienten mit AIH Typ III (n = 11). 49.....	70
Tab. 3.2:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A (n=11) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten 50	70
Tab. 3.3:	Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit dem 1.14 Gradienten 50.....	70
Tab. 3.4:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten 51	70
Tab. 3.5:	Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit dem 1.14 Gradienten 51	70
Tab. 3.6:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten 52	70
Tab. 3.7:	Reaktionsmuster von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit dem 1.14 Gradienten 52.....	71
Tab. 3.8:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten 53.....	71
Tab. 3.9:	Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Reaktionen gegenüber der 1.14 Gradientefraktion im Westernblot bei Patienten mit AIH, PBC und gesunden Probanden. 58	71

5.2 Tabellen

Tab. 1.1:	Score der „International Autoimmun Hepatitis Group“ von 1999 (⁴) Darstellung der diagnostischen Kriterien mit den entsprechenden Bewertungsfaktoren. Nach Erhebung der Befunde erfolgt eine Addition der Parameterpunktwerte.	10
Tab. 1.2:	Einteilung der AIH in drei durch den Nachweis von Antikörpern definierten Subtypen	11
Tab. 1.3:	Darstellung der verschiedenen LKM-Autoantikörper	15
Tab. 2.1:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe A.....	18
Tab. 2.2:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe A.....	19
Tab. 2.3:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe B.....	19
Tab. 2.4:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe B (n=27).....	19
Tab. 2.5:	Alters- und Geschlechtsverteilung bei Patienten der Gruppe C	20
Tab. 2.6:	Laborparameter bei Patienten der Gruppe C	20
Tab. 2.7:	Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe mit PBC.	20
Tab. 2.8:	Alters- und Geschlechtsverteilung einer gesunden Kontrollgruppe (n=35).....	21
Tab. 2.9:	Spezifische Gewichte von wässrigen Saccharose-Lösungen (4°C), (Nach Lange, N.A. (Hrsg.), Handbook of Chemistry, Sandusky (1956); und Hodgman et al. (Hrsg.), Handbook of Chemistry and Physics, 1958/59, 40. Aufl., Cleveland (1958).	27
Tab. 3.1:	Gruppe A, Patienten mit AIH Typ III (n = 11).....	46
Tab. 3.2:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe A (n=11) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten	47
Tab. 3.3:	Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit dem 1.14 Gradienten.....	47
Tab. 3.4:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe B (n=27) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten	48
Tab. 3.5:	Reaktionsmuster von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit dem 1.14 Gradienten.....	48
Tab. 3.6:	Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten der Gruppe C (n=58) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten	49

Tab. 3.7: Reaktionsmuster von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit dem 1.14 Gradienten.....	49
Tab. 3.8: Häufigkeit der Reaktionen von Seren von Patienten mit PBC (n=6) mit verschiedenen Proteinen im 1.14-Gradienten.....	50
Tab. 3.9: Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Reaktionen gegenüber der 1.14 Gradientefraktion im Westernblot bei Patienten mit AIH, PBC und gesunden Probanden.	55

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren waren im Immunpathologischen Labor bei Patienten mit AIH Typ III Antikörper aufgefallen, die im Westernblot mit dem 100 000g Überstand aus Rattenleber neben dem LP-Antigen weitere Proteine erkannten. Dieselben Reaktionsmuster wurden auch mit Seren von Patienten beobachtet, bei denen klinisch/histologisch/laborchemisch die typischen Kriterien einer AIH vorlagen, bei denen aber keiner der bisher bekannten AIH-relevanten Autoantikörper nachweisbar waren. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, diese Reaktionen besser zu klassifizieren und ihre Spezifität für die AIH zu überprüfen.

Zwei Patientengruppen wurden gebildet: Gruppe A (n=11) bestand aus Patienten mit AIH Typ III (n=11), die durch Autoantikörper gegen das LP/SLA-Antigen definiert wird (52 kDa Reaktion im Westernblot); Zu Gruppe B (n=27) gehörten Patienten mit klinisch/laborchemisch hochgradigem Verdacht auf AIH (Erhöhung von IgG-Globulinen, Ausschluss viraler und toxischer Ursachen, erhöhte Transaminasen [GPT > 20 U/l, GOT > 20 U/l]), aber keinem eindeutigen Nachweis von ANA, SMA/Anti-Aktin, Anti-LKM oder Anti-LP/SLA, sowie antimitochondrialen Autoantikörpern). Als Kontrollen wurden Seren von Patienten mit AIH Typ I (Gruppe C; n=58), PBC (n=6) und gesunden Blutspendern (n=35) analysiert. Die Seren wurden im Westernblot gegen einen 100 000g Überstand aus Rattenleber getestet. Dieser wurde zusätzlich über Sucroscichtgradientenzentrifugation weiter aufgetrennt.

Bei Verwendung des 100 000g Überstandes aus Rattenleber reagierten Seren der Patienten der Gruppen A und B häufig mit einer 66 kDa, einer 60 kDa, einer 48 kDa und einer 35 kDa Determinante. Über Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Akkumulation der 66kDa, der 48 kDa und der 35 kDa Proteine in der 1.14-Fraktion erzielt werden, die 60 kDa Determinante war dagegen kaum nachweisbar. 45 % der Seren der Gruppe A- und 81 % der Seren der Gruppe B-Patienten reagierten mit der 66 kDa Bande. In der Gruppe C kam die Reaktion in 8,6 % der Fälle vor. Gesunde Probanden zeigten keine signifikanten Reaktionen. Zusätzlich kamen in der Gruppe A (45% bzw. 55%) und der Gruppe B (37 % bzw. 37%) gehäuft Reaktionen im Bereich 48 kDa und

35 kDa vor. Das 66 kDa Protein wurde daraufhin mit einem hochpositivem Serum mithilfe der Immunpräzipitation gezielt isoliert. Trotz dieser verschiedenen Reinigungs- und Isolierungsschritte war es aber bisher nicht möglich, die relevanten Proteine mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass bei Patienten mit AIH Typ III neben den Anti-LP/SLA Antikörpern gegen das 52kDa Protein weitere Antikörper vorkommen, die insbesondere gegen Proteine bei 48, 66 und 35 kDa gerichtet sind. Da diese Antikörper auch in Seren von Patienten beobachtet werden konnten, die klinisch, histologisch und laborchemisch die typischen Kriterien einer AIH erfüllten aber negativ für die bisher bekannten Autoantikörper waren, erlauben sie möglicherweise die Definition einer weiteren Subgruppe einer autoimmunen Hepatitis und damit auch eine verbesserte Diagnostik. Die Identifizierung der Targetantigene auf molekularer Ebene steht noch aus, könnte aber zu einem verbesserten Verständnis der Ätiopathogenese der Erkrankung führen.

7 Literaturverzeichnis

1. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. May 1996;8(5):765-772.
2. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med*. Dec 30 1999;341(27):2068-2074.
3. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. Mar 5 1998;392(6671):86-89.
4. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. Nov 1999;31(5):929-938.
5. Angulo P, Batts KP, Therneau TM, Jorgensen RA, Dickson ER, Lindor KD. Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Mar 1999;29(3):644-647.
6. Angulo P, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. Jul 1999;30(1):325-332.
7. Angulo P, Maor-Kendler Y, Lindor KD. Small-duct primary sclerosing cholangitis: a long-term follow-up study. *Hepatology*. Jun 2002;35(6):1494-1500.
8. Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EL, Porta G, Nishioka M, Simon T, Daehrich C, Schlumberger W, Galle PR, Lohse AW. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut*. Aug 2002;51(2):259-264.
9. Ballot E, Bruneel A, Labas V, Johanet C. Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis. *Clin Chem*. Apr 2003;49(4):634-643.
10. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*. Dec 1995;19(12):1409-1417.
11. Berg CP, Stein GM, Keppeler H, Gregor M, Wesselborg S, Lauber K. Apoptosis-associated antigens recognized by autoantibodies in patients with the

autoimmune liver disease primary biliary cirrhosis. *Apoptosis*. Jan 2008;13(1):63-75.

12. Berg PA, Doniach D, Roitt IM. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes. *J Exp Med*. Aug 1 1967;126(2):277-290.

13. Berg PA, Klein R. [Autoimmune hepatitis and overlap syndrome: diagnosis]. *Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis = Revue suisse de médecine Praxis*. Aug 21 2002;91(34):1339-1346.

14. Berg PA SE, Strienz J. Hypergammaglobulinämische chronische aktive Hepatitis mit Nachweis von Leber-Pankreas-spezifischen komplementbindenden Autoantikörpern. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*. 1981 1981;87:921-927.

15. Bhathal PS, Powell LW. Primary intrahepatic obliterating cholangitis: a possible variant of 'sclerosing cholangitis'. *Gut*. Nov 1969;10(11):886-893.

16. Bianchi FB, Cassani F, Lenzi M, Ballardini G, Muratori L, Giostra F, Zauli D. Impact of international autoimmune hepatitis group scoring system in definition of autoimmune hepatitis. An Italian experience. *Dig Dis Sci*. Jan 1996;41(1):166-171.

17. Boberg KM. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clinics in liver disease*. Aug 2002;6(3):635-647.

18. Boberg KM, Fausa O, Haaland T, Holter E, Mellbye OJ, Spurkland A, Schrupf E. Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: an evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. Jun 1996;23(6):1369-1376.

19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7 1976;72:248-254.

20. Broome U, Bergquist A. Primary sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, and colon cancer. *Semin Liver Dis*. Feb 2006;26(1):31-41.

21. Broome U, Olsson R, Loof L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, Prytz H, Sandberg-Gertzen H, Wallerstedt S, Lindberg G. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. Apr 1996;38(4):610-615.

22. Burroughs AK, Butler P, Sternberg MJ, Baum H. Molecular mimicry in liver disease. *Nature*. Jul 30 1992;358(6385):377-378.

23. Cancado ELR PG. *Autoimmune hepatitis in South America*. . Boston: Kluwer Academic; 2000.

- 24.** Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med*. Sep 20 1999;190(6):815-826.
- 25.** Chapman RW, Arborgh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, Sherlock S. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut*. Oct 1980;21(10):870-877.
- 26.** Chen M, Shirai M, Liu Z, Arichi T, Takahashi H, Nishioka M. Efficient class II major histocompatibility complex presentation of endogenously synthesized hepatitis C virus core protein by Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblastoid cell lines to CD4(+) T cells. *J Virol*. Oct 1998;72(10):8301-8308.
- 27.** Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. Mar 1995;21(3):613-619.
- 28.** Cook GC, Mulligan R, Sherlock S. Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *The Quarterly journal of medicine*. Apr 1971;40(158):159-185.
- 29.** Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology*. Aug 2000;121(2):364-374.
- 30.** Cullen SN, Chapman RW. The medical management of primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis*. Feb 2006;26(1):52-61.
- 31.** Czaja A, Carpenter HA. Validation of scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*. Feb 1996;41(2):305-314.
- 32.** Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. Mar 1999;30(3):394-401.
- 33.** Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology*. Aug 1998;28(2):360-365.
- 34.** Czaja AJ. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol*. Apr 2001;96(4):1224-1231.
- 35.** Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. Nov 1996;24(5):1068-1073.
- 36.** Czaja AJ, Manns MP, Homburger HA. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology*. Oct 1992;103(4):1290-1295.

-
37. Czaja AJ, Ming C, Shirai M, Nishioka M. Frequency and significance of antibodies to histones in autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* Jul 1995;23(1):32-38.
38. Czaja AJ, Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type 1-autoimmune hepatitis. *Hepatology.* Sep 1997;26(3):567-572.
39. Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, Hachiya T. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* Jul 1994;107(1):200-207.
40. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *Journal of hepatology.* Sep 2002;37(3):302-308.
41. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* Aug 1955;60(4):604-617.
42. De Groote J, Fevery J, Lepoutre L. Long-term follow-up of chronic active hepatitis of moderate severity. *Gut.* Jun 1978;19(6):510-513.
43. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* Jun 1994;19(6):1513-1520.
44. Dickson RC, Gaffey MJ, Ishitani MB, Roarty TP, Driscoll CJ, Caldwell SH. The international autoimmune hepatitis score in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* Mar 1997;4(2):121-128.
45. Dighiero G, Lymberi P, Monot C, Abuaf N. Sera with high levels of anti-smooth muscle and anti-mitochondrial antibodies frequently bind to cytoskeleton proteins. *Clin Exp Immunol.* Oct 1990;82(1):52-56.
46. Domschke W, Klein R, Terracciano LM, Jung P, Kirchner T, Berg PA, Bianchi L. Sequential occurrence of primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis type III in a patient with ulcerative colitis: a follow up study over 14 years. *Liver.* Jul 2000;20(4):340-345.
47. Donaldson P, Doherty D, Underhill J, Williams R. The molecular genetics of autoimmune liver disease. *Hepatology.* Jul 1994;20(1 Pt 1):225-239.
48. Donaldson PT. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut.* Apr 2004;53(4):599-608.
49. Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM, McFarlane IG, Johnson PJ, Williams R. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology.* Apr 1991;13(4):701-706.

- 50.** Dong M, Baggetto LG, Falson P, Le Maire M, Penin F. Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography. *Anal Biochem.* May 1 1997;247(2):333-341.
- 51.** Farrant JM, Hayllar KM, Wilkinson ML, Karani J, Portmann BC, Westaby D, Williams R. Natural history and prognostic variables in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* Jun 1991;100(6):1710-1717.
- 52.** Goldstein NS, Bayati N, Silverman AL, Gordon SC. Minocycline as a cause of drug-induced autoimmune hepatitis. Report of four cases and comparison with autoimmune hepatitis. *Am J Clin Pathol.* Oct 2000;114(4):591-598.
- 53.** Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, Mowat AP, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology.* Mar 1997;25(3):541-547.
- 54.** Griga T, Tromm A, Muller KM, May B. Overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis in two cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* May 2000;12(5):559-564.
- 55.** Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Mayo Clin Proc.* Jan 21 1948;23(2):25-28.
- 56.** Hempfling W, Grunhage F, Dilger K, Reichel C, Beuers U, Sauerbruch T. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* Jul 2003;38(1):196-202.
- 57.** Herkel J, Heidrich B, Nieraad N, Wies I, Rother M, Lohse AW. Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas. *Hepatology.* Feb 2002;35(2):403-408.
- 58.** Herkel J, Manns MP, Lohse AW. Selenocysteine, soluble liver antigen/liver-pancreas, and autoimmune hepatitis. *Hepatology.* Jul 2007;46(1):275-277.
- 59.** Hodges JR, Millward-Sadler GH, Wright R. Chronic active hepatitis: the spectrum of disease. *Lancet.* Mar 6 1982;1(8271):550-552.
- 60.** Holloway PW. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem.* May 1973;53(1):304-308.
- 61.** Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, Darnis F, Levy VG, Gripon P, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology.* Nov-Dec 1987;7(6):1333-1339.

- 62.** Hopf U, Meyer zum Buschenfelde KH, Freudenberg J. Liver-specific antigens of different species. II. Localization of a membrane antigen at cell surface of isolated hepatocytes. *Clin Exp Immunol.* Jan 1974;16(1):117-123.
- 63.** Hov JR, Boberg KM, Karlsen TH. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.* Jun 28 2008;14(24):3781-3791.
- 64.** Hubbard AL, Wall DA, Ma A. Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. I. Presence of the three major domains. *J Cell Biol.* Jan 1983;96(1):217-229.
- 65.** Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med.* Dec 7 1998;188(11):2163-2173.
- 66.** Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* Nov 1992;11(11):3887-3895.
- 67.** Jensen DM, McFarlane IG, Portmann BS, Eddleston AL, Williams R. Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. *The New England journal of medicine.* Jul 6 1978;299(1):1-7.
- 68.** Johnson GD, Holborow EJ, Glynn LE. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet.* Oct 30 1965;2(7418):878-879.
- 69.** Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology.* Oct 1993;18(4):998-1005.
- 70.** Johnson PJ, McFarlane IG, Eddleston AL. The natural course and heterogeneity of autoimmune-type chronic active hepatitis. *Semin Liver Dis.* Aug 1991;11(3):187-196.
- 71.** Joske RA, King WE. The L.E.-cell phenomenon in active chronic viral hepatitis. *Lancet.* Sep 3 1955;269(6888):477-480.
- 72.** Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, Taniguchi M. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med.* Jan 3 2000;191(1):105-114.
- 73.** Kanzler S, Weidemann C, Gerken G, Lohr HF, Galle PR, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* Oct 1999;31(4):635-640.

74. Kaya M, Angulo P, Lindor KD. Overlap of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis: an evaluation of a modified scoring system. *J Hepatol.* Oct 2000;33(4):537-542.
75. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* Feb 1 2003;170(3):1481-1489.
76. Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Nishio A, Honjo T, Chiba T. Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology.* Oct 2008;135(4):1333-1343.
77. Klein R BP. *Immunopathien der Leber.* . Landsberg: ecomed; 1995.
78. Klein R, Zanger UM, Berg T, Hopf U, Berg PA. Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clin Exp Immunol.* Nov 1999;118(2):290-297.
79. Klein R. BPA. *Immunopathien der Leber.* (Hrsg.: Baenkler W.), ecomed; 1998.
80. Kobayashi M, Kawano S, Hatachi S, Kurimoto C, Okazaki T, Iwai Y, Honjo T, Tanaka Y, Minato N, Komori T, Maeda S, Kumagai S. Enhanced expression of programmed death-1 (PD-1)/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* Nov 2005;32(11):2156-2163.
81. Kotlyar DS, Campbell MS, Reddy KR. Recurrence of diseases following orthotopic liver transplantation. *Am J Gastroenterol.* Jun 2006;101(6):1370-1378.
82. Kunkel HG AEJ, Eisenmenger WJ, Bongiovanni AM,, RJ S. Extreme hypergammaglobulinemia in young women with liver disease of unknown etiology. *The Journal of clinical investigation.* 1951;30:654.
83. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuoristo M, Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: their diagnostic and prognostic significance. *Gut.* Oct 1980;21(10):878-884.
84. Lacapere JJ, Delavoie F, Li H, Peranzi G, Maccario J, Papadopoulos V, Vidic B. Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 8 2001;284(2):536-541.

-
- 85.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15 1970;227(5259):680-685.
- 86.** Lidman K, Biberfeld G, Fagraeus A, Norberg R, Torstensson R, Utter G, Carlsson L, Luca J, Lindberg U. Anti-actin specificity of human smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol*. May 1976;24(2):266-272.
- 87.** Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, Chen CJ. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. Mar 2004;50(3):770-775.
- 88.** Lindor KD, Dickson ER, Jorgensen RA, Anderson ML, Wiesner RH, Gores GJ, Lange SM, Rossi SS, Hofmann AF, Baldus WP. The combination of ursodeoxycholic acid and methotrexate for patients with primary biliary cirrhosis: the results of a pilot study. *Hepatology*. Oct 1995;22(4 Pt 1):1158-1162.
- 89.** Lindor KD, Therneau TM, Jorgensen RA, Malinchoc M, Dickson ER. Effects of ursodeoxycholic acid on survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. May 1996;110(5):1515-1518.
- 90.** Lobo-Yeo A, Alviggi L, Mieli-Vergani G, Portmann B, Mowat AP, Vergani D. Preferential activation of helper/inducer T lymphocytes in autoimmune chronic active hepatitis. *Clinical and experimental immunology*. Jan 1987;67(1):95-104.
- 91.** Lobo-Yeo A, Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology*. Aug 1990;12(2):224-232.
- 92.** Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology*. Dec 1996;24(6):1416-1421.
- 93.** Ma Y, Gaken J, McFarlane BM, Foss Y, Farzaneh F, McFarlane IG, Mieli-Vergani G, Vergani D. Alcohol dehydrogenase: a target of humoral autoimmune response in liver disease. *Gastroenterology*. Feb 1997;112(2):483-492.
- 94.** Mackay IR TL, Cowling DC. Lupoid hepatitis. *Lancet*. 1956 1956;2:1323-1326.
- 95.** Magath TB, Winkle V. Technic for demonstrating L. E. (lupus erythematosus) cells in blood. *Am J Clin Pathol*. Jun 1952;22(6):586-587.
- 96.** Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis

by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet*. Feb 7 1987;1(8528):292-294.

97. Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology*. May 2001;120(6):1502-1517.

98. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology*. Nov-Dec 1988;8(6):1662-1666.

99. McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *Journal of hepatology*. 1986;3(2):196-205.

100. McFarlane IG, McFarlane BM, Major GN, Tolley P, Williams R. Identification of the hepatic asialo-glycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LSP). *Clin Exp Immunol*. Feb 1984;55(2):347-354.

101. McFarlane IG, Wojcicka BM, Zucker GM, Eddleston AL, Williams R. Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP). *Clin Exp Immunol*. Mar 1977;27(3):381-390.

102. Meyer zum B, Miescher PA. Liver specific antigens. Purification and characterization. *Clin Exp Immunol*. Jan 1972;10(1):89-102.

103. Mix H, Weiler-Normann C, Thimme R, Ahlenstiel G, Shin EC, Herkel J, David CS, Lohse AW, Rehermann B. Identification of CD4 T-Cell Epitopes in Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas Autoantigen in Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology*. Jul 31 2008.

104. Miyakawa H, Kitazawa E, Abe K, Kawaguchi N, Fuzikawa H, Kikuchi K, Kako M, Komatsu T, Hayashi N, Kiyosawa K. Chronic hepatitis C associated with anti-liver/kidney microsome-1 antibody is not a subgroup of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol*. Dec 1997;32(6):769-776.

105. Moebius U, Manns M, Hess G, Kober G, Meyer zum Buschenfelde KH, Meuer SC. T cell receptor gene rearrangements of T lymphocytes infiltrating the liver in chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis (PBC): oligoclonality of PBC-derived T cell clones. *Eur J Immunol*. Apr 1990;20(4):889-896.

106. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet*. Apr 7 1973;1(7806):735-737.

107. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. Dec 2003;62(6):492-497.

- 108.** Nikias GA, Batts KP, Czaja AJ. The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with an acute presentation. *J Hepatol.* Nov 1994;21(5):866-871.
- 109.** Nishioka M MS, McFarlane IG, et al. . *Geographical variation in the frequency and characteristics of autoimmune liver disease.* Vol 2. Amsterdam: Elsevier; 1998.
- 110.** Okazaki T, Wang J. PD-1/PD-L pathway and autoimmunity. *Autoimmunity.* Aug 2005;38(5):353-357.
- 111.** Otsuki N, Kamimura Y, Hashiguchi M, Azuma M. Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 16 2006;344(4):1121-1127.
- 112.** Oya Y, Watanabe N, Owada T, Oki M, Hirose K, Suto A, Kagami S, Nakajima H, Kishimoto T, Iwamoto I, Murphy TL, Murphy KM, Saito Y. Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum.* Aug 2008;58(8):2498-2510.
- 113.** Page AR, Good RA. Plasma-cell hepatitis, with special attention to steroid therapy. *AMA J Dis Child.* Mar 1960;99:288-314.
- 114.** Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* Dec 1999;20(18):3551-3567.
- 115.** Poupon R. Trials in primary biliary cirrhosis: need for the right drugs at the right time. *Hepatology.* Apr 2004;39(4):900-902.
- 116.** Prasad KV, Prabhakar BS. Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmunity.* Sep-Nov 2003;36(6-7):323-330.
- 117.** Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdottir H, Grondal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jonssen A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, Gyllensten UB, Harley JB, Alarcon-Segovia D, Steinsson K, Alarcon-Riquelme ME. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet.* Dec 2002;32(4):666-669.
- 118.** Rigaud JL. Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *European biophysics journal* 1998;27(4):305–319.
- 119.** Rigaud JL. Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *European biophysics journal.* 1998;27(4):305–319.

- 120.** Rizzetto M SG, Doniach D. Microsomal antibodies in chronic active hepatitis and other disorders. *Clinical and experimental immunology*. 1973;15:331-339.
- 121.** Roberts SK, Therneau TM, Czaja AJ. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. Mar 1996;110(3):848-857.
- 122.** Rose NR. Autoimmune disease 2002: an overview. *J Investig Dermatol Symp Proc*. Jan 2004;9(1):1-4.
- 123.** Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ*. Jan 1999;6(1):6-12.
- 124.** Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol*. Nov 1 1998;161(9):4467-4471.
- 125.** Schlaak JF, Lohr H, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol*. Oct 1993;94(1):168-173.
- 126.** Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. Dec 24 1992;71(7):1065-1068.
- 127.** Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, Schoenfield LJ. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology*. Nov 1972;63(5):820-833.
- 128.** Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology*. Jul 1993;18(1):1-9.
- 129.** Strassburg CP, Alex B, Zindy F, Gerken G, Luttig B, Meyer zum Buschenfelde KH, Brechot C, Manns MP. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases. *J Hepatol*. Dec 1996;25(6):859-866.
- 130.** Strassburg CP, Jaeckel E, Manns MP. Anti-mitochondrial antibodies and other immunological tests in primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun 1999;11(6):595-601.
- 131.** Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*. Nov 2002;22(4):339-352.
- 132.** Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, Durazzo M, Rizzetto M, Tukey RH, Manns MP. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ

- between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. Dec 1996;111(6):1576-1586.
- 133.** Swanson NR, Reed WD, Yarred LJ, Shilkin KB, Joske RA. Autoantibodies to isolated human hepatocyte plasma membranes in chronic active hepatitis. II. Specificity of antibodies. *Hepatology*. Apr 1990;11(4):613-621.
- 134.** Tahiri F, Le Naour F, Huguet S, Lai-Kuen R, Samuel D, Johanet C, Saubamea B, Tricottet V, Duclos-Vallee JC, Ballot E. Identification of plasma membrane autoantigens in autoimmune hepatitis type 1 using a proteomics tool. *Hepatology*. Mar 2008;47(3):937-948.
- 135.** Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. May 9 2000;97(10):5498-5503.
- 136.** Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest*. Jul 1992;90(1):196-203.
- 137.** Tillmann HL, Jackel E, Manns MP. Liver transplantation in autoimmune liver disease--selection of patients. *Hepatogastroenterology*. Nov-Dec 1999;46(30):3053-3059.
- 138.** Tischendorf JJ, Meier PN, Strassburg CP, Klempnauer J, Hecker H, Manns MP, Kruger M. Characterization and clinical course of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol*. Oct 2006;41(10):1227-1234.
- 139.** Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T, Omata M. Present status of autoimmune hepatitis in Japan--correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol*. Jun 1997;26(6):1207-1212.
- 140.** Toh BH. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. *Clin Exp Immunol*. Dec 1979;38(3):621-628.
- 141.** Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1979;76(9):4350-4354.
- 142.** Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. Jul 21 1989;245(4915):301-305.

- 143.** van Buuren HR, van Hoogstraten HJE, Terkivatan T, Schalm SW, Vleggaar FP. High prevalence of autoimmune hepatitis among patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* Oct 2000;33(4):543-548.
- 144.** Vento S, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmunity reviews.* Jan 2004;3(1):61-69.
- 145.** Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* Jun 7 2008;14(21):3306-3312.
- 146.** Vergani D, Mieli-Vergani G, Mondelli M, Portmann B, Eddleston AL. Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver.* Dec 1987;7(6):307-315.
- 147.** Vibhakkar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res.* Apr 10 1997;232(1):25-28.
- 148.** Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity.* May 2004;37(3):217-222.
- 149.** Vogel A, Heinrich E, Bahr MJ, Rifai K, Flemming P, Melter M, Klempnauer J, Nashan B, Manns MP, Strassburg CP. Long-term outcome of liver transplantation for autoimmune hepatitis. *Clin Transplant.* Feb 2004;18(1):62-69.
- 150.** Volkman M, Martin L, Baurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C, Fiehn W, Manns MP. Soluble liver antigen: isolation of a 35-kd recombinant protein (SLA-p35) specifically recognizing sera from patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology.* Mar 2001;33(3):591-596.
- 151.** Wachter B, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Manns M. Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *J Hepatol.* Sep 1990;11(2):232-239.
- 152.** Waldenstrom J. Blutproteine und Nahrungseiweiß. *Deutsche Zeitschrift für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.* 1950 1950;2:113-119.
- 153.** Walker JE, Lutter R, Dupuis A, Runswick MJ. Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry.* Jun 4 1991;30(22):5369-5378.
- 154.** Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *The Lancet.* Dec 22-29 1990;336(8730):1527-1530.

- 155.** Wen L, Peakman M, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. $\gamma\delta$ T clones from liver biopsies of children with autoimmune chronic active hepatitis and primary sclerosing cholangitis are cytotoxic to human liver target cells *Journal of Hepatology*. 1991;13(2):80.
- 156.** Whittingham S, Irwin J, Mackay IR, Smalley M. Smooth muscle autoantibody in "autoimmune" hepatitis. *Gastroenterology*. Oct 1966;51(4):499-505.
- 157.** Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet*. Apr 29 2000;355(9214):1510-1515.
- 158.** Wurbs D, Klein R, Terracciano LM, Berg PA, Bianchi L. A 28-year-old woman with a combined hepatitic/cholestatic syndrome. *Hepatology*. Nov 1995;22(5):1598-1605.
- 159.** Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol*. May 1993;23(5):1105-1111.
- 160.** Yoshioka M, Mizuno M, Morisue Y, Shimada M, Hirai M, Nasu J, Okada H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies, detected by a capture-immunoassay, are associated with autoimmune liver diseases. *Acta Med Okayama*. Apr 2002;56(2):99-105.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Reinhild Klein. Sie ermöglichte mir diese Arbeit, indem Sie mir dieses Thema und die Ressourcen des Immunpathologischen Labor Tübingen zu Verfügung stellte. Darüber hinaus stand Sie als Ansprechpartnerin in allen Stadien dieser Arbeit zu Verfügung. Sie hatte immer ein offenes Ohr für auftretende Probleme und stand mir mit Ihrem beeindruckendem Erfahrungsschatz und Ihrem großen Herzen, weit über das Fachliche hinaus, mit Rat und Tat zur Seite. Auftretende Motivationskrisen wurden durch Ihre humorvolle Art schon im Keim erstickt.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rammensee der mir die Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ ermöglichte. Der wissenschaftliche Austausch mit anderen Doktoranten und das breite Angebot des Graduiertenkollegs bereicherte meine Promotionszeit ungemein. Darüber hinaus hat das Stipendium des Graduiertenkollegs, welches durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziert wurde dazu beigetragen, dass diese Arbeit in dieser Form überhaupt durchgeführt werden konnte.

Danken will ich auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Immunpathologischen Labors Tübingen. Ohne Ihre kompetente und freundschaftliche Begleitung, wäre es für mich unmöglich gewesen mich so schnell in die Laborarbeit einzuarbeiten und die Methoden zu erlernen. Insbesondere möchte ich Elwira Herdt für die Einweisung in die Technik des Westernblot und des ELISA danken. Radmila Maksimovic möchte ich für die Einweisung in die Dichtegradientenzentrifugation danken. Weiterhin will ich Beate Preuß, Sandra Buck, Silke Tamasi und Tanja Flohr für Ihre Hilfe bei auftretenden Fragen und Problemen bezüglich der Laborarbeit danken. Darüber hinaus will ich Maja Wilczek für Ihre Hilfe bei organisatorischen Problemen und ihr offenes Ohr bei Problemen aller Art danken.

Mein spezieller Dank gilt meiner Frau Wiebke für Ihre immer währende Geduld und Ihre emotionale Unterstützung während dieser Arbeit. Des Weiteren will ich Ihr für die Durchsicht dieser Arbeit danken.

Ferner danke ich meiner Mutter für Ihre fortlaufenden motivierenden Worte und Ihre stets großzügige finanzielle Unterstützung meines Studiums. Zuletzt möchte ich meiner lieben Freundin Ingrid und meinem Bruder Alexander für die Korrektur und Durchsicht dieser Arbeit danken.

8.2 Lebenslauf

Schulbildung

2001 Beendigung des Technischen Gymnasiums mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife in Stuttgart

2001 - 2002 Zivildienst im Rettungsdienst beim Roten Kreuz Kreisverband Esslingen

Hochschulausbildung

2002 - 2008 Studium der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

07.09.2004 Ärztliche Vorprüfung (1. Abschnitt)

04.11.2008 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)

Famulaturen

2005 - 2007 Berlin, Tübingen

Praktisches Jahr

2007 - 2008 Marienhospital Stuttgart

Studiumsbezogene Nebentätigkeiten

07 2005 - 01 2007 Stipendiat des Graduiertenkolleg 794 „Cellular mechanisms of immune-associated processes“ der DFG

Tätigkeit als Assistenzarzt

Seit 01 2009

Assistenzarzt im Robert Bosch Krankenhaus
Stuttgart. Prof. Dr. M.D. Alscher, Abteilung
Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin