

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

**Identifizierung immundominanter Epitope der
Pyruvatdehydrogenase als Targetantigen
antimitochondrialer Antikörper bei der primär-biliären
Zirrhose und ihre klinische Relevanz**

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

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

**vorgelegt von
Sandra Daniela Braun
aus Schwäbisch Gmünd**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

- 1. Berichtstatter: Frau Professor Dr. R. Klein**
- 2. Berichtstatter: Professor Dr. S. Stevanovic**
- 3. Berichtstatter: Professor Dr. U Spengler**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1. Definition	6
1.2. Historie	6
1.3. Pathologie, Differentialdiagnosen und assoziierte Erkrankungen	7
1.4. Histologie	8
1.5. Epidemiologie	9
1.6. Genetische Prädisposition und potentielle Risikofaktoren	11
1.7. Klinik	12
1.8. Diagnostik	14
1.9. Therapie	16
1.10. Prognose	20
1.11. Ungeklärte Aspekte zur Ätiologie	21
1.12. Antimitochondriale (AMA) und Antinukleäre (ANA) Antikörper	26
1.13. Ziel der Arbeit	31
2. PROBANDEN, METHODEN, MATERIALIEN	34
2.1. Probanden	34
2.2. Methoden	42
2.3. Materialien	50
3. ERGEBNISSE	55
3.1. Testung von Seren von untherapierten und therapierten PBC-Patienten auf ihre Reaktivität mit der PDH-E2-Untereinheit	57

3.2.	Zusammenhänge von M2, M4 und den 35 Peptiden der PDH-E2 Untereinheit	68
3.3.	Testung von KBR-positiven PBC-Seren auf Anti-M2, -M4 und –PDH-E2-Peptid-Aktivität im ELISA	82
3.4.	Zusammenhänge der AMA- und PDH-E2-Reaktivitäten für Seren untherapierter Patienten mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf	95
3.5.	Auswirkungen von medikamentöser Therapie und Lebertransplantation auf die AMA Reaktivität	99
4.	DISKUSSION	127
4.1.	Ziele dieser Arbeit	127
4.2.	Erläuterung zu der PDH-E2-Untereinheit und ihren 35 Peptiden	127
4.3.	Bisheriger Kenntnisstand der Literatur und Diskussion der Ergebnisse	131
5.	ZUSAMMENFASSUNG	158
6.	REFERENZEN	161
7.	DANKSAGUNG	179
8.	LEBENS LAUF	180

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

γ-GT	Gamma - Glutaryltransferase
AiH	Autoimmune Hepatitis
Ak	Antikörper
AMA	antimitochondriale Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosin-5'-triphosphat Synthase
AZA	Azathioprin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
OLT	Orthotope Lebertransplantation
PBC	primär- biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDH-E1	E1-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase
PDH-E2	E2-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase
SV	Serumendverdünnung
SD	Standardabweichung
SMP	Submitochondriale Partikel
Sn	Schweineniere
SN	Supernatant (engl.: Überstand)
SVP	Serumverdünnungspuffer
SVV	Serumvorverdünnung
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane
URSO / URSO	Ursodesoxycholsäure
WP	Waschpuffer

1. Einleitung

1.1. Definition

Die primär-biliäre Zirrhose (PBC) ist eine chronisch progrediente Lebererkrankung, an der hauptsächlich Frauen (10:1) mittleren Alters erkranken. Es kommt zu einer T-Zell-vermittelten Zerstörung der intrahepatischen Gallengänge, die bis hin zu Cholestase und Leberversagen mit Transplantationsbedürftigkeit führen kann. Die Ätiologie der PBC ist ungeklärt. Sie wird jedoch wegen der bei 95% der Patienten auftretenden Antimitochondrialen Antikörper (AMA) zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen gezählt [1].

1.2. Historie

Vermutlich wurde 1851 die primär-biliäre Zirrhose erstmals von Addison und Gull in der Form eines als "Vitiligoidea" bezeichneter Symptom-Komplexes mit Ikterus, Vitiligo und Xanthomen beschrieben [2]. 1949 wurde für die PBC aufgrund des vermehrten Auftretens von xanthomatösen Hautveränderungen der Begriff „xanthomatöse biliäre Zirrhose“ eingeführt, der jedoch schon 1951 durch Ahrens und Mitarbeiter mit dem Begriffe „primäre“ und „sekundäre biliäre Zirrhose“ für intra- bzw. extrahepatische Obstruktion der Gallenwege ersetzt wurde. Seither ist die primär-biliäre Zirrhose als eigenständiges Krankheitsbild anerkannt [3]. Seit der Veröffentlichung von Rubins und Mitarbeiter im Jahre 1965 wird die primär-biliäre Zirrhose auch „chronisch nicht eitrig destruiierende Cholangitis“ genannt [4]. Der Begriff der „Zirrhose“ stammt noch aus der Zeit vor der Kenntnis der AMA, als man die PBC nur in ihrem Endstadium erkennen konnte.

1965 kam es zur Entdeckung der antimitochondrialen Antikörper (AMA), wodurch es ermöglicht wurde, die Diagnose der PBC schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung stellen zu können [5]. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Antikörper gegen die Mitochondrien richten. Dies

gelang im Immunfluoreszenz Test durch Nachweis des typischen grobkörnigen Musters in Mitochondrienreichen Zellen [5] und durch die Verwendung von Mitochondrien verschiedener Organe [6] in der Komplementbindungsreaktion (KBR). Durch den Gebrauch von submitochondrialen Fraktionen in der KBR konnte das später als M2 bezeichnete [7-8] Targetantigen in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert werden [9]. Dieses M2-Antigen konnte durch WesternBlot in 5 M2-Determinanten unterteilt werden (siehe AMA), welche in den darauf folgenden Jahren auf molekularer Ebene als Untereinheiten eines 2-Oxosäure- oder α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexes der inneren mitochondrialen Membran identifiziert wurden (Siehe unten „Aufbau der 2-Oxosäure-Dehydrogenasen) [10-13].

1.3. Pathologie, Differentialdiagnosen und assoziierte Erkrankungen

Bei der primär-biliären Zirrhose kommt es zu einer von T-Zellen vermittelten periportal beginnenden Inflammation und Zerstörung der kleinen intralobulären Gallengänge. Es wird davon ausgegangen, dass Zytokine der CD4+ T-Lymphozyten und eine Störung der zellulären Autoimmunität der CD8+ T-Lymphozyten zu der Schädigung der intralobulären Gallengänge beitragen. Lymphozytäre Zytokine scheinen zur Störung der Barrierefunktion zu führen, indem sie die Tight Junctions der Cholangiozyten in ihrer Funktion beeinträchtigen [14]. Wegen der daraus resultierenden Einschränkung der Drainagefunktion kann es bereits vor dem zirrhotischen Stadium zur Cholestase mit stark erhöhten laborchemischen Cholestaseparametern, wie der alkalischen Phosphatase (AP) und der Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT), kommen. Im weiteren Verlauf kann die Entzündung bis auf das gesamte Leberparenchym übergreifen und schließlich zur Fibrose und Leberzirrhose bis hin zum Leberversagen mit Transplantationsbedürftigkeit führen [15-16].

Eine Destruktion der Gallengänge mit Granulombildung ist charakteristisch für das Frühstadium der PBC. Makroskopisch weist die PBC typischerweise eine mikronoduläre Zirrhose des Hanot-Typs auf. Sie kann jedoch auch in einer makronodulären Form auftreten, die für die autoimmune, chronisch aktive Hepatitis typisch ist. Im Gegensatz zur chronisch aktiven Hepatitis weist die

primär-biliäre Zirrhose in den meisten Fällen pathologische Unterschiede wie eine unregelmäßige Fibrosierung mit hyperplastischer Granulombildung, häufig entzündliche Infiltrate sowie eine Verminderung der Gallengänge mit dem Auftreten einer chronischen Cholestase schon vor dem Stadium der Zirrhose auf [17].

Ein Nichtauftreten von Granulomen im Frühstadium sowie eine verstärkte, periportale, entzündliche Reaktion und das Auftreten der makronodulären Form der Zirrhose, sprechen für einen aktiven Verlauf der Erkrankung mit schlechter Prognose.

Je nach Stadium kann die Differenzierung einer primär-biliären Zirrhose von einer chronisch persistierenden Hepatitis (CPH) oder einer chronisch aktiven Hepatitis (CAH) schwierig sein. Piecemeal-Nekrosen (Mottenfrasnecrosen) treten häufig bei der PBC auf, sind jedoch auch bei der CAH zu finden [18]. Ebenso kann die klinisch-morphologische Abgrenzung zur primär-sklerosierenden Cholangitis, Sarkoidose und zu der medikamentös induzierten Hepatitis schwierig sein, bei denen jedoch die antimitochondrialen Antikörper stets fehlen.

Eine Assoziation der PBC mit anderen ebenfalls zum Formenkreis der Autoimmunerkrankungen gehörenden Syndromen ist häufig. Das Sjögren-Syndrom ist bei 50% - 75% der PBC-Patienten zu finden [19], jedoch tritt PBC selten bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom auf [20]. Des Weiteren wird bei PBC-Patienten ein gehäuftes Auftreten von Sklerodermie (5%-10%) [21], des CREST-Syndroms [22], Arthritis (40%) [23] und Thyreoiditis [24] beobachtet.

1.4. Histologie

Die PBC lässt sich nach Scheuer in vier histologische Stadien einteilen [25]. Da die PBC sich fokal manifestiert und häufig alle vier Stadien verstreut gleichzeitig in der Leber auftreten, kann eine korrekte Diagnosestellung nach einer einzelnen Leberbiopsie schwierig sein.

I. Stadium – destruierende nicht eitrige Cholangitis / periportale Entzündung

Der Krankheitsbeginn der primär-biliären Zirrhose äußert sich in einer floriden Schädigung der intralobulären Gallengänge. Die fokal auftretenden Läsionen des Epithels erreichen im ersten Stadium einen Durchmesser von bis zu 100µm. Unter Aussparung des Leberparenchyms kommt es durch Infiltration der Portalfelder von Lymphozyten, Plasmazellen, Eosinophilen und Histozyten zu einer Aufweitung und periportalen Entzündung. Häufig ist eine Granulombildung mit Histozyten, Lymphozyten und gelegentlich auch mit Riesenzellen zu beobachten.

II. Stadium – Entzündungsausdehnung ins Gewebe

Das zweite Stadium ist charakterisiert durch die Proliferation und Destruktion der kleinen Gallengänge. Ebenfalls kommt es zu einer Ausbreitung der Inflammation mit Beteiligung des Leberparenchyms.

III. Stadium – septale Fibrose (Brückenfibrose)

Im dritten Stadium kommt es zu einer deutlichen Fibrosierung der Leber, die sich von den Portalfeldern aus langsam über das restliche Leberparenchym ausdehnt. Die Fibrosierung führt zum Verlust der Gallengänge und somit zur periportalen Cholestase. Piecemeal-Nekrosen (Mottenfraßnekrosen) sind ebenso kennzeichnend. In diesem Stadium kann es schwierig sein, die PBC von einer chronisch aktiven Hepatitis zu unterscheiden.

IV. Stadium – biliäre Zirrhose mit regenerative Knoten

Im vierten und somit Endstadium kommt es zur Leberzirrhose mit fibrösen Septen und Regenerationsknoten, welche allerdings unregelmäßig verteilt und deswegen durch Biopsien nicht immer nachzuweisen sind.

1.5. Epidemiologie

Im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen tritt die PBC gewöhnlich im Alter zwischen 30 und 65 Jahren und selten vor dem 30. Lebensjahr auf.

Ersterkrankungen von Frauen im Alter von 15 oder 93 Jahren sind jedoch in der Literatur beschrieben worden [15, 26]. Das Verhältnis von erkrankten Männern zu erkrankten Frauen beträgt 1:10.

1950 wurde in einer Studie des Rockefeller-Instituts von 25 in der Literatur beschriebenen Fällen berichtet und die PBC als seltene Erkrankung angesehen. Zur aktuellen Prävalenz und Inzidenz sind keine genauen Angaben vorhanden. Die weltweit vorkommende primär-biliäre Zirrhose wird heute allerdings als eine vornehmlich in den nordeuropäischen Ländern gehäuft auftretende Ursache einer Lebererkrankung angesehen [15, 27].

In epidemiologischen Studien konnten deutliche Unterschiede im geographischen Auftreten dieser Erkrankung aufgezeigt werden. In einigen Studien wird ein Nord-Süd-Gefälle vermutet, das jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden konnte [28-29]. Die Inzidenz der PBC variiert zwischen 251 in Wales / England, 51 Victoria / Australien, unter 25 in Kanada und beinahe 0 / 1 000 000 pro Jahr in Afrika und Indien [30-34]. Die geschätzte Prävalenz der PBC in Rochester / Minnesota liegt bei 65,4 für Frauen und bei Männern bei 12,1 / 100 000 pro Jahr. Die geschätzte Inzidenz bei 4,5 / 100 000 pro Jahr für Frauen; für Männer bei 0,7 / 100 000 pro Jahr [30]. Diese großen geographischen Unterschiede der Inzidenz, sowohl innerhalb einzelner Studien als auch zwischen verschiedenen Studien, lassen auf noch nicht identifizierte Risikofaktoren rückschließen [27]. Jedoch ist bei den verschiedenen Studien zu bedenken, dass die variierenden Inzidenzen zum Teil auf genetische Besonderheiten der einzelnen Populationen und unterschiedlich verwendete Methoden zurückzuführen sind. Außerdem wurde in den bisherigen Studien leider kaum auf Umweltbedingungen, wie z. B. das Rauchen, den Einfluss hormoneller Empfängnisverhütung, Schwangerschaft oder Diät etc. geachtet.

Generell gilt, dass die PBC häufiger bei kaukasischen Frauen auftritt, jedoch auch in anderen ethnischen Gruppen beobachtet werden kann. Eine in den USA durchgeführte und 2007 veröffentlichte Studie von Peters et al. zeigt, dass vor allem bei nicht-kaukasischen Frauen (hier Latein- und Afroamerikanerinnen) die Krankheit schwerer verläuft als bei hellhäutigen europäischen Patientinnen. Weitere Unterschiede bezüglich der Rate der erkrankten Männer zu erkrankten

Frauen, dem durchschnittlichen Erkrankungsalter und der Anzahl der AMA-positiven Patienten konnten nicht nachgewiesen werden [35]. In der asiatischen Bevölkerung ist Gleiches jedoch mit einer niedrigeren Prävalenz als der in Europa anzutreffen [36].

In mehreren Studien wird ein deutlicher Anstieg der Prävalenz und der Inzidenz vor allem in den letzten 30 Jahren gezeigt, dessen Ursache nicht geklärt ist. Es wird jedoch eher eine durch die Antimitochondrialen Antikörper verbesserte Möglichkeit zur Detektion und die verbesserte Kenntnis der PBC verursachte Steigerung der Inzidenz als ein tatsächlich vermehrtes Vorkommen dieser Erkrankung angenommen [19, 37]. Zusammenfassend wird die Inzidenz der gesamten weißen Bevölkerung auf ca. 3500 und die Prävalenz auf ca. 47 000 Fälle im Jahr geschätzt [38].

1.6. Genetische Prädisposition und potentielle Risikofaktoren

Für die Entwicklung der PBC weisen Verwandte ersten Grades ein Risiko von 4-6% auf, was für Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen vergleichsweise hoch ist [39]. Ebenso ist das Risiko der Verwandten von PBC-Patienten, generell eine Autoimmunerkrankung zu erwerben, erhöht, wobei Töchter erkrankter Mütter besonders betroffen sind [40]. Die Prävalenz der PBC in Familien mit einem betroffenen Mitglied wird auf 1000x höher geschätzt als die der Allgemeinbevölkerung [41]. Dieses familiär gehäufte Auftreten der PBC und von Autoimmunerkrankungen allgemein wird als Hinweis für das Vorliegen einer genetischen Komponente gewertet [42]. Zusätzlich weisen gesunde Familienmitglieder von PBC-Erkrankten vermehrt eine gestörte T-Zell-Regulierung [43] und eine erhöhtes Vorkommen von zirkulierenden Autoimmunantikörpern [44], jedoch nicht von antimitochondrialen Antikörpern [45], auf.

Der Haplotyp HLA-DR8 wird mit einer genetischen, jedoch nur schwachen Prädisposition der PBC in Verbindung gebracht [46]. In deutschen und japanischen Populationen mit PBC-Erkrankten scheint der Haplotyp HLA-DRB1 [47-48] vermehrt aufzutreten. Eine weitere Studie zeigte eine Assoziation der

PBC mit einer Variante des CTLA4 Gens, welches einen koinhibitorischen Immunrezeptor kodiert, der in den Vorgang der Selbsttoleranz involviert ist [49]. Des Weiteren befinden sich auf dem X-Chromosom Gene für die Autoimmuntoleranz [50]. Warum die PBC jedoch vornehmlich das weibliche Geschlecht betrifft, ist ebenfalls noch ungeklärt. Eine Theorie stützt sich auf die Studie von Invernizzi et al., die im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine gehäuft auftretende X-chromosomale Monosomie bei PBC Patienten feststellen konnte, was für eine Haploinsuffizienz von spezifisch X-Chromosom gekoppelten Genen spricht [50]. Jedoch tritt eine X-chromosomale Haploinsuffizienz generell gehäuft bei Autoimmunerkrankungen auf [51], die bekanntlich allgemein vermehrt das weibliche Geschlecht betreffen.

In epidemiologischen Studien wurde als potentieller Risikofaktor der PBC das Rauchen von Zigaretten genannt und eine Assoziation vermutet [52]. Zumindest wurde in einer Studie das Zigarettenrauchen mit dem fortgeschrittenen Stadium der Fibrose assoziiert [53].

1.7. Klinik

Die häufigsten Symptome der primär-biliären Zirrhose sind bei 70%-90% der PBC-Patienten Müdigkeit bzw. Erschöpfungszustände und quälender Juckreiz (20%-70%) und bei 21% bzw. 19% auch die ersten Symptome [15]. Vor der Entdeckung der Antimitochondrialen Antikörper führten nur diese Symptome zur Diagnosestellung.

Der Verlauf der primär-biliären Zirrhose ist sehr unterschiedlich. Es werden aktive und inaktive Verläufe beobachtet. Ein inaktiver Verlauf der PBC liegt vor, wenn innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 5 Jahren keine weitere Progression aus den histologischen Stadien I/II heraus auftritt. Ist dies jedoch der Fall und es kommt zu der Entwicklung der histologischen Stadien III/IV mit portaler Hypertension, Transplantationspflichtigkeit oder gar dem Tode des Erkrankten, liegt eine aktiver Verlauf der PBC vor [54]. Bei der aktiven Form beträgt das mittlere Überleben 12 Jahre nach Auftreten der ersten Symptome [55]. Es wurde schon in mehreren Studien versucht, einen prognostischen

Marker für den Verlauf der PBC zu finden, jedoch ohne durchschlagenden Erfolg [56].

Einige der PBC-Patienten werden von einem ausgeprägten Fatigue-Syndrom und einem starker Pruritus in ihrem Alltag beeinträchtigt. Bei den meisten PBC-Patienten liegt jedoch eine gute Lebensqualität vor. Von betroffenen Patienten wird als sehr belastend empfunden, dass durch die mit exzessiver Tagesmüdigkeit assoziierten Erschöpfungszustände die sozialen und zwischenmenschlichen Beziehungen stark eingeschränkt werden [57-58]. Was diese starken Erschöpfungszustände verursacht, ist bisher noch unklar. Hollingsworth et al. haben eine Assoziation dieser Fatigue mit einer mitochondrialen Dysfunktion postuliert [59]. In der Diskussion wird später noch genauer auf dieses Thema eingegangen.

Als das Unangenehmste wird von vielen Patienten jedoch der quälende Juckreiz angegeben [15]. Der Pruritus kann erstmals während der Schwangerschaft auftreten und wird dann anfangs oft fälschlicherweise auf diese zurückgeführt oder als dermatologische Erkrankung verkannt. Im Gegensatz zu dem mit der Schwangerschaft assoziierten Juckreiz persistiert der von der PBC verursachte Pruritus postpartal und tritt typischerweise verstärkt nachts, bei eng anliegender, grober Kleidung, bei trockener Haut und warmem, feuchtem Wetter auf. Die Ursache des Pruritus ist unbekannt.

Weitere häufig im Verlauf auftretende Symptome sind Ikterus, durch Melaninablagerungen [60] verursachte Hyperpigmentierung (25% - 50% [61]), Xanthelasmen (20%), trockene Haut (70%) [61], Xanthome vor allem bei der seltener auftretenden Hypercholesterinämie (5%), Steatorrhoe aufgrund der verminderten Sekretion von Gallensäuren [62], ein Mangel fettlöslicher Vitaminmangel (A, D, E, K) und rezidivierende Harnwegs- und Hautpilzinfekte (20%). Dermatologische Beschwerden führen in beinahe 40% der Fälle zur Diagnose der PBC.

Interessanterweise kann bei der PBC auch eine enorme Hyperlipidämie beobachtet werden. Bei mindestens 50% der Patienten ist das Cholesterin erhöht und kann besonders bei Patienten, die Xanthome aufweisen, 1000 mg/dl (26 mmol/L) überschreiten [63]. In den frühen Stadien der PBC sind leichte

Anstiege der Low-Density und der Very-Low-Density Lipoproteine (LDL und VDL) und ein enormer Anstieg des High-Density Lipoproteins (HDL) nachweisbar [64]. Dies könnte erklären warum PBC-Patienten trotz ihrer teils enormen Cholesterinspiegel nicht zusätzlich vermehrt an arteriosklerotischen Erkrankungen leiden und versterben.

Des Weiteren wird noch eine nicht auf die hepatische Enzephalopathie zurückführbare Beeinträchtigung cerebraler Funktionen, wie des Gedächtnisses und der Konzentration, beobachtet. In einer Studie von Newton et al. war diese Beeinträchtigung bei 53 von 198 Patienten vorhanden. Es konnte eine Korrelation der strukturellen, zerebralen Läsionen und der autonomen Dysfunktion zu den kognitiven Einschränkungen, jedoch keine Korrelation zum Schweregrad der Leberschädigung festgestellt werden [65].

In späteren Stadien, in denen sich die Zirrhose verstärkt ausprägt, können Zirrhose-typische Komplikationen wie portale Hypertension mit Aszites, Hepato- (~70% [66]) und Splenomegalie (<5%), Ösophagus- und Fundusvarizen, hepatische Enzephalopathie und Leberkarzinome auftreten.

Ebenso wird häufig das Auftreten einer eventuell durch Malabsorption verursachten Osteoporose bei PBC-Patienten beobachtet, jedoch wird deren kausaler Zusammenhang in Frage gestellt. Eine weitere These besagt, dass die Osteoporose durch ein die Osteoblasten hemmendes Toxin verursacht werden könnte. Außerdem tritt in seltenen Fällen eine Osteomalazie auf, die vor allem bei bettlägerigen Patienten durch den Mangel an Sonnenlicht und somit einer ungenügenden Bereitstellung von Vitamin D erklärt wird.

1.8. Diagnostik

Zur Diagnosestellung der PBC müssen folgende 3 Kriterien erfüllt sein [15]:

- Das Auftreten von AMA im Serum,
- Eine Erhöhung der Leberwerte (vor allem der alkalischen Phosphatase) über mehr als 6 Monate und
- Typische histologische Veränderungen in der Leber.

Speziell bei Frauen sollte an die Diagnose der PBC gedacht werden, wenn sie über Juckreiz unklarer Herkunft, Müdigkeit, Ikterus und / oder ungeklärten Gewichtsverlust mit einem Unwohlseinsgefühl im rechten, oberen Quadranten klagen und zusätzlich eine ungeklärte Erhöhung der Alkalischen Phosphatase aufweisen. Bei diesen Patienten sollte zusätzlich noch nach den regelmäßig auftretenden PBC assoziierten Erkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom oder der Arthritis, gefragt werden.

Bei 50-60% der Patienten wird heutzutage die Diagnose noch vor Eintreten der Symptome gestellt [67-69]. In dem asymptomatischen Anfangsstadium der PBC sind laborchemische und serologische Veränderungen schon vor Eintritt der ersten Symptome nachweisbar. Diese Veränderungen drücken sich in schon Jahre vor den ersten Symptomen auftretenden, für die PBC typischen antimitochondrialen Antikörpern aus [70], auf die später näher eingegangen wird.

An weiteren serologischen Parametern ist noch eine Erhöhung des Gesamt – IgM bei normalen IgG- und IgA- Werten typisch. PBC-Patienten weisen eine höhere Anzahl von IgM-bildenden Plasmazellen auf, die zusätzlich eine höhere Quantität an IgM Antikörpern produzieren als die ihrer gesunden Kontrollen [71]. Außerdem treten weitere spezifische antinukleäre Antikörper (ANA) auf, die gegen intrazelluläre Strukturen, wie u.a. die „nuclear dots“ (sp100), Kernmembran (gp 120) [72] und Kernporenproteine (gp 210) gerichtet sind [73]. ANA treten in bis zu 70% der PBC Patienten auf [74] und sind ebenso bei AMA-negativen PBC Patienten nachweisbar. Des Weiteren haben sie noch für die Diagnose der Autoimmunhepatitis und des Overlap-Syndroms eine klinische Bedeutung.

An biochemischen Veränderungen ist fast immer eine massive Erhöhung der Alkalischen Phosphatase (bis auf das 20fache des oberen Normwertes) [75] zu beobachten. Der Wert scheint sich früh im Verlauf auf einem hohen Niveau einzupendeln und weist dann eine Fluktuation von 20% auf [76]. Gleiches gilt für die 5'-Nucleotidase und die Gamma-Glutamyl-Transferase (bis 2000 mg/dl).

Die Aminotransferasen sind meistens normwertig oder sogar leicht erhöht vorzufinden. Sie können selten auch bis auf das 5fache erhöht sein. Ihnen wird kein prognostischer Wert zugeschrieben. Bei Vorliegen eines bis zu 10fach erhöhten Wertes ist jedoch differentialdiagnostisch an ein Overlap-Syndrom (PBC / chronische Autoimmunhepatitis zu denken [77].

Das Bilirubin ist in den frühen Stadien der PBC normalerweise nicht erhöht, steigt jedoch in den meisten Fällen bei Fortschreiten der Erkrankung an [78]. Es sind sowohl das indirekte als auch das direkte Bilirubin betroffen. Die Zunahme des Bilirubinwertes wird als prognostisch ungünstiges Zeichen gewertet [77] und als Verlaufsparemeter zur Indikation einer Lebertransplantation herangezogen.

In dem Blut und in der Leber besonders von PBC-Patienten in frühen Stadien der Erkrankung wurden vermehrte Eosinophile Zellen gefunden, deren potentielle pathogene Funktion noch nicht geklärt ist [79-80].

An weiteren biochemischen Pathologien können noch erhöhte Serum-Konzentrationen von Ceruloplasmin, Gallensäure (stark erhöht) [81] und Hyaluronan (Hyaluronsäure) [82] auftreten. Erhöhte Hyaluronsäure korreliert mit der Serum-Konzentration von Bilirubin und dem histologischen Fortschreiten der Erkrankung [82].

1.9. Therapie

Therapien zur Bekämpfung der autoimmunologisch ausgelösten Destruktion der Gallengänge waren bisher wenig erfolgreich. Die einzig bewährte Therapie der PBC ist die der Ursodesoxycholsäure.

1.9.1 Ursodesoxycholsäure (URSO)

Ursodesoxycholsäure ist eine natürliche, tertiäre Gallensäure, die als Arzneistoff zur Auflösung von kleinen Gallensteinen und zur Behandlung der primär-biliären Zirrhose Verwendung findet [83]. Chemisch ist sie ein zur Gruppe der Sterine (Sterole) gehörendes Steroid. Ihr Name stammt vom asiatischen Schwarzbären ab, dessen Galle hohe Konzentrationen aufweist (lat. *ursus* „der Bär“). URSO kann auch synthetisch hergestellt werden und ist

weniger hepatotoxisch als die endogenen Gallensäuren. Die Substanz wird passiv resorbiert, im enterohepatischen Kreislauf über die Galle ausgeschieden und teilweise über den Darm wieder aufgenommen. Ihr genauer Wirkmechanismus ist nicht vollständig verstanden, wird aber als multifaktoriell angenommen [84]. Zu etwa 3 % wird URSO auch in der menschlichen Galle gefunden.

Ursodesoxycholsäure ist schon in den Stadien I und II der PBC indiziert, jedoch noch nicht bei dem alleinigen Vorliegen von antimitchondrialen Antikörpern, sondern erst bei zusätzlich erhöhten Leberwerten [84]. Bei früher Verabreichung kann eine bis zu 40%ige Senkung der Alkalischen Phosphatase [85], sowie eine Verbesserung der weiteren pathologischen Werte erreicht werden. Langfristig wird die Progression zu Spätstadien verlangsamt und das Überleben erhöht [86]. Terasaki et al. konnten eine Reduktion der HLA-Expression auf Hepatozyten und Gallengangsepithelien unter URSO-Gabe nachweisen [87], was zur Reduzierung der durch T-Zellen vermittelten hepatozellulären Nekrosen beitragen könnte. Auch Vuoristo et al. konnten eine Reduzierung der proliferierten Gallengänge durch Ursodesoxycholsäure nachweisen [88]. Des Weiteren berichten Yoshikawa et al. von einer Abnahme der Cytokininduktion (IL-2, IL-4, IFN γ) durch URSO in mononukleären Zellen [89]. Hanada et al. berichtet von einer Reduktion der Zytokine TNF- α und IFN γ durch URSO, jedoch von keiner signifikanten Senkung von IL-2 und IL-4 [14].

Im Allgemeinen gilt, dass eine wirksame Therapie erst bei einer Dosis von >10 mg/kg KG pro Tag zu erwarten ist [90]. Die Dosierung von 13 bis 15 mg/kg KG am Tag hat sich in der Behandlung der Patienten bewährt. Die Therapie mit URSO ist generell gut verträglich, kann jedoch Diarrhoe, Kopfschmerzen und eine Gewichtszunahme (~3,6 kg) als Nebenwirkungen auslösen [91]. Jedoch ist die URSO nicht bei allen Patienten wirksam. Poupon et al. postuliert eine genetische und immunologische Prädisposition für Non-Responder auf die Therapie mit Ursodesoxycholsäure [92]. Non-Responder weisen meist persistierende biochemische Veränderungen auf und entwickeln innerhalb von 6 bis 12 Monaten ein fortgeschrittenes histologisches Stadium trotz einer Behandlung mit Ursodesoxycholsäure.

1.9.2 Methotrexat (MTX)

Methotrexat wurde erstmals 1986 zur Therapie der PBC eingesetzt. Niedrig dosiert mit 0,25 mg/kg KG 1x pro Woche verabreicht, scheint MTX eher eine immunmodulatorische und/ oder antiinflammatorische Wirkung als die eines Antimetaboliten aufzuweisen [93]. Auch wenn bei einigen Patienten unter MTX-Therapie von viel versprechenden Ergebnissen berichtet wurde [94-95], haben nicht alle Studien eine erfolgreiche Antwort auf MTX nachweisen können [96-97]. Eine weitere Studie zeigte auch keinen Vorteil der zusätzlichen MTX-Gabe zu URSO bezüglich der nicht transplantationsbedürftigen Überlebenszeit [98]. MTX stellte sich als fraglich wirksames, jedoch sicheres Medikament heraus [98]. MTX wird aufgrund seiner ausbleibenden Effektivität nicht als therapeutisches Mittel bei der PBC eingesetzt.

1.9.3 Colchizin

Die genaue Wirkweise von Colchizin ist nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es die Produktion von Autocoiden chronisch stimulierter Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten und von lokalen Zytokinen moduliert [99-100]. Des Weiteren inhibiert Colchizin endotheliale Adhäsionsmoleküle und senkt die Expression von L-Selektin an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Ebenso beeinflusst es die Aktivität von Zytokinen wie IL-2 und TNF bei PBC Patienten [101]. Es ist keine Studie bekannt, die zeigen konnte, dass Colchizin eine die Lebenserwartung steigernde Wirkung aufweist [102]. Lediglich der Pruritus konnte signifikant gebessert werden [88].

1.9.4 Weitere Medikamente

Bei Therapieversuchen haben sich Prednisolon [103] und Silymarin [104] in der Behandlung der PBC als überwiegend unwirksam gezeigt, sowie Azathioprin [105-106], Penicillamin [107] und Cyclosporin [108-109] teils gar als toxisch.

1.9.5 Lebertransplantation (OLT)

Die primär-biliäre Zirrhose verursacht 1% aller Leberzirrhosen. Sie wird zur Therapie von Patienten in den Spätstadien der PBC, bei denen keine medikamentöse Therapie greift, eingesetzt. Über den richtigen Zeitpunkt für die Durchführung einer Lebertransplantation ist man sich nicht einig. Zu einer OLT wird jedoch geraten, wenn die geschätzte Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Transplantation weniger als 80% beträgt [110] und die folgenden Kriterien, wie z.B.: Plasma Bilirubinkonzentration >5 mg/dl, Serum Albuminkonzentration <2,8 g/dl, das Auftreten von Zirrhose typische Komplikationen, unerträglicher Pruritus oder den Alltag einschränkende pathologische Knochenfrakturen, erfüllt sind. Die Lebertransplantation lindert die Symptome und erhöht die Lebenserwartung der PBC-Patienten. In einer Studie konnte eine 2 Jahres Überlebensrate von 74% vs. 31% in der Gruppe der Lebertransplantierten Patienten gezeigt werden [110]. Die Transplantation wird jedoch von präoperativ chronisch kranken und unterernährten Patienten schlechter vertragen als von weniger schwer Erkrankten [110].

Der Juckreiz und die zirrhosetypischen Komplikationen, wie z.B.: die hepatische Enzephalopathie, Blutungen aus Ösophagusvarizen oder das Hepatorenale Syndrom sind normalerweise umgehend nach einer Transplantation reversibel [111]. Ikterus und Aszites bilden sich etwas langsamer innerhalb von Tagen oder wenigen Monaten zurück. Eine Splenomegalie bleibt meistens weitgehend bestehen, auch wenn die vergrößerte Milz sich in einigen Fällen etwas zurückbildet. Ebenfalls innerhalb weniger Monate bilden sich die Xanthome der Haut zurück. Im Gegensatz dazu kann es zwischen 12 und 18 Monaten dauern, bis sich die hepatische Osteodystrophie trotz Gabe von Vitamin D und Kalzium bessert.

Man geht davon aus, dass sich bei der PBC ein strukturverwandtes Molekül (Oligopeptid mit Sequenzhomologien) auf der Oberfläche von Cholangiozyten befindet (Kreuzreaktivität mit AMA), welches nach Lebertransplantation erneut exprimiert werden könnte. Wahrscheinlich spielt es in der Pathogenese der PBC eine zentrale Rolle [112]. In einigen Fällen erkrankten lebertransplantierte Patienten erneut an der primär-biliären Zirrhose [113-114]. In einer Studie mit

485 Patienten, wurde nach durchschnittlich 76 Monaten bei 23% ein Wiederauftreten der PBC beobachtet [115]. Es konnte eine fast um das 2fache erhöhte Rückfallquote unter dem Immunsuppressivum Tacrolimus im Gegensatz zu Cyclosporin festgestellt werden. Der Grund der unterschiedlichen Wirkung dieser beiden Calcineurin-Inhibitoren ist unklar [115].

Das erneute Aufflammen der PBC in transplantierten Patienten ist durch das erneut vorliegende histologische Korrelat zu diagnostizieren. Jedoch persistieren die AMA in der Mehrzahl der Patienten nach Transplantation [116-117]. Diese Patienten werden ebenfalls mit URSO therapiert, auch wenn in einer Studie kein genereller Überlebensvorteil oder ein verlängertes Überleben des Transplantates im Gegensatz zu nicht mit URSO therapierten Patienten gezeigt werden konnte [118].

1.9.6 Therapie der Symptome und Komplikationen der PBC

Das Management sollte jedoch auch die gegebenenfalls weiteren Krankheitskomponenten wie erhöhte Hyperlipidämie (Statine), Osteoporose (Kalzium, Bisphosphonate, schmerzstillende Medikamente), Hypothyreose (Thyroxin), Müdigkeit (Modafinil) und anhaltenden Juckreiz (Antihistaminika, Colestyramin, Rifampin, Opioidantagonisten) umfassen, die durch Ursodesoxycholsäure nicht oder nicht ausreichend beeinflusst werden.

Bei Vorliegen eines Sicca-Syndroms kann es zu einer therapiepflichtigen Pankreasinsuffizienz kommen.

1.10. Prognose

Die Prognose der PBC hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten deutlich verbessert. Die meisten Patienten in den Frühstadien haben unter Behandlung eine normale Lebenserwartung. Studien haben bei Patienten, die schon früh mit Ursodesoxycholsäure behandelt wurden und auf diese auch die gewünschte biochemische Reaktion zeigten, eine gute Prognose gezeigt. Einige Studien postulieren eine bessere Prognose, wenn die PBC schon im asymptomatischen Stadium diagnostiziert wird [56, 67, 69, 119]. Die Signifikanz dieser Studien ist jedoch fraglich. Tritt bei PBC-Patienten eine der assoziierten Erkrankungen, wie

eine Thyreoiditis, ein Sicca-Syndrom und/oder eine Sklerodermie auf, ist dies mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet, auch wenn die klassischen Symptome der PBC fehlen [56].

Bei der Mehrheit der Patienten entwickeln sich die Symptome innerhalb von zwei bis vier Jahren [67], ebenso bleiben bis zu 1/3 der Patienten für viele Jahre symptomfrei [120].

Es wurden in der Vergangenheit diverse Studien veröffentlicht, in denen verschiedenste Faktoren untersucht wurden, die möglicherweise mit einer schlechteren Prognose der PBC in Zusammenhang stehen sollen. Darunter fielen u.a. die antinukleären Antikörper (im Besonderen die Antizentromer Antikörper), die in einer Studie von Yang et al. aus dem Jahre 2004 mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet waren. Bei 41% von den ANA-positiven Patienten kam es zu einem Leberversagen vs. 25% der ANA-negativen Patienten [121]. Des Weiteren wurde noch der Anstieg von Bilirubin [77], sowie die Antikörperprofile C und D [122] mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Die Ausbildung von Granulomen wiederum wurde mit einem verbesserten Überleben assoziiert.

Von etlichen prädiktiven Modellen ist das Mayo Survival Model dasjenige, das sich zur Abschätzung der Überlebensrate ohne Erreichen der Transplantationsbedürftigkeit am besten bewährt hat und am meisten genutzt wird [77]. Es stützt sich auf die Faktoren Alter, Bilirubin, Albumin, Prothrombinzeit, sowie den Schweregrad der Flüssigkeitsretention, wobei die Bilirubinkonzentration am schwersten gewichtet wird.

Bisher gibt es jedoch keinen zuverlässigen Wert, der die Entwicklung der Symptome vorhersagen könnte [56].

1.11. Ungeklärte Aspekte zur Ätiologie

1.11.1 Allgemeine Überlunge

Zur Klärung der Pathogenese der primär-biliären Zirrhose müssen stets die folgenden ungeklärten Tatsachen in die Überlegungen mit einbezogen werden: Da einerseits die E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase(PDH)-Komplexes, was das Autoimmunantigen M2 der antimitochondrialen Antikörper

darstellt, an der inneren Oberfläche der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, und die PDH somit durch drei Membranen von dem extrazellulären Immunsystem getrennt ist, ist das Auslösen einer Autoimmunreaktion durch Exposition zu antigenpräsentierenden Zellen schwer vorstellbar. Hierzu publizierten 2008 Berg et al. die These, dass der Beginn von Autoimmunerkrankungen mit einer Störung des Apoptosevorgangs vergesellschaftet sein könnte [123]. Durch eine ineffiziente Entsorgung der Zellreste wird eine Immunantwort induziert, aus der die autoimmunen Antikörper resultieren.

Des Weiteren ist die PBC eine scheinbar nur auf die Leber beschränkte Autoimmunerkrankung, deren antimitochondriale Antikörper gegen ein in beinahe jeder Zelle des Körpers vorkommendes Antigen M2 gerichtet sind [124]. Bisher wird als Hauptursache der Pathogenese ein Versagen der Autotoleranz der T-Lymphozyten gegen die E2-Untereinheit der PDH angesehen, da die alleinige Produktion antimitochondrialer Antikörper zur Klärung der Pathogenese dieser Lebererkrankung nicht auszureichen scheint [125].

Es wird davon ausgegangen, dass ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren, unbekanntem Umwelteinflüssen und einer Dysfunktion des Immunsystems für die Entstehung der PBC verantwortlich ist [15, 126-127]. Wie schon bei anderen Autoimmunerkrankungen erkannt wurde, scheint für die Auslösung der primär-biliären Zirrhose, neben einer genetischen Prädisposition, ein den Pathomechanismus auslösendes Ereignis nötig zu sein.

1.11.2 Die „Molecular Mimicry“ Theorie und potentiell die Induktion auslösende Agenzien

Molecular Mimicry beschreibt ein Phänomen, bei dem bestimmte Antigene eine ausreichende Ähnlichkeit mit endogenen Proteinen aufweisen, um eine autoimmune Reaktion auszulösen. Sowohl Viren, Bakterien, Toxine als auch Xenobiotika (körperfremde Stoffe) könnten ein Antigen enthalten, das möglicherweise die primär-biliäre Zirrhose triggert. Es liegt nahe, dass so aufgrund der Ähnlichkeit zwischen der mitochondrialen Membran und der

Zellwand mancher Bakterienstämme, durch das Molecular Mimicry unter anderem die Induktion der Antimitochondrialen Antikörper mit einer Infektion pathogenetisch in Zusammenhang stehen könnte.

Eine solche Kreuzreaktion zwischen bakteriellen Antigenen und humanen Proteinen konnte schon bei diversen Bakterien, u.a. Mykoplasmen [128], nachgewiesen werden. Einige Stämme sowohl von Enterobacteriaceae als auch diverse Mykobakterien kamen schon als Verursacher in Frage [129]. Des Weiteren lassen sich bei den meisten Patienten auch Antikörper gegen retrovirale Proteine finden und retrovirale Sequenzen in biliären Epithelien von PBC - Patienten klonen, so dass auch ein virales Agens als Auslöser der PBC vermutet wurde [130]. Beweisende Ergebnisse konnten jedoch nicht erbracht werden [131].

Besonders Escherichia Coli wurde eingehend untersucht und vor allem wegen der bei PBC Patienten gehäuft auftretenden Harnwegsinfekten als Auslöser vermutet. Es konnten jedoch keine Theorien bewiesen werden, die E.coli als auslösendes Agens identifizieren würden.

Aktuell wird das strikt aerobe, gram negative Bakterium *Novosphingobium aromaticivorans* als Initiator favorisiert. Das ubiquitär vorkommende *N. aromaticivorans* ist jedoch vor allem im menschlichen Stuhl, der Bodenerde und in Küstengebieten zu finden [70]. Seine beiden eine Lipoyl-Gruppe enthaltenden Proteine (47 und 50 kD) [132] weisen eine höhere Ähnlichkeit mit der immundominanten Region der menschlichen Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-E2 Untereinheit auf als jede andere bisher studierte Mikrobe. Es scheinen generell lipoylisierte Enzyme, wie z.B. die PDH-E2 und sogar die Lipoyl-Säure selbst, Ziele der Autoimmunantwort in der PBC dazustellen [133]. Selmi et al. konnte bei *N. aromaticivorans* 100 bis 1000fach stärkere Antigen-Antikörper-Reaktionen feststellen als bei E. coli [132]. Zusätzlich ist *N. aromaticivorans* in der Lage, Xenobiotika zu metabolisieren, die Ähnlichkeiten zu chemischen Verbindungen aufweisen, die mit Seren von PBC-Patienten reagieren. Einige dieser Xenobiotika beziehen sich immunologisch auf den Kofaktor des aktiven Zentrums der PDH-E2, die Lipoylsäure. Dadurch kann *N. aromaticivorans* theoretisch die Autotoleranz auf zwei Arten stören:

1. durch eine aufgrund einer subklinischen Infektion verursachte Molecular Mimicry
2. durch Metabolite von aus der Umwelt aufgenommenen Xenobiotika.

Forscher aus Mailand/ Italien konnten von 77 Patienten in allen Seren, die Antikörper gegen PDH-E2 enthielten, auch Antikörper feststellen, die gegen *N. aromaticivorans* gerichtet waren. Ebenso ergaben ihre Untersuchungen, dass die Titer der gegen die Proteine von *N. aromaticivorans* gerichtet waren, die gleiche Konzentration aufwiesen, wie die AMA gegen die PDH-E2 Untereinheit [134]. 13 von 14 isländischen, AMA-positiven PBC-Patienten reagierten mit mindestens einer der beiden α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-E2 Komplexen [134].

Leung et al. immunisierten Kaninchen mit einem organischen Xenobiotikum, indem 6-Bromhexoanate an BSA gekoppelt wurde. Alle immunisierten Hasen entwickelten AMA, die jegliche Charakteristika der humanen AMA aufwiesen und sowohl mit der E2 Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase, der verzweigt-kettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase und der α -Ketosäure-Dehydrogenase reagierten. Die AMA der Kaninchen hemmten die enzymatische Funktion der PDH-E2 und banden nicht an Peptidsequenzen von BSA. Im Gegensatz dazu produzierten BSA-immunisierte Kontrollen keinerlei solcher Aktivitäten. Zusätzlich wurden Meerschweinchen mit Bromhexoanaten immunisiert. Diese entwickelten antimitochondriale Antikörper und erkrankten nach circa 18 Monaten an einer autoimmunen Cholangitis [135].

Zusätzlich wurde in weiteren Studien die Bedeutung von in unserer Umwelt vorkommenden Xenobiotika untersucht. Amano et al. modifizierten die PDH-E2, indem die Lipoyl-Säure an ihrem Lysin-Anker gegen ein Lipoyl-Säure mimendes Xenobiotikum ersetzt wurde [136]. Auf diese Weise wurden 107 verschiedene Xenobiotika getestet, von denen 33 eine signifikant höhere IgG-Reaktion auf Seren von PBC-Patienten aufwiesen als ihre gesunden Kontrollen. Zusätzlich waren 9 dieser 33 Verbindungen reaktiver als das natürlich vorkommende Lipoyl-Säure tragende Peptid. 8 dieser 9 Verbindungen zeigten eine Kreuzreaktion mit Lipoyl-Säure.

Die 2-Octynoic-Säure war einzigartig in der Analyse der quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehung sowie der Reaktivität. Es wurde von PBC-Seren eine hohe Immunglobulin-Reaktion gegen das PDH-E2-Peptid mit gekoppelter 2-Octynoic-Säure gezeigt. Die Verwendung von 2-Octynoic-Säure ist weit verbreitet in Parfums, Lippenstift und vielen gebräuchlichen Geschmacksverstärkern, was das gehäufte Auftreten von PBC-Erkrankungen bei häufigem Gebrauch dieser Artikel erklären könnte [136]. Diese beiden Studien zeigten, dass ebenso Xenobiotika Risikofaktoren darstellen und eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der PBC spielen könnte. Vor allem würde das die unterschiedliche Häufung der PBC-Erkrankungen je nach Wohnort (wie z. B. das häufigere Auftreten an einem Wasserreservoir) oder den verschiedenen Lebensgewohnheiten erklären. Aber auch viele der anderen getesteten Xenobiotika finden sich häufig im alltäglichen Leben bzw. in alltäglich genutzten Gegenständen und Mitteln wieder.

1.11.3 Weitere Überlegungen bezüglich der Pathomechanismen

Dass überwiegend Frauen betroffen sind, könnte neben der Theorie der X-chromosomalen Monosomie (siehe genetische Prädisposition), möglicherweise auch mit hormonelle Einflüsse zusammenhängen. Auf biliären Epithelzellen von PBC-Patienten werden Östrogenrezeptoren (ER-Alpha und ER-Beta) exprimiert. Es wird vermutet, dass Östrogene die Proliferation der Cholangiozyten (beispielsweise als Reaktion auf eine Schädigung) über diesen Weg beeinflussen [137-138].

Neuerdings wird eine Sekretionsstörung von Phospholipiden (durch MDR3) in die Primärgalle als Ursache verschiedener cholestatischer Syndrome diskutiert. Dies könnte laut Tierversuchen Auswirkungen auf die Cholangiozyten haben und mögliche Ursache von Cholangiopathien (PBC und PSC) sein [139]. Die Cholangiozyten selbst scheinen eine bedeutende Rolle bei Leberregeneration und Fibrosebildung zu spielen und eine Reihe von proentzündlichen Zytokinen und parakrinen Mediatoren zu bilden. Ihre Funktion und Bedeutung bei cholestatischen Erkrankungen wie der PBC und PSC wird intensiv erforscht [140].

Neuman et al. zeigte in seiner Arbeit, dass Tumornekrose Faktor-alpha (TNF- α) und Transforming Growth Faktor-beta (TGF- β) sich entsprechend der Krankheitsaktivität erhöht zeigen. Unter URSO Therapie konnte eine signifikante Senkung des TNF- α und des TGF- β Spiegels nachgewiesen werden. Der positive Effekt von URSO könnte mit der Reduktion dieser beiden Zytokine, die eventuell in der Pathogenese der PBC eine Rolle spielen, in Zusammenhang stehen [141].

Vor allem wegen des erneuten Auftretens der PBC nach einer Lebertransplantation wird auch eine Immunpathogenese diskutiert. Für eine Immunpathogenese spricht auch ein Mäusemodell, bei dem es nach Impfung mit PDH zur Entwicklung einer PBC kam [142], das Auftreten von IgA-AMA in der Galle sowie dem Speichel von PBC-Patienten [143] und die Assoziation mit anderen Autoimmunkrankheiten (siehe oben).

1.12. Antimitochondriale (AMA) und Antinukleäre (ANA) Antikörper

Die Antimitochondrialen Antikörper sind das serologische Kennzeichen der PBC, das bei 95% der Patienten auftritt [15]. Bisher wurden 9 Subklassen der AMA identifiziert (*Tabelle 1.1*), jedoch sind ihre Rolle in der Pathogenese und ihre Induktion (siehe Molecular Mimicry) immer noch ungeklärt [131, 144].

Tabelle 1.1: Darstellung der verschiedenen AMA-Untereinheiten, ihrer assoziierten Erkrankungen und ihre vermuteten Targets.

AMA-Untereinheit	Assoziierte Erkrankung	Gerichtet gegen	Mitochondriale Membran *
M1	Infektiös, z. B. Syphilis	Cardiolipin	Innere +
M2	PBC	α -Ketosäure-Deyhydrogenase	Innere
M3	Medikamenteninduziert, v. a. bei Venoucuran	Unbekannt	Äußere

M4	PBC	Antigen assoziiert mit Sulfitoxidase	Äußere / Intermembranös
M5	Kollagenerkrankungen, z. B. Lupus erythematodes	Unbekannt	Äußere +
M6	Medikamenteninduziert, v. a. bei Iproniazid	Monoaminoxidase	Äußere
M7	Infektiös, z. B. Myokarditis	FAD-Anteil von Flavoenzymen	Innere +
M8	PBC	Äußere Mitochondrienmembran	Äußere
M9	PBC	Glycogen-Phosphorylase	Äußere

(+ = bei nicht hepatischer Erkrankung *[145] + = bei nicht hepatischer Erkrankung)

In Seren von PBC-Patienten konnten bisher 4 AMA-Subtypen, Anti-M2, Anti-M4, Anti-M8 und Anti-M9 mithilfe von verschiedenen Antigenfraktionen in der KBR, dem ELISA und dem WesternBlot nachgewiesen werden. Alle diese AMA-Typen sind hoch spezifisch für die PBC. Anti-M2 ist der diagnostisch wichtigste AMA-Typ der PBC. Anti-M4 und Anti-M8 treten nur zusammen mit Anti-M2 auf. Anti-M9 hingegen kann ebenso in AMA-negativen Patienten auftreten [146].

M2

Die entsprechenden Antigene werden entweder mit der inneren (M2) oder der äußeren mitochondrialen Membran (M4, M8, M9) mit aufgereinigt. Da es jedoch so gut wie unmöglich ist, die äußere mitochondriale Membran alleine ohne Teile der Inneren zu isolieren, kann eine Kontamination von M2 mit den anderen Antigenen 3 Subklassen nicht ausgeschlossen werden [146]. 1967 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Aktivität der Komplementbindenden

Antikörper auf eine Reaktion mit einem Antigen der inneren mitochondrialen Membran zurückzuführen ist [6]. Lindenborn-Fotinos et al. waren die ersten, die M2 noch weiter mittels WesternBlot analysierten [147]. Es wurden 5 M2-Determinanten a-e mit den Molekülmassen 70-75 (a), 56 (b), 51 (c), 45 (d) und 36 (e) detektiert (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Darstellung der M2-Determinanten.

M2-Determinante	Gerichtet gegen	Molekulargewicht
M2a	E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	80 kD
M2b	Protein-E3-bindendes Protein des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	56 kD
M2c	E2-Untereinheit des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes	51 kD
M2d	E1 α -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	45 kD
M2e	E1 β -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	36 kD

Diese Autoantigene entsprechen den E2-Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, des 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplexes und des Verzweigtketten-Dehydrogenase-Komplexes der Familie der 2-Oxosäure-Dehydrogenasen, die untereinander eine große Ähnlichkeit aufweisen [15].

80% der AMA-positiven PBC-Seren reagieren mit der M2a-Determinante und somit mit der E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes [148]. 50% der Seren reagieren mit der E2-Untereinheit des Verzweigtketten-Dehydrogenase-Komplexes [147]. Die Multienzym-Komplexe aus der Familie

der 2-Oxosäure-Dehydrogenasen sind alle an der enzymatischen Energiegewinnung aus Kohlenhydraten beteiligt.

M4, M8 und M9

Anti-M4 Antikörper wurden erstmals nachgewiesen, als Seren sowohl gegen die innere als auch gegen die äußere mitochondriale Membran getestet wurden. 15 der 40 Seren reagierten in der KBR mit beiden Membranfraktionen. Im Gegensatz zu dem Trypsin-sensitiven M2 Antigen der inneren Membran konnte die Reaktion mit der äußeren Membran nicht durch Trypsin gestört werden [149]. M4 ist im WesterBlot nicht detektierbar [150]. Da M4, wie M8, stets nur zusammen mit dem M2 Antigen auftritt, wird seine Identität als eigenständiges Antigen angezweifelt und es teils gar als Artefakt interpretiert. In den 80ern ging man davon aus, dass M4 mit der Sulfitoxidase assoziiert ist [151]. Berg et al. veröffentlichte jedoch ein Studie, in der die E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase als das Autoantigen M4 postuliert wurde [150].

Das Antigen von Anti-M8 ist unbekannt, scheint aber mit Laminin assoziiert zu sein [152].

M9 ist die einzige AMA-Subklasse, die bei der PBC auch in Abwesenheit von Anti-M2 Antikörpern zu finden ist. Sie reagiert mit einem Antigen der Glykogen-Phosphorylase. Sie tritt auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen auf und ist nicht PBC-, aber organspezifisch. Das Auftreten der M9 scheint mit einer besseren Prognose vergesellschaftet zu sein [122]. In der *Tabelle 1.3* werden die 4 mitochondrialen Antigen-Antikörper-Systeme bei der primär-biliären Zirrhose aufgeführt.

Tabelle 1.3: Vier mitochondriale Antigen-Antikörper-Systeme bei der primär-biliären Zirrhose

Antigen	Korrespondierend mit	Klinische Relevanz
M2	α-Ketosäuredehydrogenase-Komplex (5 Determinanten)	Diagnostischer Marker
M4	Assoziiert mit Sulfitoxidase	Prognostischer Marker

M8	Unbekannt; wird gewonnen aus Mikrosomen aus Schweineniere	Prognostischer Marker
M9	Glykogenphosphorylase (zwei Determinanten bei 98 und 59 kD)	Diagnostischer Marker (wenn Anti-M2 negativ) und prognostischer Marker

Prognostische Bedeutung der AMA Profile

Klein et al. identifizierte 4 AMA Profile A-D mit prognostischer Bedeutung für einen aktiven oder inaktiven Verlauf der PBC [122]. Die Profile C (54 %) und D (96 %) weisen in einem Zeitraum von 6–8 Jahren eine deutliche Progression zu Spätstadien auf, während 100% der Patienten mit dem Profil A und 96 % der Patienten mit dem Profil B in den Krankheitsstadien 1 und 2 verbleiben.

Tabelle 1.4: Die 4 AMA-Profile zur prognostischen Einschätzung der PBC.

AMA-Profil	Antikörperkonstellation
A	Nur Anti-M9 positiv im ELISA
B	Anti-M9 und/oder Anti-M2 positiv im ELISA
C	Anti-M2, -M4 und/oder -M8 positiv im ELISA (mit oder ohne Anti-M9)
D	Anti-M2, -M4 und/oder -M8 positiv in ELISA und KBR (mit oder ohne Anti-M9)

ANA

Wie unter „1.8 Diagnostik“ schon erwähnt, treten ANA in bis zu 70% der PBC Patienten auf [74] und sind ebenso bei AMA-negativen PBC-Patienten nachweisbar. Sie richten sich gegen intrazelluläre Strukturen, wie die „nuclear dots“ (sp100), Kernmembran (gp 120) [72] und Kernporenproteinen (gp 210) [73] und sind mit einer aktiveren Verlaufsform assoziiert. Nickowitz et al. fand z.B. Homologien zwischen den bei der PBC ebenso auftretenden Antinukleären Antikörpern (ANA) und dem bei E. coli vorkommenden Gen mutY und dem bei

Salmonella typhimurium exprimierten mutB Gen [73], was wiederum die Theorie des Molecular Mimicry unterstützt.

1.13. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen mehrere Fragestellungen bearbeitet werden, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

a) Suche nach weiteren immundominanten Epitopen außerhalb der inneren Lipoyl-Domäne

Es ist bekannt, dass das Hauptantigen der antimitochondrialen Antikörper bei der primär-biliären Zirrhose die E2-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase darstellt [10-13]. In vorangegangenen Studien wurden Peptide, die das Lipoyl-bindenden Lysin K173 umgeben (Peptide 167-184 oder 165-178) als immundominante Epitope der PDH-E2 Untereinheit und das Haupttarget der Anti-M2-Antikörper definiert [153]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob noch weitere Peptide außerhalb der inneren Lipoyl-Domäne Antigene der Anti-PDH-E2-Antikörper darstellen. Hierfür wurden die Seren von 91 klinisch und histologisch bestätigten PBC-Patienten im ELISA auf ihre Reaktivität mit 35 synthetisch hergestellten Peptiden, die die vollständige Länge der PDH-E2 Einheit abdecken, getestet. Jedes dieser Peptide bestand aus 25 Aminosäuren und überlappte in beide Richtungen jeweils mit den nächsten 8 Aminosäuren der Nachbarpeptide.

Des Weiteren wurde die Reaktivität der PBC-Seren gegen das bisher als M2 Haupttarget identifizierte Peptid der inneren Lipoyl-Domäne untersucht. Hierfür wurden einmal das lipoylierte und das unlipoylierte Peptid 167-184, sowie beide Formen jeweils allein und an Ovalbumin gekoppelt, im ELISA auf ihre Reaktion mit PBC-Seren getestet.

b) Suche nach möglichen Hinweisen für die Identität von M4

Anti-M4 Antikörper wurden erstmals nachgewiesen, als Seren sowohl gegen die innere, als auch gegen die äußere mitochondriale Membran getestet wurden. Jedoch ist bis heute die Identität des M4-Antigens der antimitochondrialen

Antikörper bei der PBC ungeklärt. Bereits in den 80er Jahren wurde das M4-Antigen mit der Sulfioxidase und einer schlechten Prognose assoziiert [154]. Wie man heute jedoch weiß, ist die Sulfioxidase ein Enzym des intermembranösen Raums, das vermutlich bei der Antigenpreparation aus technischen Gründen nicht von der Fraktion der äußeren mitochondrialen Membran getrennt werden kann und somit diese verunreinigt. In mehreren Studien wurde die humane Sulfioxidase synthetisiert und im ELISA sowie im WesternBlot mit PBC-Seren getestet. Jedoch blieben die erwarteten Reaktionen gegen die Sulfioxidase aus [155]. 2006 publizierten Berg et al. eine Arbeit in der das M4-Antigen mit der PDH-E1 Untereinheit assoziiert wurde [150]. Leider gelang auch in dieser Studie kein endgültiger Beweis für die Identität des M4-Antigens.

Ein anderes Ziel unserer Arbeit war es daher, durch die Korrelation der M2- und M4-Reaktivitäten der IgG- und IgM-Antikörper unter Umständen weitere Hinweise auf die Identität des M4-Antigens zu erhalten.

c) Suche nach einem Zusammenhang der PDH-E2-Peptide und der Reaktivität komplementbindender Antikörper

Die Komplementbindungsreaktion gilt in der Immunologie als eine hochspezifische, jedoch gering sensitive Methode zum Nachweis von Autoantikörpern. Da natürliche Autoantikörper kein Komplement binden, ist der Nachweis komplementbindender Antikörper fast beweisend für das Vorliegen einer Erkrankung. Diese Methode dient vor allem zum Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern, da sie unter Verwendung bestimmter submitochondrialer Fraktionen eine Subspezifizierung zulässt und komplementbindende Antikörper gleichzeitig immer ein Hinweis sind für eine relevante immunologische Aktivität, so dass ihnen auch eine prognostische Bedeutung zugeschrieben wird.

Die von Klein et al. identifizierten AMA Profile A-D besitzen eine prognostische Bedeutung für einen aktiven oder inaktiven Verlauf der PBC [122]. Die Profile C (54 %) und D (96 %) weisen in einem Zeitraum von 6–8 Jahren eine deutliche Progression zu Spätstadien auf, während 100% der Patienten mit dem Profil A

und 96 % der Patienten mit dem Profil B in den Krankheitsstadien 1 und 2 verbleiben. Interessanterweise zeigt sich der Hauptunterschied zwischen der Profile A und B zu den Profilen C und D im Vorhandensein komplementbindender Antikörper, was ihren prognostischen Wert nur betont. Aus diesem Grunde und mit der Frage, ob die PBC-Seren mit komplementbindenden Antikörpern bevorzugt mit einem bestimmten Antigen der PDH-E2 reagieren, wurden sie nach ihrer M2- und M4-Aktivität in Gruppen eingeteilt und ebenfalls mit den 35 Peptiden getestet und korreliert.

d) Suche nach einem Zusammenhang der PDH-E2 Peptide und der Reaktivität für Seren von PBC-Patienten mit aktivem bzw- inaktivem Krankheitsverlauf

In der Hoffnung, noch weitere prognostische Marker für einen aktiven oder inaktiven Krankheitsverlauf identifizieren zu können, wurden die 91 AMA-positiven PBC-Patienten ihrem Krankheitsverlauf nach in 2 Gruppen eingeteilt und ihre Seren gegen die 35 synthetisierten Peptide der PDH-E2 Untereinheit getestet. Anschließend wurden ihre Reaktivitäten mit den M2- und M4-Reaktivitäten korreliert.

e) Suche nach den Auswirkungen der verschiedenen Therapien auf die AMA-Reaktivität

Klein et al. konnte nach Ursodesoxycholsäure Therapie ein Rückgang der AMA-Reaktivität gegen die Sulfioxidase bei cholestatischen Lebererkrankungen, vornehmlich bei der PSC nachweisen [156]. Mit der Frage, ob dies bei der PBC ebenso auftreten könnte oder ob sich andere Auswirkungen bemerkbar machen könnten, wurden die PBC-Patienten nach der ihnen verabreichten Therapie in Gruppen eingeteilt und die Reaktivität ihrer Seren vor und nach Therapie miteinander verglichen.

2. Probanden, Methoden, Materialien

2.1. Probanden

2.1.1. AMA-positive PBC-Patienten

Nach Diagnosestellung der PBC wurden alle Patienten mindestens 5 Jahre (5-28 Jahre) lang weiterhin beobachtet. Ein Overlap-Syndrom und weitere nicht-autoimmune Erkrankungen (z.B.: Alkoholische, virale oder metabolische Lebererkrankung und Steatohepatitis) wurden mithilfe von relevanten Autoimmun- und viralen Antikörpern sowie quantitativen Immunglobulin-Titern und dem Krankheitsverlauf bestmöglich ausgeschlossen.

In dem untersuchten Patientenkollektiv waren bei 90,2% antimitochondriale Antikörper nachweisbar. Das Haupttarget dieser antimitochondriale Antikörper (AMA) ist bei der PBC die E2-Untereinheit (PDH-E2) des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, der in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist.

Es wurden die Daten von 91 AMA-positiven PBC-Patienten für die Korrelation mit den PDH-E2-Peptiden und somit zur Suche nach weiteren möglichen immundominanten Epitopen verwendet.

In der *Tabelle 2.1* sind die Geschlechts- und Altersverteilung der 91 Patienten dargestellt. Die angegebenen Altersangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die *Tabelle 2.2* führt die serologischen Daten dieser Patienten auf.

Tabelle 2.1.: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten mit PBC (n=91).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	91	47,9	19 - 69
Männer	10	50,8	44 - 63
Frauen	81	47,7	19 - 69

Tabelle 2.2: Serologische Daten der 91 PBC-Patienten.

Antimitochondriale Antikörper	
AMA (IFT) (Titer > 1:160)	91
Anti-M2 (KBR) (Titer > 1:66)	61
Anti-M2 (ELISA) total	91
IgG	83
IgM	69
Anti-PDH (ELISA)	91
Antinukleäre Antikörper	
	(Titer > 1:160)
„nuclear dots“ (sp100)	16
Kernmembran (gp210)	10
Zentromer	8

Es wurden zwischen 2 und 28 fortlaufende Serumproben pro PBC-Patient untersucht. Insgesamt wurden die ermittelten Daten aus 582 Seren in unsere Auswertungen aufgenommen. Alle Seren wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.1.2. AMA positive PBC Patienten vor Therapiebeginn

Von den 91 Patienten mit manifester PBC waren bei 65 Patienten Seren vorhanden, die zu einem Zeitpunkt vor Therapiebeginn abgenommen wurden. Geschlechts- und Altersverteilung sind in *Tabelle 2.3* angegeben. Die histologischen PBC-Leberstadien und die biochemischen Daten werden in den *Tabellen 2.4* und *2.5* aufgeführt.

Tabelle 2.3: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten vor Therapiebeginn (n=65).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	65	50,1	19 - 69
Männer	7	49,5	44 - 55
Frauen	58	45,5	19 - 69

Bei 42 der 65 untherapierten Patienten wurden Leberbiopsien entnommen.

Tabelle 2.4: Histologische Leberbefund der 65 untherapierten PBC-Patienten.

Histologisches Leberstadium	Häufigkeit der PBC-Patienten
PBC-Stadium I / II	30
PBC-Stadium III / IV	12

Tabelle 2.5: Laborchemische Daten der 65 PBC-Patienten (Mittel +SD).

AP (U/l) (normal < 120)	453 ± 451
γGT (U/l) (normal < 50)	154 ± 143
GOT (U/l) (normal < 35)	39.4 ± 42.6
GPT (U/l) (normal < 35)	51 ± 49.3
Cholinesterase (kU/l) (normal > 5)	4.7 ± 1.7
Bilirubin (mg%) (normal < 1.5)	1.62 ± 0.8
Cholesterol (mg/dl) (normal < 200)	251 ± 69
Eosinophile (%) (normal < 4)	3.61 ± 2.36
IgG-Globuline (mg%) (normal < 1800)	1679 ± 855
IgA-Globuline (mg%) (normal < 400)	269 ± 158
IgM-Globuline (mg%) (normal < 280)	416 ± 255

2.1.3. ELISA

Bei diesen 65 Patienten zeigte sich im ELISA die in der *Tabelle 2.6* aufgeführte Verteilung der gegen M2 gerichteten IgG- und IgM-Antikörper.

Tabelle 2.6: Häufigkeit der Anti-M2 Antikörper unter den untherapierten Patienten (n=65).

Patientenanzahl, von denen Seren vor Therapiebeginn vorhanden sind	65
Patienten mit Anti-M2 IgG-Antikörpern	62 (95%)
Patienten mit Anti-M2 IgM-Antikörpern	51 (78%)
Patienten ohne Anti-M2 IgG- oder IgM-Antikörper	1 (1,5%)

Dementsprechend ist die Verteilung der M4-Reaktivitäten in *Tabelle 2.7* dargestellt.

Tabelle 2.7: Häufigkeit der Anti-M4 Antikörper unter den untherapierten Patienten (n=65).

Patientenanzahl mit Seren vor Therapiebeginn	65
Patienten mit Anti-M4 IgG-Antikörper	58 (89%)
Patienten mit Anti-M4 IgM-Antikörper aufweisen	48 (73%)
Patienten ohne Anti-M4 IgG- oder IgM-Antikörper	1 (1,5%)

2.1.4. KBR

Des Weiteren wurden die im ELISA Anti-M2- und Anti-M4-positiven Serumproben auf komplementbindende Antikörper getestet (*Tabelle 2.8*).

Tabelle 2.8: Anteil der untherapierten Patienten mit komplementbindenden Anti-M2 (n=57) und Anti-M4-Antikörper (n=51).

Patientenanzahl, mit Seren vor Therapiebeginn	64
---	----

Patienten mit komplementbindenden Anti-M2-Antikörpern	57 (89%)
Patienten mit komplementbindenden Anti-M4-Antikörpern	51 (79%)
Patienten mit komplementbindenden Anti-M2- und Anti-M4-Antikörpern	50 (78%)
Patienten ohne komplementbindende Anti-M2-Antikörpern	7 (11%)
Patienten ohne komplementbindende Anti-M4-Antikörpern	13 (20%)
Patienten ohne komplementbindende Antikörpern	7 (11%)

In der unten aufgeführte *Tabelle 2.9* wird das gemeinsame Auftreten von Anti-M2- und Anti-M4- komplementbindenden Antikörpern dargestellt.

Tabelle 2.9: Zusammenhang des Auftretens der Anti-M2 und Anti-M4 Antikörper in der KBR (n=64).

In der KBR	M2 positiv	M2 negativ
M4 positiv	50	1
M4 negativ	7	7

2.1.5. Krankheitsverlauf

Mithilfe von Leberbiopsien können schon zu Beginn der Erkrankung die PBC-typischen Leberveränderungen festgestellt werden. Es werden bei der PBC zwei Formen des Krankheitsverlaufes unterschieden. Persistiert das histologische Stadium I oder II bei einem Patient über fünf Jahre hinweg, liegt ein inaktiver Krankheitsverlauf vor. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei der aktiven Verlaufsform die Leberpathologien als progredient und es kommt innerhalb von fünf Jahre zu einer Ausbildung der histologischen Spätstadien III/IV. Ebenso können hier eine portale Hypertension mit der Notwendigkeit

einer Lebertransplantation oder sogar der Tod durch Leberversagen auftreten. In der *Tabelle 2.10* ist die Häufigkeit der Patienten mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf dargestellt.

Tabelle 2.10: Aktiver (n=37) und inaktiver (n=54) Krankheitsverlauf bei den AMA-positiven Patienten (n=91).

	Anzahl	Männlich	Weiblich
Aktiv	37 (41%)	6 (16,2%)	31 (83,7)
Inaktiv	54 (59%)	2 (3,7)	52 (96,2)

2.1.6. AMA-positive PBC-Patienten von Beginn an unter Therapie

Aus dem Kollektiv der 91 AMA-positiven PBC-Patienten standen 26 bei der ersten Serumprobenabnahme bereits unter Therapie. Geschlechts- und Altersverteilungen sind in *Tabelle 2.11* angegeben.

Tabelle 2.11: Geschlechts- und Altersverteilung der bereits therapierten Patienten (n=26)

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	26	46,6	27 - 69
Männer	3	51,5	44 - 63
Frauen	23	45,3	27 - 69

2.1.7. PBC-Patienten unter Therapieeinfluß

Die 65 zu Beginn untherapierten AMA-positiven PBC-Patienten wurden nun nach der im weiteren Verlauf erhaltenen Therapieform in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Ursodesoxycholsäure (URSO)

49 der 91 Patienten wurden mit Ursodesoxycholsäure behandelt. *Tabelle 2.12* zeigt die Geschlechts- und Altersverteilung dieser Patienten auf.

Tabelle 2.12: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten unter Ursodesoxycholsäure-Therapie (n=49).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	49	48,7	27 - 69
Männer	5	51,2	44 – 63
Frauen	44	48,4	27 - 69

Es waren von 21 Patienten Seren vor und nach Therapiebeginn vorhanden. Diese Serumproben wurden nun nach ihrem Abnahmezeitpunkt in 3 Gruppen aufgeteilt: vor Therapie, innerhalb der ersten beiden Jahren unter Therapie und Seren nach 2 Jahren unter Therapie.

Methotrexat (MTX)

Von 5 der 7 mit Methotrexat behandelten Patienten waren für die Auswertungen geeignete Seren vorhanden. Die Patienten wurden zwischen 5 und 160 Monaten behandelt, wobei die durchschnittliche Behandlungsdauer 39,9 Monate betrug. In der *Tabelle 2.13* wird die Geschlechts- und Altersverteilung dieses Patientenkollektives dargestellt.

Tabelle 2.13: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten unter Methotrexat – Therapie (n=7).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	7	47,2	39 - 56
Männer	-	-	-
Frauen	7	47,2	39 - 56

Azathioprin (AZA)

9 Patienten wurden mit Azathioprin therapiert (Geschlechts- und Altersverteilung in *Tabelle 2.14*). Von 3 der 9 Patienten waren verwertbare Seren vor und unter Therapie vorhanden.

Tabelle 2.14: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten unter Azathioprin – Therapie (n=9).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	9	45,8	37 - 69
Männer	1	55	55
Frauen	8	44,8	37 - 69

Lebertransplantation (OLT)

10 Patienten erhielten eine Lebertransplantation. *Tabelle 2.15* gibt die Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten zum Diagnosezeitpunkt wieder. *Tabelle 2.16* zum Zeitpunkt der Transplantation. Für die Auswertung waren die Seren von 8 der 10 Patienten geeignet.

Tabelle 2.15: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten mit einer OLT bei Diagnosestellung (n=10).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
Insgesamt	10	42,1	28 - 58
Männer	1	45	45
Frauen	9	41,8	28 - 58

Tabelle 2.16: Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten mit einer OLT bei Transplantation (n=10).

	Anzahl	Durchschnittsalter in Jahren	Altersspanne in Jahren
--	--------	---------------------------------	---------------------------

Insgesamt	10	51	39 - 61
Männer	1	59	59
Frauen	9	50,1	39 - 61

Aus *Tabelle 2.15* und *Tabelle 2.16* ist zu erkennen, dass die durchschnittliche Dauer bis zum Zeitpunkt der Transplantation 8,9 Jahre betrug.

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung und Aufarbeitung der Antigene

Zur Gewinnung des M2 und M4-Antigens werden eine in Eis gekühlte Rattenleber (M4) und ein Rinderherz (M2) bei 4°C aufgearbeitet. Entsprechendes Gewebe wird in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, gewaschen, abgewogen und bei minus -70°C bis zum Verarbeitungstag eingefroren. Nach dem Auftauen wird dem Gewebe in einem Verhältnis von 1:2 ([g] Gewebe: [ml] Puffer) Tris-Puffer zugegeben und in einem Küchenmixer für etwa 30 Sekunden auf höchster Stufe zerkleinert. Um ein Absinken des pH-Wertes zu verhindern, werden während des Mixens je 5 ml einer 1M Tris-Lösung zupipettiert. Anschließend wird das Gewebe zum weiteren Zellaufschluss 15 Sekunden lang mit einem Ultra turrax weiter zerkleinert. Das Gewebehomogenat wird mit 1M Tris-Lösung auf pH 7,4 eingestellt und bei 2000 rpm (545g) 10 Minuten lang in der Sorvall GSA Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei 10 000 rpm (13 630 g) für 10 Minuten zentrifugiert. Im Pellet befinden sich nun die Mitochondrien. Es folgt die Resuspendierung und Homogenisierung des Pellet mit einem Glaspotter. Ebenso das dreimalige Waschen durch je 10 Minuten bei 11 000 rpm in der Sorvall SS 34. Danach werden die Pellets mit etwas Puffer erneut resuspendiert und bei – 20°C eingefroren. Aufgetautes Homogenat wird in kleinen Fraktionen mit Ultraschallwellen aufgelöst und anschließend in einer Ultrazentrifuge bei 100 000g zentrifugiert. Die Überstände der jetzt freigesetzten submitochondrialen Partikel fungieren als Antigene. Dieses „Antigengemisch“ enthält Fragmente der äußeren Mitochondrienmembran, die intermembranöse

Matrix der Mitochondrien und Reste der inneren Mitochondrienmembran, in der unter anderem die PDH enthalten ist.

Die im Pellet enthaltenen submitochondrialen Partikel werden je nach Organ mit oder ohne Chloroformbehandlung (Herz mit, Leber ohne) weiterverarbeitet. Zur endgültigen Gewinnung des M2 und M4-Antigens werden weitere Zentrifugationsschritte bei 33 000 rpm benötigt. Die Auftrennung der submitochondrialen Partikel erfolgt mithilfe eines vorsichtig in den Tube-Röhrchen aufgeschichteten Saccharose-Gradienten. Nach Herstellung der Saccharose-Lösungen werden diese in abfallender Konzentration jeweils in 1-1½ ml gekühlt übereinander geschichtet. Man beginnt mit der höchsten Konzentration von 1,28 und bildet einen Saccharose-Gradienten bis zu einer Konzentration von 1,04. Die resuspendierten Pellets mit den enthaltenen submitochondrialen Partikeln werden nun auf den Saccharose-Gradienten zugegeben. Es ist auf darauf zu achten, die Tube-Röhrchen vor dem Zentrifugieren gut auszutarieren.

Nach der Zentrifugation befindet sich das M2-Antigen in den Saccharose-Konzentrationen von 1,16 bis 1,24. Das M4-Antigen sammelt sich in den Konzentrationen von 1,04 bis 1,14.

Aufarbeitung der rekombinanten Antigene der E2-Untereinheit

Die rekombinanten Antigene wurden mit DMSO aufgelöst und in derselben Art und Weise wie die anderen Antigene verarbeitet.

2.2.2. Immunfluoreszenztest (IFT)

Vorbereitete Gefrierschnitte (-20°C) wurden aufgetaut und jeder Objektträger mit einem PapPen[®] in 3 Teile unterteilt. So entstehen drei Versuchsfelder pro Objektträger mit je 5 Organschnitten (Rattenleber, Rattenherz, Rattenniere, Rattenmagen und menschliche Schilddrüse). Die Seren werden mit PBS-Puffer 1:5 verdünnt, auf die Versuchsfelder mit einer Plastikpipette aufgetragen und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Objektträger vorsichtig mit PBS abgespült und zweimal 15 Min. in PBS auf dem Rüttler gewaschen. Nun werden die Versuchsfelder mit den mit FITC verbundenen, 1:45

verdünnten Antikörpern (Dako Kappa Lambda IgG, IgM und IgA) großzügig bedeckt, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wiederum zweimal 15 Min. mit PBS gewaschen. Die Objektträger werden unter Zugabe von Eindeckmittel (50% Glycerin + 50% PBS) mit einem Deckglas bedeckt.

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

2.2.3. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Testprinzip

Im Elisa ist es möglich, im Serum vorhandene Antikörper, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, zu detektieren. Nunc-Platten werden mit dem jeweiligen Antigen beschichtet und anschließend das verdünnte Patientenserum zupipettiert. In der Inkubationszeit gehen die im Serum enthaltenen Antikörper mit ihrem Antigen eine kovalente Bindung ein. Um diese Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, werden gegen den Fc-Teil der gesuchten humanen Antikörper gerichtete, Peroxidase gekoppelte Antikörper zugegeben. Nach zusätzlicher Zugabe eines Substrats erfolgt proportional der Antigen-Antikörper-Bindungen durch die Peroxidase-Reaktion ein Farbumschlag, womit der Antikörpertiter im Serum durch den ELISA-Reader messbar wird.

Ansetzen des Antigens

Das jeweils zu testende Antigen wurde nach dem Auftauen mit Bikarbonatpuffer so verdünnt, dass bei den Antigenen M2 und M4 eine Soll-Konzentration von 10 µg / ml erreicht wurde. Diese Konzentration konnte sich im Routine-Labor für den AMA-Antikörper-Nachweis etablieren. Die 35 PDH-E2-Peptide wurden auf eine Sollkonzentration von 25 µg / ml verdünnt. Anschließend wurden die Nunc-Platten mit je 100 µl pro Well des verdünnten Antigens beschichtet und über Nacht bei 4°C für 16h – 24h inkubiert.

Verdünnung der Patientenserum

Die Kontrollserum und die zu testenden Serum, hier von klinisch manifesten PBC Patienten, wurden in zwei Schritten verdünnt. Im ersten Schritt wurden die Serum in Eppendorfcups mit Serumverdünnungspuffer (SVP) auf eine Vorverdünnung (SVV) von 1:50 verdünnt. Die Endverdünnung (SEV) von 1:3000 erfolgte in Deepwell-Platten. Diese Verdünnung wurde gewählt, da sie sich im Routinelabor zum Nachweis von Antikörpern gegen M2 und M4 bewährt hat.

Zur Testung der 36 Peptide der PDH-E2-Untereinheit wurde eine Serumendverdünnung von 1:500 gewählt.

Durchführung

Nach Ablauf der Inkubationszeit zur Beschichtung der Platten mit den Antigenen erfolgte eine Waschung der Platten mit Waschpuffer I, wodurch die noch freien Bindungsstellen abgedeckt werden. Nachdem der Waschpuffer von 15 Minuten lang inkubierte, erfolgte das Ausklopfen der Platten mithilfe von Zellstoff. Es wurden pro Well je 100 µl Serumendverdünnung in die Platten pipettiert und bei Raumtemperatur 90 Minuten zur Inkubation stehen gelassen. Nach einem weiteren Waschvorgang der Platten mit Waschpuffer II wurden pro Well je 100 µl Peroxidase konjugierte Antikörper pipettiert, die bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubierten. Nach erneutem Waschvorgang mit Waschpuffer II war nach Zugabe des Substrats aufgrund der Peroxidasereaktion ein Farbumschlag zu beobachten. Nach 10-15 Minuten wurde die Reaktion mit 25 %-iger Schwefelsäure abgestoppt und der Farbumschlag im Elisa-Reader mit einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet. Die Normwerte für die Reaktivitäten gegen ein Antigen werden mithilfe des Mittelwertes von gesunden Probanden plus der zweiten Standardabweichung ermittelt. Patientenserum werden ab einem Absorptionwert von 200 [Ax1000] als positiv gewertet.

Die 35 Peptide der PDH-E2

In dieser Arbeit wurden die Seren von 91 klinisch, serologisch und histologisch gesicherten PBC-Patienten im ELISA auf ihre Reaktivität gegen 35 synthetisch hergestellten Peptide, die die vollständige Länge der PDH-E2 Einheit abdecken, getestet. Jedes dieser Peptide bestand aus 25 Aminosäuren und überlappte in beide Richtungen jeweils mit den nächsten 8 Aminosäuren der Nachbarpeptide. Die Aminosäuresequenzen von 33 der 35 Peptide sind in der *Tabelle 4.3* dargestellt. Die Peptide D10 und D11 sind in der unten aufgeführten *Tabelle 4.3* nicht aufgelistet, da sie zusammen das „Transit-Peptid“ bilden, welches nicht als Teil des PDH-E2 Enzyms angesehen wird.

Die aufgeführten Peptide stellen mit ihren 25 Aminosäuren kleine Proteine dar und eignen sich zum Detektieren linearer Peptide und potentieller Epitope der PDH-E2.

Tabelle 4.3: Darstellung der menschlichen PDH-E2 Untereinheit, aufgeteilt in 33 Peptide (D10-G8) a 25 Aminosäuren (AS) mit jeweils 8 überlappenden AS zum Nachbarpeptid in beide Richtungen.

Lokalisation der PDH-E2	Peptid Nr. (AS)	Aminosäuren-Sequenz
Äußere Lipoyl- Domäne (As 1-10)	D12 (-2-23)	YYSLPPHQKVPLPSLSPTTMQAGTIA
	E1 (16-40)	TMQAGTIARWEKKEGDKINEGDLIA
	E2 (33-57)	INEGDLIAE<u>EVETDK</u>*ATVGFESLEEC
	E3 (50-74)	GFESLEECYMAKILVAEGTRDVPIG
	E4 (67-91)	GTRDVPIGAIICITVGKPEDIEAFK
“Hinge” Region	E5 (84-108)	PEDIEAFKNYTLDSSAPTPQAAPA
	E6 (101-125)	PTPQAAPPTPAATASPTPSAQAP
Innere	E7 (118-142)	PTPSAQAPGSSYPPHMQVLLRALSP

Lipoyl-Domäne (AS 133-217)	E8 (135-159)	VLLPALSPTMTMGTVQRWEKKVGEK
	E9 (152-176)	WEKKVGEKLSEGDLL<u>AEIETDK</u>[*]ATI
	E10 (169-193)	<u>IETDK</u>[*]ATIGFEVQEEGYLAKILVPE
	E11 (186-210)	LAKILVPEGTRDVPLGTPLCIIVEK
	E12 (203-227)	PLCIIVEKEADISAFADYRPTEVTD
"Hinge" Region	F1 (220-244)	YRPTEVTDLKPQVPPPTPPPVAAVP
	F2 (237-261)	PPPVAAVPPTPQPLAPTSTPCPAT
	F3 (254-278)	PSTPCPATPAGPKGRVFDPLAKKL
E1/E3 Schnittstelle (AS 272-303)	F4 (271-295)	VDPLAKKLAVEKGIDLTQVKGTGPD
	F5 (288-312)	QVKGTGPDGRITKKDIDSFVPSKVA
"Hinge" Region	F6 (305-329)	SFVPSKVAPAPAAVVPPTGPGMAPV
Katalytisches Zentrum (AS 331-561)	F7 (322-346)	TGPGMAPVPTGVFTDIPISNIRRV
	F8 (339-363)	ISNIRRVIAQRMLQSKQTIPHYLS
	F9 (356-380)	TIPHYLSIDVNMGEVLLVRKELNK
	F10 (373-397)	LVRKELNKILEGRSKISVNDFFIIKA
	F11 (390-414)	VNDFFIIKASALACKLVPEANSSWMD
	F12 (407-431)	EANSSWMDTVIRQNHVVDVSVAVST
	G1 (424-448)	DVSVAVSTPAGLITPIVFNAHIKGV
	G2 (441-465)	FNAHIKGVETIANDVVSLATKAREG
	G3 (458-482)	LATKAREGKLQPHEFQGGTFTIS^{**}NL
G4 (475-499)	GTFTIS^{**}NLGMFGIKNFSAIINPPQA	

	G5 (492-516)	AIINPPQACILAIGASEDKLVPADN
	G6 (509-533)	DKLVPADNEKGFVDVASMMSVTLSCD
	G7 (526-550)	MSVTLSCD H**RVVDGAVGAQWLAEFR
	G8 (543-561)	VDGAVGAQWLAEFRKYLEKPITMLL

Die überlappenden Aminosäuren sind "fett" gedruckt. / Die Aminosäuresequenzen der inneren (AS 167-183) und der äußeren (AS 41-53) Lipoyl-bindenden Domäne mit enthaltenem Lipoyl-bindenden Lysin sind unterstrichen. / * Lipoyl-bindendes Lysin in der äußeren und inneren Lipoyl-Domäne / ** Katalytisch aktiver Teil des katalytischen Zentrum (S480 und H534).

2.2.4. KBR (Komplementbindungsreaktion)

Testprinzip

Die KBR beruht auf dem Prinzip, dass Antigen-Antikörper-Komplexe Komplement aktivieren und binden. Das aktivierte Komplement löst das vom Antikörper gebundene Antigen auf. Zur Detektion der gesuchten komplementbindenden Antikörper wird dem Blut das entsprechende Antigen beigefügt. Enthält das zuvor dekomplementierte Blut die gesuchten Antikörper, bilden diese einen Antigen-Antikörper-Komplex mit dem zugeführten Antigen. Nach Zugabe einer definierten Menge an Komplement erfolgt nun die Lyse des Antigens. Das Komplement wird verbraucht. Somit bleibt im Folgenden nach Ambozeptorzugabe die Hämolyse aus. Die Erythrozyten sinken ab und bilden am Boden der Mikrotiterplatten einen Knopf. Der Überstand bleibt klar und es hat keine Hämolyse stattgefunden. Die Reaktion ist positiv.

Falls keine Antikörper im Blut enthalten sind, wird das Komplement nicht verbraucht und kann nach Zugabe eines Ambozeptors, der einen Immunkomplex darstellt, der aus Antikörper-beladenen Erythrozyten besteht, aktiviert werden. Dieses nun von dem Ambozeptor gebundene und aktivierte

Komplement löst eine Hämolyse aus. Das freie Hämoglobin führt zu einer Trübung und spricht für eine Reaktion ohne Antikörpernachweis, die Reaktion ist negativ.

Herstellen der Erythrozytensuspension

2 x 4ml gekühltes Hammelblut wurden gewaschen, indem es mit physiologischer Kochsalzlösung vermischt und bei 1400rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend dekantiert wurde. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Das Sediment wurde mit gebrauchsfertigem KBR-Puffer resuspendiert und in einem Messzylinder auf insgesamt 30ml aufgefüllt. Zur Auslösung einer Hämolyse wurde 1ml der Suspension mit 24ml 0,5%-igem Ammoniak vermischt und anschließend das freie Hämoglobin gegen H₂O bei 541nm gemessen, wodurch sich die benötigte Menge des KBR-Puffers in ml zur Verdünnung der Suspension für eine 3%ige Lösung und die benötigte Menge des Ambozeptors in µl berechnen lässt. Das Blut wird anschließend für 45 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Verdünnung und Dekomplementierung der Seren

Die Seren wurden mit Serumverdünnungspuffer bis zu einer Vorverdünnung von 1:11 verdünnt und bei 56°C für 30 Minuten im Wasserbad dekomplementiert.

Anlegen der Verdünnungsreihe

Es wurden jeweils 25µl KBR-Puffer pro Well in die Rundbodenmikrotiterplatten vorgelegt. Zum Anlegen der Verdünnungsstufen wurde die erste Reihe der Platten mithilfe einer 12-Kanalpipette mit 25µl Serumvorverdünnung auf eine Titerstufe von 1:22 verdünnt. Nach Mischen wurden aus dieser Verdünnung wiederum 25µl entnommen, womit die nächste Reihe der Mikrotiterplatte auf die nächste Titerstufe verdünnt wurde. Nach 6-facher Wiederholung wurde somit in der 6. Reihe eine Verdünnungsstufe von 1: 700 erreicht.

Durchführung

Zu der angelegten Verdünnungsreihe wurde pro Well 25µl verdünntes M2 bzw. M4-Antigen zugegeben. Eine definierte Menge an Komplement wurde abgemessen und mit Ampuwa und KBR-Puffer verdünnt und in 25µl pro Well beigefügt. Anschließend inkubierten die Platten 60 Minuten im Brutschrank. Danach wurden 25µl pro Well der 3%igen Erythrozytensuspension zugegeben, auf dem Rüttler kurz vermischt und zur weiteren Inkubation erneut in den Brutschrank gestellt. Nach 30minütiger Inkubationszeit wurden die Platten über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am nächsten Tag ausgewertet.

2.3. Materialien

2.3.1. Materialien

- epT.I.S.Standard 50-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Biohit Tips 300 µl – 1200 µl (BIOHIT, Finnland)
- Deepwellplatten, Polystyrol 1,2 mm (Wicker GmbH, Kirchheim-Teck)
- NuncTM Immunoplate (NuncTM Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- Probenröhrchen (Kartell, Italien)
- 12-Kanal Pipette (Biohit Proline 25-250 µl)
- 8-Kanal Pippette, Eppendorf Research[®] Pro 50-1200 µl (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Pasteurpipette 3ml (BRAND)
- Pipette Eppendorf Reference 10 µl - 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipurpose Cloth TORK (SCA, Sweden)
- Cuvettes (Coulter GmbH, Krefeld)
- PS-Microplate 96 Well (greiner bio-one)
- IKA[®]-Schüttler MTS 4 (Janke & Kunkel, IKA[®] - Labortechnik, Staufen)
- Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hängisen)
- Microcentrifuge Tubes mit/ohne Deckel (Greiner BioOneGmbH, Frickenhausen)

- Falcon[®] Blue Max, Polypropylene Conical Tube (Becton Dickinson Labware, NJ,USA)
- Messzylinder 25ml – 1000ml, Duran[®] Hirschmann EM (Techcolor Germany)
- Messkolben 25ml – 5000ml Duran[®] Jenapglas Hirschmann EM (Schott, Mainz)
- Magnetrührer IKA[®]-Combimag RET (Janke & Kunkel, IKA[®] - Labortechnik, Staufen)
- Parafilm[®] (Plastic Packing Menaska, WI)
- Pipettierhilfe Macro (BRAND)
- Stabpipetten 10ml (Costar[®], Corning, NY, USA)

2.3.2. Geräte

- Diluter, Microlab 500 Series (Hamilton, Reno, Nevada, USA)
- Pipettor-Diluter (Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, USA)
- Rüttler Reax 2000 (Heidolph, Germany)
- Rüttler vortex Genie (WINN, Holland)
- ELISA Reader SLT Rainbow (SLT LabInstruments, Österreich);
Software: Magellan (Tecan[®] Trading AG, Switzerland)
- Computer (hp Compaq, Intel Pentium 4HT)
- Kopierer (Sharp AR-M155)
- Drucker (hp Laser Jet 1200)
- Mikrogrammwaage Mettler H20T (Colora Messtechnik GmbH, Lorch)
- Waage (Sartorius AG, Göttingen)
- pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten)
- Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)
- Multipipette[®] plus eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg)
- Spectrophotometer, UV / visible (Pharmacia LKB)
- Rotixa / K (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

- Ultracentrifuge TGA-50 (Kontron, Tegventa)

2.3.3. Substanzen

- Triton[®] X-100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Bovines Serum Albumin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- ELISA - Substrat (Citratpuffer, pH 5,0 + 0,5 mg/ml Phenylendiamine + 0,03 % Wasserstoffperoxid)
- Schwefelsäure 25 % (MERCK, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt)
- Natriumchlorid (MERCK, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat (MERCK, Darmstadt)
- Citronensäure-Monohydrat (ROTH, Karlsruhe)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrate (MERCK, Darmstadt)
- Natriumcarbonat (NaCO₃) (Merck, Darmstadt)
- DMSO (AppliChem)
- Ampuwa[®] (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg)
- Calciumchlorid (MERCK, Darmstadt)
- Magnesiumchlorid (MERCK, Darmstadt)
- Barbitalnatrium (MERCK, Darmstadt)
- Salzsäure (HCl) 32% (Merck, Darmstadt)
- Guinea Pig Complement (ORAY 15, Dade Behring)
- Hammelblut (CDAW 31, Dade Behring)
- NaCl 0,9% Fresenius Spüllösung Plastipur[®] (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg)
- Ambozeptor from Rabbit (ORLC 25, Dade Behring)
- Ammoniak 0,5% (MERCK, Darmstadt)

2.3.4. Puffer

- PBS-Puffer, pH 7,4 (10 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 63 mM Na_2HPO_4)
- ELISA- Serumverdünnungspuffer (PBS-Puffer + 0,08 % Triton X 100 + 0,004 mg/ml)
- ELISA Waschpuffer 1 (PBS-Puffer + 0,5 % BSA)
- ELISA Waschpuffer 2 (PBS-Puffer + 0,25 % BSA+ 0,2 % Triton X 100)
- Bicarbonat-Puffer 0,2 M, pH 9,6 (64 mM Na_2CO_3 , 136mM NaHCO_3)
- Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5,0 (80 mM tri-Natriumcitrat, 30 mM Citronensäure)
- KBR-Puffer, pH 7,38 (0,15 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ + 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ + 141 mM NaCl + 1,8 mM Barbitol-Na + 2,4 mM Barbitol)

2.3.5. Antikörper

- Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat Anti Human IgG Fcy Fragment specific (Jackson, Immuno Research Laboratories INC., West Grove, PA, USA)
- Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat anti-human IgM Fc5 μ Fragment specific (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove, PA, USA)

2.3.6. selbst hergestellte Antigene (siehe Methoden)

- Antigen M2 - aus Mitochondrien von Rinderherzen
- Antigen M4 - aus Mitochondrien einer Rattenleber

2.3.7. Rekombinante Antigene

- E2 Untereinheit der PDH in 36 Antigene a 25 AS (biotrend, Köln)
- Lipoylbindender E2 – Epitop mir Liponamid + Ovalbumin (biotrend, Köln)

- Lipoylbindender E2 – Epitop ohne Liponamid + Ovalbumin (biotrend, Köln)
- Ovalbumin (biotrend, Köln)

3. Ergebnisse

Vorweg eine Gliederung der ermittelten Ergebnisse:

Testung von Seren von untherapierten und therapierten PBC-Patienten auf ihre Reaktivität mit der PDH-E2-Untereinheit

- AMA-positive PBC-Patienten vor Therapiebeginn
- AMA-positive PBC-Patienten unter Therapie
- Kontrollgruppe mit gesunden Probanden
- Aktivität des lipoylierten und unlipoylierten Peptid 167-184

Zusammenhänge von M2, M4 und den 35 Peptiden der PDH-E2 Untereinheit

- Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten zu den Reaktivitäten gegen die PDH-E2 Peptide
 - mit Seren untherapierter PBC-Patienten (Spearman Rangkoeffizient)
 - mit Seren therapierter PBC-Patienten
 - Extremwerte bei E11
- Korrelation der Anti-M2- zu der Anti-M4-Reaktivität
 - mit Seren untherapierter PBC-Patienten
 - mit Seren therapierter PBC-Patienten

Testung von KBR-positiven PBC-Seren auf ihre Anti-M2, -M4, -PDH-E2-Peptid-Aktivitäten im ELISA

- Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivität zu den PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten komplementbindender Antikörper (M2 / M4)

- Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivität zu den PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten nicht-komplementbindender Antikörper (M2 / M4)
- Korrelation der Anti-M2- bzw. Anti-M4-Reaktivitäten im ELISA zu den M2- bzw. M4-Titern in der KBR

Zusammenhänge der AMA- und PDH-E2-Reaktivitäten für Seren untherapierter Patienten mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf

- aktiver Krankheitsverlauf
- inaktiver Krankheitsverlauf

Auswirkungen von medikamentöser Therapie und Lebertransplantation auf die AMA Reaktivität

- Zeitliches Verhalten der Reaktivitäten vor Therapiebeginn
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten von Seren untherapierter Patienten
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten von Seren therapierter Patienten
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Ursodesoxycholsäure (URSO)
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Methotrexat (MTX)
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Azathioprin (AZA)
- Verhalten der AMA-Reaktivitäten nach orthotoper Lebertransplantation (OLT)

3.1. Testung von Seren von untherapierten und therapierten PBC-Patienten auf ihre Reaktivität mit der PDH-E2-Untereinheit

3.1.1. AMA-positive PBC-Patienten vor Therapiebeginn

Von den 91 AMA-positiven Patienten mit manifester PBC waren bei 65 Patienten Seren vorhanden, die vor Therapiebeginn gewonnen werden konnten (s. Probanden 2.3). Die restlichen 26 der 91 Patienten standen bereits bei der ersten Serumprobenabnahme unter Therapie.

Serumproben von 44 dieser 65 Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Serumprobenabnahme noch nicht unter Therapie standen, wurden gegen die 35 Peptide der PDH-E2 getestet. In den unten aufgeführten *Abbildungen 3.1* und *3.2* sind die Anzahl der Patienten aufgelistet, die im ELISA IgG- und IgM-Antikörper-Reaktivitäten gegen die jeweiligen Peptide der E2-Untereinheit aufweisen.

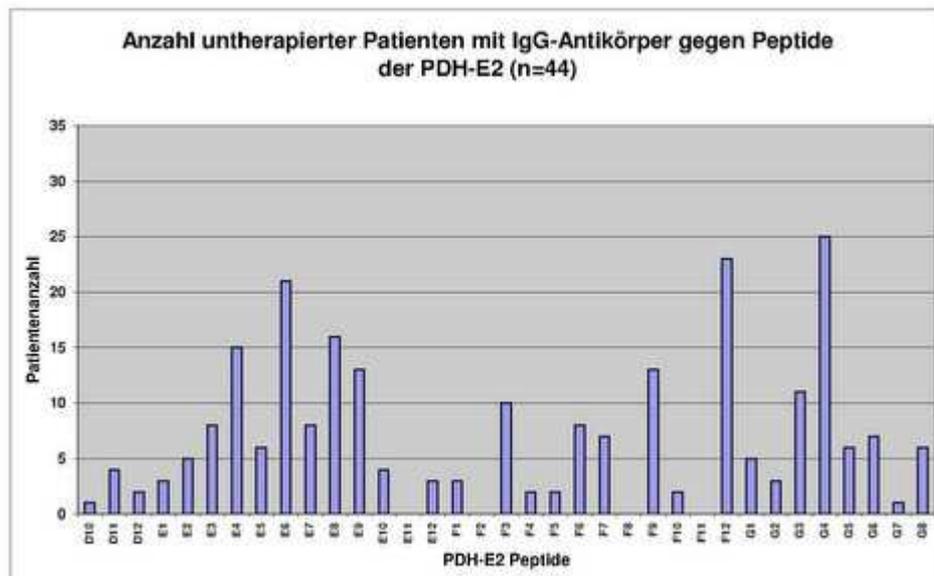


Abbildung 3.1: Häufigkeit der IgG-Antikörper gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 44 untherapierten PBC-Patienten.

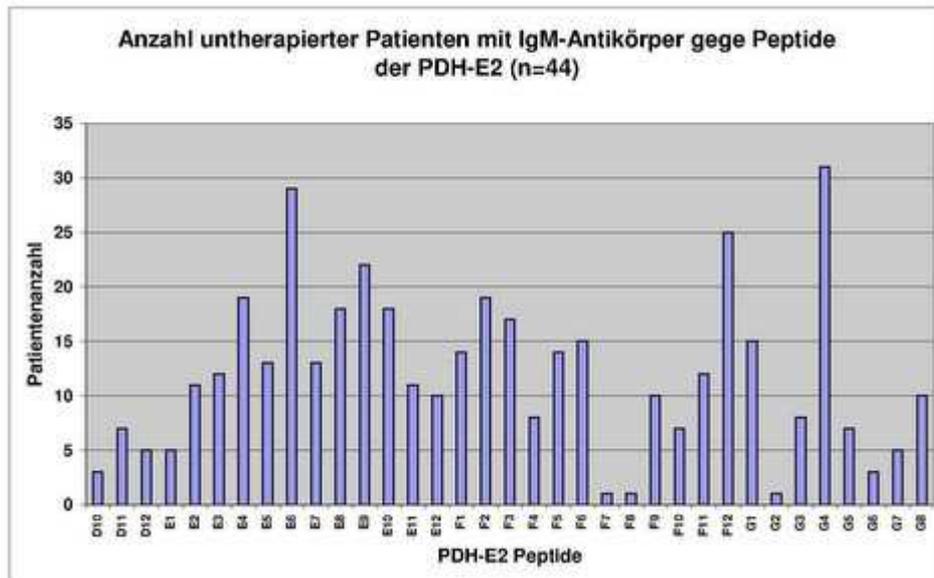


Abbildung 3.2: Häufigkeit der IgM-Antikörper gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 44 untherapierten PBC-Patienten.

Bei den untherapierten Patienten fanden sich am häufigsten IgG-Antikörper gegen das G4-Peptid (55,5%, n=25). Des Weiteren reagieren 51,1% der Patientenseren (n=23) mit dem Peptid F12 und 46,6% (n=21) mit dem Peptid E6. Auch die IgM-Antikörper reagierten hauptsächlich mit 68,8% (n=31) gegen das G4-Peptid. Mit dem F12-Peptid reagierten 55,5% (n=25) und mit E6-Peptid 64% (n=29) der Patientenseren (Abbildung 3.2).

Die Mittelwerte der IgG- und IgM-Antikörper-Reaktivitäten der untherapierten Patienten (n=44) gegen die 35 verschiedenen PDH-E2-Peptide sind in *Abbildung 3.3* und *Abbildung 3.4* aufgeführt.

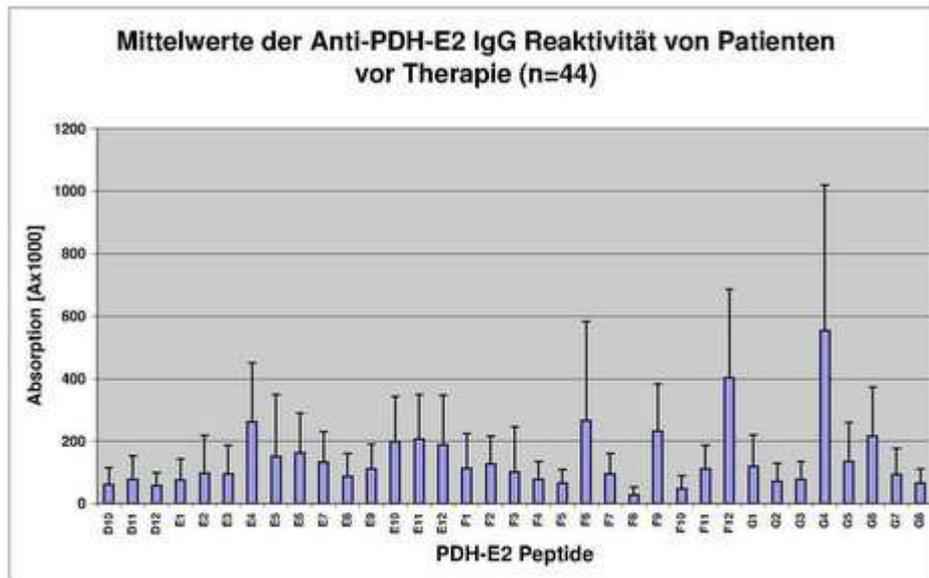


Abbildung 3.3: Mittelwerte der IgG-Antikörper-Reaktivität gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 44 untherapierten PBC-Patienten.

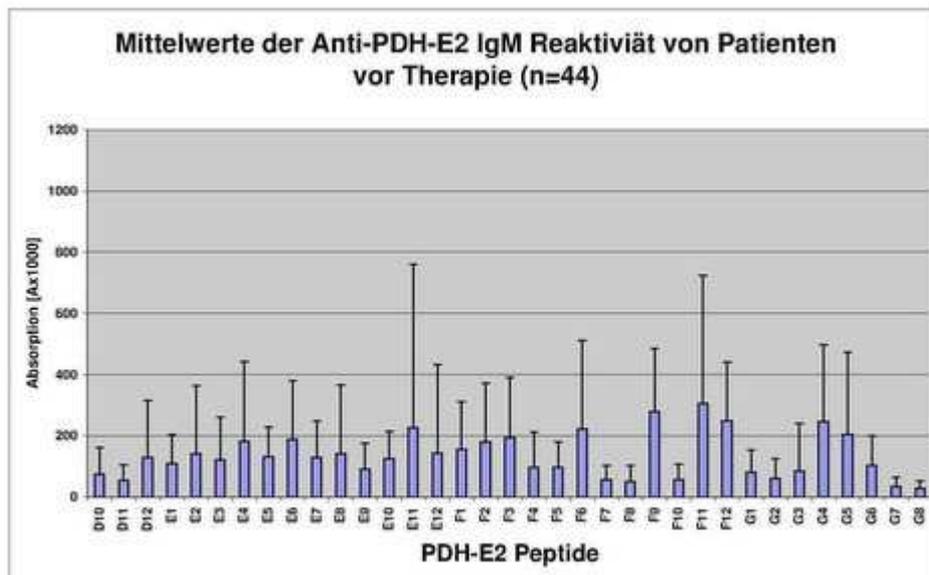


Abbildung 3.4: Mittelwerte der IgM-Antikörper-Reaktivität gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 44 untherapierten PBC-Patienten.

Erhöhte Mittelwerte zeigen die IgG-Reaktivitäten gegenüber G4 (MW: 561 [Ax1000]) und F12 (MW: 400 [Ax1000]). Ebenso fallen die Standardabweichungen von G4 und F12 mit Werten > 1000 [Ax1000] und > 600 [Ax1000] auf. Niedertitrige IgM-Antikörper werden lediglich gegenüber dem F11-Peptid mit 310 [Ax1000] gefunden. Die höchsten Streuungen der Werte sind bei den Standardabweichungen der Peptide E11 und F11 mit Werten > 700 [Ax1000] abzulesen. Die Standardabweichungen der Peptide G4 und F6 erreichen Werte von bis zu 500 [Ax1000].

3.1.2. AMA-positive PBC-Patienten unter Therapie

Aus dem Kollektiv der 91 AMA-positiven PBC-Patienten standen 26 bei der ersten Serumprobenabnahme bereits unter Therapie (s. Probanden 2.3). Von diesen 26 von Beginn an therapierten Patienten wurden 22 gegen die PDH-E2 Peptide getestet. In den unten stehenden *Abbildungen* 3.5 und 3.6 ist die Anzahl der Patienten aufgeführt, die eine IgG- bzw. IgM-Reaktivität der Antikörper gegen die einzelnen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit aufweisen.

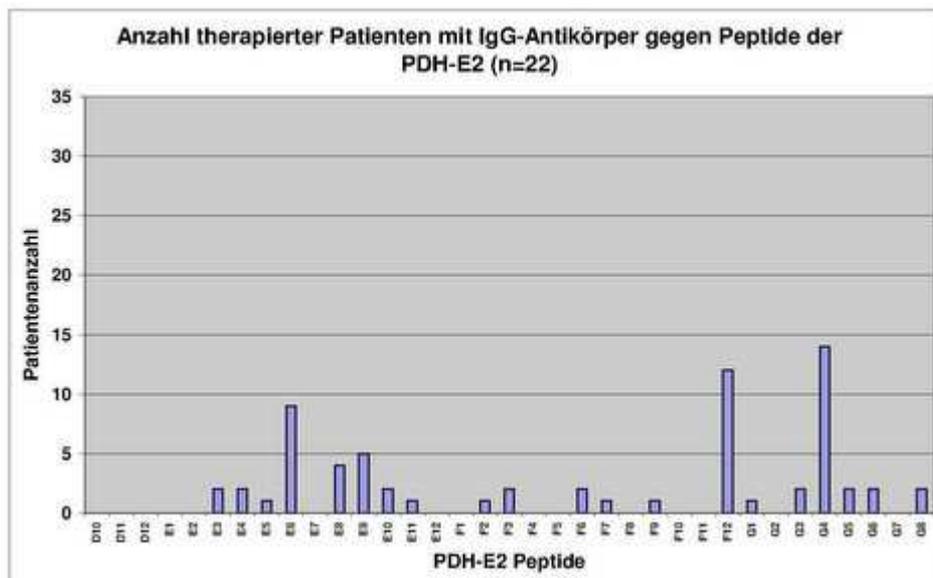


Abbildung 3.5: Häufigkeit der IgG-Antikörper gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 therapierten PBC-Patienten.

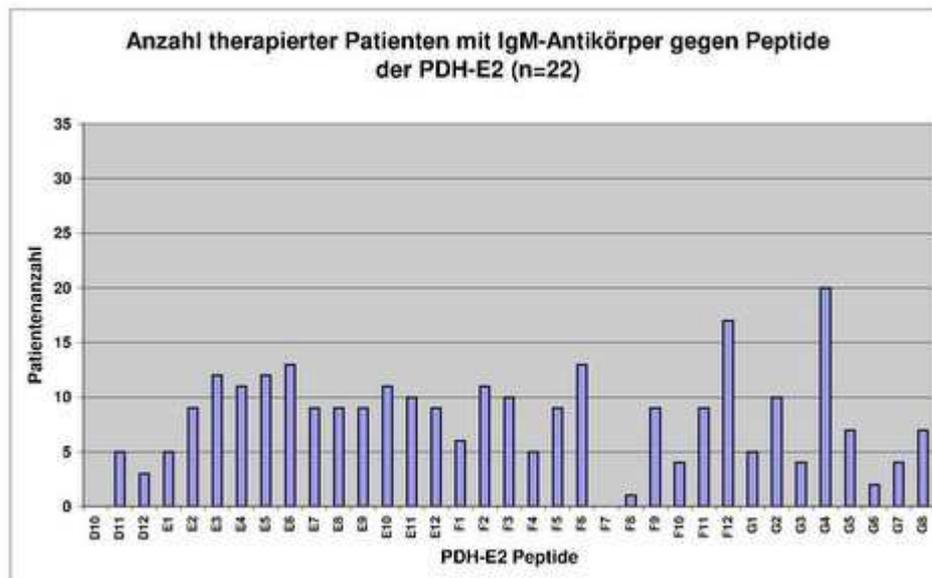


Abbildung 3.6: Häufigkeit der IgM-Antikörper gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 therapierten PBC-Patienten.

Bei den therapierten Patienten wurden am häufigsten IgG-Antikörper gegen die Peptide G4 (63,3%, n=14) und F12 (54,5%, n=12) nachgewiesen. Des Weiteren reagiert das E6-Peptid mit 40,9% (n=9) der Patientenseren. Ebenso zeigten die Anti-M2 IgM-Antikörper bei den Serumproben der 22 therapierten Patienten mit 90,9% die stärkste Aktivität gegen das G4-Peptid (n=20) (Abbildung 3.6). Mit dem Peptid F12 reagierten 77,2% (n=17) und E6 59% (n=13).

Die Mittelwerte der IgG- und IgM-Antikörper-Reaktivität der therapierten Patienten (n=22) gegen die 35 verschiedenen PDH-E2-Peptide sind in *Abbildung 3.7 und 3.8* aufgeführt.

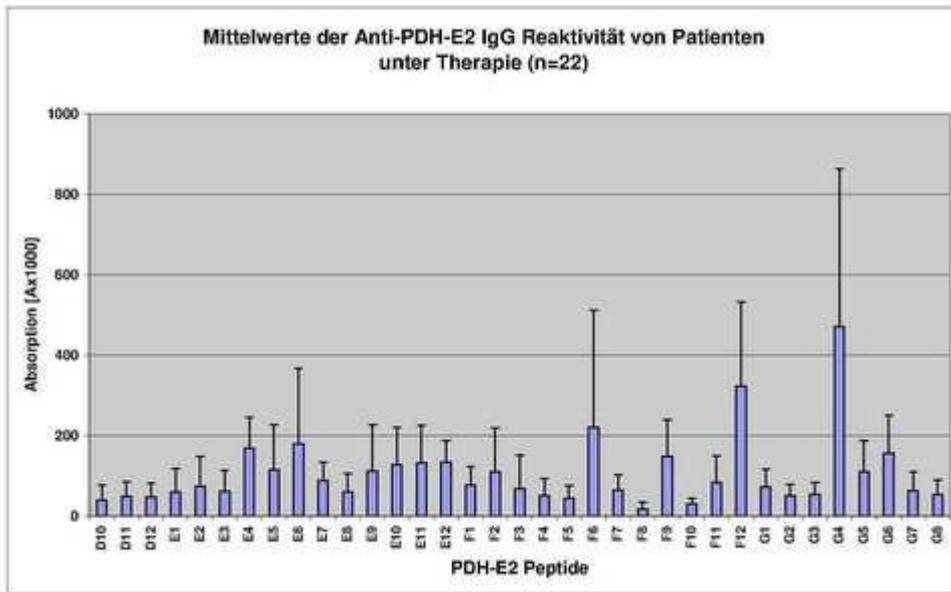


Abbildung 3.7: Mittelwerte der IgG-Antikörper-Reaktivität gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 therapierten PBC-Patienten.

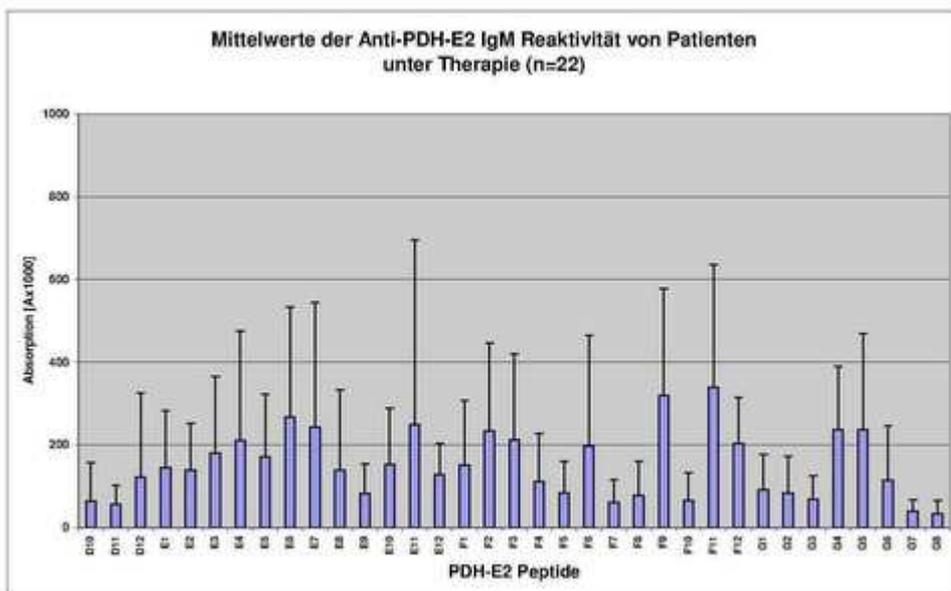


Abbildung 3.8: Mittelwerte der IgM-Antikörper-Reaktivität gegen 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 therapierten PBC-Patienten.

Das G4-Peptid weist bei den IgG-Antikörpern mit > 450 [Ax1000] den höchsten Mittelwert und die höchste Standardabweichung mit Werten bis zu ~ 850 [Ax1000] auf. Das F12-Peptid erreicht einen Mittelwert > 300 [Ax1000] mit einer Standardabweichung bis > 500 [Ax1000]. Auch bei den therapierten Patienten werden bei den IgM-Antikörpern nur leicht erhöhte Mittelwerte erreicht. Das F11-Peptid zeigt mit ~ 340 [Ax1000] den höchsten Mittelwert mit der zweithöchsten Standardabweichung bis zu > 600 [Ax1000]. Die Standardabweichung von E11 weist Werte auf von bis zu 700 [Ax1000] bei einem leicht erhöhten Mittelwert von 250 [Ax1000].

Signifikanz

Bei den Antikörper-Reaktivitäten zwischen den Patienten vor und unter Therapie waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

3.1.3. Kontrollgruppe mit gesunden Probanden

Als Kontrollgruppe wurden die Seren von 22 gesunden Probanden mit den Peptiden der PDH-E2 Untereinheit getestet. Die Peptide D10 und D11 werden genauso genommen nicht zu der eigentlichen PDH-E2-Untereinheit gezählt und hier vernachlässigt. In der Diskussion wird auf die PDH-E2-Peptide näher eingegangen. In den *Abbildungen 3.9* und *3.10* sind die Häufigkeiten der Patienten mit IgG- und IgM-Reaktivität gegen PDH-E2 dargestellt.

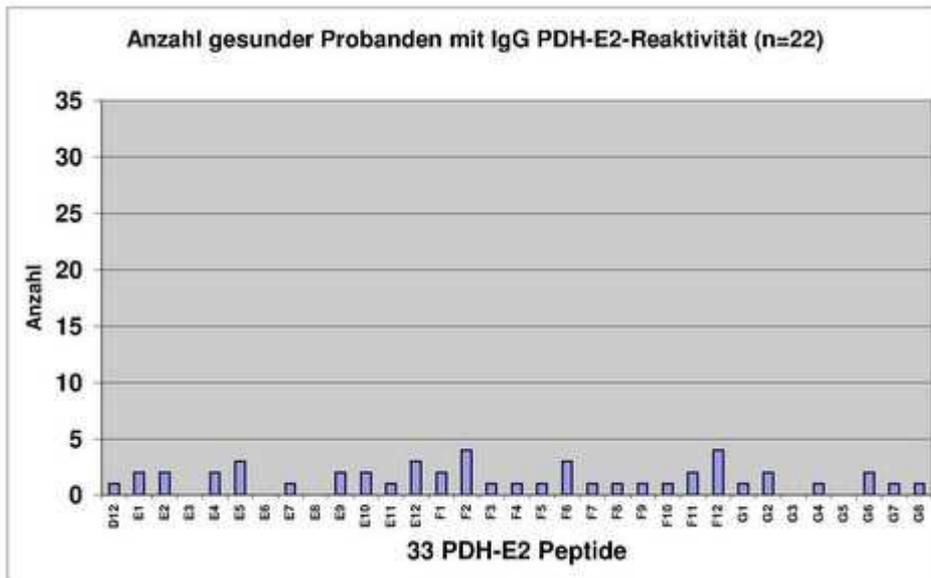


Abbildung 3.9: Häufigkeit der IgG-Antikörper gegen 33 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 gesunden Probanden.

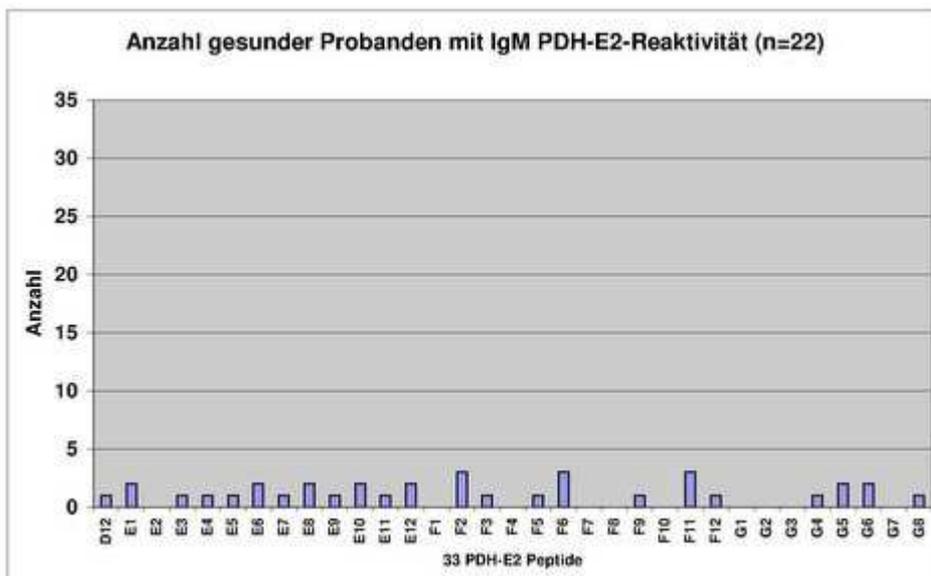


Abbildung 3.10: Häufigkeit der IgM-Antikörper gegen 33 Peptide der PDH-E2 Untereinheit bei 22 gesunden Probanden.

Die IgG-Antikörper von 4 (18%) der 22 gesunden Probanden reagieren mit den Peptiden F2 und F12 der PDH-E2. Ebenso ist bei der IgM-Reaktivität mit drei der gesunden Probanden (14%), die eine Reaktivität zu einzelnen Peptiden aufweisen, keine spezifische Aktivität auszumachen.

Zusammenfassend:

Zwischen den Reaktivitäten der therapierten und untherapierten Patienten ist kein signifikanter Unterschied auszumachen. Die Patientenkollektive weisen eine erhöhte Aktivität mit den Peptiden G4, F12 und E6 auf. Das G4-Peptid reagiert mit 55,5% (IgG) und 68% (IgM) der Seren von den 44 AMA-positiven PBC-Patienten vor Therapiebeginn und mit 63% (IgG) und 90,9% (IgM) der Seren von den unter Therapie stehenden Patienten. Das F12-Peptid reagiert mit 51% (IgG) und 55% (IgM) der Seren von den untherapierten und mit 54% (IgG) und 77% (IgM) der Seren der therapierten PBC-Patienten. Ebenso weist E6 mit 40% (IgG) und 64% (IgM) der Seren von untherapierten und 40,9% (IgG) und 59% (IgM) der Seren von therapierten Patienten eine erhöhte Reaktivität auf. Der geringe prozentuale Unterschied der Aktivitäten gegen das G4- und F12-Peptid ist unter Umständen auf die geringere Anzahl der therapierten Patienten zurückzuführen. G4 und F12 sind beides Peptide des katalytischen Zentrums der PDH-E2 Untereinheit. Auf die genaue Struktur der PDH-E2 und die Lokalisation der Proteine wird in dem Methodenteil und der Diskussion genauer eingegangen.

3.1.4. Aktivität des lipoylierten und unlipoylierten Peptids 167-184

In vorhergehenden Studien wurden Peptide, die das Lipoyl-bindende Lysin K173 umgeben (Peptide 167-184 oder 165-178) als immundominante Epitope der PDH-E2 Untereinheit definiert [153]. Jedoch konnten wir in unseren Testungen bei den Peptiden E9 und E10, die diese Region des Lipoyl-bindenden Lysins K173 abdecken, keine erhöhte Aktivität ermitteln. Da die Peptide E9 und E10 nicht vollständig dem publizierten Peptid entsprechen, synthetisierten wir das Peptid 167-184 in einer unlipoylierten (Peptid 167-184)

und in einer Liponamid gebundenen Form (Peptid 167-184-LA) und testeten diese mit den Seren der 91 AMA-positiven PBC-Patienten im ELISA.

Um herauszufinden, ob die AMA-Reaktivität gegen ein Konformationsepitop der PDH-E2 gerichtet ist und die Tertiärstruktur des Peptids für die Erkennung eine Rolle spielt, wurden zusätzlich beide Peptidvarianten mit gekoppeltem Ovalbumin (OVA) (OVA-Peptid 167-184 und OVA-Peptid 167-184-LA) getestet. In *Tabelle 3.1* wird die Aktivität der oben beschriebenen Peptide aufgeführt.

Tabelle 3.1: Durchschnittliche Reaktivität von Seren der 91 AMA-positiven PBC-Patienten gegen die verschiedenen Peptidvarianten des publizierten immundominanten Epitops der PDH-E2-Einheit im Vergleich zu den Reaktivitäten der in dieser Arbeit ermittelten Peptide E6, F12 und G4.

Peptide	IgG-Antikörper			IgM-Antikörper		
	Anzahl (%) positiv	Mittelwert [A x 1000] \pm SD (median)	Grenz-wert	Anzahl (%) positiv	Mittelwert [A x 1000] \pm SD (median)	Grenz-wert
Peptide der inneren Lipoyl-Domäne						
169-193 (in unserer Arbeit Peptid E10)	11 (12)	210 \pm 219 (157)	300	37 (39)	143 \pm 120 (101)	120
Synthetisiertes Peptid 167-184	0	113 \pm 63 (93)	100	5 (5)	53 \pm 79 (20)	100
Synthetisiertes Peptid 167-184-LA	3 (3)	135 \pm 71 (111)	100	10 (11)	78 \pm 107 (40)	100
Synthetisiertes Peptid OVA-167-184	42 (44)	316 \pm 260 (271)	100	54 (57)	254 \pm 318 (117)	100
Synthetisiertes Peptid OVA-167-184-LA	21 (22)	175 \pm 280 (148)	100	29 (31)	113 \pm 217 (52)	100
Peptid der "Hinge" Region						
101-125 (Peptid E6)		188 \pm 161			242 \pm 266	

	42 (44)	(150)	150	52 (55)	(130)	100
Peptide der katalytischen Domäne						
407-431 (Peptid F12)	53 (56)	432 ± 355 (321)	300	55 (58)	229 ± 166 (174)	150
475-499 (Peptid G4)	55 (58)	562 ± 484 (442)	300	70 (74)	252 ± 230 (203)	120

Zusammenfassung:

Wie in *Tabelle 3.1.* zu sehen ist, hat keines der Seren der 91 PBC-Patienten IgG- und nur fünf IgM-Antikörper gegen die unlipoylierten Peptidvariante (ohne OVA). Die Seren von 3 Patienten besitzen IgG- und 10 Patienten IgM-Antikörper gegen die lipoylierte Form. Durch das Koppeln an Ovalbumin wird die Aktivität gegen die Peptide deutlich gesteigert. Jedoch zeigen die meisten Seren eine hohe Reaktivität gegen Ovalbumin (nicht in der Tabelle dargestellt). Die Reaktivität gegen die unlipoylierte (OVA-Peptid 167-184) OVA-Peptidform war signifikant höher als gegen die lipoylierte OVA-Peptidvariante (OVA-Peptid 167-184-LA). Ebenso waren die Reaktivitäten gegen diese beiden Peptidvarianten mit gekoppeltem Ovalbumin höher als gegen Ovalbumin alleine.

Nach Subtraktion der reinen Anti-OVA-Reaktivität von den Reaktivitäten gegen die OVA-gekoppelten Peptidvarianten hatten noch die Seren von 40 (44%) der 91 PBC-Patienten eine IgG-Reaktivität gegen das unlipoylierte (OVA-Peptid 167-184) und 20 (22%) gegen das lipoylierte Peptid (OVA-Peptid 167-184-LA). IgM-Antikörper wurden dementsprechend noch bei 57% und 31% nachgewiesen.

3.2. Zusammenhänge von M2, M4 und den 35 Peptiden der PDH-E2 Untereinheit

3.2.1 Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten zu den Reaktivitäten gegen die PDH-E2 Peptide

mit Seren untherapierter PBC-Patienten

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist, zu überprüfen, ob die im ELISA ermittelten Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten der AMA-positiven Patientenserum mit einem oder mehreren der 35 PDH-E2 Peptide korrelieren. Diesbezüglich wurden jeweils die IgG- und IgM-Reaktivitäten der Anti-M2- und Anti-M4-Antikörper von den untherapierten Patienten und den bereits unter Therapie stehenden Patienten zu den Reaktivitäten der 35 PDH-E2 Peptide korreliert.

In der *Abbildung 3.11* wird das Bestimmtheitsmaß der Korrelation der Anti-M2 und der Anti-M4 IgG-Reaktivitäten aus Seren von untherapierten Patienten (n=44) mit den Reaktivitäten gegen die jeweiligen Peptide der PDH-E2 Untereinheit dargestellt. Dementsprechend wird in *Abbildung 3.12* das Bestimmtheitsmaß der IgM-Reaktivitäten aufgezeigt.

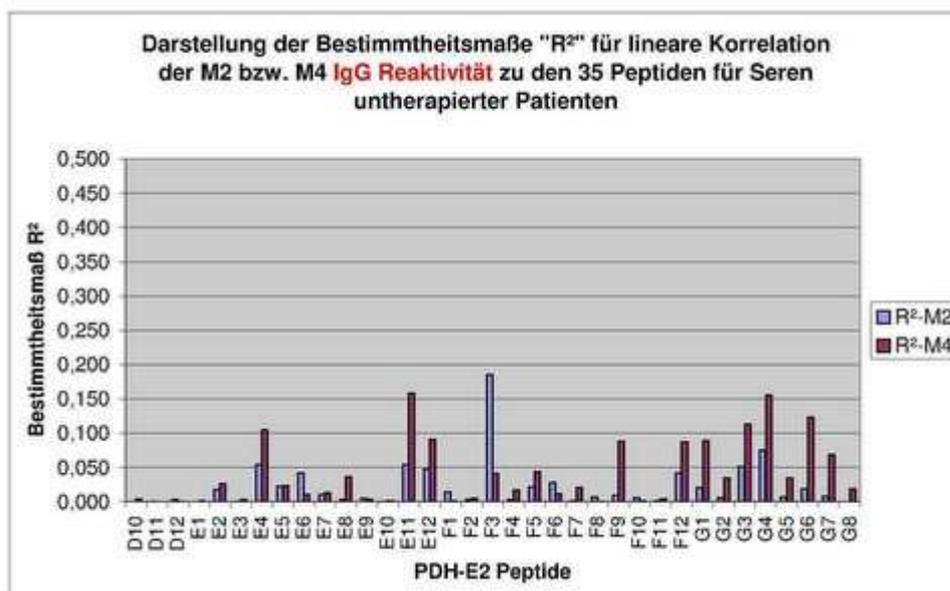


Abbildung 3.11: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivitäten mit den Reaktivitäten gegen die 35 Peptiden der PDH-E2 Untereinheit für Seren von 44 untherapierten Patienten.

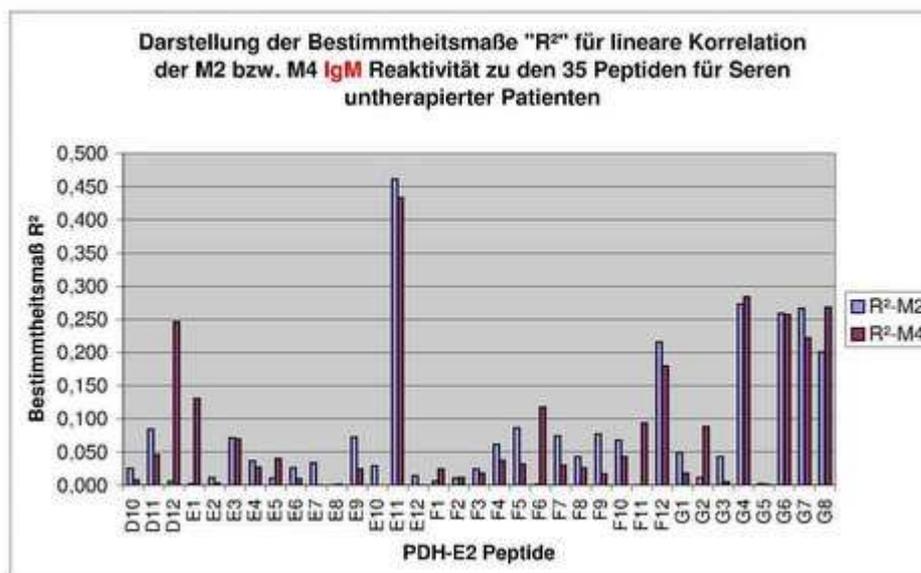


Abbildung 3.12: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgM-Reaktivitäten mit den Reaktivitäten gegen die 35 Peptiden der PDH-E2 Untereinheit für Seren von 44 untherapierten Patienten.

Das Bestimmtheitsmaß überschreitet den Wert 0,2 bei den IgG-Antikörpern nicht. Bei den IgM-Antikörpern werden Werte von bis zu 0,45 erreicht. Somit liegt bei beiden Antikörper-Subtypen keine Korrelation zwischen Anti-M2- und Anti-M4-Antikörpern mit Antikörpern gegen eines der Peptide vor. Die leicht angehobenen Korrelationskoeffizienten bzw. die leicht angehobenen Bestimmtheitsmaße sind durch Ausreißer bedingt. Da nur die IgM-Reaktivität annähernd ein erhöhtes Bestimmtheitsmaß erreicht, wird nur auf diese bezüglich der Ausreißer in der *Abbildung 3.13 und 3.14* näher eingegangen.

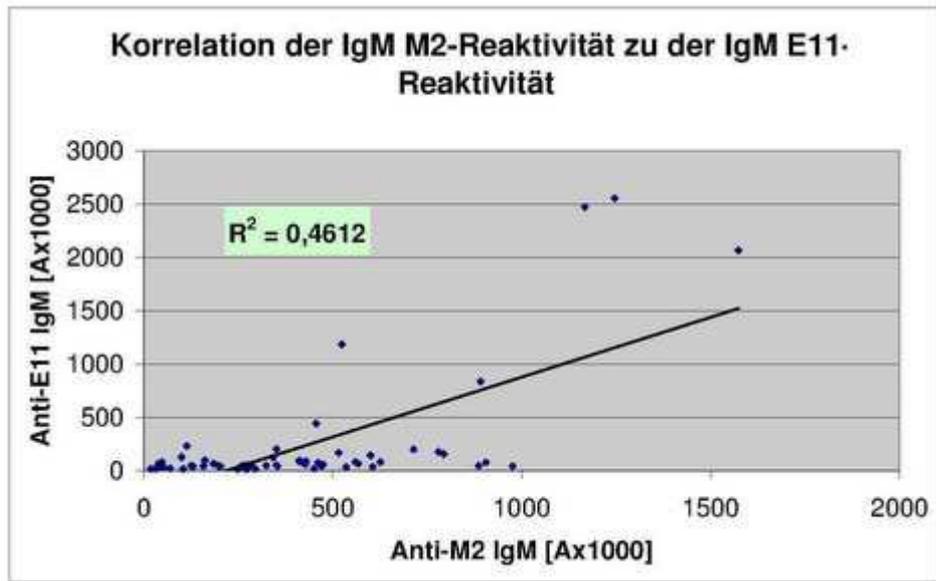


Abbildung 3.13: Darstellung der durch Ausreißer bedingten Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes bei der IgM Reaktivität für Seren von 44 untherapierten Patienten.

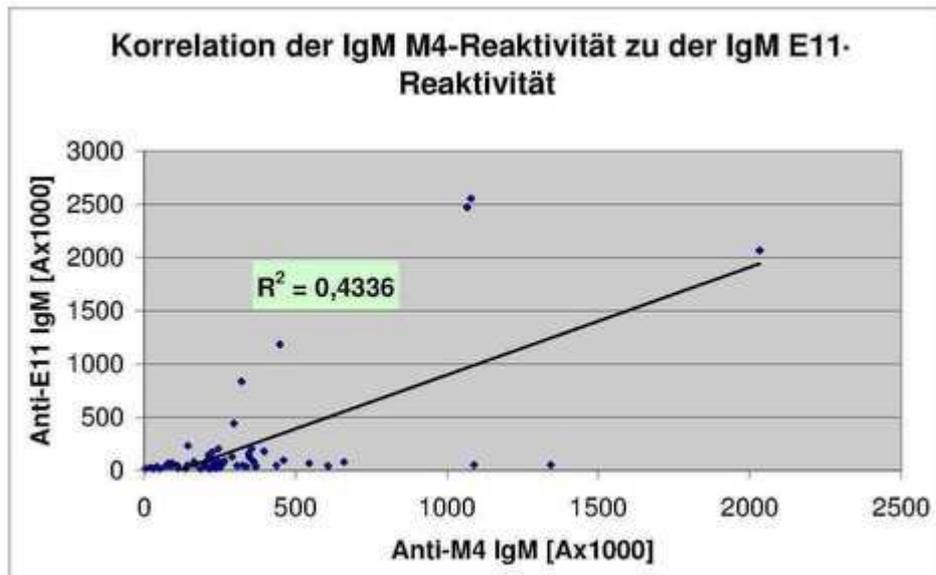


Abbildung 3.14: Darstellung der durch Ausreißer bedingten Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes bei der IgM Reaktivität für Seren von 44 untherapierten Patienten.

Spearman Rangkoeffizient

Auf Grund der Ausreißer-bedingten geringen Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes bei der Standardkorrelationsberechnung wurde auf die Berechnung des Spearman Rangkoeffizienten zurückgegriffen.

Spearman Rangkoeffizient der IgG-Reaktivität:

Auch bei dieser Berechnung, die aufgrund ihrer Rangbildung der Werte weniger sensibel auf Ausreißer ist, werden nur Werte $< 0,5$ erreicht (Abbildung 3.15). Es besteht keine Korrelation zwischen den Patienten ohne Therapieeinfluss und den 35 Peptiden und die vorherigen Ergebnisse werden bestätigt.

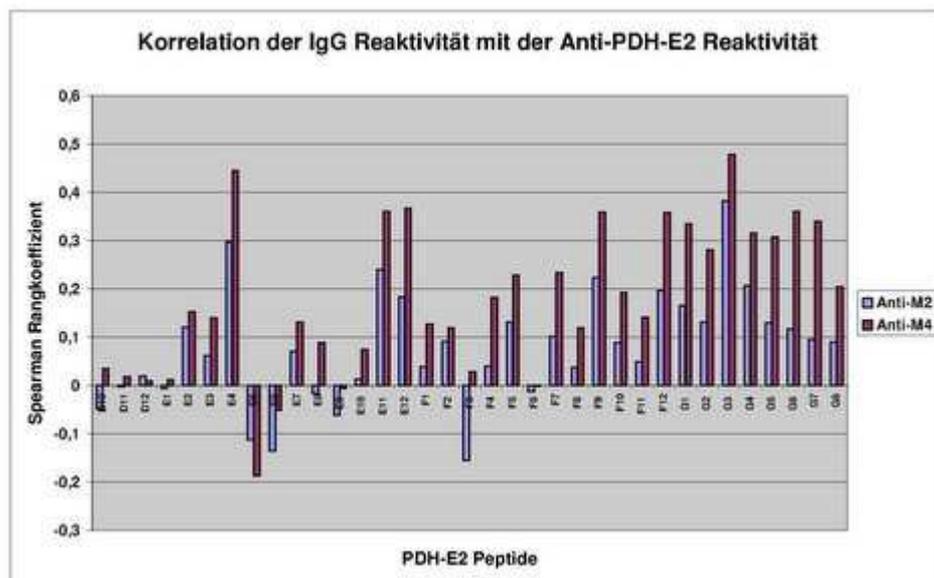


Abbildung 3.15: Darstellung des Zusammenhangs der IgG-Reaktivität zu der Reaktivität gegen die 35 Peptide für Seren von 44 untherapierten Patienten.

Spearman Rangkoeffizient der IgM Reaktivität:

Ebenso wenig werden bei der IgM Reaktivität Werte $> 0,55$ erreicht (Abbildung 3.16). Somit besteht auch hier nur eine sehr schwache, nicht verwertbare Korrelation zwischen den Reaktivitäten.

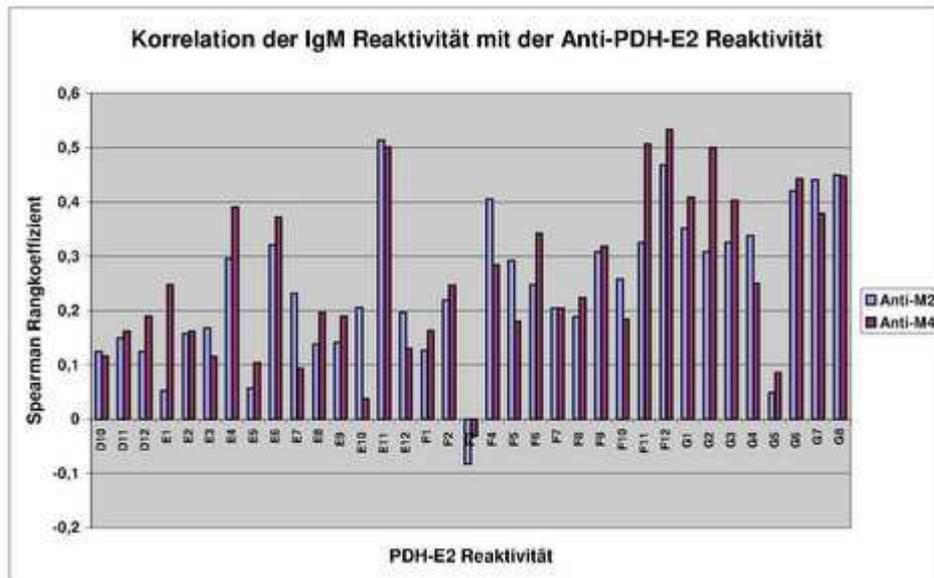


Abbildung 3.16: Darstellung des Zusammenhangs der IgM-Reaktivität zu der Reaktivität gegen den 35 Peptide für Seren von 44 untherapierten Patienten.

Zusammenfassend:

Es lässt sich keine positive Korrelation zwischen der Anti-M2- bzw. der Anti-M4-Reaktivität und der Reaktivität gegen eines der 35 Peptide der PDH-E2-Untereinheit in Seren von untherapierten Patienten nachweisen.

mit Therapierte Patienten (n=22)

Dieselben Berechnungen wurden mit dem Kollektiv der unter Therapie stehenden Patienten (n=22) durchgeführt. In *Abbildung 3.17* ist das Bestimmtheitsmaß der Korrelation der Anti-M2- und der Anti-M4 IgG-Reaktivitäten aus Seren von unter Therapie stehenden Patienten zu den Reaktivitäten gegen die jeweiligen Peptide der PDH-E2 Untereinheit dargestellt. *Abbildung 3.18* demonstriert dementsprechend das Bestimmtheitsmaß für die IgM-Reaktivität.

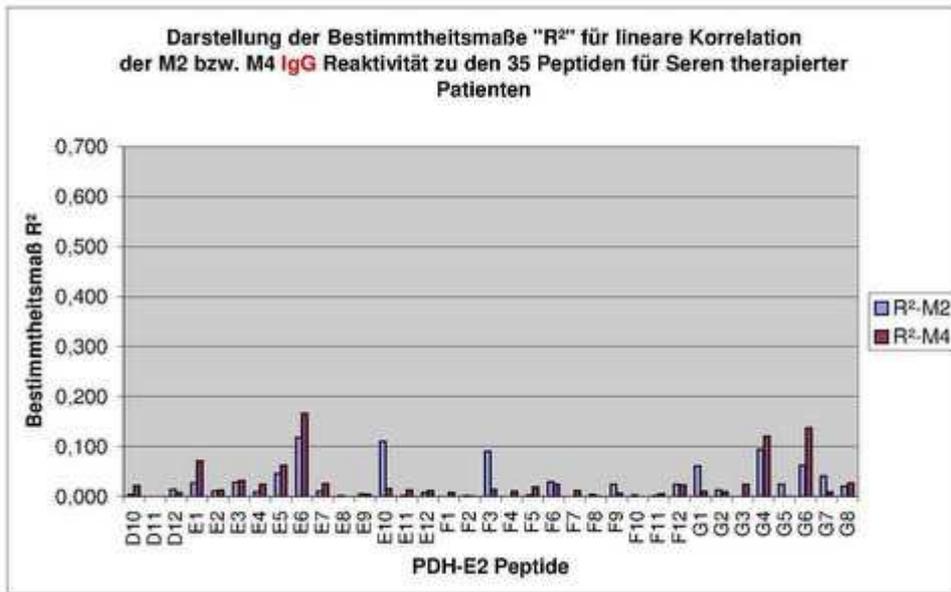


Abbildung 3.17: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivität mit der Reaktivität gegen die 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit für Seren von 22 therapierten Patienten.

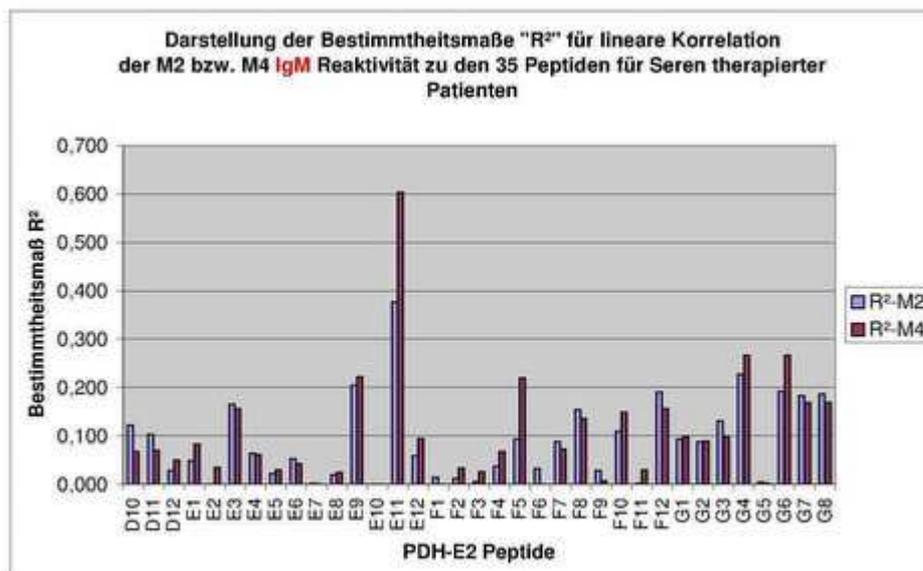


Abbildung 3.18: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgM-Reaktivität mit der Reaktivität gegen die 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit für Seren von 22 therapierten Patienten.

Bei den Seren der unter Therapie stehenden Patienten lässt sich bei der IgG-Reaktivität keinerlei Korrelation feststellen. Das Bestimmtheitsmaß erreicht keine Werte $> 0,18$.

Bis auf eine Ausnahme erreichen die Bestimmtheitsmaße der Anti-M2 und der Anti-M4 IgM-Reaktivitäten zu den Reaktivitäten der PDH-E2 Peptide keine Werte $> 0,4$, somit besteht keine Korrelation.

Nur das Bestimmtheitsmaß der Anti-M4-Reaktivität zu der Anti-E11-Reaktivität zeigt mit einem Wert von $0,6$ eine leichte Korrelation.

Die leicht angehobenen Korrelationskoeffizienten bzw. die leicht angehobenen Bestimmtheitsmaße bei der IgM-Reaktivität sind auch hier Ausreißer-bedingt. In den unten aufgeführten *Abbildungen 3.19 und 3.20* werden die leicht angehobenen Bestimmtheitsmaße der Anti-M4 IgM-Reaktivität zu der Anti-E11 IgM-Reaktivität dargestellt.

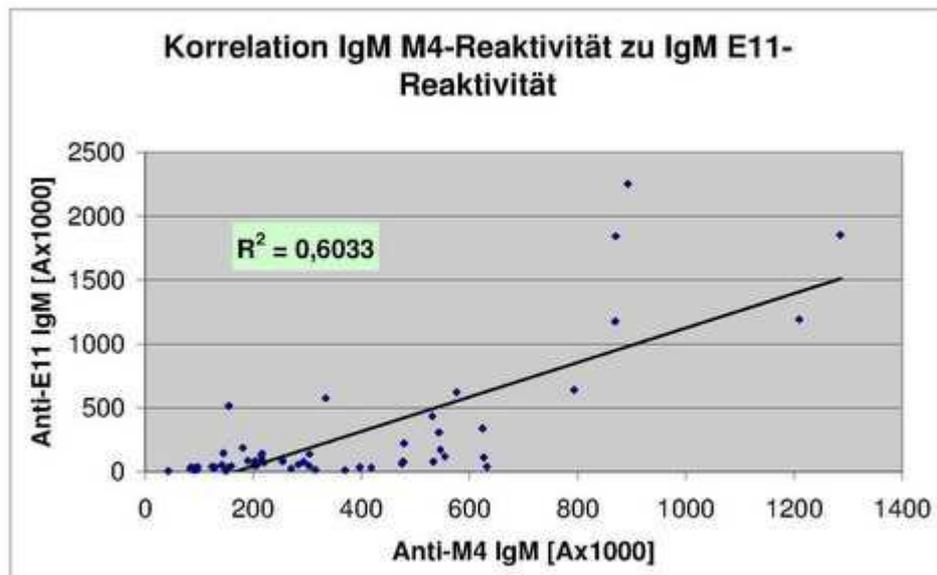


Abbildung 3.19: Darstellung der Ausreißer bedingten Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes bei der IgM Reaktivität für Seren von 22 unter Therapie stehenden Patienten.

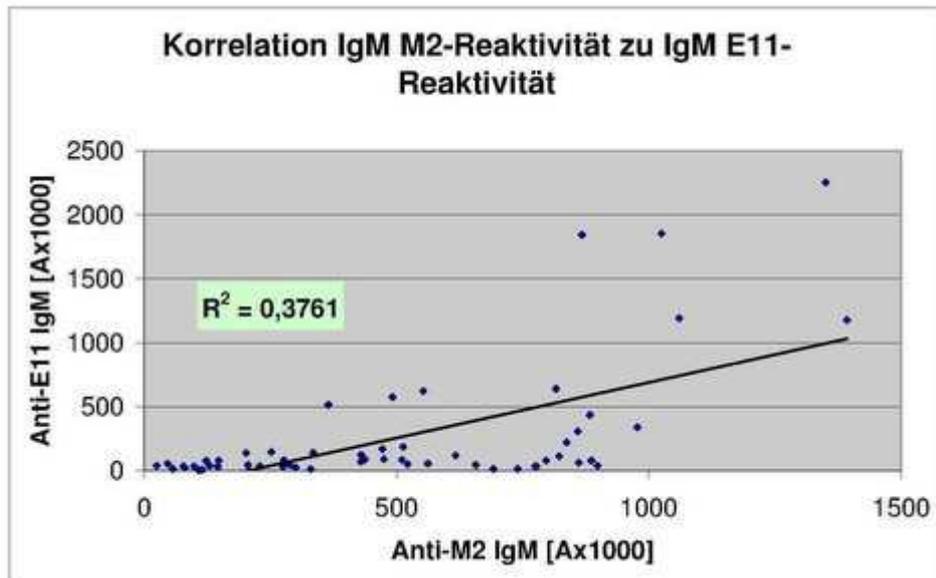


Abbildung 3.20: Darstellung der Ausreißer bedingten Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes bei der IgM Reaktivität für Seren von 22 unter Therapie stehenden Patienten.

Extremwerte bei E11:

Es fällt auf, dass bei Extremwerten der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten häufig auch gegen das E11-Peptid eine hohe Reaktivität nachgewiesen werden kann, speziell bei den IgM-Antikörpern, ansatzweise auch bei IgG.

IgG:

Von 5 Patienten, die gegen E11 eine im Vergleich zu den anderen Peptiden deutlich erhöhte IgG-Reaktivität zeigen (502 bis 675 [Ax1000]), weisen 3 einen aktiven Krankheitsverlauf auf. Alle 3 Patienten erreichen ebenso Extremwerte bei den Anti-M2 bzw. Anti-M4 IgG-Reaktivitäten (Tabelle 3.2):

Tabelle 3.2: Darstellung der Extremwerte der Anti-E11 IgG-Reaktivität und ihre begleitenden Anti- M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivitäten.

Patient (IgG Anti-E11 Reaktivität [Ax1000])	Anti-M2 IgG Reaktivität [Ax1000]	Anti-M4 IgG Reaktivität [Ax1000]
1. Pat. (502)	884	1004
2. Pat. (572)	859	778
3. Pat. (675)	1148	1523

IgM:

Es besteht bei beiden Patienten, die bei der Anti-E11 IgM-Reaktivität Extremwerte > 2000 [Ax1000] aufzeigten, ein aktiver Krankheitsverlauf.

Tabelle 3.3: Darstellung der Extremwerte der Anti-E11 IgM-Reaktivität und ihre begleitenden Anti- M2 und Anti-M4 IgM-Reaktivitäten.

Patient (IgM Anti-E11 Reaktivität [Ax1000])	Anti-M2 IgM Reaktivität [Ax1000]	Anti-M4 IgM Reaktivität [Ax1000]
1. Pat (2555)	1246	1079
2. Pat (2067)	1573	2032

Zusammenfassend:

Auch bei den Seren von den unter Therapie stehenden Patienten lässt sich keine positive Korrelation zwischen der Anti-M2- bzw. Anti-M4-Reaktivität und der Reaktivität gegen eines der 35 PDH-E2-Peptide nachweisen.

3.2.2 Korrelation der Anti-M2- zu der Anti-M4-Reaktivität mit Seren untherapierter PBC-Patienten

Bei der Korrelation der Anti-M2 mit der Anti-M4 IgG-Reaktivität in Seren von untherapierten PBC-Patienten erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,765. Der Korrelationskoeffizient der IgM-Reaktivität von Anti-M2 zu Anti-M4 beträgt 0,713. Die Korrelationen sind in den *Abbildungen* 3.21 und 3.22 dargestellt.

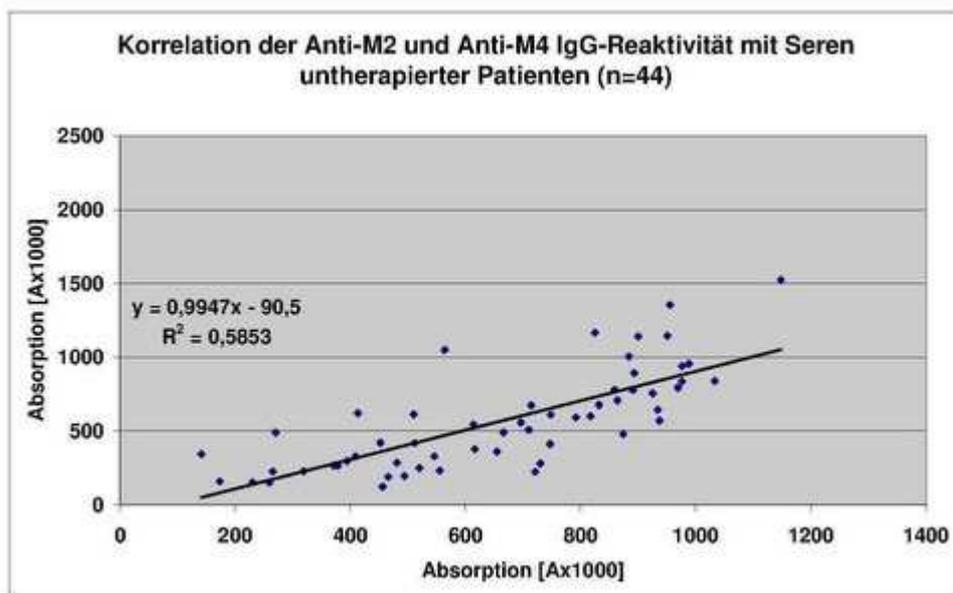


Abbildung 3.21: Korrelation der Anti-M2 zu der Anti-M4 IgG-Reaktivität mit Seren von 44 untherapierter Patienten (Korrelationskoeffizienten von 0,765).

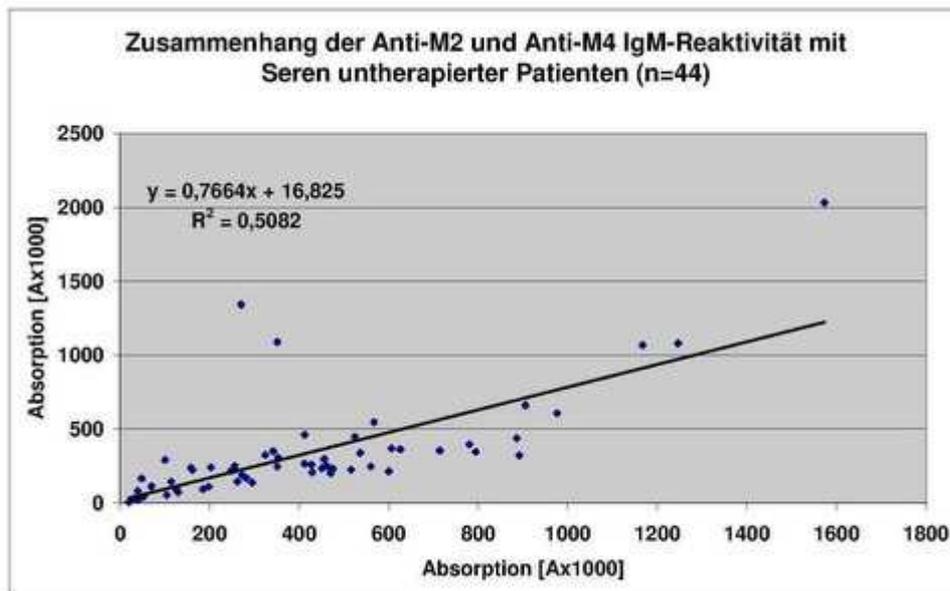


Abbildung 3.22: Korrelation der Anti-M2 zu der Anti-M4 IgM-Reaktivität mit Seren von 44 untherapierter Patienten (Korrelationskoeffizienten von 0,713).

Wie in 3.2.1. schon erwähnt, wurde der Zusammenhang zwischen der Reaktivität der 35 PDH-E2 Peptide und der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten mithilfe des Spearman Rangkoeffizienten berechnet. Um den generellen Zusammenhang von M2 und M4 zu verdeutlichen, werden nun die zuvor berechneten Spearman Rangkoeffizienten von Anti-M2- und Anti-M4 miteinander korreliert. In *Abbildung 3.23* ist das Bestimmtheitsmaß der IgG-Reaktivität dargestellt. Der Korrelationskoeffizient der beiden Spearman Rangkoeffizienten von Anti-M2 und Anti-M4 beträgt 0,917. *Abbildung 3.24* zeigt das Bestimmtheitsmaß der IgM-Reaktivität gegen M2 und M4 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,820.

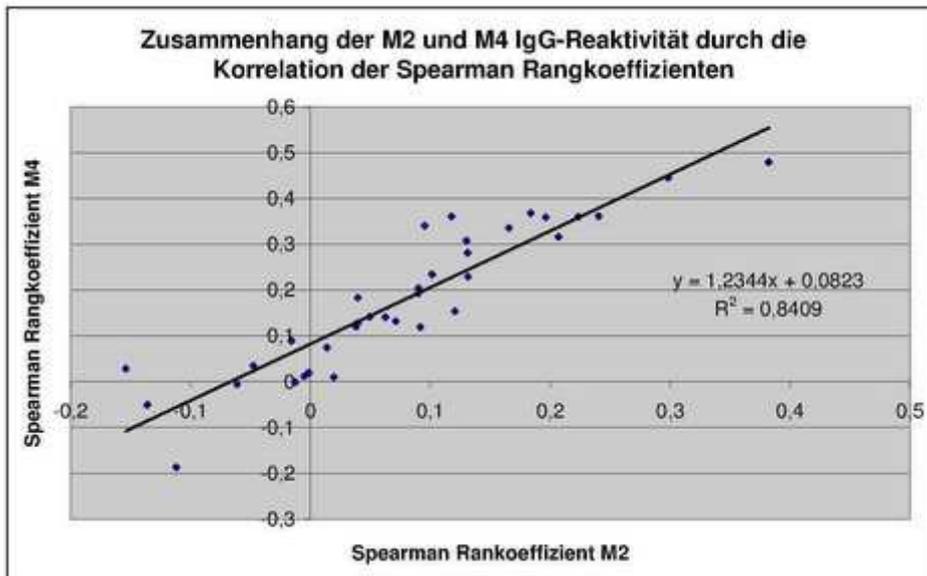


Abbildung 3.23: Darstellung des Zusammenhangs der Anti-M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivität mithilfe der Spearman Rangkoeffizienten (n=44) (Korrelationskoeffizienten von 0,917).

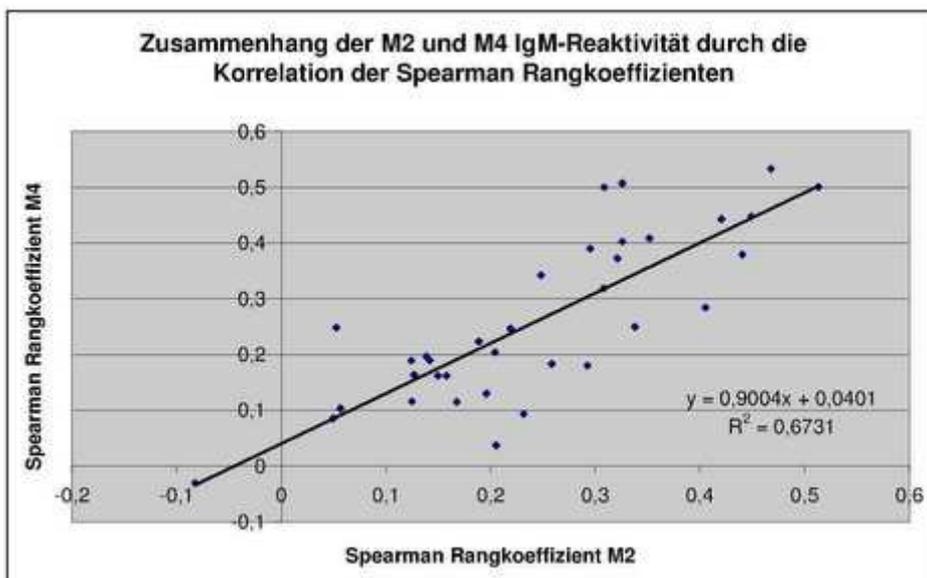


Abbildung 3.24: Darstellung des Zusammenhangs der Anti-M2 und Anti-M4 IgM-Reaktivität mithilfe der Spearman Rangkoeffizienten (n=44) (Korrelationskoeffizienten von 0,820).

mit Seren therapierter PBC-Patienten (n=29)

Bei der Korrelation der Anti-M2 zu der Anti-M4 IgG-Reaktivität mit Seren von therapierter PBC-Patienten erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,764. Der Korrelationskoeffizient der IgM-Reaktivität von Anti-M2 zu Anti-M4 beträgt 0,839. Die Korrelationen sind in den *Abbildungen* 3.25 und 3.26 dargestellt.

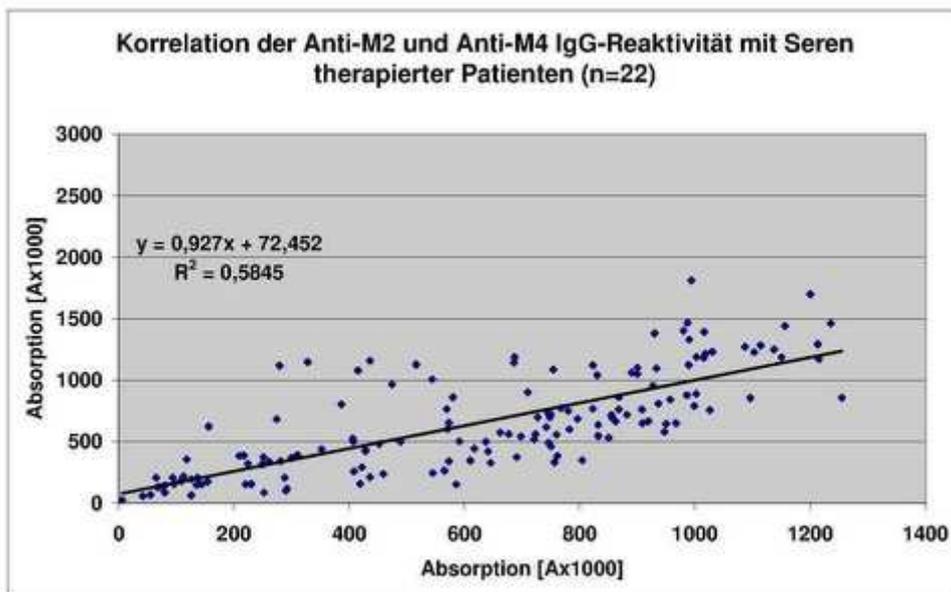


Abbildung 3.25: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivität mit Seren therapierter Patienten (n=29).

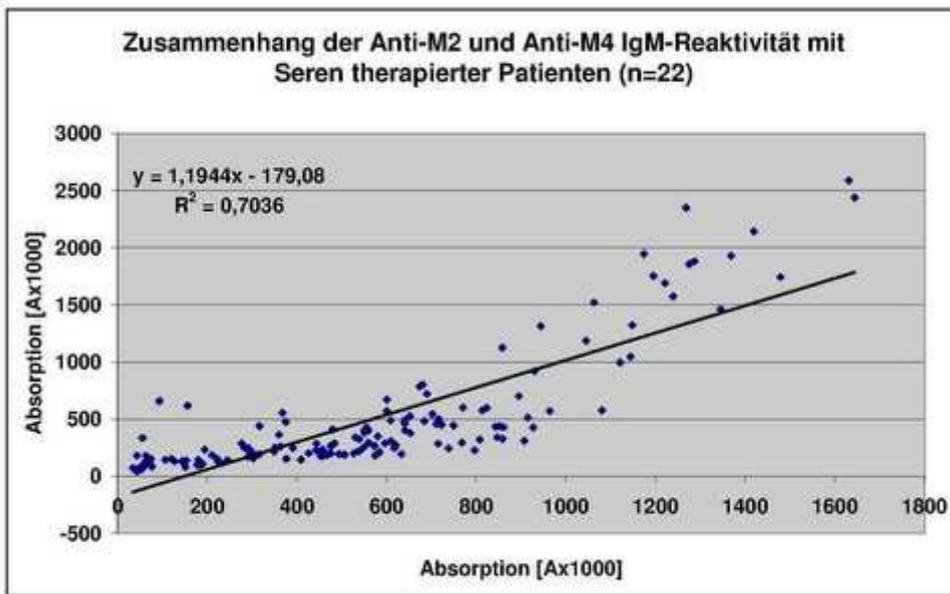


Abbildung 3.26: Korrelation der Anti-M2 und Anti-M4 IgM-Reaktivität mit Seren therapierter Patienten (n=29).

Zusammenfassend:

In Seren untherapierter und therapierter PBC-Patienten weisen sowohl die IgG-, als auch die IgM-Reaktivität von Anti-M2 eine positive Korrelation zu Anti-M4 mit Werten $> 0,7$ auf.

Auch bei der Analyse der Spearman Rangkoeffizienten der Anti-M2 und Anti-M4 IgG- und IgM-Reaktivitäten ist mit Korrelationswerten von 0,917 und 0,820 ein deutlicher Zusammenhang zu erkennen (Abbildung 3.23). Das Bestimmtheitsmaß der Spearman Rangkoeffizienten-Korrelation von der Anti-M2 zu der Anti-M4 IgM-Reaktivität spricht ebenfalls, wenn auch in einem schwächeren Ausmaß ($R^2 = 0,67$), für einen Zusammenhang zwischen Anti-M2 und Anti-M4 (Abbildung 3.24).

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass zwischen M2 und M4 eine positive Korrelation und somit ein Zusammenhang besteht.

3.3. Testung von KBR-positiven PBC-Seren auf ihre Anti-M2, -M4 und -PDH-E2-Peptid-Aktivitäten im ELISA

3.3.1. Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten zu den Anti-PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten komplementbindender Antikörper

Eine weitere Unterteilung der Patienten ohne Therapie erfolgte abhängig von dem Nachweis komplementbindender Antikörper.

M2

Von den 57 in der KBR Anti-M2 positiven Patienten waren die Seren von 36 Patienten gegen die 35 Peptide der PDH-E2 getestet worden. Die von diesen Seren im ELISA ermittelten Anti-M2-Reaktivitäten wurden mit ihren Absorptionen der PDH-E2-Peptide korreliert.

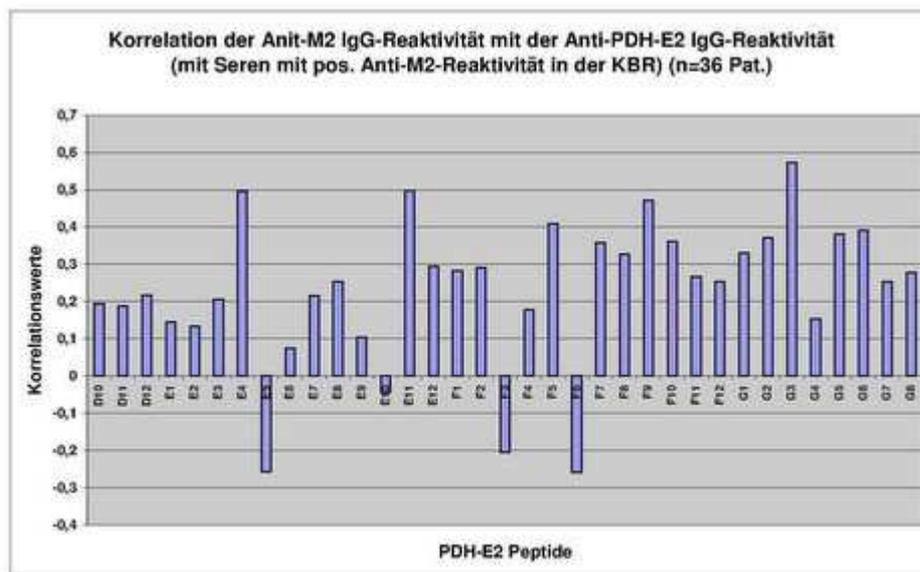


Abbildung 3.27: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M2 IgG-Reaktivitäten zu den IgG-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten mit komplementbindenden M2 Antikörpern (n=36).

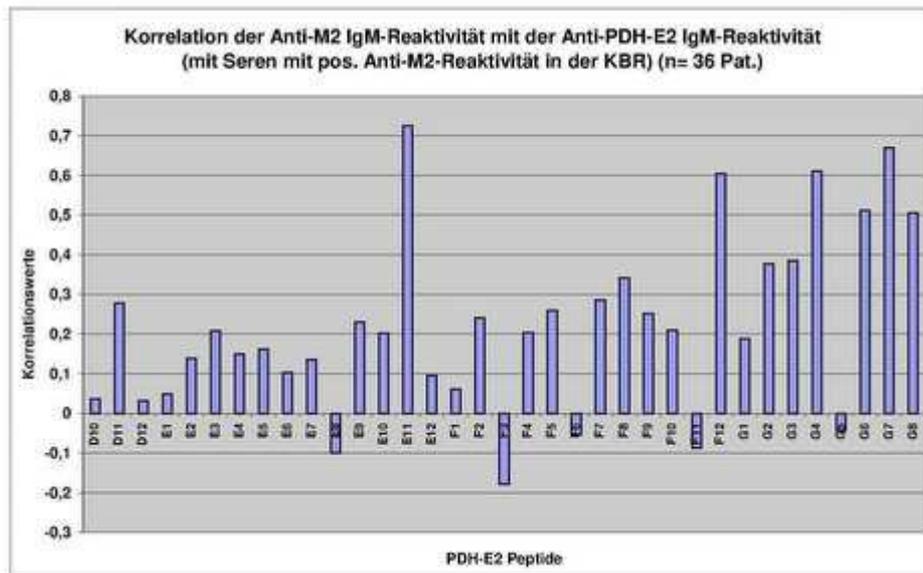


Abbildung 3.28: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M2 IgM-Reaktivitäten zu den IgM-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten mit komplementbindenden M2 Antikörpern (n=36).

In der *Abbildung 3.27* wird deutlich, dass bei einer Korrelation der Anti-M2 zu den Anti-PDH-E2-Peptid IgG-Reaktivitäten von Patientenserum mit komplementbindenden Antikörpern weder ein positiver noch eine negativer Zusammenhang feststellbar ist. Es werden keine Korrelationswerte > 0,55 erreicht. Nur gegen das G3-Peptid wird ein leicht erhöhter Wert von ~ 0,55 erreicht. Eine deutliche Korrelation ($R = 0,73$) besteht zwischen der Anti-M2 IgM-Reaktivität der Seren und ihrer IgM-Reaktivität gegen das E11-Peptid (*Abbildung 3.28*). Ebenso zeigen sich noch leichte Korrelationen der IgM-Reaktivitäten von Anti-M2 zu Anti-G7 ($R = 0,67$), sowie zu Anti-G4 und Anti-F12 ($R = 0,6$). Bei den weiteren Peptiden sind keine ausschlaggebenden positiven oder negativen Korrelationen erkennbar.

M4

Serumproben von 29 der 51 Patienten, die komplementbindende Anti-M4 Antikörper aufwiesen, wurden gegen Peptide der PDH-E2-Untereinheit getestet (n=29).

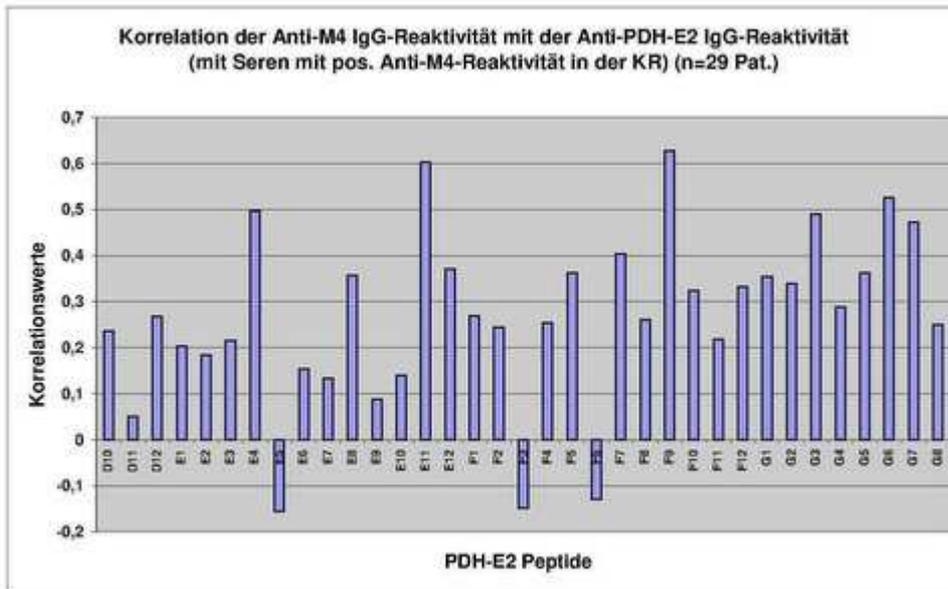


Abbildung 3.29: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M4 IgG-Reaktivitäten zu den IgG-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten mit komplementbindenden M4 Antikörpern (n=29).

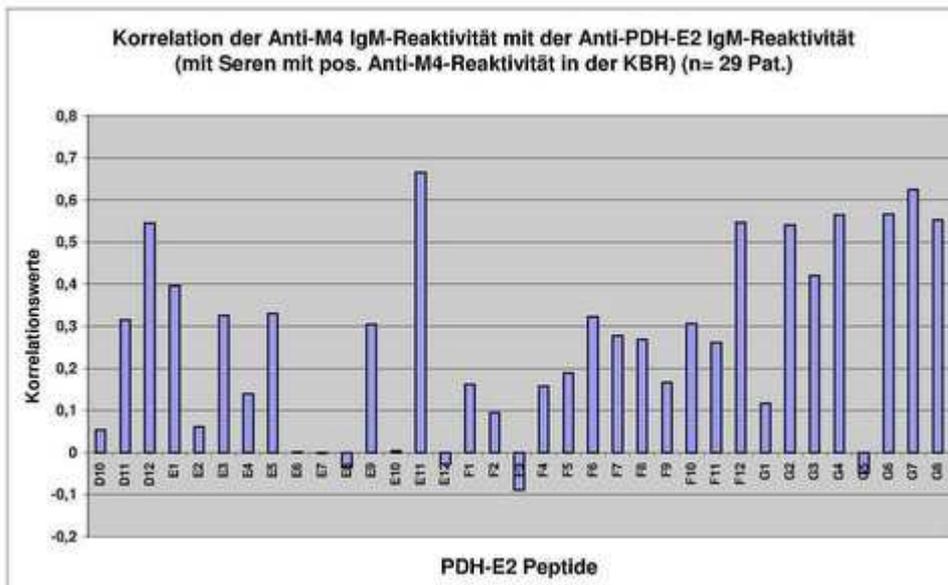


Abbildung 3.30: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M4 IgM-Reaktivitäten zu den IgM-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten mit komplementbindenden M4 Antikörpern (n=29).

Sowohl die Korrelation der IgG-Reaktivitäten gegen das F9-Peptid, als auch die Korrelation gegen das E11-Peptid weisen mit einem Wert von 0,63 bzw. 0,60 eine schwache Korrelation zu der Anti-M4-Reaktivität auf (*Abbildung 3.29*). Bei den weiteren Anti-Peptid-Reaktivitäten ist keine positive oder negative Korrelation zu der Anti-M4-Reaktivität festzustellen. Auch bei den IgM-Antikörpern zeigt sich mit 0,66 ein leicht erhöhter Korrelationswert der Anti-M4 zu der Anti-E11-Reaktivität (*Abbildung 3.30*). Des Weiteren wird noch mit 0,63 von der Anti-G7 zu der Anti-M4 IgM-Reaktivität eine schwache Korrelation erreicht.

Zusammenfassend:

In der KBR Anti-M2 und Anti-M4 positive Seren scheinen im ELISA insbesondere mit dem E11-Peptid zu reagieren.

Von den PBC-Seren mit komplementbindenden Antikörpern korrelieren die IgM-Reaktivitäten von Anti-M2 zu Anti-E11 ($R = 0,73$), sowie die IgG- ($R = 0,60$), als auch IgM-Reaktivitäten ($R = 0,66$) von Anti-M4 zu Anti-E11. Keine Korrelation ist bei der IgG- Reaktivität von Anti-M2 zu Anti-E11 zu erkennen.

3.3.2. Korrelation der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten zu den PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten nicht-komplementbindender Antikörper

Des Weiteren wurde untersucht, ob zwischen den im ELISA ermittelten Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten der Patientenserum ohne komplementbindende Antikörper eine Korrelation mit den Reaktivitäten der PDH-E2-Peptide nachzuweisen ist. *Abbildung 3.31* und *3.32* stellen die Korrelationswerte der Anti-M2 IgG- und IgM-Reaktivitäten zu den Anti-Peptid-Reaktivitäten dar.

M2

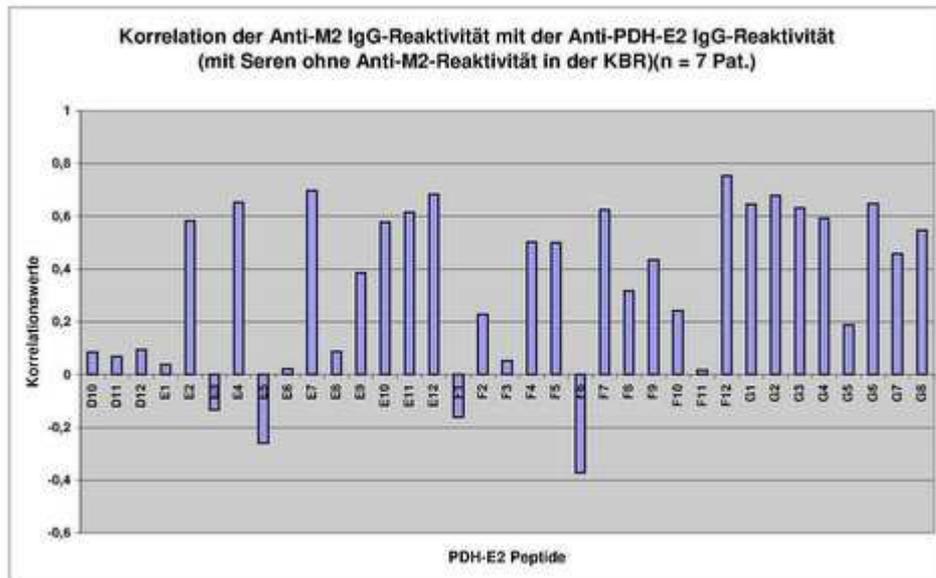


Abbildung 3.31: Korrelation der im ELISA Anti-M2 IgG-Reaktivitäten zu den IgG-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten ohne komplementbindende M2 Antikörper (n=7).

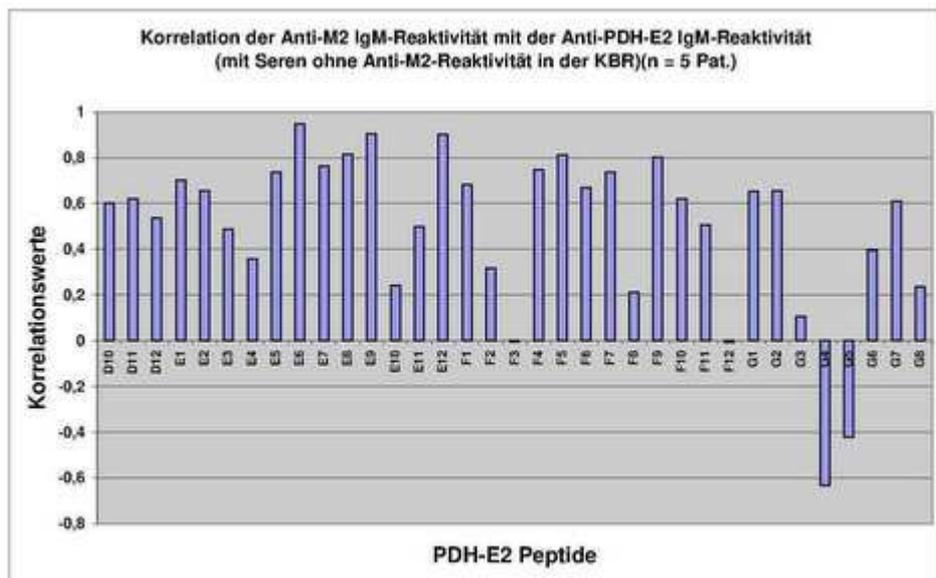


Abbildung 3.32: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M4 IgM-Reaktivitäten zu den IgM-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten ohne komplementbindende M2 Antikörper (n=5).

10 Anti-Peptid IgG-Reaktivitäten erreichen korreliert zu der Anti-M2 IgG-Reaktivität Werte von $> 0,6$ (Abbildung 3.31). Einen Korrelationswert von $> 0,7$ erreicht die Anti-F12 (im katalytischen Zentrum) zu der Anti-M2 IgG-Reaktivität. Sechs der Anti-Peptid IgM-Reaktivitäten erreichen hohe Korrelationenwerte von $> 0,8$. Jedoch ist hier bei einer sehr geringen Patientenserenanzahl die Aussagekraft dieser Korrelationswerte fraglich (Abbildung 3.32). Dennoch werden die höchsten Korrelationen von den IgM-Reaktivitäten von Anti-M2 zu Anti-E6, gefolgt von Anti-E9 und Anti-E12, erreicht.

M4

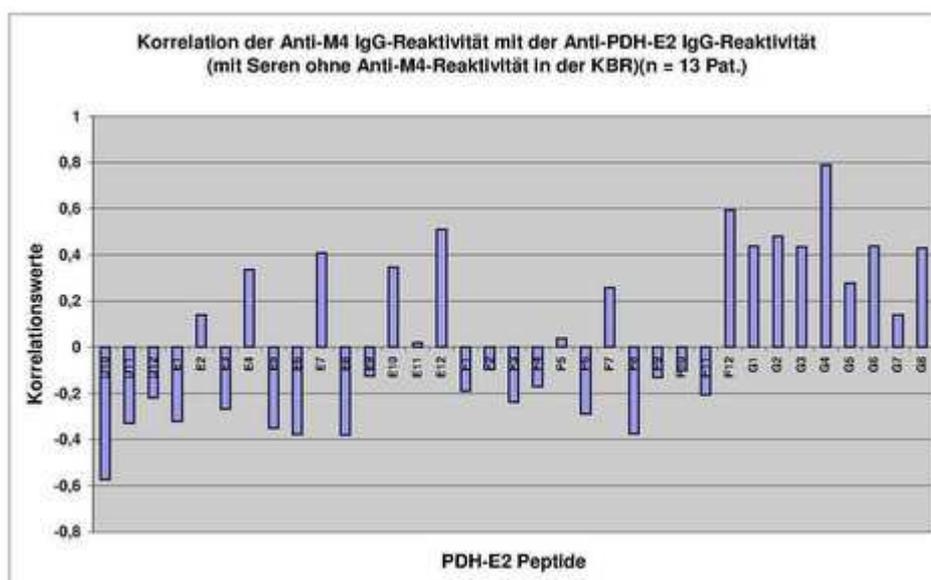


Abbildung 3.33: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M4 IgG-Reaktivitäten zu den IgG-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten ohne komplementbindende M4 Antikörper (n=13).

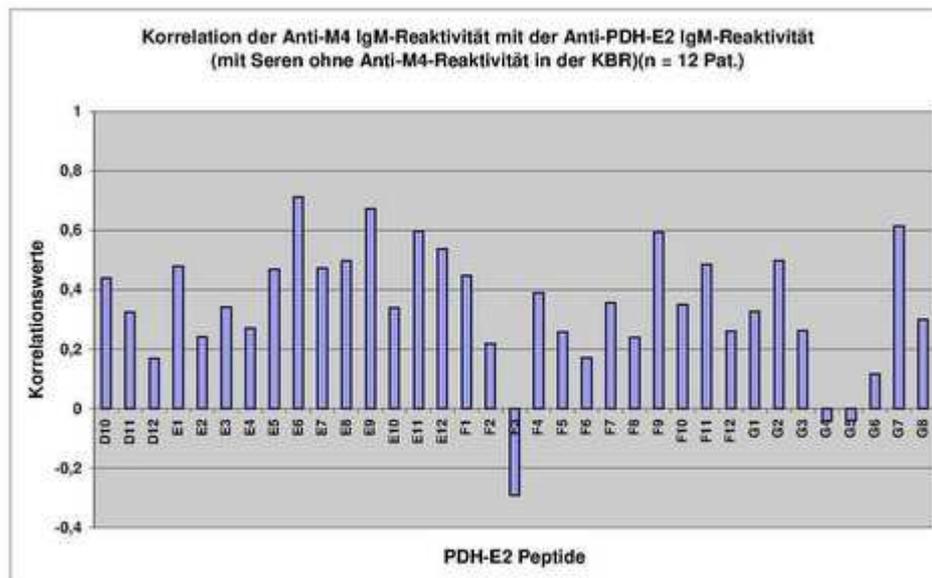


Abbildung 3.34: Korrelation der im ELISA ermittelten Anti-M4 IgM-Reaktivitäten zu den IgM-Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2 Peptide für Seren untherapierter Patienten ohne komplementbindende M4 Antikörper (n=12).

Bei einer Patientenserenzahl von 13 wird nur von der Anti-G4 IgG-Reaktivität eine deutliche Korrelation mit einem Wert von 0,8 zu der Anti-M4 IgG-Reaktivität erreicht (Abbildung 3.33). Die beiden Anti-Peptid IgM-Reaktivitäten weisen E6 und E9 mit Werten > 0,6 eine leichte Korrelation zu der Anti-M4 IgM-Reaktivität auf (Abbildung 3.34).

Zusammenfassend:

Bei geringen Patientenzahlen ist es schwierig, statistisch verwertbare Rückschlüsse zu ziehen. Eine deutliche Korrelation mit einem Wert von 0,8 erreicht die Anti-M4 mit der Anti-G4 IgG-Reaktivität. Bei den IgM-Antikörpern scheinen sowohl die Anti-M2 als auch die Anti-M4 mit Anti-E6 Reaktivität zu korrelieren. Des Weiteren sind keine klar verwertbaren Korrelationen auszumachen.

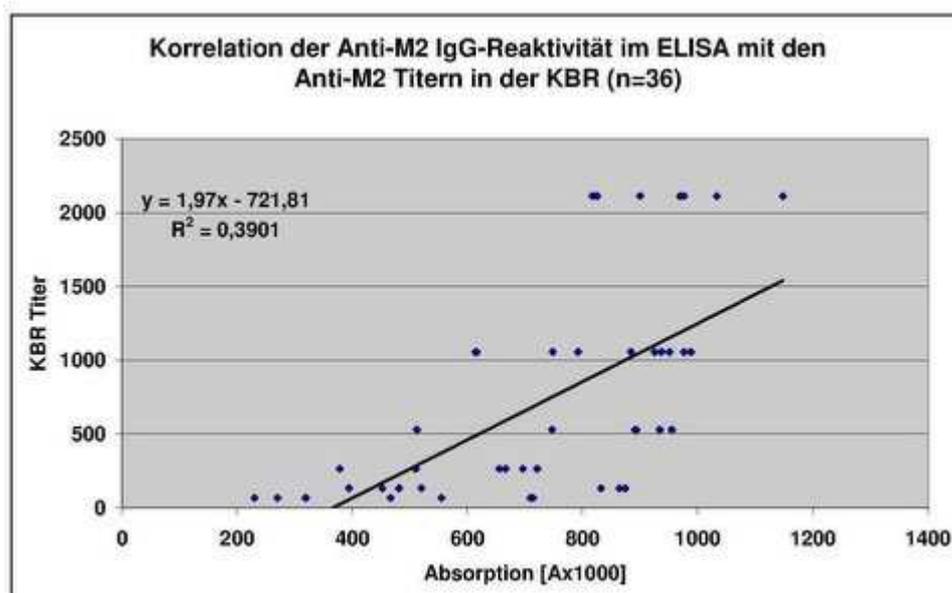
3.3.3. Korrelation der Anti-M2-, -M4- und –PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten im ELISA zu den Anti-M2- bzw. -M4-Titern in der KBR

Korrelation der Anti-M2 und -M4-Reaktivitäten (ELISA) zu den Anti-M2- und M4-Titern (KBR)

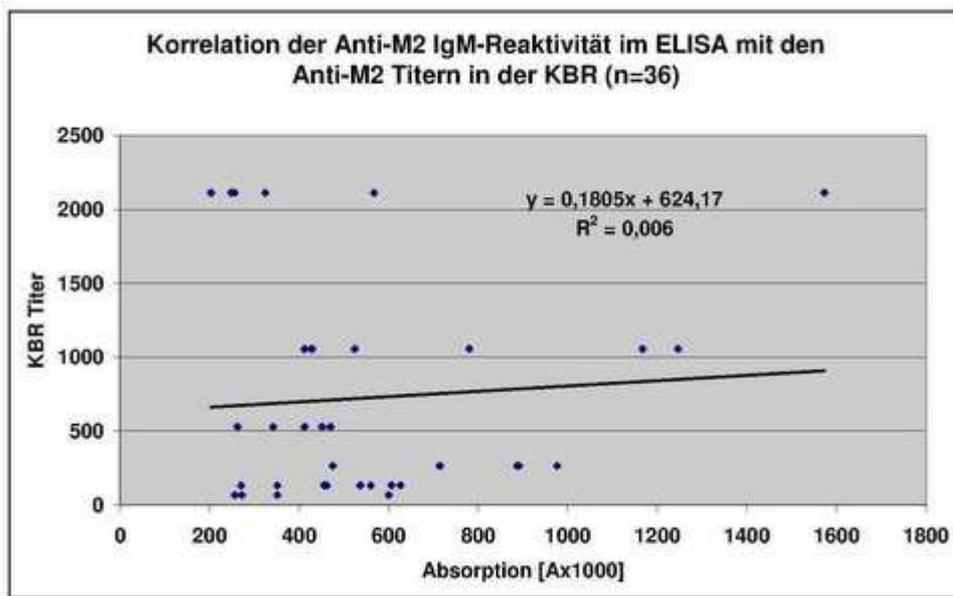
Mit der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den Reaktivitäten im ELISA und in der KBR besteht, wurden in diesem Teil der Arbeit die jeweiligen Anti-M2- bzw. Anti-M4-Reaktivitäten mit den Titern in der KBR korreliert. Die Korrelationen sind in den *Abbildungen 3.35 bis 3.38* dargestellt.

(Hinweis: In der KBR entsprechen die Verdünnungsstufen folgendem Titer-Schema: 66, 132, 264, 528, 1056 und 2112. Bei den Abbildungen der IgM-Reaktivitäten wurde von der Skala der IgG-Reaktivität etwas abgewichen, um die Werte besser darstellen zu können.)

M2



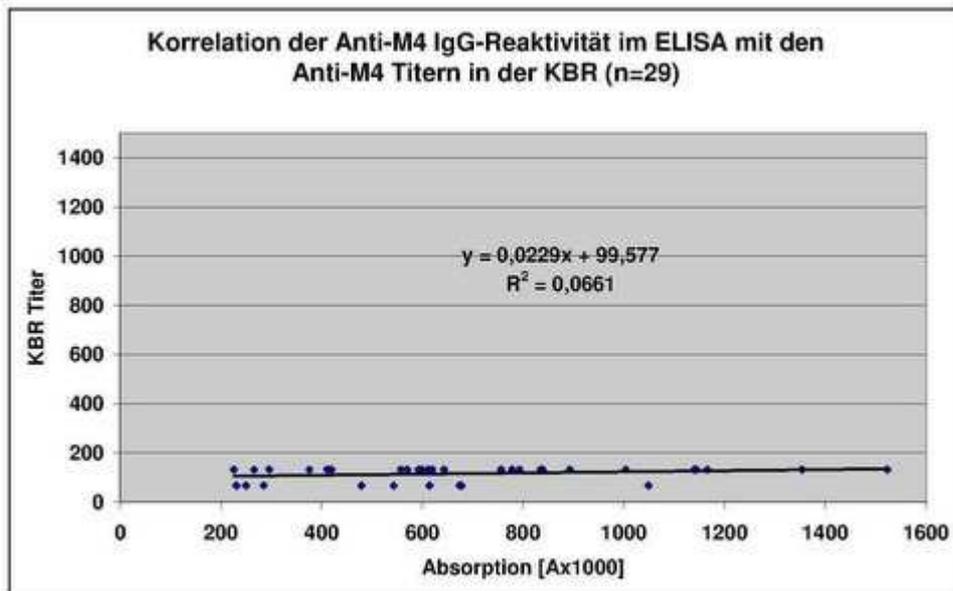
Abbildungen 3.35: Korrelation der Anti-M2 IgG-Reaktivität im ELISA mit den Anti-M2 Titern in der KBR (n=36). Korrelationswert: 0,62.



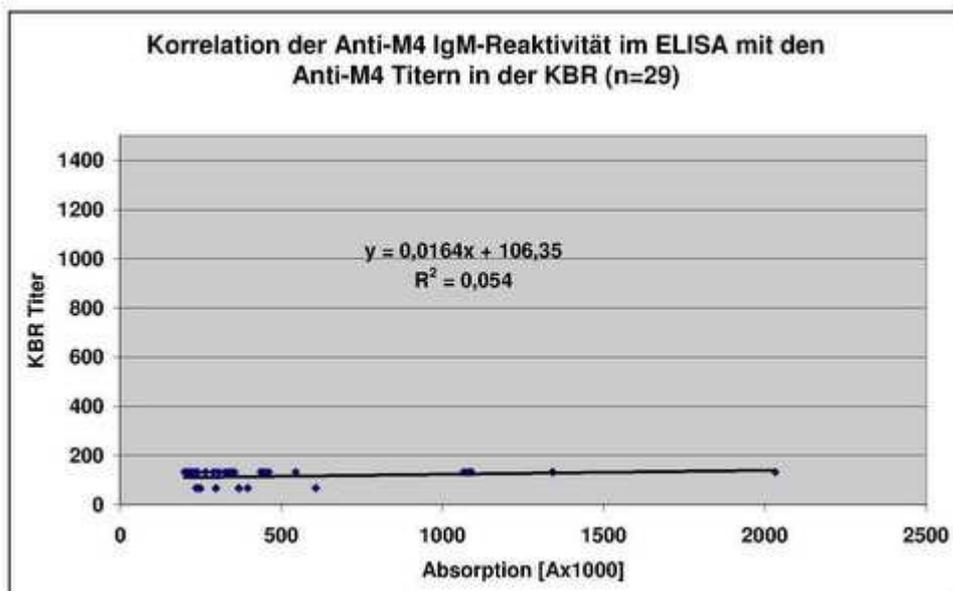
Abbildungen 3.36: Korrelation der Anti-M2 IgM-Reaktivität im ELISA mit den Anti-M2 Titern in der KBR (n=36). Korrelationswert: 0,26.

Bei der Korrelation der Anti-M2 IgG-Reaktivität im ELISA mit den Anti-M2 Titern in der KBR erhält man einen Wert von 0,62, was eine leichte Korrelation beschreibt. Die Korrelation der Anti-M2 IgM-Reaktivität mit den Anti-M2 Titern der KBR ergibt einen Wert von 0,26.

M4



Abbildungen 3.37: Korrelation der Anti-M4 IgG-Reaktivität im ELISA mit den Anti-M4 Titern in der KBR (n=29). Korrelationswert: 0,08.



Abbildungen 3.38: Korrelation der Anti-M4 IgM-Reaktivität im ELISA mit den Anti-M4 Titern in der KBR (n=29). Korrelationswert: 0,23.

Die Anti-M4 IgG-Reaktivität erreicht mit den Anti-M4 Titern einen Wert von 0,08. Bei der Korrelation der Anti-M4 IgM-Reaktivität mit den Anti-M4 Titern der KBR erhält man einen Wert von 0,23. Beide Werte sprechen für keinerlei Korrelation.

Korrelation der Anti-PDH-E2-Peptid-Reaktivitäten (ELISA) zu den Anti-M2- und Anti-M4-Titer (KBR)

Des Weiteren wurden die Anti-M2 und -M4-Titer der KBR mit den im ELISA ermittelten Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2-Peptide korreliert um mögliche Zusammenhänge der komplementbindenden Antikörper mit einzelnen Peptiden detektieren zu können (Abbildungen 3.39 bis 3.42).

M2 (KBR)

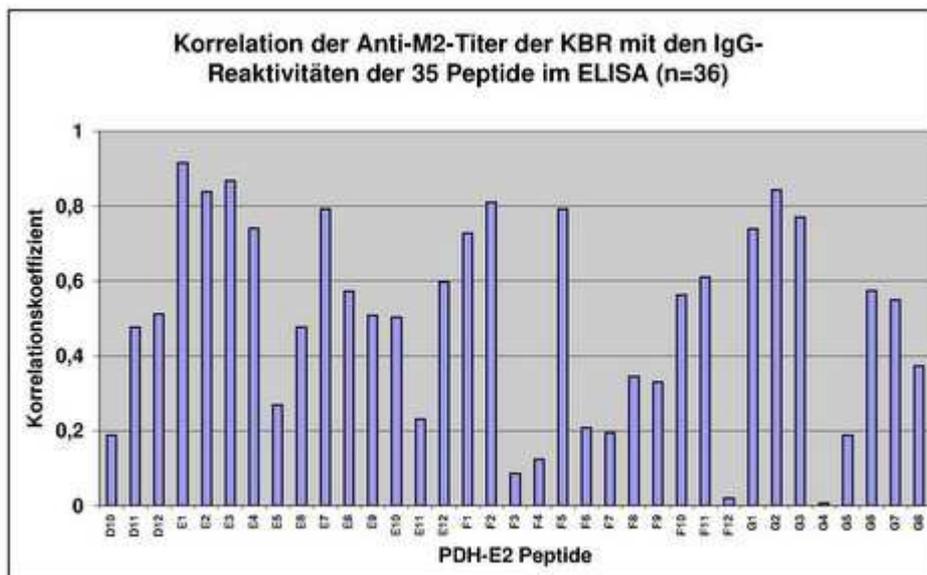


Abbildung 3.39: Korrelation der Anti-M2-Titer der KBR mit den im ELISA ermittelten IgG-Reaktivitäten der 35 PDH-Peptide (n=36).

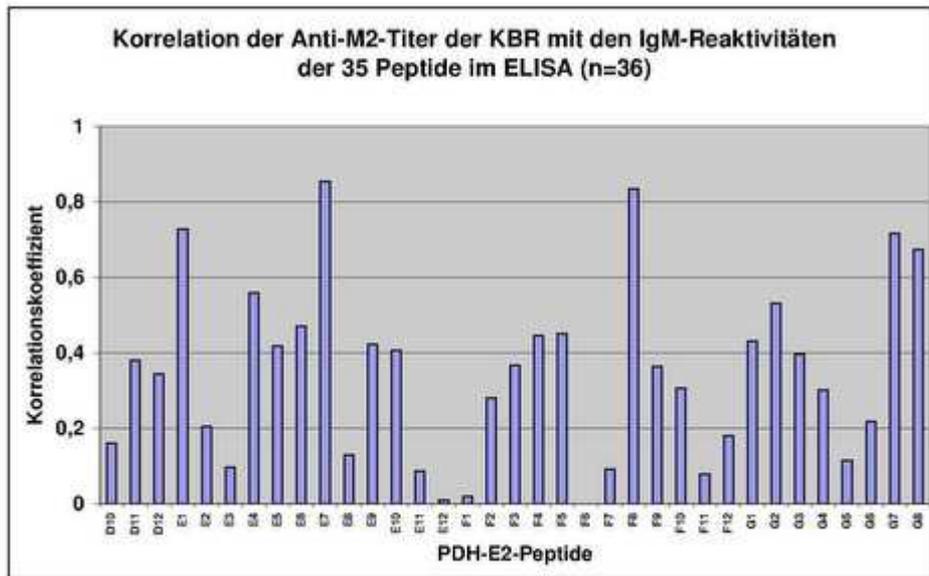


Abbildung 3.40: Korrelation der Anti-M2-Titer der KBR mit den im ELISA ermittelten IgM-Reaktivitäten der 35 PDH-Peptide (n=36).

Vor allem bei den IgG-Antikörpern werden von sieben Peptiden Korrelationswerte von 0,8 erreicht. Jedoch weisen hier interessanterweise die sonst durch starke Reaktivitäten auffallenden Peptide F12 und G4 keinerlei Korrelation mit Werte von nahezu null auf. Bei den IgM-Antikörpern fallen Korrelationswerte über 0,8 auf, die von den Peptiden E7 und F8 erreicht werden.

M4 (KBR)

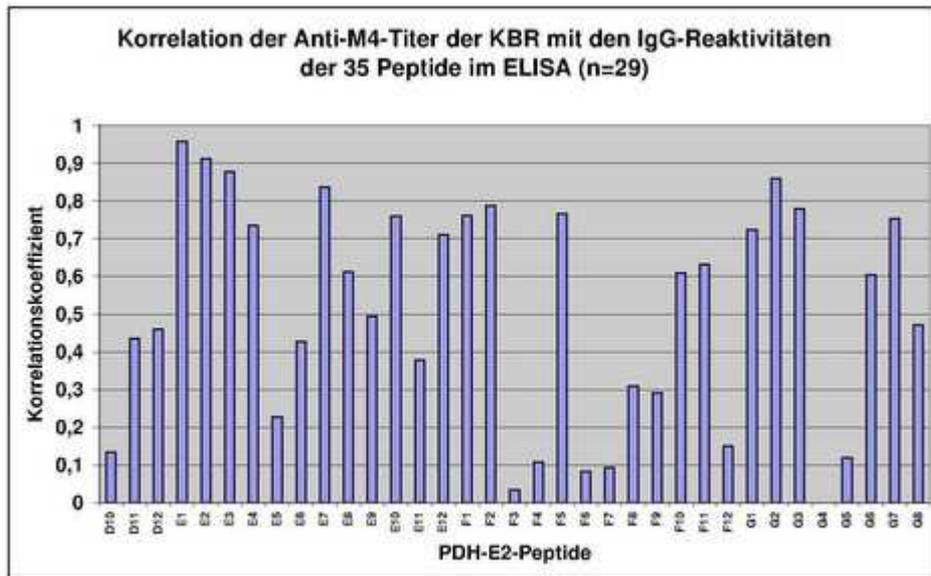


Abbildung 3.41: Korrelation der Anti-M4-Titer der KBR mit den im ELISA ermittelten IgG-Reaktivitäten der 35 Peptide (n=36).

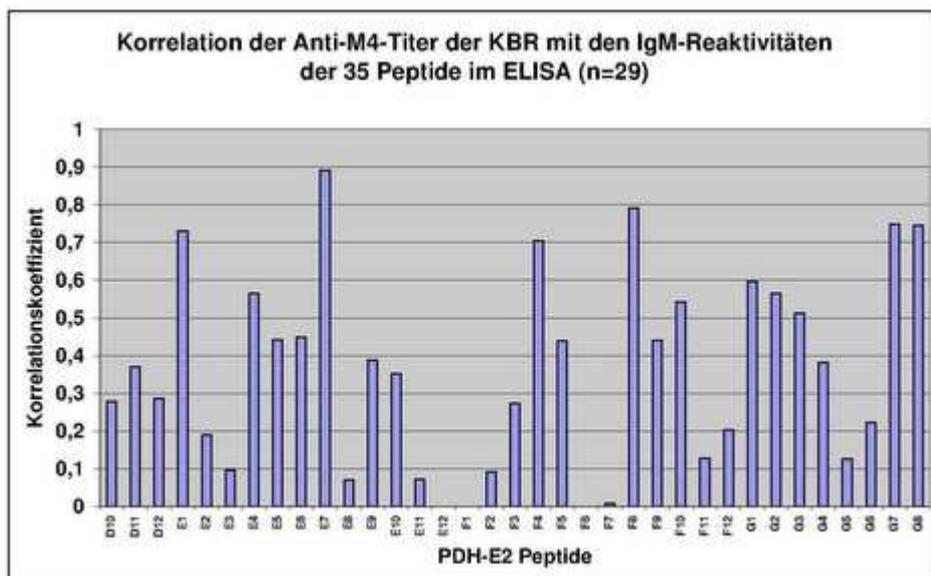


Abbildung 3.42: Korrelation der Anti-M4-Titer der KBR mit den im ELISA ermittelten IgM-Reaktivitäten der 35 Peptide (n=36).

Bei Korrelationsberechnungen der KBR Anti-M4 positiven Seren ergeben beinahe dieselben Werte, wie oben bei den Anti-M2 positiven Seren schon beschrieben.

Zusammenfassend:

Mit einem Wert von 0,62 scheint eine geringe Korrelation zwischen den Reaktivitäten der Anti-M2 IgG-Antikörper im ELISA und den Anti-M2 Antikörpern in der KBR zu bestehen.

Nur das E7-Peptid erreicht bei allen vier Reaktivitäten einen Korrelationswert > 0,8.

3.4. Zusammenhänge der AMA- und PDH-E2-Reaktivitäten für Seren untherapierter Patienten mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf

Im Folgenden wurde untersucht, ob Patienten mit einem aktiven bzw. inaktiven Krankheitsverlauf antimitochondriale Antikörper aufweisen, die verstärkt mit einem bestimmten Epitop der PDH-E2 Untereinheit reagieren und korrelieren. Hierfür wurden die Daten der PBC-Patienten mit einem aktiven bzw. inaktiven Krankheitsverlauf herausgesucht und ihre AMA-Reaktivitäten mit den Reaktivitäten gegen die 35 Peptide der PDH-E2 Untereinheit korreliert. Die *Tabelle 2.8* in *Kapitel 2.3* führt die Anzahl der Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf auf, die ein Fortschreiten der PBC-Erkrankung bis zur Leberzirrhose erlitten. Ebenso ist die Anzahl der Patienten aufgelistet, die an einer inaktiven Form der PBC erkrankten, die im Frühstadium persistiert. Von den 37 PBC-Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf waren die Daten von 15 Patienten vorhanden, die für die Berechnungen geeignet waren. Es wurden ausschließlich Seren vor Therapiebeginn zur Bestimmung der Korrelationswerte der Anti-M2- mit den Anti-M4-Reaktivitäten im ELISA verwendet. In den *Abbildungen 3.43* und *3.44* sind die Korrelationswerte der Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf dargestellt:

Aktiver Verlauf:

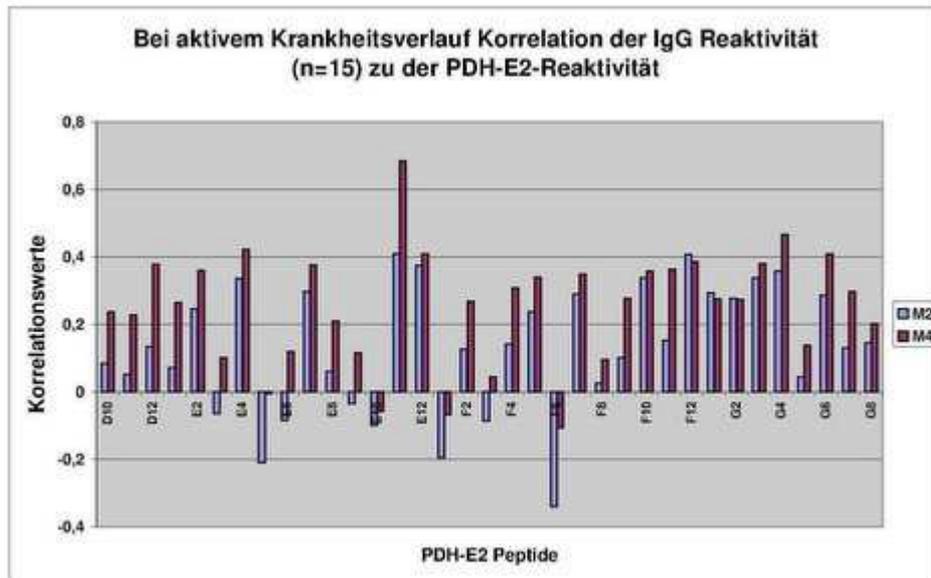


Abbildung 3.43: Korrelation der IgG-Reaktivität aus Seren von Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf zu der PDH-E2-Reaktivität (n=15) (signifikanter Unterschied < 0,05 zu inaktivem Verlauf nach Kolmogorov: E2, E3).

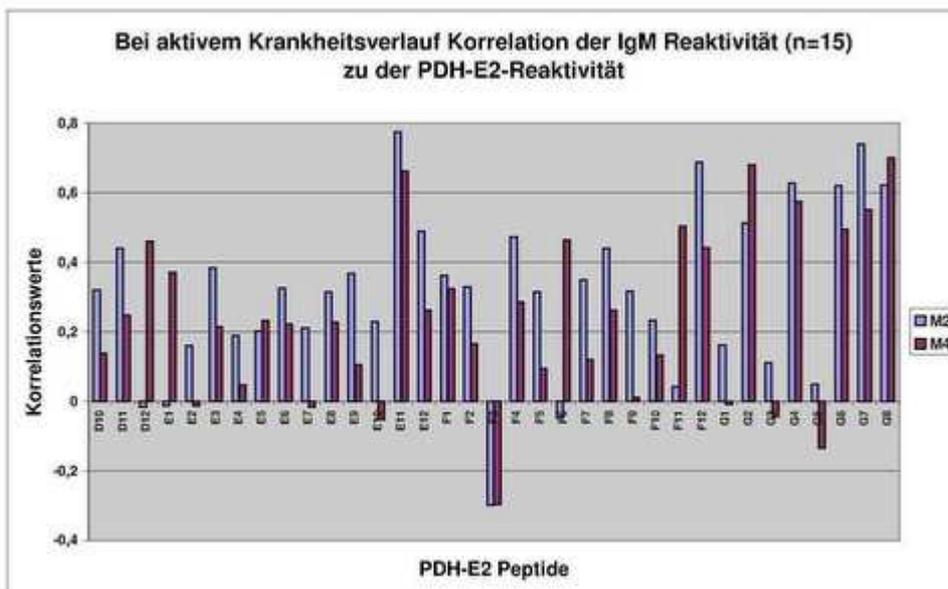


Abbildung 3.44: Korrelation der IgM-Reaktivität aus Seren von Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf zu der PDH-E2-Reaktivität (n=15) (signifikanter Unterschied < 0,05 zu inaktivem Verlauf nach Kolmogorov: E4, G6, G7; nach Mann Whitney: E4, F12, G1, G5, G6).

Zu der Anti-M2 IgG-Reaktivität sind keine Korrelationen festzustellen. Ein leicht erhöhter Korrelationswert von 0,68 zeigt sich zwischen der Anti-E11 und der Anti-M4 IgG-Reaktivität. Ebenso zeigen sich bei den IgM-Antikörpern hohe Korrelationswerte > 0,6 zwischen der Anti-M2 und der Anti-M4 zu der Anti-E11 Reaktivität. Hier zeigt sich jedoch der höchste Korrelationswert mit 0,8 bei der Anti-M2 Reaktivität. Des Weiteren zeigten Anti-F12, Anti-G4 und Anti-G6, -G7 und -G8 Korrelationswerte > 0,6 zu der Anti-M2 IgM-Reaktivität. Zu Anti-M4 fallen die Korrelationswerte > 0,6 der Anti-G2 und -G8 IgM-Reaktivität auf.

Inaktiver Verlauf:

Von 26 der 54 Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf waren die Daten für die Berechnungen geeignet. In den *Abbildung 3.45 und 3.46* werden die Korrelationswerte von Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf dargestellt:

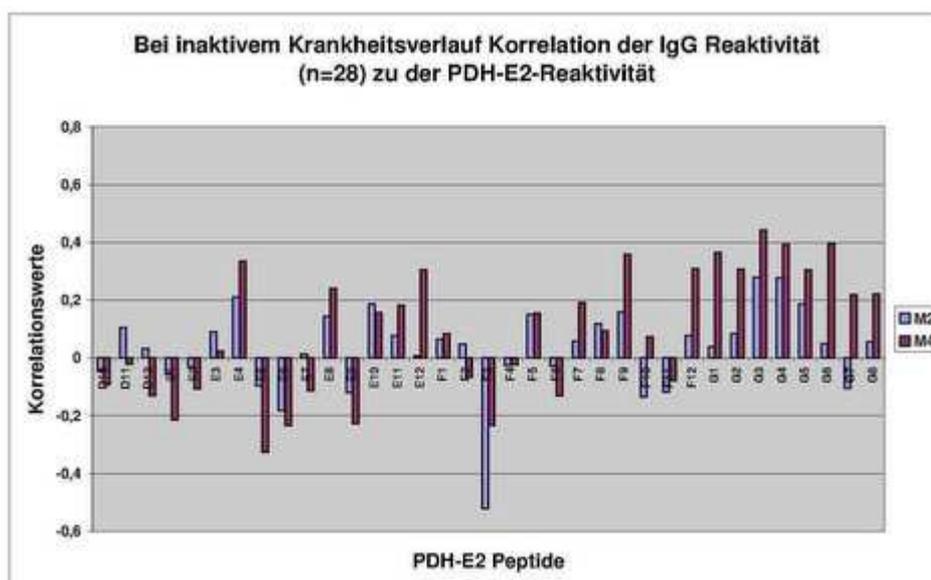


Abbildung 3.45: Korrelation der IgG-Reaktivität aus Seren von Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf zu der PDH-E2-Reaktivität (n=28) (signifikanter Unterschied < 0,05 zu aktivem Verlauf nach Kolmogorov: E2, E3).

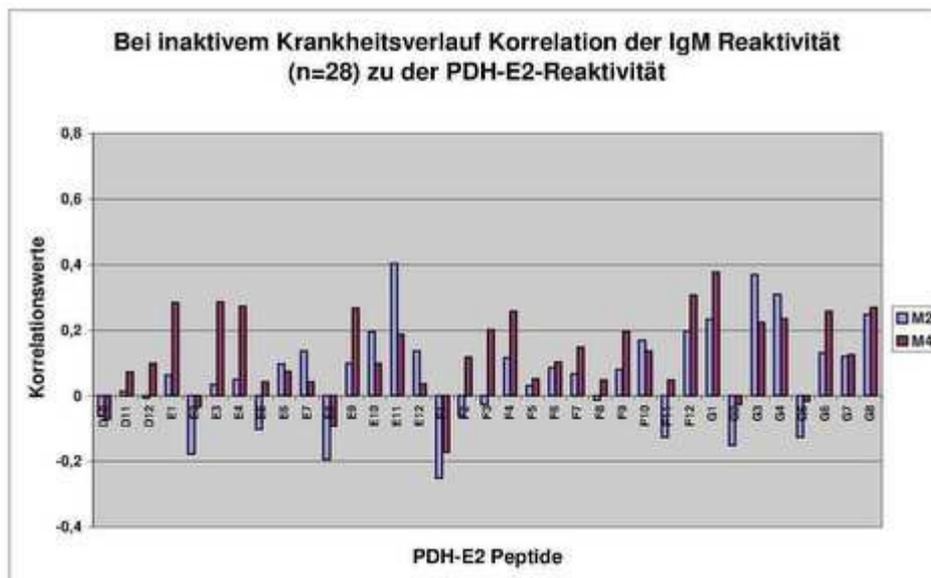


Abbildung 3.46: Korrelation der IgM-Reaktivität aus Seren von Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf zu der PDH-E2-Reaktivität (n=28) (signifikanter Unterschied < 0,05 zu aktivem Verlauf nach Kolmogorov: E4, G6, G7; nach Mann Whitney: E4, F12, G1, G5, G6).

Bei den IgG-Antikörpern werden keine Korrelationswerte > 0,5 bzw < -0,5 erreicht. Folglich ist keine Korrelation vorhanden. Die Korrelationswerte überschreiten bei den IgM-Antikörpern keine Werte > 0,4 bzw < -0,4. Somit ist hier ebenfalls keine Korrelation nachweisbar.

Zusammenfassend:

Sowohl bei den IgG- als auch bei den IgM-Antikörper-Reaktivitäten zeigt sich bei den Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf eine deutliche Korrelation zu dem E11-Peptid. Bei einem inaktiven Krankheitsverlauf ist keine Korrelation zu einer der 35 Peptid-Reaktivitäten vorhanden.

3.5. Auswirkungen von medikamentöser Therapie und Lebertransplantation auf die AMA Reaktivität

Im Folgenden wurde untersucht, ob und wie die verschiedenen, bei der PBC verabreichten Medikamente sowie eine Lebertransplantation die Reaktivität der antimitochondrialen Antikörper beeinflussen.

Diesbezüglich wurden die PBC-Patienten je nach Therapie in Gruppen eingeteilt. In der *Tabelle 3.8* ist die Anzahl der Patienten aufgeführt, von denen Serumproben vor und nach Therapiebeginn vorhanden waren und für die Berechnungen verwendet wurden.

Tabelle 3.8: Anzahl der Patienten bezüglich ihrer erhaltenen Therapieform.

Therapie	Anzahl der Patienten
länger als 2 Jahre ohne Therapie	8
Ursodesoxycholsäure (URSO)	21
Methotrexat	5
Azathioprin	3
OLT	8

3.5.1. Zeitliches Verhalten der Reaktivitäten vor Therapiebeginn

Zuerst wurde untersucht, ob die AMA-Reaktivitäten der Serumproben von untherapierten Patienten einen Standardverlauf aufweisen. In den aufgeführten *Abbildungen 3.47 bis 3.50* sind die Reaktivitätsverläufe von 6 Patienten mit mehr als 4 Serumproben vor Therapiebeginn über einen Zeitraum von 10 Jahren dargestellt.

M2

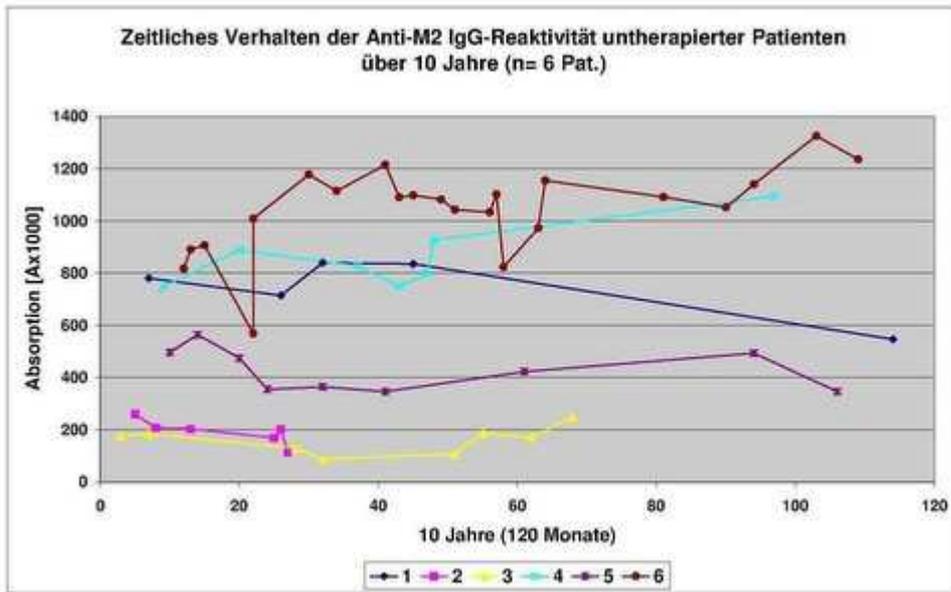


Abbildung 3.47: Zeitliches Verhalten der Anti-M2 IgG-Reaktivität untherapierter Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (120 Monaten)(n=6).

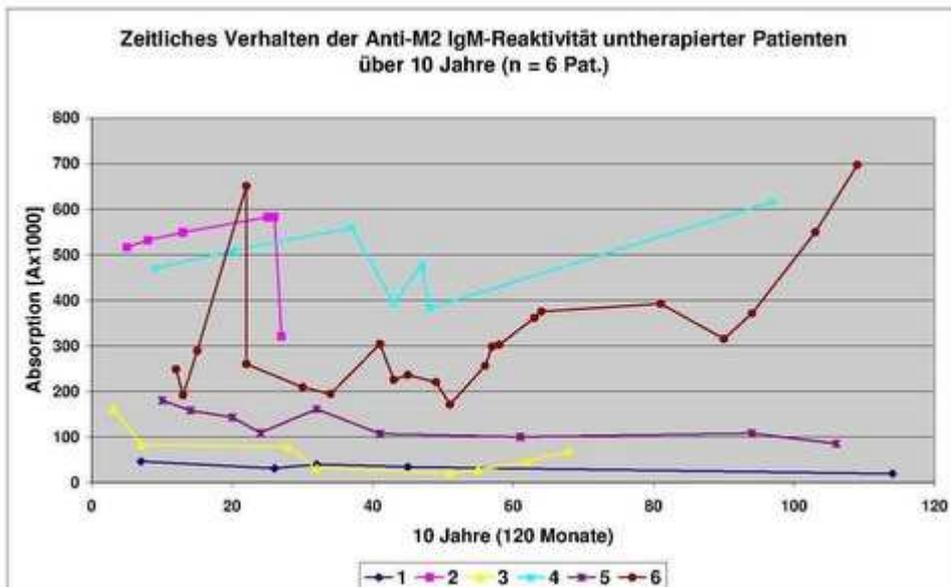


Abbildung 3.48: Zeitliches Verhalten der Anti-M2 IgM-Reaktivität untherapierter Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (120 Monaten)(n=6).

M4

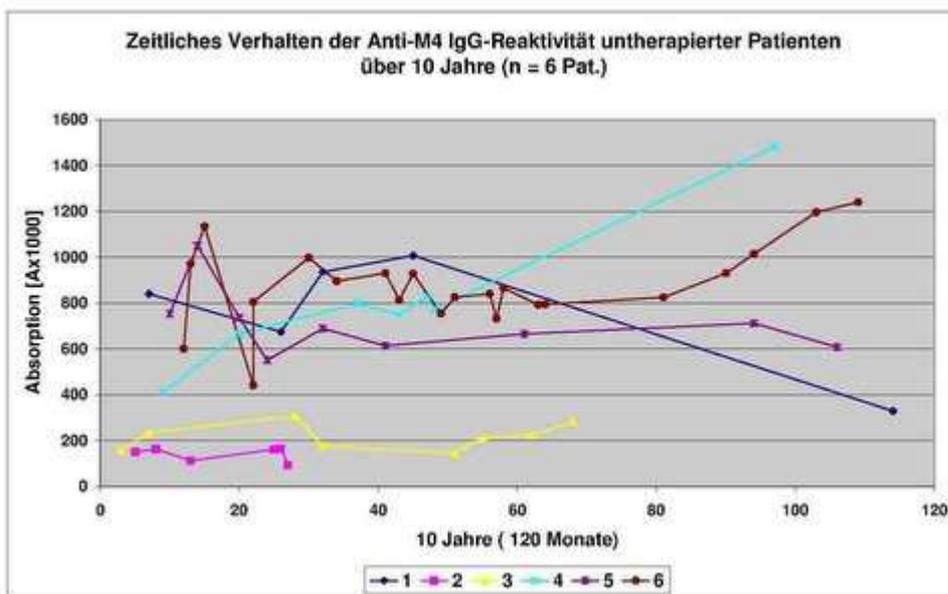


Abbildung 3.49: Zeitliches Verhalten der Anti-M4 IgG-Reaktivität untherapierter Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (120 Monaten)(n=6).

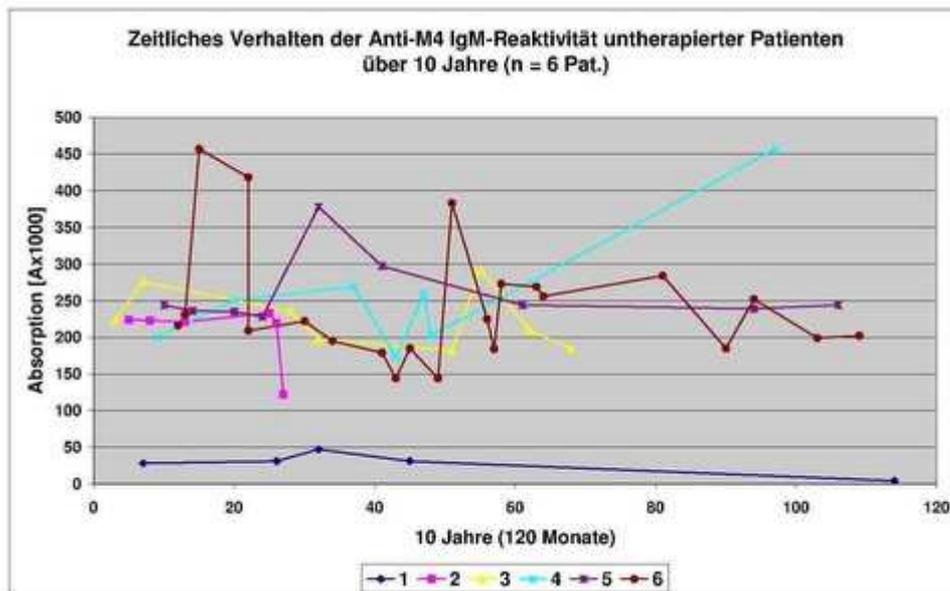


Abbildung 3.50: Zeitliches Verhalten der Anti-M4 IgM-Reaktivität untherapierter Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (120 Monaten)(n=6).

Zusammenfassend:

Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 10 Jahren bzw. 120 Monaten ist bei Seren untherapierter Patienten weder bei der Anti-M2 IgG- oder IgM-, noch bei der Anti-M4 IgG- oder IgM-Reaktivität ein Standardverlauf oder ein gemeinsames Verhalten der Reaktivitäten erkennbar.

3.5.2. Verhalten der AMA-Reaktivitäten von Seren untherapierter Patienten

Um die in 3.5.3. bis 3.5.7 ermittelten Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden die Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten aus Seren von untherapierten Patienten ermittelt. In den *Abbildungen 3.51 bis 3.54* sind die Mittelwerte der AMA- und Anti-PDH-E2-Peptid Reaktivitäten innerhalb der ersten 4 Jahre nach

Beobachtungsbeginn im Vergleich zu den Mittelwerten aus Seren nach dem 4. Beobachtungsjahr dargestellt.

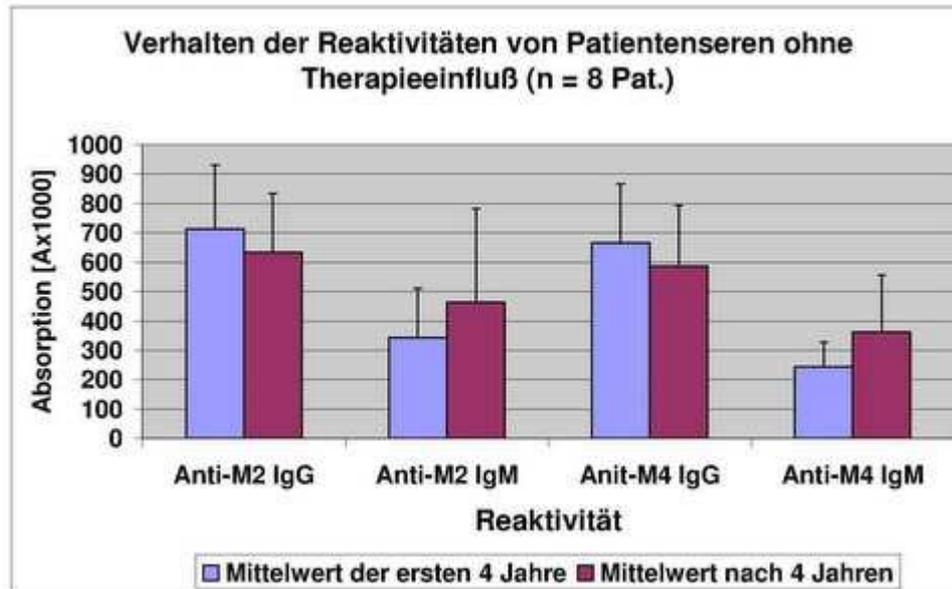


Abbildung 3.51: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten untherapierter Patienten aus den ersten 4 Jahren nach Beobachtungsbeginn im Vergleich zu den Mittelwerten der AMA-Reaktivitäten nach dem 4. Beobachtungsjahr (n=8).

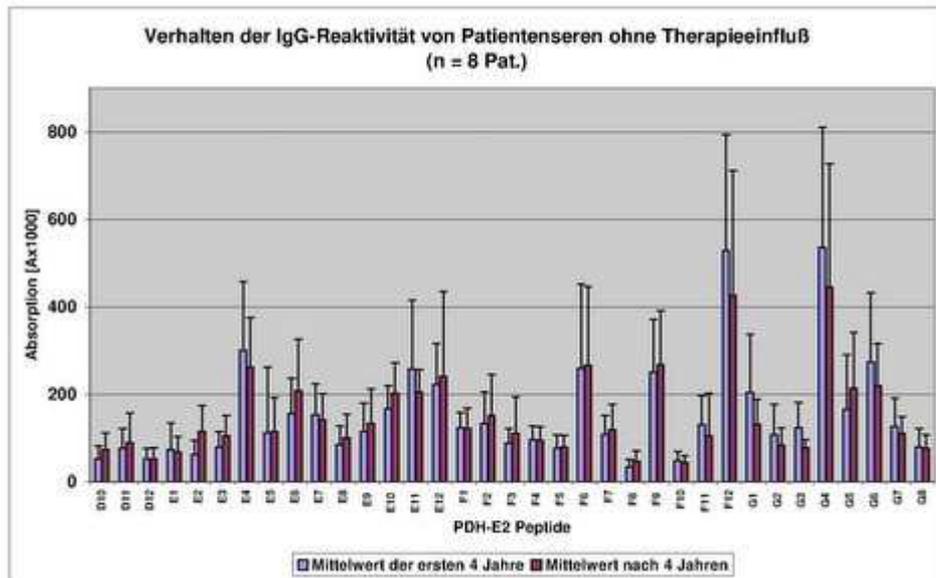


Abbildung 3.52: Mittelwerte der IgG-Reaktivitäten der 35 PDH-E2 Peptide untherapierter Patienten aus den ersten 4 Jahren nach Beobachtungsbeginn im Vergleich zu den Mittelwerten der IgG-Reaktivitäten der 35 PDH-E2 Peptide nach dem 4. Beobachtungsjahr (n=8) in einer Skala bis 800 [Ax1000]. (signifikanter Unterschied < 0,05 zu nach vier Jahren Beobachtung nach Wilcoxon: **G4**, G6).

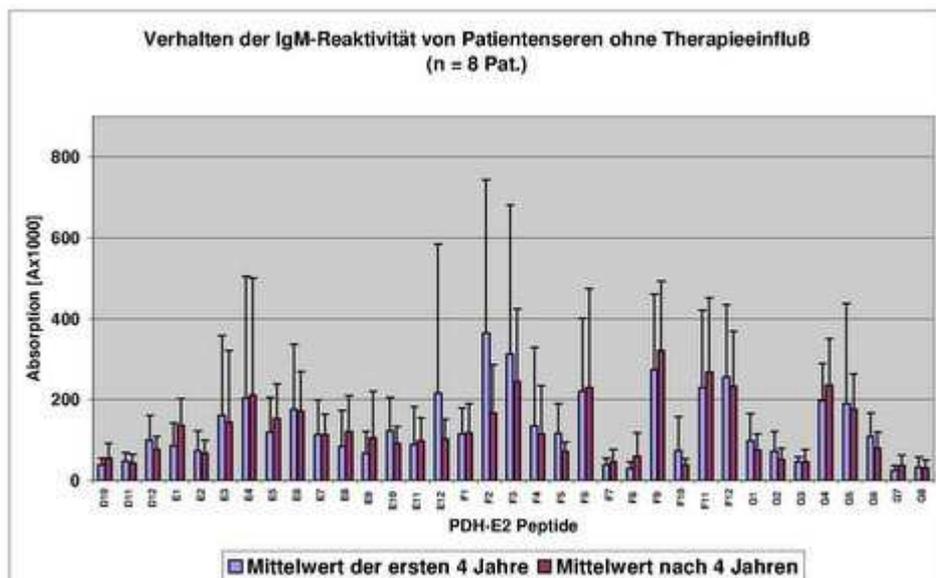


Abbildung 3.53: Mittelwerte der IgM-Reaktivitäten der 35 PDH-E2 Peptide untherapierter Patienten aus den ersten 4 Jahren nach Beobachtungsbeginn im Vergleich zu den Mittelwerten der IgM-Reaktivitäten der 35 PDH-E2 Peptide nach dem 4. Beobachtungsjahr (n=8) in einer Skala bis 800 [Ax1000]. (keine signifikanten Unterschiede).

In Anlehnung an Kapitel 3.4 wurden die Patientenserum innerhalb ihrer Therapieform-Gruppen zusätzlich noch nach ihrem aktiven oder inaktiven Krankheitsverlauf aufgeteilt. Es wurde ermittelt, mit wie vielen Epitopen der PDH-E2-Untereinheit ein Serum reagiert und inwieweit sich dieses Verhalten durch therapeutische Maßnahmen verändert. In der Abbildungen 3.50 sind die Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum eines untherapierten Patienten dargestellt, aufgeteilt nach der Reaktivität und dem jeweiligen Krankheitsverlauf.

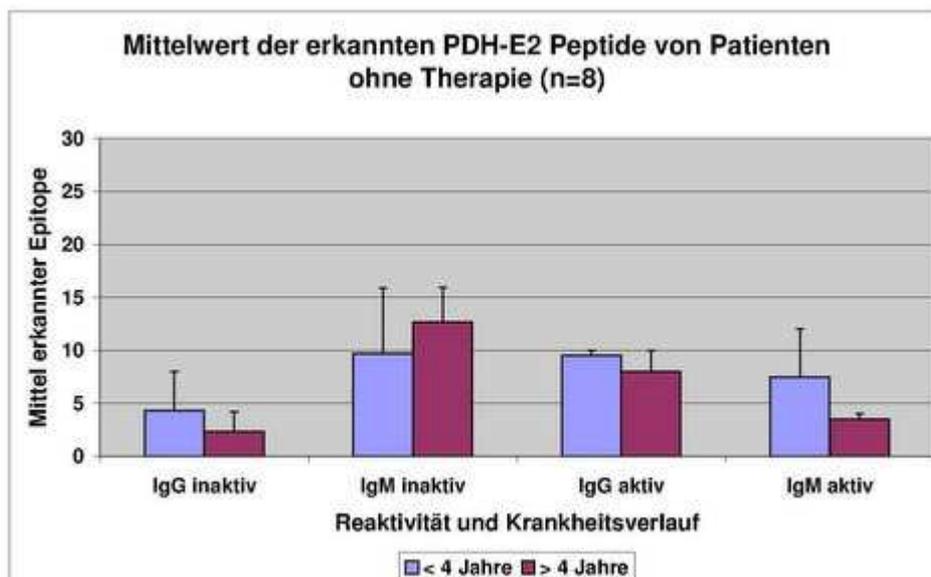


Abbildung 3.54: Darstellung der Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum von Patienten ohne Therapieeinfluss (n=6).

Zusammenfassend:

6 (75%) der 8 Patienten ohne Therapie zeigen einen inaktiven und 2 (25%) einen aktiven Krankheitsverlauf. In *Abbildung 3.51* scheinen die IgG-Reaktivität im Mittel nach 4 Jahren abzufallen und die IgM-Reaktivität anzusteigen. Innerhalb der 35 Peptide fallen bei der IgG-Reaktivität das F12- und das G4-Peptid auf, da beide eine Reaktivität über 500 [Ax1000] erreichen, die nach 4 Jahren um 100 [Ax1000] abfällt. Bei der IgM-Reaktivität werden mit Ausnahme des F2-Peptids keine erhöhten Mittelwerte erreicht. Bezüglich der erkannten Epitope pro Serum ist es bei einer Anzahl von 6 Patienten nicht möglich repräsentative Aussagen zu machen. Bei einem inaktiven Krankheitsverlauf werden hier von den IgG- weniger Epitope erkannt als von den IgM-Antikörpern (IgG: 4, IgM: 10), was ebenso zu den Beobachtungen von Mackay passt [10]. Die Reaktivitäten der Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf (n=2) verhalten sich genau umgekehrt und die Anzahl der erkannten Epitope scheint hier im Verlauf auch ohne Therapie abzunehmen.

3.5.3. Verhalten der AMA-Reaktivitäten therapierter Patienten vor und unter Therapie

In den *Abbildungen 3.55 bis 3.58* sind die Mittelwerte der Antikörper-Reaktivitäten und der erkannten Epitope aus Seren vor und unter Therapie für PBC-Patienten aller Therapieformen dargestellt.

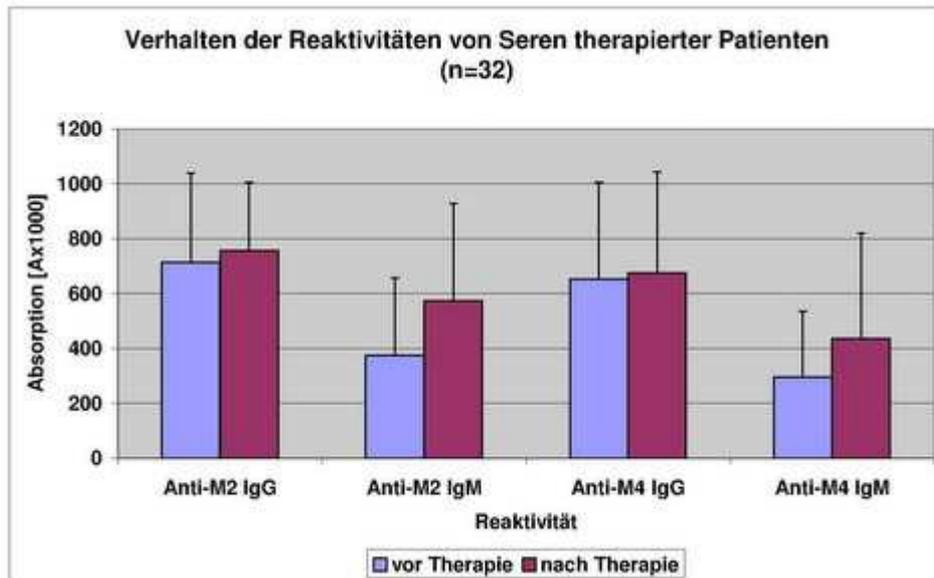


Abbildung 3.55: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten von Patienten verschiedener Therapieformen im Vergleich vor und unter Therapie (n=32) (signifikanter Unterschied $< 0,05$ zwischen den Reaktivitäten vor und unter Therapie für einen gepaarten Test nach Wilcoxon: IgG: Anti-M2, Anti-M4).

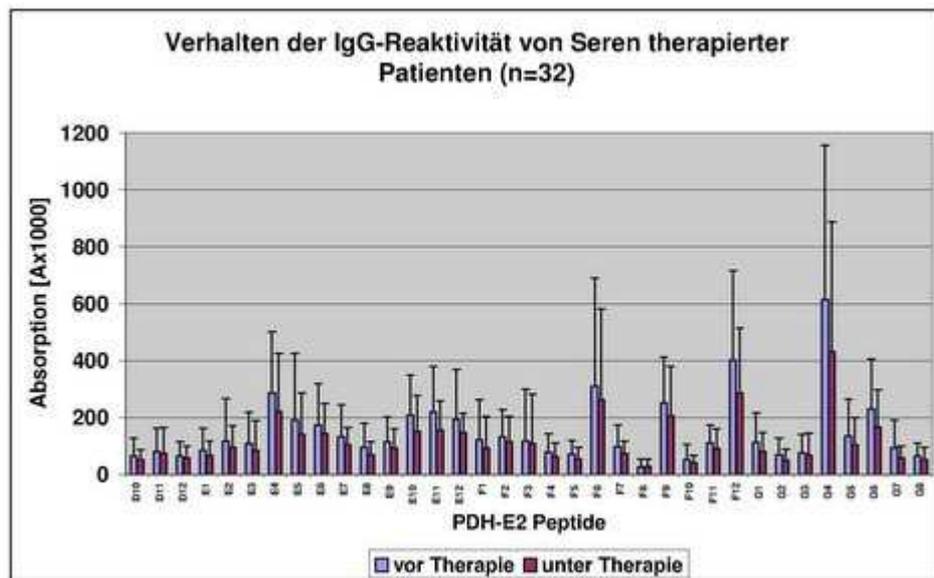


Abbildung 3.56: : Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgG-Reaktivitäten von Patienten verschiedener Therapieformen im Vergleich vor und unter Therapie

(n=32) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (signifikanter Unterschied < 0,05 zwischen den Reaktivitäten vor und unter Therapie nach Wilcoxon bei den Peptiden: E1, E4, **E6**, E10, E11, F1, F5, F7, F9, **F12**, G2, **G4**, G6).

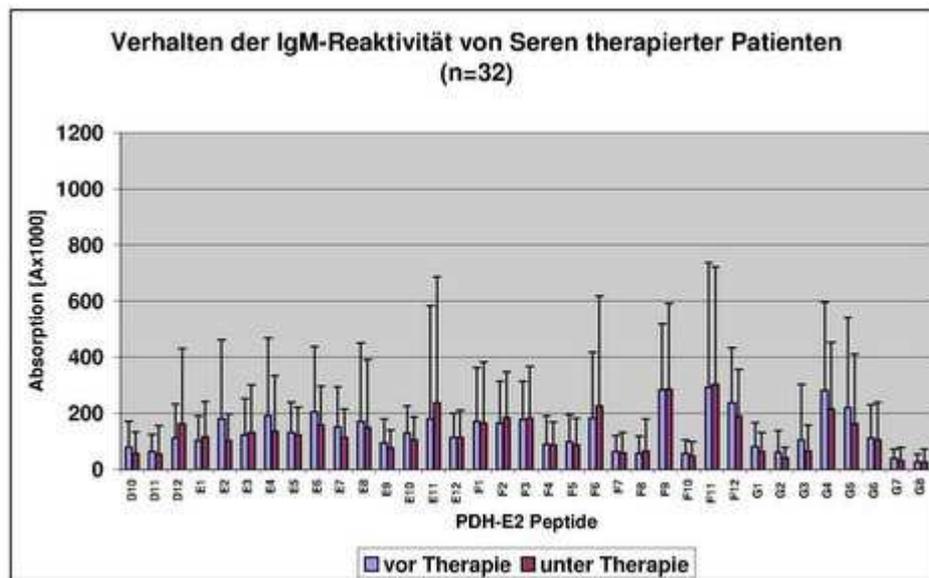


Abbildung 3.57: : Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivitäten von Patienten verschiedener Therapieformen im Vergleich vor und unter Therapie (n=32) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (signifikanter Unterschied < 0,05 zwischen den Reaktivitäten vor und unter Therapie für einen gepaarten Test nach Wilcoxon bei den Peptiden: D10, D11, E2, **E6**, E7, E9, E10, F5, F7, F10, **F12**, G1, **G4**, G5, G7, G8).

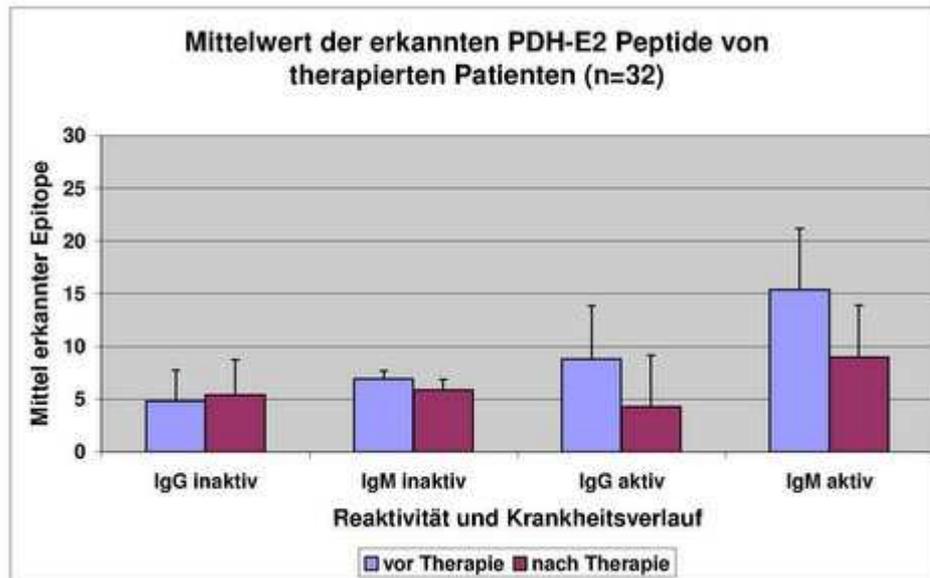


Abbildung 3.58: Darstellung der Mittelwerte der pro Serum erkannten Epitope von Patienten aus allen Therapieformen vor und unter Therapie (n=32).

Zusammenfassend:

In der *Abbildung 3.55* der AMA-Reaktivitäten ist unter Therapie ein Anstieg bei der IgG- und tendenziell auch bei der IgM-Reaktivität zu erkennen, was sich somit gegensätzlich zu der IgG-Reaktivität der untherapierten Patienten nach 4 Jahren Beobachtung verhält. Bei der IgG-Reaktivität gegen die 35 Peptide ist zu sehen, dass das G4-Peptid verstärkt von den PBC-Patienten erkannt wird und die Reaktivität unter Therapie deutlich absinkt (ca. 200 [Ax1000]). Hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Reaktivitätswerten vor und unter Therapie. Bei den IgM-Antikörpern wird der Absorptionswert 300 [Ax1000] von den therapierten Patienten nicht überschritten. In *Abbildung 3.58* macht es den Anschein, dass bei einem aktiven Verlauf im Mittel von beiden Antikörper-Subtypen mehr Epitope erkannt werden als bei einem inaktiven Krankheitsverlauf. Vor allem bei einem aktiven Krankheitsverlauf scheinen unter Therapie weniger Epitope erkannt zu werden. Bei einem inaktiven Krankheitsverlauf ändert sich unter Therapie an der Anzahl der erkannten Epitope jedoch wenig.

3.5.4. Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Ursodesoxycholsäure (URSO)

Die Ursodesoxycholsäure stellt den Goldstandard der PBC-Therapie dar. Ihre Auswirkungen auf die AMA sind in den *Abbildung 3.59* bis *3.62* dargestellt. Die Seren von 21 der 49 AMA-positiven mit URSO therapierten PBC-Patienten waren für die folgenden Auswertungen geeignet.

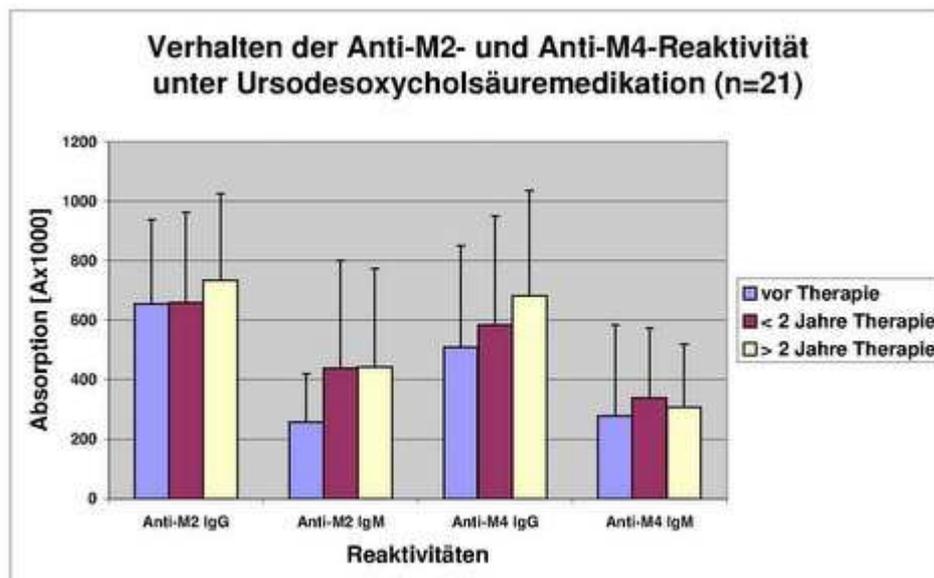


Abbildung 3.59: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten im Vergleich vor Therapiebeginn, bis 2 Jahre und nach 2 Jahren unter Ursodesoxycholsäure-Therapie (n=21).

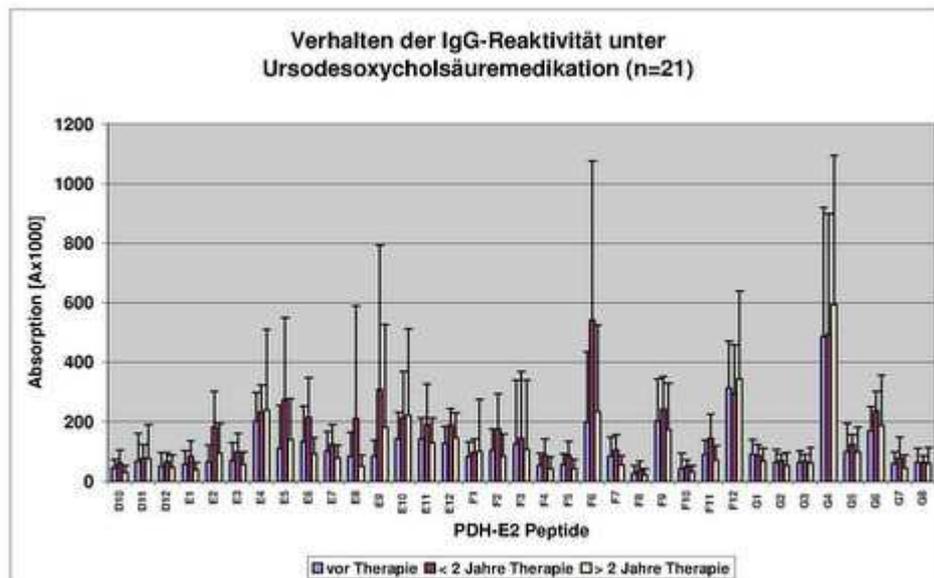


Abbildung 3.60: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgG-Reaktivität im Vergleich vor Therapiebeginn, bis 2 Jahre und nach 2 Jahren unter Ursodesoxycholsäure- Therapie (n=21) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied $< 0,05$ von den Reaktivitäten vor zu den Reaktivitäten < 2 Jahre unter URSO-Therapie wird bei den folgenden Peptiden erreicht: E1, F5. Bei den Reaktivitäten < 2 Jahre zu > 2 Jahre unter URSO-Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet werden).

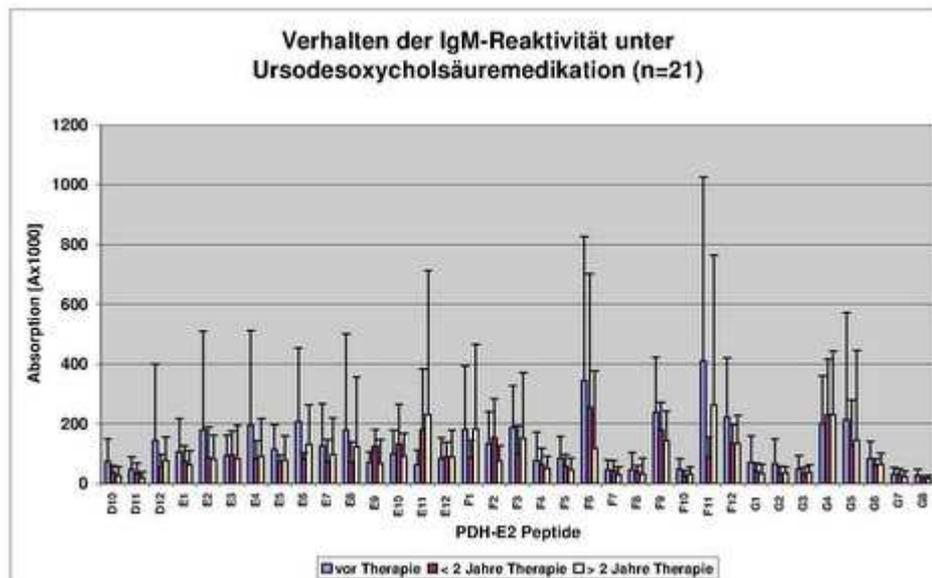


Abbildung 3.61: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivität im Vergleich vor Therapiebeginn, bis 2 Jahre und nach 2 Jahren unter Ursodesoxycholsäure-Therapie (n=21) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied $< 0,05$ von den Reaktivitäten vor zu den Reaktivitäten < 2 Jahre unter URSO-Therapie wird bei den folgenden Peptiden erreicht: D10, D11, E1, E4, E6, E7, E8, E9, F5, F8, F10, F12, G5, G7, G8. Bei den Reaktivitäten < 2 Jahre zu > 2 Jahre unter URSO-Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet werden).

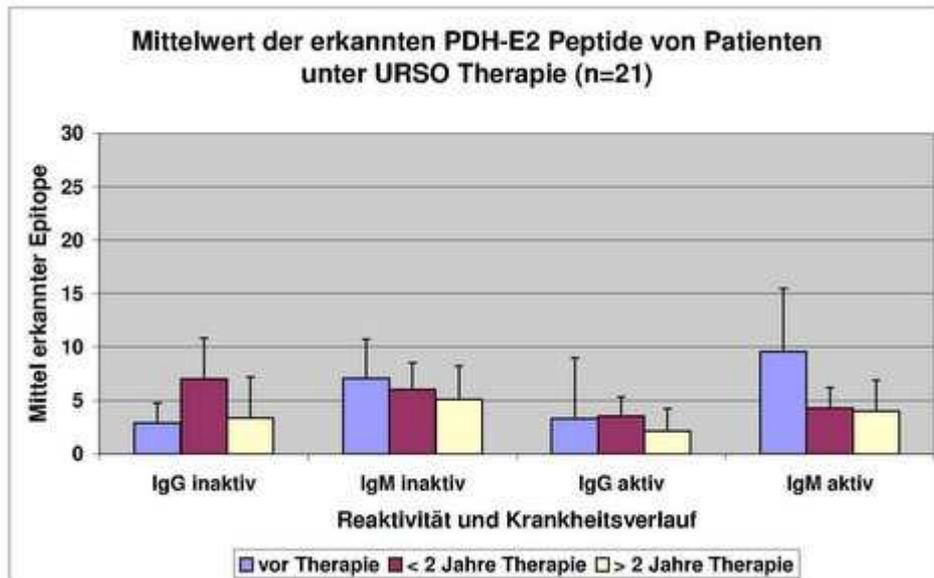


Abbildung 3.62: Darstellung der Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum von Patienten unter Ursodesoxycholsäure-Therapie (n=21).

Aufgrund des unter Ursodesoxycholsäure - Therapie erhöhten Reaktivitätsanstiegs gegen das E9-Peptid selektierten wir die Daten der gegen die lipoylierten und unlipoylierten Peptide getesteteten, mit Ursodesoxycholsäure behandelten PBC-Seren heraus und trennten sie nach Abnahmendatum vor Therapie, < 2 Jahre unter Therapie und > 2 Jahre unter Therapie. Auch hier zeigen unsere Ergebnisse im Mittel einen jedoch nicht signifikanten Anstieg der IgG-Reaktivität unter Ursodesoxycholsäure-Therapie (Abbildung 3.63).

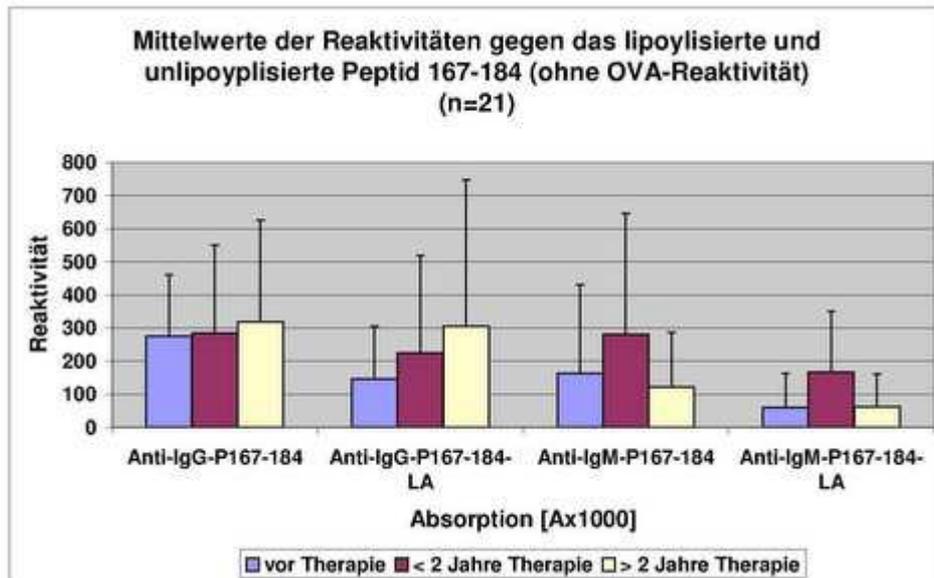


Abbildung 3.63: Verhalten der Reaktivität vor und unter Ursodesoxycholsäure gegen das lipoylierte und unlipoylierte Peptid 167-184 nach Subtraktion der Anti-OVA-Reaktivität (n=21) (nicht signifikant).

Zusammenfassend:

In der *Abbildung 3.59* der Anti-M2- und Anti-M4-Reaktivitäten ist zu erkennen, dass sowohl die Reaktivität der IgG- als auch der IgM-Antikörper unter Ursodesoxycholsäure gegen M2 und M4 im Laufe der Jahre ansteigen, abgesehen von der Anti-M4 IgM-Reaktivität, die sich verhältnismäßig wenig zu ändern scheint. In *Abbildung 3.60* fallen bei der IgG-Reaktivität neben dem G4-Peptid noch zwei weitere Peptide ins Auge. Einmal das F6-Peptid, welches ein Epitop der „Hinge Region“ darstellt und das E9-Peptid, welches dem von Gershwin et al. publizierten Lipoyl-bindenden Peptid entspricht. Diese erhöhten Reaktivitätsanstiege gegen E9 und F6 sind nicht signifikant und bei genauerer Analyse ist auszumachen, dass die Werte beide Male von einem einzigen Extremwert eines Patienten verursacht werden. Bei den restlichen Patienten treten keine erhöhten Werte auf. Ebenso lässt sich bei den IgM-Antikörperreaktionen in *Abbildung 3.61* eine erhöhte, nicht-signifikante IgM-Reaktivität gegen das F9-Peptid beobachten, welche von Extremwerten von

drei der 21 Patienten bestimmt wird, die jedoch ebenso Extremwerte gegen das F11 Peptid (Katalytisch aktive Region) aufweisen. Bei den mit URSO therapierten PBC-Patienten ist zu sehen, dass die Anzahl der erkannten Epitope der PHD-E2 bei der IgG-Reaktivität innerhalb der ersten beiden Jahren bei beiden Krankheitsverläufen leicht zunimmt und in den folgenden Jahren unter URSO-Therapie sowohl bei der IgG- als auch bei der IgM-Reaktivität wieder abnimmt.

3.5.5. Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Methotrexat (MTX)

Ein früher in Studien zur Therapie der PBC eingesetztes Medikament ist das Methotrexat, dessen Auswirkungen auf die AMA-Reaktivitäten in den *Abbildungen 3.64 bis 3.67* dargestellt sind. Die Seren von 2 der 7 Patienten, die im Rahmen einer Studie das Medikament Methotrexat erhielten, waren nicht geeignet für die Auswertungen.

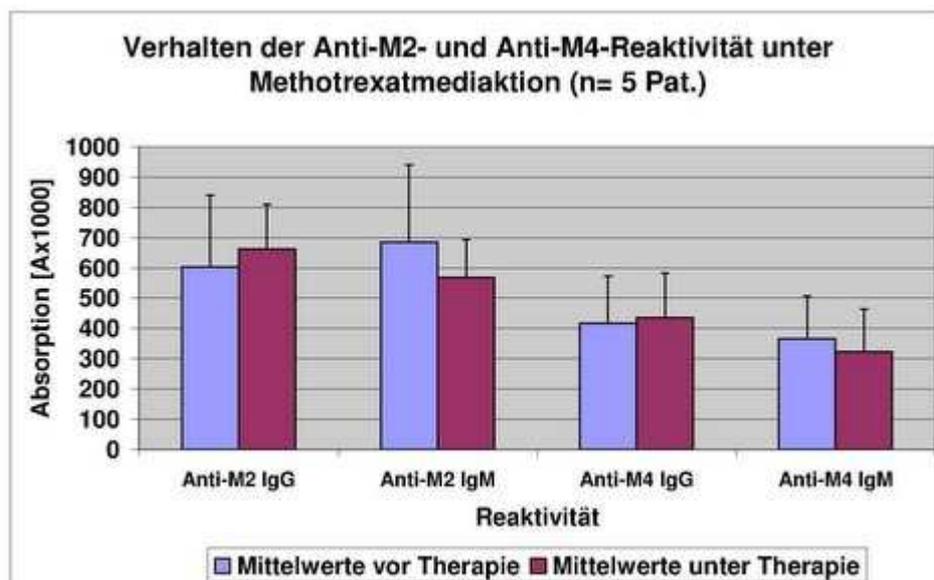


Abbildung 3.64: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten im Vergleich vor Therapie und unter MTX-Therapie (n=5).

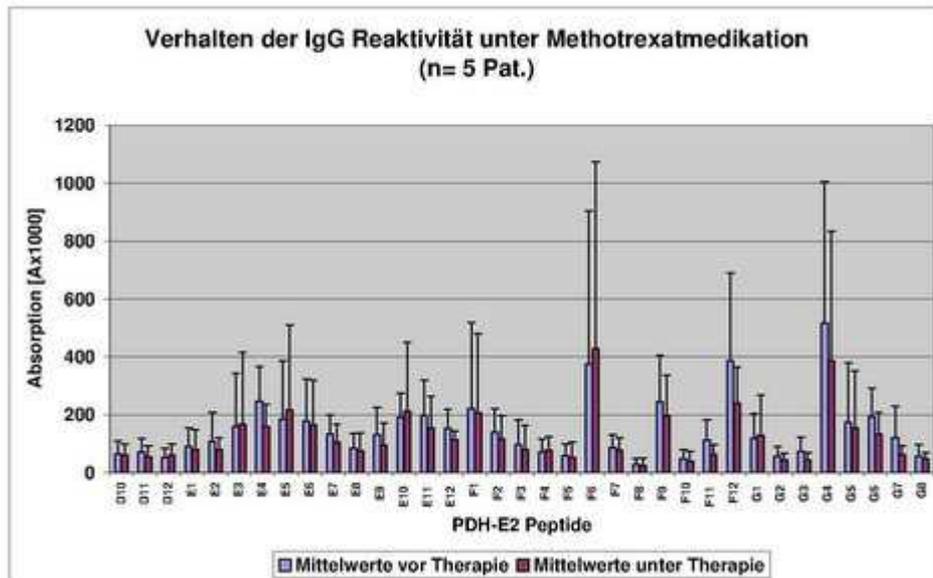


Abbildung 3.65: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgG-Reaktivitäten im Vergleich vor Therapie und unter MTX-Therapie (n=5) in einer Skala bis 1200 [Ax1000].

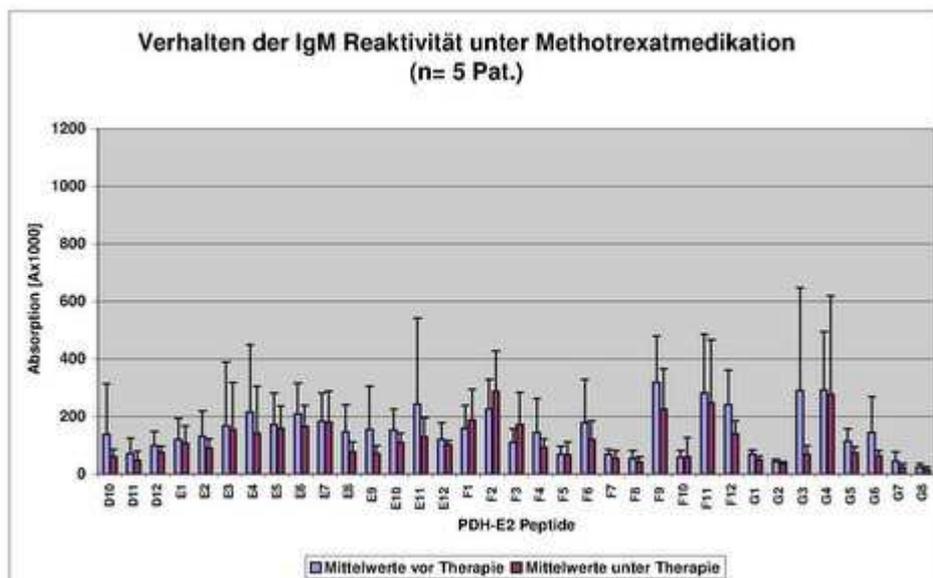


Abbildung 3.66: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivitäten im Vergleich vor Therapie und unter MTX-Therapie (n=5) in einer Skala bis 1200 [Ax1000].

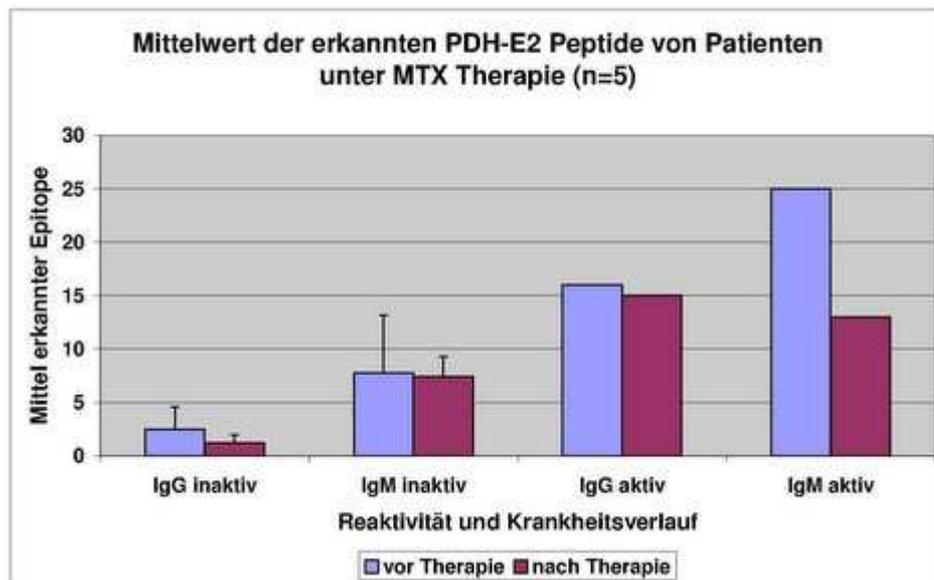


Abbildung 3.67: Darstellung der Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum von Patienten unter Methotrexat-Therapie (n=5) (bei dem aktiven Verlauf nur ein Patient).

(Signifikanz siehe 3.5.6.)

Zusammenfassend:

Die Antikörper-Reaktivitäten der unter MTX stehenden Patienten zeigen ein entgegen gesetztes Verhalten zu den Reaktivitäten der untherapierten Patienten. Die *Abbildung 3.64* zeigt unter MTX-Therapie tendenziell steigende IgG- bei (leicht) fallenden IgM-Reaktivitäten. Bei den IgG-Antikörpern sind erhöhte Absorptionswerte bis 500 [Ax1000] gegen das G4 Peptid zuerkennen, die unter Therapie geringfügig absinken. Ebenso wird gegen das F6-Peptid ein leicht erhöhter Mittelwert bis 400 [Ax1000] mit einer Standardabweichung zu Extremwerte bis > 1000 [Ax1000] erreicht. Auch hier werden bei der IgM-Reaktivität keine erhöhten Mittelwerte erreicht. Maximaler Mittelwert wird gegen das F9-Peptid mit knapp 300 [Ax1000] erreicht, gefolgt von G4. Unter MTX-Therapie zeigen sich im Vergleich von vor und unter Therapie kaum Veränderungen bezüglich der Epitoperkennung. Außer bei der IgM-Reaktivität des aktiven Krankheitsverlaufs, bei der unter Therapie deutlich weniger Epitope

erkannt werden, was jedoch bei einem einzelnen Patienten nicht aussagekräftig ist.

3.5.6. Verhalten der AMA-Reaktivitäten unter Therapie mit Azathioprin (AZA)

Azathioprin wurde früher ebenfalls zur Therapie der PBC eingesetzt. Die *Abbildungen 3.68 bis 3.71* zeigen den Einfluss von Azathioprin auf die AMA-Reaktivitäten. Bei den mit AZA therapierten Patienten waren die Seren von 3 Patienten für die Berechnungen der Reaktivitäten im Vergleich von vor und unter Therapie geeignet. Bei der Berechnung der Signifikanz wurden die Patienten, die mit Azathioprin und Methotrexat therapiert wurden zu einer Gruppe der „Immunsuppressiva“ (IS) zusammengefasst.

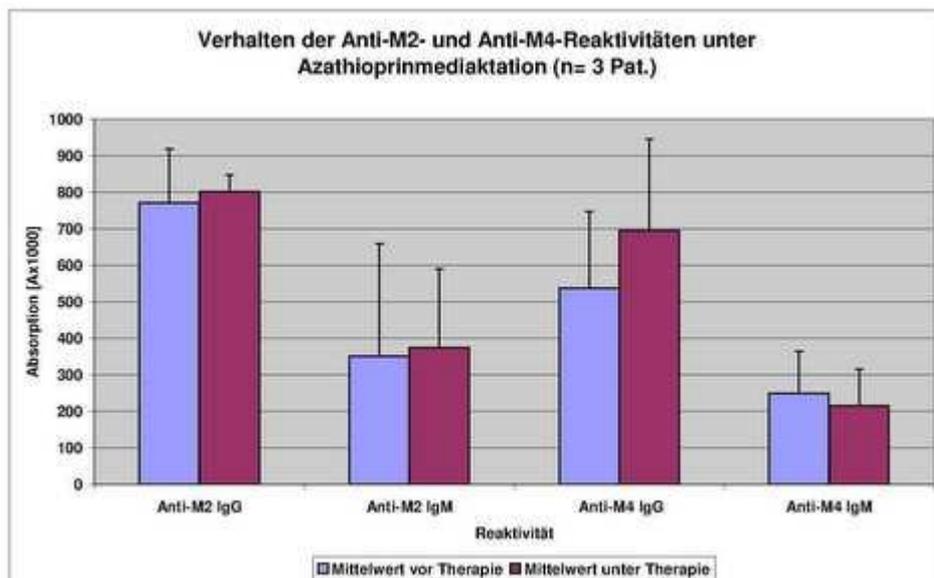


Abbildung 3.68: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten im Vergleich vor und unter AZA-Therapie (n=3).

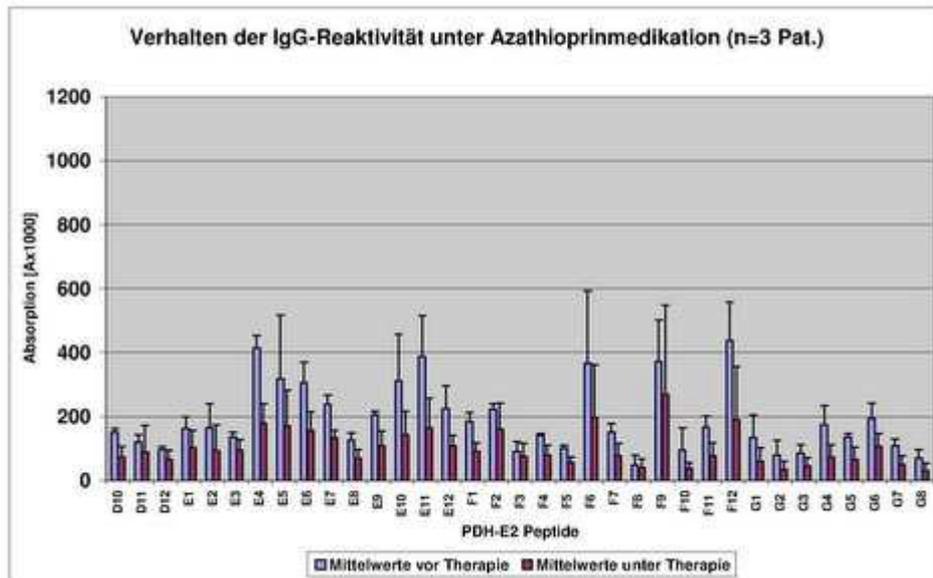


Abbildung 3.69: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgG-Reaktivitäten im Vergleich vor und unter AZA-Therapie (n=3) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied $< 0,05$ von vor und unter IS-Therapie konnte bei den folgenden Peptiden nachgewiesen werden: E4, E7, E9, E11, E12, F11, F12, G4, G6, G7).

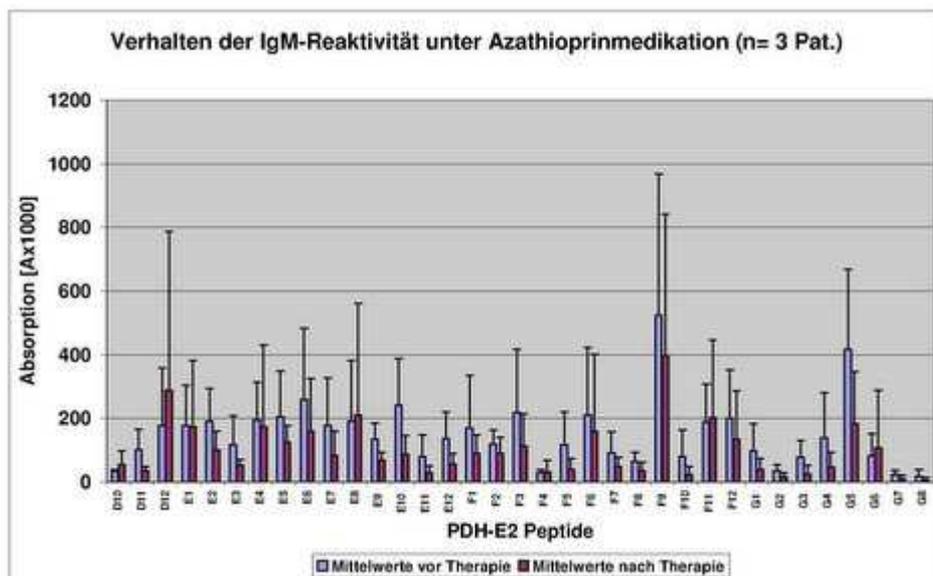


Abbildung 3.70: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivitäten im Vergleich vor und unter AZA-Therapie (n=3) in einer Skala bis 1200 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied $< 0,05$ von vor und unter IS-Therapie konnte bei den folgenden Peptiden nachgewiesen werden: D12, E8, E10, F11, G5, G8).

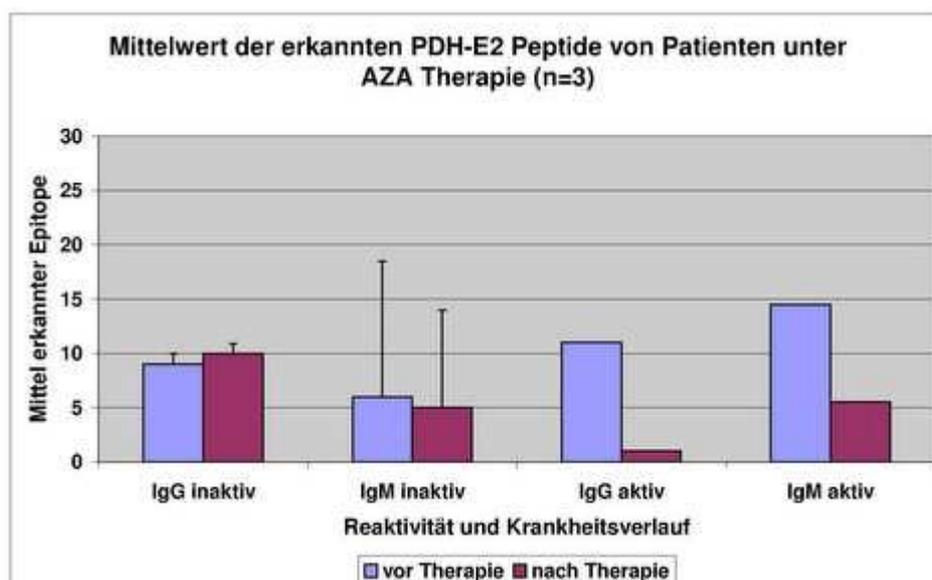


Abbildung 3.71: Darstellung der Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum von Patienten unter Azathioprin-Therapie (n=3) (bei dem aktiven Verlauf nur ein Patient).

Zusammenfassend:

Generell lässt sich bei den beiden Immunsuppressiva Azathioprin und Methotrexat mit ansteigenden IgG- und fallenden oder gleich bleibenden IgM-Reaktivitäten, ein ähnliches Verhalten beobachten. Es fällt auf, dass unter Azathioprinmedikation die IgG-Reaktivität gegen M2 und M4 tendenziell anzusteigen scheint, die IgG-Reaktivitäten der PDH-Peptide bei jedem einzelnen Peptid jedoch deutlich abnehmen. Die IgM-Reaktivität scheint unter Azathiopringabe nur gegen D12 anzusteigen. Auch hier zeigen sich wieder die höchsten Absorptionswerte bei G4 und F9, die unter Therapie abnehmen. Die Aussagekraft der *Abbildung 3.71* ist bei drei unter AZA stehenden Patienten

und nur einem Patienten für die Darstellung des aktiven Krankheitsverlaufes sehr gering. Jedoch werden unter AZA- und vor allem unter MTX-Therapie bei einem aktiven Krankheitsverlauf von der IgM-Reaktivität weniger Epitope erkannt. Bei dem inaktiven Krankheitsverlauf zeigen sich kaum Veränderungen der Reaktivitäten bis auf einen tendenziellen Anstieg der IgG-Reaktivität unter Therapie.

3.5.7. Verhalten der AMA-Reaktivitäten nach orthotoper Lebertransplantation (OLT)

Wenn durch eine medikamentöse Therapie bei einem aktiven Krankheitsverlauf keine positiven Effekte mehr zu erzielen sind, wird als therapeutische Option die orthotopie Lebertransplantation eingesetzt. In den *Abbildungen 3.72 bis 3.77* sind die AMA-Veränderungen nach OLT dargestellt. Bei der OLT waren die Seren von 8 der 10 PBC-Patienten für die auf die Therapie bezogenen Auswertungen geeignet.

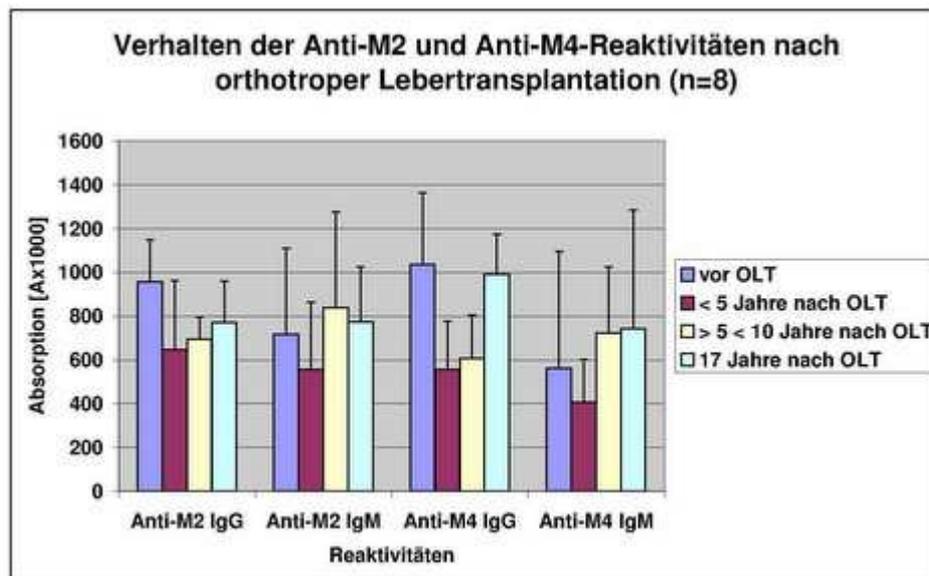


Abbildung 3.72: Mittelwerte der AMA-Reaktivitäten im Vergleich vor und nach Lebertransplantation (n=8) in einer Skala bis 1600 [Ax1000].

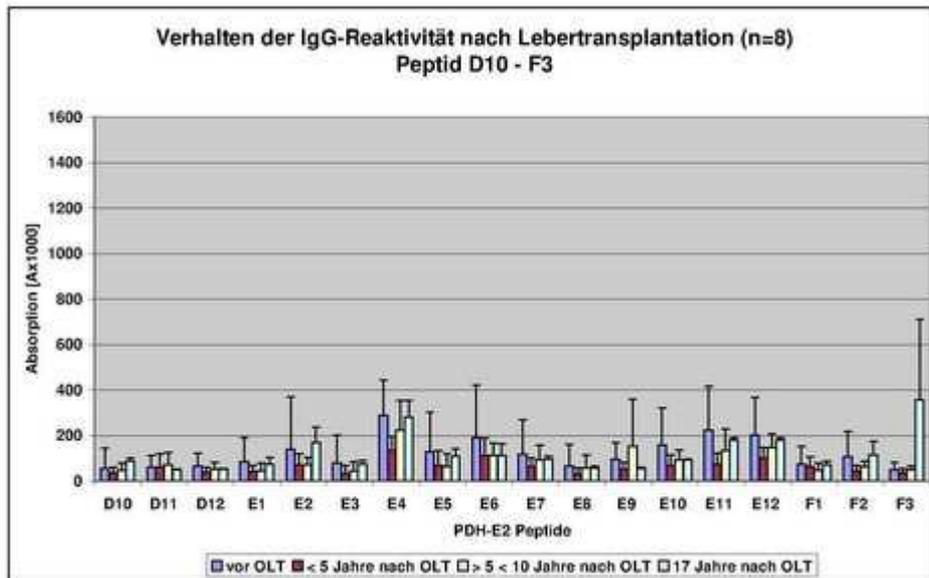


Abbildung 3.73: Mittelwerte der Anti-PDH-E2 IgG-Reaktivitäten gegen die Peptide D10 bis F3 im Vergleich vor und nach Lebertransplantation (n=8) in einer Skala bis 1600 [Ax1000].

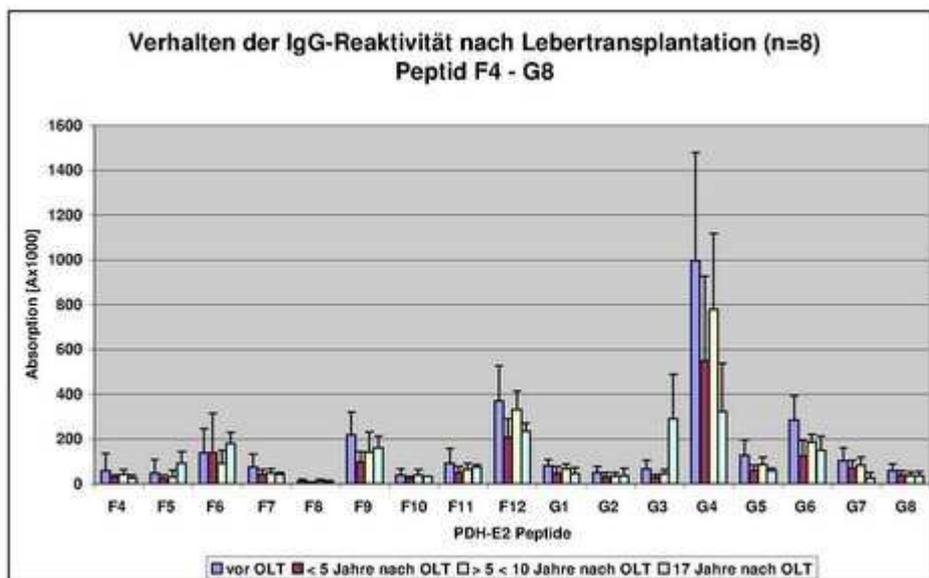


Abbildung 3.74: Mittelwerte der Anti-PDH-E2 IgG-Reaktivitäten gegen die Peptide F4 bis G8 im Vergleich vor und nach Lebertransplantation (n=8) in einer Skala bis 1600 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied < 0,05 zwischen den

Reaktivitäten a) vor und < 5 Jahre nach OLT: E3, E5, E8, E9, E10, E11, F1, F5, F8, F10, F11, G3, G5. b) < 5 Jahre und > 5 Jahre nach OLT: E1, E3, E5, E11, F1, F5, F8, F11, F12, G2, G3, G5 nachgewiesen werden).

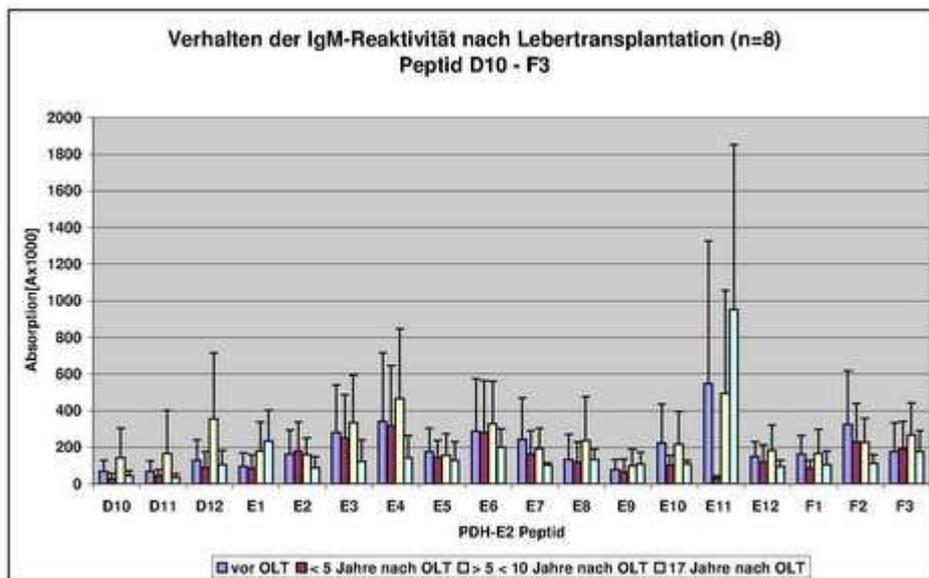


Abbildung 3.75: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivitäten gegen die Peptide D10 bis F3 im Vergleich vor und nach Lebertransplantation (n=8) in einer Skala bis 2000 [Ax1000].

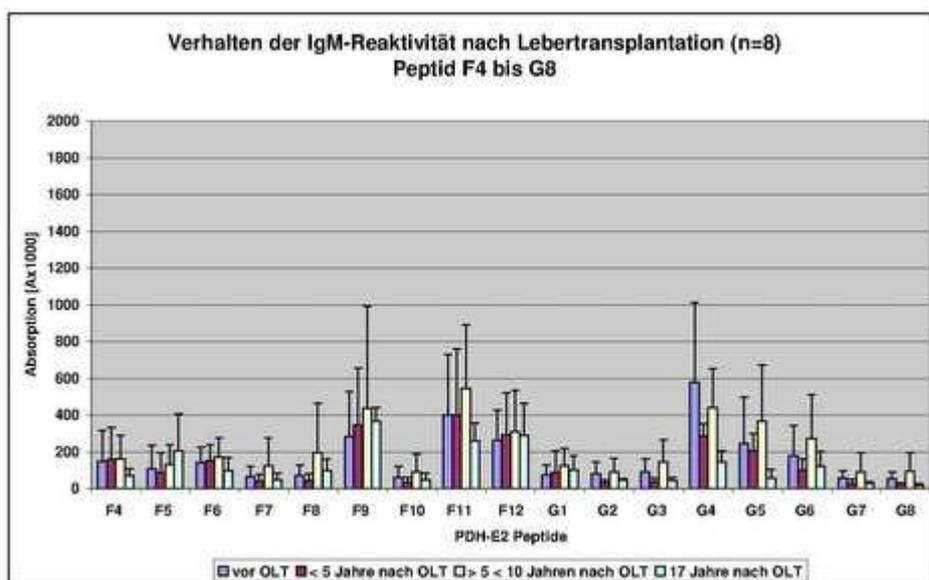


Abbildung 3.76: Mittelwerte der Anti-PDH-E2-Peptid IgM-Reaktivitäten gegen die Peptide F4 bis G8 im Vergleich vor und nach Lebertransplantation (n=8) in einer Skala bis 2000 [Ax1000] (ein signifikanter Unterschied < 0,05 konnte zwischen den Reaktivitäten a) vor und < 5 Jahre nach OLT: F5, F6, F7, F8, F9, F10, G3, G6, G7. b) < 5 Jahre und > 5 Jahre nach OLT: F3, F5, F6, F9, F12, G3, G6 nachgewiesen werden).

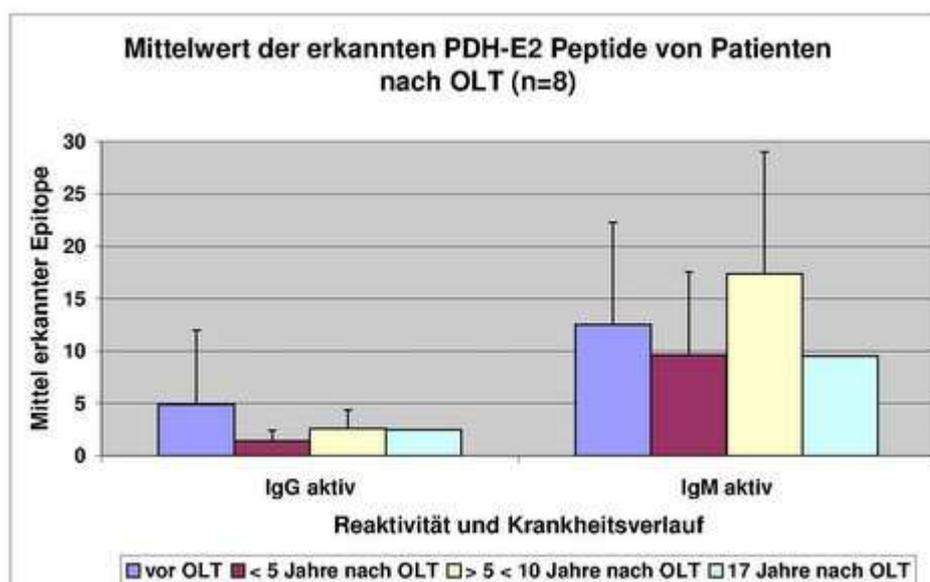


Abbildung 3.77: Darstellung der Mittelwerte der erkannten Epitope pro Serum von Patienten nach orthotoper Lebertransplantation (n=8) (bei 17 Jahren nach Therapie nur ein Patient).

Zusammenfassend:

Bei der OLT ist zu sehen, dass die Antikörper-Reaktivitäten zunächst abfallen und 5 Jahre nach OLT wieder ansteigen, bei der Anti-M4-Reaktivität sogar über das Anfangsniveau. Bei den IgG-Antikörpern sticht vor Therapie deutlich das G4 Peptid mit einem extrem hohen Mittelwerte von > 1000 [Ax1000] und einer Standardabweichung von bis zu 1500 [Ax1000] heraus. Es zeigt sich in den ersten 5 Jahren nach OLT ein Rückgang der IgG-Reaktivität, die in den darauf folgenden Jahren wieder auf einen deutlich erhöhten Mittelwert von bis zu 800

[Ax1000] ansteigt (beide Unterschiede nicht signifikant). Bei der IgM-Reaktivität werden vor Therapie Maximalwerte von > 500 [Ax1000] von den Peptiden E11 und G4 erreicht. Interessanterweise zeigt sich hier bei der IgM-Reaktivität der PBC-Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten haben und somit einen aktiven Krankheitsverlauf aufweisen, vor Therapie (vor OLT) ein erhöhter Mittelwert bei E11 von > 500 [Ax1000] mit einer Standardabweichung von bis zu 1300 [Ax1000]. Nach OLT kommt es auch hier zu einem deutlichen Abfall < 100 [Ax1000] des Mittelwertes der IgM-Reaktivität, gefolgt von einem erneuten starken Anstieg auf einen Wert von > 500 [Ax1000] und anschließend sogar > 800 [Ax1000]. Für diese Extremwerte bei E11 besteht keine Signifikanz und ist bei einer hier geringen Anzahl von 2 Patienten Ausreißer-bedingt. In *Abbildung 3.77* ist abzulesen, dass die Anzahl der erkannten Epitope bei beiden Antikörper-Subtypen erstmals abnimmt und im Verlauf der Zeit ebenfalls wieder ansteigt. Vor allem bei der IgM-Reaktivität werden vor Therapie im Mittel schon 12 Epitope der PDH-E2 erkannt, was sich im Verlauf der Zeit bis auf ein Mittel von ca. 17 Epitopen steigert. Anhand der Standardabweichung ist zu erkennen, dass von einigen Serumproben beinahe alle Epitope der PDH-E2 erkannt werde.

Zusammenfassung von Kapitel 3.5:

Bei Seren von untherapierten PBC-Patienten scheint die Reaktivität der IgM-Antikörper im Laufe der Zeit anzusteigen und die IgG-Reaktivität abzufallen. Bei dem Patientenkollektiv der verschiedenen Therapieformen steigen neben der IgM- auch die IgG-Reaktivitäten einen geringen, jedoch signifikanten Anstieg. Unter den verschiedenen Therapieformen verhalten sich interessanterweise die Reaktivitäten der mit Immunsuppressiva therapierten Patienten mit ansteigenden IgG- und abfallenden IgM-Antikörpern entgegengesetzt zu den Reaktivitäten von Patienten ohne Therapieeinfluss. Die mit URSO therapierten Patienten zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Reaktivitäten. Bei den Lebertransplantierten Patienten bestätigt sich das bereits bekannte Phänomen eines postoperativen Abfalls der Antikörper-Reaktivitäten, die jedoch nach

wenigen Jahren wieder ansteigen. Die Anzahl der erkannten Epitope scheint im Laufe der Erkrankung abzunehmen – mit Ausnahme der IgM-Antikörper von Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf. Unter Therapie ist dies ebenso bei den IgM-Antikörpern von Patienten mit einem inaktiven Verlauf zu beobachten. Interessanterweise werden von den IgM-Antikörpern der Lebertransplantierten Patienten - die alle einen aktiven Krankheitsverlauf aufweisen - bereits vor Therapie bis zu 12 von 35 Epitopen erkannt. Diese Anzahl steigt nach Lebertransplantation im Mittel bis auf 17 Epitope an.

4. Diskussion

4.1. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, aus den ermittelten Daten der PBC-Seren weitere Erkenntnisse zu gewinnen, die für ein besseres Verständnis der PBC beitragen können. Dabei lagen die Schwerpunkte auf den folgenden Fragestellungen:

- Enthält die PDH-E2-Untereinheit außerhalb der inneren Lipoyl-Domäne noch weitere immundominante Epitope?
- Können die ermittelten Daten weitere Hinweise zur Identifikation des M4-Antigens liefern?
- Besteht bei einem aktiven oder inaktiven Krankheitsverlauf der PBC eine verstärkte Reaktivität mit einem der Epitope der PDH-E2 Untereinheit?
- Ist bei der PBC durch das Verabreichen von Medikamenten oder durch eine Lebertransplantation eine Auswirkung auf die AMA-Reaktivität erkennbar?

4.2. Erläuterung zu der PDH-E2-Untereinheit und ihren 35 Peptiden

Funktionsweise und Aufbau der α -Ketoglutarat-Dehydrogenasen

Im Intermediär-Stoffwechsel katalysieren Multienzymkomplexe die oxidative oder dehydrierende Decarboxylierung von 2-Oxosäuren und die Übertragung des gebildeten Acetyl-Restes auf Coenzym A, die Vorreaktion des Citratzyklus. Zu diesen α -Ketoglutarat-Dehydrogenasen gehören drei Multienzymkomplexe, die wiederum aus je drei Untereinheiten, E1 bis E3, bestehen [13]. E1 und E2 liegen je nach umzusetzendem Substrat, in unterschiedlichen Isoformen vor.

In der unten stehenden *Tabelle 4.1* werden die drei α -Ketoglutarat-Dehydrogenasen mit ihren drei Untereinheiten aufgeführt.

Tabelle 4.1: Darstellung der drei α -Ketoglutarat-Dehydrogenasen mit ihren drei Untereinheiten (PDH-E2 „fett gedruckt“).

	Pyruvat-DH-Komplex (PDH)	Oxosäure-DH-Komplex (ODH)	Verzweigtketten-DH-Komplex
E1	Pyruvat-Dehydrogenase (1.2.4.1)	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (1.2.4.2)	Verzweigtkettige- α -Ketosäuren-Dehydrogenase (1.2.4.4)
E2	Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase (2.3.1.12)	Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (2.3.1.61)	Dihydrolipoyl-Verzweigtkettigen-Transacylase (2.3.1.168)
E3	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (1.8.1.4)	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (1.8.1.4)	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (1.8.1.4)

Wie oben bereits erwähnt, ist das von 90% der PBC-Seren erkannte Haupttarget der Anti-M2 Antikörper die E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, die Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase (PDH-E2). Die PDH-Reaktion findet in der inneren Mitochondrienmatrix statt.

Die E1-Untereinheit des PDH-Komplexes katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat und die Übertragung des gebildeten Hydroxyäthyl-Restes auf Thiamindiphosphat (TPP). Von diesem Enzym wird dann die Oxidation der TPP-gebundenen Hydroxyäthyl-Gruppe zum Acetyl-Rest katalysiert. Dieser Rest und die gewonnenen Reduktionsäquivalente werden auf Liponamid übertragen.

Die Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase (E2), die das Haupttarget der Anti-M2 Antikörper darstellt, überträgt den Acetyl-Rest von Liponamid auf Coenzym A, wobei reduziertes Dihydrolipoamid zurückbleibt.

Das dritte Enzym, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, reoxidiert Dihydrolipoamid unter Bildung von NADH^+H^+ . Die Elektronen werden zunächst von enzymgebundenem FAD übernommen und dann über eine katalytisch wirksame Disulfid-Brücke der E3-Untereinheit auf gelöstes NAD^+ übertragen.

Die 5 beteiligten Coenzyme sind mit den Enzym-Komponenten in unterschiedlicher Weise assoziiert. Thiamindiphosphat ist nicht kovalent an E1 gebunden, Liponamid ist kovalent mit einem Lysin-Rest von E2 verknüpft, und FAD ist als prosthetische Gruppe an E3 gebunden. NAD^+ und Coenzym A sind als lösliche Coenzyme nur vorübergehend mit dem Komplex assoziiert.

Wichtig für die PDH-Katalyse ist die räumliche Beziehung zwischen den Bestandteilen des Komplexes. Das kovalent gebundene Liponamid-Coenzym ist Teil einer mobilen Domäne von E2 und deshalb sehr beweglich. Dieser sog. Liponamid-Arm schwingt während für die Katalyse zwischen E1 und E3 hin und her. Auf diese Weise kann Liponamid sowohl mit dem an E1 gebundenen TPP als auch mit gelöstem Coenzym A und dem als Elektronen-Akzeptor dienenden FAD in E3 in Wechselwirkung treten [13].

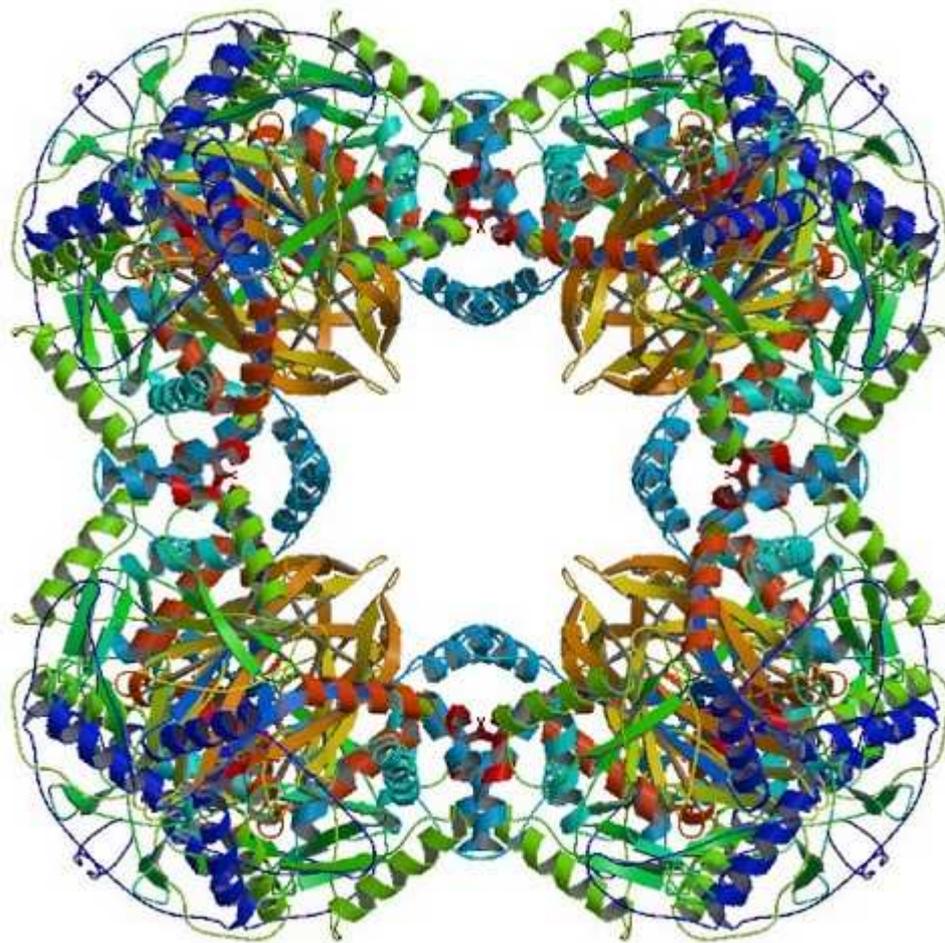


Abbildung 4.2: Darstellung der würfelförmigen, katalytischen Kernstruktur der aus 24 Dihydrolipoamid-S- Acetyltransferase-Untereinheiten bestehenden PHD-E2 [157].

(Die würfelförmige Kernstruktur besteht aus 24 Untereinheiten. Die aktiven Zentren befinden sich an den Grenzflächen der Untereinheiten, welche mit in einer Trimer-Struktur angeordnet sind. Acht dieser Trimere bilden einen innen hohlen, kegelstumpffartigen Würfel. Die beiden Substrate, CoA und Liponamid, befinden sich zwei sich gegenüberliegenden Öffnungen eines 30Å langen Tunnels, welcher zwischen den Untereinheiten lokalisiert ist und eines der katalytischen Zentren der PDH-E2 darstellt. Genaue Funktionsweise mit Videodarstellung : www.chemgapedia.de)

4.3. Bisheriger Kenntnisstand der Literatur und Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Suche nach weiteren immundominanten Epitopen außerhalb der inneren Lipoyl-Domäne

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Haupttarget der Anti-M2 Antikörper-Reaktivität bei PBC-Patienten. Es gilt als gesichert, dass das Ziel der Anti-M2 Antikörper die E2-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (PDH-E2) darstellt. Es wurde bereits in mehreren Studien versucht, das immundominante Epitop der PDH-E2 Untereinheit zu identifizieren [11, 136, 158-159]. Bislang galt die innere Lipoyl-Domäne der PDH-E2 und davon speziell die Aminosäuresequenz AS 167-184, die das Lipoyl-Lysin K173 enthält, als das bedeutendste immundominante Epitop. Dieses Lysin K173 bindet den für das Enzym notwendigen Kofaktor Liponamid. Ebenso wurden die gut verdeckten Aminosäuren, die das Lipoyl-Lysin K173 umgeben, mit der AMA-Reaktivität von PBC-Seren in Verbindung gebracht. Da das PDH-Enzym in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und somit noch von zwei weiteren Membranen umgeben wird, und zusätzlich das Liponamid-Lysin K173 nicht an der Oberfläche des Moleküls exponiert zu sein scheint [160], ist eine Induktion von Autoantikörpern ohne weitere pathologische Mechanismen schwer vorstellbar. Ein Mechanismus, der zu einer Induktion von Autoimmunantikörpern beitragen könnte, wäre eine von Berg et al. publizierte Störung der Apoptose. Durch eine „fehlerhafte Entsorgung von Zellresten“ wäre es denkbar, dass sowohl intrazellulär als auch intramitochondrial gelegene Peptide von dem Immunsystem aufgenommen, präsentiert und als „fremd“ fehlgedeutet werden [123].

Einige Studien postulieren, dass mindestens 75 Lysin-Reste notwendig seien, um eine charakteristische Wiedererkennung der Antikörper auszulösen [11, 161-162], was darauf schließen lässt, dass primär die Tertiärstruktur zur Erkennung des Autoantigen eine Rolle spielt [162]. Wieder andere postulieren, dass kleine lineare Peptide (wie Aminosäuren (AS) 167-184) innerhalb der PDH-E2 im ELISA die höchste Reaktivität auslösen, wenn auch nur bei einer

Serumverdünnung von 1 : 80 000 [11]. Andererseits wurde veröffentlicht, dass eine Lipoylisierung der Peptide, wie zum Beispiel die Bindung des Kofaktors Liponamid von K173 für die Antikörperreaktion notwendig ist [153, 159]. Diese Erkenntnisse werden jedoch kontrovers diskutiert [10, 158, 163].

Ein weiteres Epitop der PDH-E2, das mit der äußeren Lipoyl-Domäne assoziiert wurde [11, 159, 162], wird auf eine schwache Kreuzreaktion zurückgeführt [162]. Andere Autoren berichteten, dass Seren von Nicht-PBC-Patienten ebenso Epitope innerhalb der E1/E3 Schnittstelle und des katalytischen Zentrums erkennen [164]. Bei der Testung des katalytischen Zentrums der PDH-E2 (AS 331-560) wurden bisher hauptsächlich große Fragmente verwendet [11, 153, 162, 165], die nach ausbleibender Reaktion für „immunologisch unbedeutend“ erklärt wurden [160, 162].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Seren von 91 Patienten mit klinisch, serologisch und histologisch gesicherter PBC im ELISA auf ihre Reaktivität mit 35 synthetisch hergestellten Peptiden getestet, die die vollständige Länge der PDH-E2 Einheit abdecken. Jedes dieser Peptide bestand aus 25 Aminosäuren und überlappte in beide Richtungen jeweils mit den nächsten 8 Aminosäuren der Nachbarpeptide.

Da die Peptide E9 (152-176) und E10 (169-193), die beide das Lipoyl-bindende Lysin K173 enthalten, in den durchgeführten Testungen kaum eine AMA-Reaktivität zeigten, synthetisierten wir das in den vorhergehenden Arbeiten publizierte Peptid 167-184, einmal in einer Liponamid-gebundenen und einmal in einer Liponamid-freien Variante (Peptid+LA und Peptid). Bei der Testung der AMA-positiven PBC-Seren gegen diese nicht an Ovalbumin (OVA) gekoppelten Peptide reagierte keines mit dem unlipoylierten und 3% mit dem lipoylierten Peptid. Bei der IgM-Reaktivität reagierten entsprechend 5% bzw. 10%.

Mit dem Gedanken, dass für die Proteinerkennung der Antikörper die Tertiärstruktur eine wichtige Rolle spielt, wurden beiden Peptide an OVA gekoppelt (Peptid+OVA & Peptid+LA+OVA). Beide Peptidvarianten wurden im ELISA erneut mit den PBC-Seren getestet. Doch auch hier zeigte sich nur eine schwache Reaktivität gegen die synthetisierten Peptide. Wie schon in anderen

Studien gezeigt [153], steigerte das Koppeln an OVA die Reaktivität, jedoch zeigten die meisten Seren bereits allein auf das Ovalbumin eine gesteigerte Reaktivität, womit sich dieses Protein zum Detektieren konformationsspezifischer Antikörper als ungeeignet herausstellt. Das Vorkommen von Anti-OVA-Antikörpern ist ein weit verbreitetes Phänomen in der Allgemeinbevölkerung [166]. Nach Subtraktion der IgG-Reaktivität gegen OVA von der IgG-Reaktivität gegen die an OVA gekoppelten Peptide zeigten noch 44% der Seren eine IgG-Reaktivität gegen die unlipoylierte Form (Peptid+OVA) und 22% gegen die lipoylierte (Peptid+L+OVA). Bei der IgM-Reaktivität reagierten 57% bzw. 31%.

Diese Ergebnisse sprechen weder für die Notwendigkeit der Lipoylisierung eines Peptids, noch können sie das bisher als immundominant angesehene Peptid 167-184 als solches bestätigen.

Stark reaktive lineare Epitope fanden wir in der ersten „Hinge-Region“ (Peptid E6, AS 101-125) und in dem, bislang als „immunologisch inaktiv“ betrachteten katalytischen Zentrum der PDH-E2 [160, 162]. Bis zu 64% der PBC-Patienten hatten IgG- oder IgM-Antikörper gegen das Peptid E6 (**PTPQAAPAPTPAATASPPTPSAQAP**), sowie bis zu 77% gegen das Peptid F12 (AS 407-431, **EANSSWMDTVIRQNHVVDVSVAVST**) und 91% gegen G4 (AS 475-99, **GTFTIS**NLGMFGIKNFSAIINPPQA**) der katalytischen Domäne. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtungen bei den gesunden Probanden bestärkt, bei denen nur 18% der Seren mit dem Peptid F12, 4% mit G4 und keines mit E6 reagierten.

Die katalytischen Zentren von zwei sich gegenüber liegenden PDH-E2 Untereinheiten bilden eine Art Tunnel, in dessen Mitte sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Die Öffnung des Tunnels, die gegen die Oberfläche des Moleküls gerichtet ist, stellt die liponamidbindende Seite dar. Im Gegensatz dazu bildet die gegenüberliegende Öffnung die Bindungsstelle des Coenzym A (CoA). Inmitten dieses katalytischen Zentrums der menschlichen PDH-E2 befinden sich zwei Aminosäuren, H534 und S480, von denen jeweils eine von einer PDH-E2 Untereinheit gestellt wird. Diese Aminosäuren trennen die beiden

Substratbindungsstellen voneinander und sind direkt in der Transacetylaserreaktion beteiligt [167-168].

Wie in 4.3.2 bereits beschrieben, enthält das aktive Zentrum der katalytischen Domäne der PDH-E2 die Aminosäure S480. Ebenso enthält das Peptid G4 (AS 475-99), gegen das in der vorliegenden Arbeit die höchste Reaktivität ermittelt werden konnte, diese Aminosäure S480. Diese Tatsache könnte die schon von verschiedenen Autoren berichtete Inhibierung der PDH-E2 Enzymaktivität durch Anti-M2 positive PBC-Seren erklären. Diese Enzymhemmung wurde bisher jedoch auf die Reaktivität der Antikörper mit der inneren Lipoyl-Domäne zurückgeführt [169-172], die theoretisch die Beweglichkeit des zwischen den Untereinheiten schwingenden Liponamid-Armes einschränken könnte. Nachdem die katalytische Domäne, im Gegensatz zu der inneren Lipoyl-Domäne, das aktive Zentrum dieses Proteins enthält, ist eine Hemmung der Enzymaktivität durch Antikörper, die mit dem katalytischen Zentrum interagieren, ebenso plausibel.

Die inneren katalytischen Domänen der prokaryontischen und der humanen PDH weisen weniger als 35% an Übereinstimmungen auf. Jedoch besteht zwischen den aktiven Zentren der PDH-Untereinheiten bei den Eu- und Prokaryonten große Ähnlichkeit. Diese Beobachtungen passen zu dem bei Autoimmunerkrankungen häufig beobachteten Phänomen, dass sich die Aktivität von Autoimmunantikörpern gegen evolutionär unveränderte Proteinstrukturen richtet und diese *in vitro* mit den Enzymfunktionen interagieren [173]. Ebenso unterstützt dies die Theorie, dass die Pathogenese auf Mechanismen wie dem „molecular mimicry“ oder einer Störung des Apoptosevorgangs beruhen kann. Zusätzlich werden unsere Erkenntnisse von einer 2004 veröffentlichten Studie unterstützt, in der von PBC-Patienten erfolgreich das humane Beta-Retrovirus gewonnen und geklont wurde, dessen aus 5 Aminosäuren bestehendes Hüllenprotein eine 80%-ige Übereinstimmung mit der in G4 enthaltenen und ebenso S480 beinhaltenden Sequenz AS TFTIS (siehe *Tabelle 4.2*) aufweist [174]. Bislang sind die Überlegungen zu diesen Zusammenhängen noch weitgehend spekulativ.

Eine weitere theoretische Überlegung wäre die Verbindung von der Enzyminhibition mit dem bei PBC-Patienten auftretenden „Fatigue-Syndrom“. Die Müdigkeit wird von den Patienten als sehr belastend empfunden, da durch die mit exzessiver Tagesmüdigkeit assoziierten Erschöpfungszustände die sozialen und zwischenmenschlichen Beziehungen stark eingeschränkt werden [57-58]. Diese Erschöpfungszustände konnten nicht auf Depressionen zurückgeführt werden [175]. Jones et al. postulierte, dass die Müdigkeitszustände der einzelnen Patienten über die Zeit hinweg konstant bleiben und mit einer eingeschränkten Lebenserwartung assoziiert sein könnten [176]. Durch die Inhibition der PDH-E2 Enzymaktivität ist die Bildung von Coenzym A gestört und dem Citratzyklus kann nicht ausreichend Substrat für die Produktion des energiereichen ATPs bereitgestellt werden. Wegen des darauf folgenden Substratmangels im Citratzyklus muss der Organismus auf die weniger ergiebige Energiegewinnung durch Laktat zurückgreifen. Aufgrund dieser Überlegungen wäre die klinische Ausprägung der Enzymblockade des katalytischen Zentrums in Form des Fatigue-Syndroms denkbar. Hollingsworth et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die Müdigkeit bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose mit einer Dysfunktion der muskulären Mitochondrien in Form von exzessiver Azidose nach körperlicher Anstrengung vergesellschaftet ist [59]. Biagini et al. untersuchten PBC Patientinnen auf ein elektromyographisches Korrelat der Müdigkeit, das jedoch nicht nachgewiesen werden konnte [177]. Newton et al. äußerten bereits die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Müdigkeit und einer autonomen Dysfunktion besteht, was nicht bestätigt wurde [178], jedoch ebenso Gegenstand weiterer Studien darstellen könnte.

Des Weiteren zeigten die PBC-Seren eine starke Reaktion mit dem Peptid F12. Da jedoch auch 18% der gesunden Probanden Antikörper gegen F12 aufwiesen, ist hier von einem Ziel natürlicher Autoimmunantikörper auszugehen. Ebenso das Peptid E6, gegen das sowohl bei den PBC-Patienten als auch bei den gesunden Probanden vor allem die IgM-Antikörper zu

reagieren scheinen. Jedoch sind bei dem E6-Peptid keine erhöhten Reaktivitätsmittelwerte nachzuweisen.

Es ist durchaus bekannt, dass natürliche Autoantikörper, die eine wichtige Rolle in der Primärabwehr einnehmen, ebenso wie die pathologischen Autoimmunantikörper, bevorzugt gegen archaische, strukturell unveränderte Enzyme gerichtet sind. Ebenso auf die Existenz von natürlichen Autoimmunantikörpern hinweisend sind die Beobachtungen, dass sich die Antikörper-Reaktivitäten gesunder Probanden von denen der PBC-Patienten bei einigen Peptiden des katalytischen Zentrums (Peptide: F9, G5, G6) kaum unterschieden oder diese teilweise sogar überstiegen (Peptide: F2, F8, F11). Dass gesunde Probanden ebenso Antikörper gegen Peptide des katalytischen Zentrums aufweisen, wurde bereits in vorhergehenden Studien erkannt [164]. Auch Mackay et al. kamen zu diesen Erkenntnissen, als sie ebenso mit 8 Aminosäuren überlappende Peptide der inneren Lipoyl-Domäne synthetisierten und feststellten, dass Seren gesunder Probanden ebenfalls eine Reaktivität gegen die Peptide aufzeigten, wenn auch eine niedrigere als die der PBC-Seren [10]. Wie in unserer Arbeit erkannten die meisten Seren mehrere Epitope über die ganze PDH-E2 Einheit verteilt, was sich besonders ausgeprägt bei den IgM-Antikörpern beobachten lässt.

Außerdem fielen zwei der 91 AMA-positiven Seren bezüglich ihrer besonderer Eigenschaften auf. Beide zeigten im ELISA und im WesternBlot eine hohe Anti-M2 und Anti-PDH-Reaktivität, reagierten im Gegensatz dazu jedoch weder mit E9 oder E10, noch F12 oder G4 oder einem anderen der 35 PDH-E2 Peptide. Dadurch, dass die 35 Peptide ausschließlich lineare Aminosäuresequenzen darstellen und zwei der Seren keinerlei Reaktion mit einem dieser Proteine zeigten, könnte dies ein Hinweis auf die Existenz von Antikörpern darstellen, die gegen konformationsspezifische Epitope gerichtet sind. Es ist bekannt, dass bei 90% der B-Zellen die Tertiärstruktur des Peptids für die Erkennung des Epitops eine Rolle spielt [179-180]. Jedoch ist die Darstellung eines Proteins stark von den Möglichkeiten der Methode abhängig. Bisher ist noch keine Methode bekannt, die sowohl lineare als auch Konformationsepitope erkennen und

zusätzlich noch aufgrund der Tertiärstruktur verborgene Peptide detektieren könnte. Unsere Methode ist in der Lage, sowohl lineare als auch innerhalb eines Proteins verborgene Peptidstrukturen zu erkennen, sie ist jedoch nicht zum Detektieren von Konformationsepitopen geeignet. Dennoch hat sich diese Methode schon bei der Identifizierung immundominanter Epitope von verschiedenen Kollagenosen bewährt [181]. Angesichts der „klonalen Selektion“ und der daraus resultierenden „polyklonalen Antwort“ ist es durchaus denkbar, dass die bei Autoimmunerkrankungen auftretende Reaktivität gegen mehrere lineare und Konformationsepitope anfangs durch ein einzelnes lineares Peptid ausgelöst wird, welches uns auf die Spur des initiiierenden Agens führen könnte.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Anti-PDH-E2-Antikörper in Seren von PBC-Patienten besonders mit den linearen Peptiden des katalytischen Zentrums der PDH-E2 reagieren. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, geht man davon aus, dass die bei der PBC auftretende teils schwerwiegende Zerstörung der Gallengänge von T-Zellen vermittelt wird. Es bleibt noch zu klären, ob das G4-Peptid ebenso für die T-Zellen, die hauptsächlich lineare Peptide erkennen [182], ein Epitop darstellt. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass allem Anschein nach nicht nur die linearen, sondern auch die Konformationsepitope bei der Antigenerkennung der Autoimmunantikörper eine Rolle spielen.

4.3.2. Suche nach möglichen Hinweisen für die Identität von M4

Anti-M4 Antikörper wurden erstmals nachgewiesen, als Seren sowohl gegen die innere, als auch gegen die äußere mitochondriale Membran getestet wurden. Damals reagierten 15 der 40 Seren in der KBR mit beiden Membranfraktionen. Im Gegensatz zu dem Trypsin-sensitiven M2-Antigen der inneren Membran konnte die Reaktion mit der äußeren Membran nicht durch Trypsin gestört werden [149]. Als weiteres Merkmal ist das M4-Antigen nicht im WesternBlot detektierbar [150].

1986 wurde beobachtet, dass 10 Seren, die im WesternBlot nicht gegen das 74kD Protein reagierten, eine Reaktion mit dem 52kD Protein aufweisen. Dieses Antigen ließ sich jedoch weder im ELISA mit submitochondrialen Partikeln noch mithilfe von Chloroform gelöster ATPase detektieren [183]. Man hatte hierbei darauf spekuliert, dass diese Seren mit dem M4-Antigen reagieren würden. 1988 veröffentlichten Fusconi et al. eine Arbeit mit ähnlichen Beobachtungen, in der 7 mitochondriale Peptide aus den Zellen von Rinderherzen isoliert wurden, die dann im WesternBlot Reaktionen mit antimitochondrialen Antikörpern aufwiesen. 84% der Seren reagierten mit dem 74kD Peptid. Ebenso zeigten 87% der Seren, die nicht mit diesem 74kD Peptid reagierten, eine Reaktion gegen ein 52kD Peptid, das im ELISA mit submitochondrialen Partikel erneut nicht zu detektieren war [184]. Inzwischen weiß man, dass es sich damals nicht, wie angenommen, um das M4-Antigen handelte, sondern um die M2c-Determinante. Bei der Antigenpräparation der submitochondrialen Partikel werden die M2-Determinanten nicht voneinander getrennt und sind somit im ELISA nicht einzeln nachweisbar, können jedoch im WesternBlot aufgetrennt und detektiert werden.

Anfang der 90er wurde das M4-Antigen mit der Sulfitoxidase und einer schlechteren Prognose assoziiert [154]. Laut Ono et al. gibt es Hinweise dafür, dass die innere mitochondriale Membran an dem Transport der Sulfitoxidase in den intermembranösen Raum beteiligt ist und die Sulfitoxidase ein Enzym des intermembranösen Raums darstellt [185]. Daraufhin synthetisierten Palmer et al. in einer Studie die mit M4 assoziierte Sulfitoxidase und testeten diese im WesternBlot und im ELISA mit bestätigten PBC-Seren. In keiner der beiden Methoden konnte eine spezifische Reaktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten von Klein et al. ebenso bestätigt werden [54]. Jedoch korrelierte bei Palmer et al. die IgG-Konzentration mit der „optical density“ der ELISA Messungen, weswegen auf eine unspezifische Bindung an das künstlich hergestellte Antigen geschlossen wurde [155]. Die Sulfitoxidase kann vermutlich bei der Antigenpräparation aus technischen Gründen nicht von der

Fraktion der äußeren mitochondrialen Membran getrennt werden und stellt somit ein Artefakt in Form einer „reaktiven Verunreinigung“ dar.

Erst 10 Jahre später nahmen Berg et al. die Forschungen bezüglich der Identität des M4-Antigens erneut auf und publizierten 2006 eine Arbeit, in der das M4-Antigen mit der PDH-E1-Untereinheit der PDH assoziiert wurde. Mit Seren, die in der KBR als M4 positiv identifiziert worden waren, konnte hier im ELISA eine Reaktivität gegen die PDH-E2- und die PDH-E1-Untereinheit nachgewiesen werden. Es gelang jedoch nicht, eine gegen die PDH-E1 Untereinheit gerichtete Reaktivität bei Seren nachzuweisen, die sich in der KBR als M4 negativ gezeigt hatten. Des Weiteren hatten von in der KBR Anti-M4 positiven Seren 74% Antikörper gegen die Alpha-Determinante und 67% gegen die Beta-Determinante der PDH-E1 Untereinheit [150].

Die in unserer Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen eine deutliche Korrelation zwischen dem M2- und dem M4-Antigen. Bei den Korrelationen sowohl der IgG- als auch der IgM-Reaktivitäten von M2 zu M4 werden Korrelationswerte über 0,7 erreicht, was einen positiven Zusammenhang beschreibt. Worin dieser Zusammenhang besteht, bleibt jedoch weiter unklar.

Diese positive Korrelation der beiden Antigene könnte man als zusätzliches Argument für die Assoziation des M4-Antigens mit der PDH-E1-Untereinheit werten. Allein aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Untereinheiten ist es durchaus vorstellbar, dass die PDH-E1 in ähnlichem Maße wie die PDH-E2 das Potential zur Induktion von Autoimmunantikörper besitzen könnte. Geht man davon aus, dass die Antikörperinduktion durch eine Störung des Apoptosevorgangs [123] verursacht wird, kann theoretisch die PDH-E1, ähnlich wie die PDH-E2, durch Mechanismen wie z.B. den *in vivo* Proteinabbau durch das Proteasom (oder weitere Mechanismen, deren genaue Erläuterungen jedoch den Rahmen der Arbeit erheblich überschreiten würden) in kleine immunogene Epitope zerlegt werden und anschließend durch eine weitere Störung der Autoimmuntoleranz [125] als pathogen erkannt werden.

Ebenso ist die Assoziation von M4 und PDH-E1 mit der Theorie des „molecular mimicry“ in Einklang zu bringen. Die PDH-E1 und -E2 stellen zwei nebeneinander liegende Untereinheiten desselben Enzymkomplexes dar, die je einen Schritt eines sowohl für aerobe Eukaryonten, als auch für aerobe Prokaryonten lebenswichtigen Reaktionsvorgangs katalysieren. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass jede stattgehabte Infektion mit einem aeroben Bakterium theoretisch zu einer Antikörperinduktion und Kreuzreaktion zwischen den bakteriellen PDH-E1 und -E2 und den humanen, körpereigenen PDH-E1- und -E2-Strukturen führen könnte.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass unter Therapie der Korrelationskoeffizient der IgM-Reaktivitäten von M2 zu M4 von 0,713 auf 0,839 ansteigt. Dieses Ergebnis ist jedoch schwer einzuordnen.

Da das M4-Antigen als Trypsin-resistent gilt, wären Daten über das Verhalten der PDH-E1-Untereinheit gegenüber Trypsin für die Bestätigung oder Widerlegung der oben genannten Überlegungen interessant. Dies wurde in dieser Arbeit nicht getestet, jedoch ist es höchst wahrscheinlich, dass sich die PDH-E1-Untereinheit von Trypsin zerschneiden lässt. Trypsin ist ein Gemisch dreier Verdauungsenzyme. Es wird zur Zerkleinerung von Proteinen im Laboralltag routinemäßig eingesetzt. Es hydrolysiert Peptidbindungen, gehört zu den Endopeptidasen und stellt eine Serinprotease dar, die nach den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), jedoch nicht zwischen Lysin-Prolin und Arginin-Prolin spaltet [186]. Die einzigen nicht von Trypsin gespaltenen Proteine bei PDH-E2 Untereinheit sind die in dieser Arbeit als E6, F1 und F2 definierten Peptide.

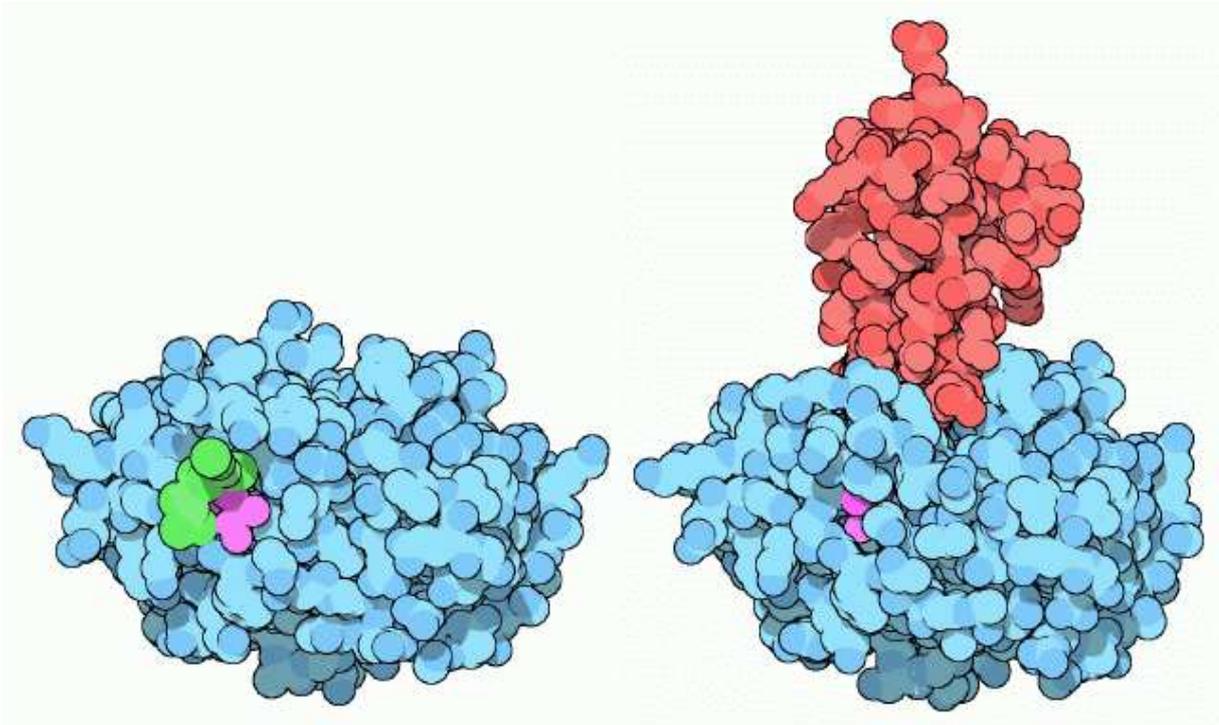


Abbildung 4.3: Trypsinogen und Trypsin mit gebundenem Trypsinogeninhibitor [187].

Ein Haupttarget der Antikörper gegen gramnegative Bakterien ist zum Beispiel ein Polysaccharid [182]. Da Antikörper ebenso andere Moleküle, wie Kohlenhydrate und Lipide binden können [182], wäre eine weitere Überlegung, dass das M4-Antigen ein Glyko-, Lipo- oder gar kein Protein darstellen könnte. Dies würde sowohl die Trypsin-Resistenz als auch die Schwierigkeiten erklären, M4 im WesternBlot detektieren zu können.

Ebenso technisch schwierig im WesternBlot nachzuweisen sind Proteine mit hydrophoben Aminosäuren. Da das M4-Antigen mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert ist und membranständige Proteine aus biochemischen Gründen hydrophobe Aminosäuren enthalten, würde dies wiederum für die These sprechen, dass das M4-Antigen ein Protein darstellen könnte.

Eine Korrelation von M2 zu M4 von 0,7 könnte auch auftreten, wenn das M4-Antigen ein weiteres Epitop der PDH-E2-Untereinheit und somit ein Artefakt darstellen würde. Ebenso fällt - diese Theorie unterstützend - unter 3.5 auf,

dass sich die gegen M2 gerichtete IgG-Reaktivität in einem ähnlichen Absorptionsniveau bewegt und sich gleichsinnig verhält wie die gegen M4 gerichtete IgG-Reaktivität. Gleiches ist bei der IgM-Reaktivität zu beobachten. Dabei ist zu beachten, dass bei der Antigengewinnung die Isolierung der reinen Antigene aus technischen Gründen nicht möglich ist [146]. Nach Lyse der Zellen, mehrfachen Zentrifugationsschritten und weiterer Ultraschallbehandlung der Zellentrümmer erhält man ein Antigengemisch, welches aus Fragmenten der äußeren Mitochondrienmembran, der intermembranösen Matrix der Mitochondrien und Resten der inneren Mitochondrienmembran besteht. Mithilfe eines Saccharose-Gradienten werden anschließend die submitochondrialen Partikel aufgetrennt. Nach Zentrifugation befindet sich das M2-Antigen in den Saccharose-Konzentrationen 1,16 bis 1,24 und das M4-Antigen in den Schichten von 1,04 bis 1,14. Da die Konzentrationsschichten 1,14 und 1,16 direkt aneinander angrenzen, ist es denkbar, dass die Partikel der inneren mitochondrialen Membran mit der PDH-E2 Untereinheit teilweise die benachbarten Konzentrationsschichten verunreinigen könnten. Grund hierfür kann unsauberes Abpipettieren der Schichten sein. Dass manche Epitope, wie z.B. das Epitop E11, vermehrt von Anti-M4 positiven Seren erkannt werden, könnte für die Theorie sprechen, dass M4 ein Teil des M2-Antigens darstellt. Jedoch sprechen auch hier wieder die Trypsin-Resistenz des M4-Antigens und die Schwierigkeiten, das M4-Antigen im WesternBlot zu detektieren, dagegen.

Schlussendlich ist die positive Korrelation der Anti-M2- zu der Anti-M4-Reaktivität eine interessante Beobachtung, jedoch schwer einzuordnen. Die Identität des M4-Antigens bleibt Gegenstand weiterer Nachforschungen.

4.3.3. Die Anti-E11 Reaktivität – ein neuer Marker für einen aktiven Krankheitsverlauf bei der PBC?

Diverse Studien untersuchten verschiedenste Faktoren, um schon in einem frühen Stadium der PBC einen aktiven Krankheitsverlauf vorhersagen zu könnten. Darunter fielen unter anderem die antinukleären Antikörper (im

Besonderen die Antizentromer Antikörper), die in einer Studie von Yang et al. aus dem Jahre 2004 mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet waren. Bei 41% der ANA-positiven Patienten kam es zu einem Leberversagen vs. 25% der ANA-negativen Patienten [121]. Flisiak et al. assoziierten einen erhöhten AP-Wert mit einem progressiven Krankheitsverlauf in Kombination mit einer hohen Anti-M2 und Anti-M4 Serumkonzentration (Anti-M2 > 1300 RU/ml, Anti-M4 > 400 RU/ml) [188]. Des Weiteren wurde noch der Anstieg von Bilirubin [77], sowie die Antikörperprofile C und D (siehe unten) [122] mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Die Ausbildung von Granulomen wiederum wurde mit einem verbesserten Überleben assoziiert. Von etlichen Modellen ist das Mayo Survival Model dasjenige, das sich zur Abschätzung der Überlebensrate ohne Erreichen der Transplantationsbedürftigkeit am ehesten durchsetzen konnte [77]. Es stützt sich auf die Faktoren Alter, Bilirubin, Albumin, Prothrombinzeit, sowie den Schweregrad der Flüssigkeitsretention, wobei die Bilirubinkonzentration am schwersten gewichtet wird.

Bisher gibt es jedoch keinen zuverlässigen Wert, der die Entwicklung der Symptome, insbesondere in Frühstadien der Erkrankung eindeutig vorhersagen könnte [56].

In dem 1988 von Klein et al. entwickelten Modell der AMA-Profile, das die Rolle der AMA-Reaktivitäten bezüglich des prognostischen Verlauf der PBC identifiziert, ist bereits auf eine Schlüsselrolle des M4-Antigens hingewiesen worden [122]. Die Profile C (54 %) und D (96 %) weisen in einem Zeitraum von 6–8 Jahren eine deutliche Progression zu Spätstadien auf, während 100% der Patienten mit dem Profil A und 96 % der Patienten mit dem Profil B in den Stadien I und II verbleiben (*Tabelle 1.4*). Es fällt auf, dass die Anti-M4 Reaktivität nur in den Profilen C und D enthalten ist, die bis zu 96% mit einem aktiven Krankheitsverlauf vergesellschaftet sind. Die These, dass das M4-Antigen mit einer schlechten Prognose der PBC assoziiert ist, wird in der Literatur vielseitig unterstützt [122].

Schon bei 3.2 fielen Ausreißer-bedingte Extremwerte hauptsächlich bei dem E11-Peptid auf. Bei den IgG-Antikörpern von fünf Patienten zeigten sich diese Ausreißer und bei drei der fünf Patienten bestand ein aktiver Krankheitsverlauf. Bei der IgM-Reaktivität waren bei beiden Patienten Ausreißer-bedingte Extremwerte gegen E11 nachzuweisen, und beide hatten einen aktiven Krankheitsverlauf. Ebenso ergaben unter 3.3 durchgeführte Korrelationsberechnungen der Absorptionswerte von Seren mit komplementbindenden Antikörpern angehobene Korrelationskoeffizienten bei E11. Sowohl bei den IgG- als auch bei den IgM-Antikörpern erreichten die Korrelationsberechnungen von Anti-M4 zu Anti-E11 Werte von 0,60 und 0,66. Anti-M2 erreichte bei den IgM-Antikörpern mit einem Wert von 0,73 eine Korrelation zu Anti-E11. Des Weiteren scheinen in 3.4 sowohl die IgG- als auch die IgM-Reaktivitäten von Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf verstärkt mit der Reaktivität gegen das E11-Peptid der PDH-E2 zu korrelieren. Das E11-Peptid entspricht in dieser Arbeit der Aminosäuresequenz AS 186-210, welches in der inneren Lipoyl-Domäne der PDH-E2 lokalisiert ist und das Lipoyl-bindende Lysin K173 umgibt.

Aufgrund der oben beschriebenen Daten wurde versucht, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem E11-Peptid und einem aktiven Krankheitsverlauf zu finden. Anti-M4 erreicht korreliert mit der entsprechenden Reaktivität gegen das E11-Peptid bei den IgG-Antikörpern von Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf einen Wert von 0,68 und bei den IgM-Antikörpern von 0,66, was wiederum den prognostisch ungünstigen Charakter des M4-Antigens unterstreicht. Jedoch erreicht die Anti-M2 IgM-Reaktivität des gleichen Patientenkollektivs korreliert zu der Anti-E11-Reaktivität einen Wert von 0,77 (*Abbildung 3.39* und *3.40*), was wiederum gegen eine Assoziation der Anti-E11-Reaktivität mit dem M4-Antigen spricht.

Im Vergleich werden von Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf bei dem E11-Peptid maximale Korrelationswerte von 0,4 erreicht, was somit keinem Zusammenhang entspricht (*Abbildung 3.45* und *3.46*).

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Signifikanz < 0,05. Signifikanz E11-IgG: 0,104, E11-IgM: 0,613).

Des Weiteren waren bei 20 der 37 Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf (54%) komplementbindende Antikörper nachweisbar. Bei den 57 Patienten, die komplementbindende Antikörper aufwiesen, zeigten wiederum 20 (35%) einen aktiven Krankheitsverlauf. Natürliche Autoimmunantikörper binden und aktivieren kein Komplement und lysieren somit auch nicht die von ihnen gebundenen Strukturen. Somit wird das Auftreten von komplementbindenden Antikörpern als Zeichen eines aktiven Krankheitsgeschehens gewertet, worin auch die Theorie des Zusammenhangs mit einer schlechteren Prognose und einem aktiven Krankheitsverlauf begründet liegt. Außerdem ist zu beachten, dass komplementbindende Antikörper in der Regel gegen Konformationsepitope gerichtet sind, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass sie mit den in dieser Arbeit verwendeten linearen PDH-E2 Peptiden nicht in derselben Art und Weise interagieren wie *in vivo*. In Kapitel 3.3 wurden nur Seren, die in der KBR eine positive Aktivität aufwiesen, für die Auswertungen genutzt und deren im ELISA ermittelte Absorptionswerte miteinander korreliert. Ob ein Serum komplementbindende Antikörper enthält oder nicht, kann bisher nur in der KBR ermittelt werden. Somit ist es schwierig festzustellen, ob nun wirklich die komplementbindenden Antikörper im ELISA das Antigen binden oder ob eventuell im Serum vorhandene nicht-komplementbindenden Antikörper mit dem Antigen interagieren. In 3.3.3. wurde zusätzlich versucht einen Zusammenhang zwischen den Absorptionswerten im ELISA und den KBR-Titern festzustellen. Mit Korrelationswerten von 0,26, 0,23 und 0,08 sind bei den IgM-Antikörpern und der Anti-M4 IgG-Reaktivität keinerlei Zusammenhänge feststellbar. Nur die Korrelation der Anti-M2 IgG-Reaktivität mit den Anti-M2 Titern ergab einen Wert von 0,62, was einer leichten Korrelation entspricht. Bei den PDH-E2 Peptiden erreicht nur das E7-Peptid bei allen 4 Reaktivitäten Korrelationswerte > 0,8.

Man geht davon aus, dass komplementbindende Antikörper hauptsächlich gegen Konformationsepitope gerichtet sind und der IgM-Subklasse der Antikörper angehören. Bezüglich der Korrelationswerte von 0,26 und 0,23, die bei den Berechnungen von den IgM-Reaktivitäten mit den KBR-Titer ermittelt wurden, muss bedacht werden, dass die IgM-Antikörper mit den im ELISA verwendeten linearen Peptiden vermutlich nicht wie *in vivo* interagieren können. Somit kann eine eventuell im Körper stattfindende Reaktivität der Antikörper mit dieser Methode *in vitro* nicht nachgewiesen werden.

Wie in den *Abbildungen* 3.35 bis 3.38 zu sehen ist, werden in der KBR Anti-M2 Titer von bis zu 2112 erreicht, wobei die Anti-M4 Titer nicht über die zweite Verdünnungsstufe von 132 hinausgehen. Die leichte Korrelation von 0,62 der Anti-M2 Titer mit der Anti-M2 IgG-Reaktivität im ELISA deutet auf die Existenz von komplementbindenden IgG- und nicht - wie erwartet - von IgM-Antikörpern hin. Die weitere Interpretation dieser Ergebnisse wird hier erneut durch die Unkenntnis der Identität des M4-Antigens erschwert. Jedoch scheint mit einem Korrelationswert von 0,08 keinerlei Zusammenhang zwischen der IgG-Reaktivität im ELISA und den Anti-M4 Titern zu bestehen.

Bei der Korrelation der AMA- mit den Anti-PDH-E2-Reaktivitäten von in der KBR positiven PBC-Seren zeigt sich in unseren Daten, dass 3 der 4 AMA-Reaktivitäten mit der Reaktivität gegen das E11-Peptid korrelieren. Hier werden Werten von 0,6 (Anti-M4 IgG), 0,73 (Anti-M2 IgM) und 0,66 (Anti-M4 IgM), die eine Korrelation beschreiben, erreicht (*Abbildung* 3.27 bis 3.30). Diese Korrelationswerte der Anti-E11-Reaktivität sind zu den AMA-Reaktivitäten bei PBC-Seren ohne komplementbindende Antikörper etwas schwächer ausgeprägt (*Abbildung* 3.31 bis 3.34). Hier werden vor allem von den Anti-M2 und Anti-M4 IgG-Reaktivitäten Werte von 0,6 und nahezu 0 und den IgM-Reaktivitäten von knapp 0,5 und 0,6 erreicht. Da auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den bei E11 erreichten Korrelationswerten der PBC-Seren mit und ohne komplementbindenden Antikörpern auszumachen ist, kann der Reaktivität gegen E11 keine prognostische Bedeutung zugesprochen werden.

Bereits bei der Korrelation der Anti-M2- zu der Anti-M4-Reaktivität mit den Anti-PDH-E2-Reaktivitäten in Kapitel 3.1. zeigten sich der höchste (jedoch mit 0,45 nicht verwertbare) Wert bei dem E11-Peptid. Doch selbst dieser geringfügige Anstieg der Korrelationswerte war ausschließlich von Ausreißern bedingt. Es scheint so, als ob einige der Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf mit Extremwerten selektiv gegen das E11-Peptid reagieren, dieses jedoch nicht als Marker für einen aktiven Krankheitsverlauf herangezogen werden kann. Wir konnten unsere These, dass das E11-Peptid einen neuen Marker für einen aktiven Krankheitsverlauf darstellen könnte, nicht mit signifikanten Werten belegen.

4.3.4. Untersuchung der Auswirkungen von den verschiedenen Therapieformen auf die AMA-Reaktivitäten

Wie schon in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, sind die Ätiologie der PBC und die Rolle der antimitochondrialen Antikörper bei dieser Autoimmunkrankheit weitgehend ungeklärt. Bisher geht man davon aus, dass die AMA keinen Krankheitswert besitzen, sondern ein eventuell durch Kreuzreaktion entstandenes „Nebenprodukt“ der Erkrankung, darstellen.

In einer vorhergehenden Arbeit von Klein et al. konnte ein Abfall der Autoimmunantikörper unter Therapie mit Ursodesoxycholsäure bei der PSC nachgewiesen werden [189]. Mit Hinblick auf mögliche weitere Hinweise bezüglich der Bedeutung der AMA bei der PBC wurden in dieser Arbeit die AMA-Reaktivitäten der PBC-Patienten vor und nach Therapie und aufgeteilt nach ihren verschiedenen Therapieformen untereinander verglichen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Untherapierte PBC-Patienten

Bei den AMA-Reaktivitäten der PBC-Patienten ohne Therapieeinfluss zeigten sich sechs untherapierte Patienten, die mehr als vier Serumproben aufwiesen. Die Verläufe der AMA-Reaktivitäten werden in den *Abbildungen 3.47 bis 3.50* in

Kapitel 3.5.1 aufgeführt. Hier ist bei keiner der vier Reaktivitäten in einem Beobachtungszeitraum von bis zu zehn Jahren ein Standardverlauf zu erkennen. Jedoch scheint die Reaktivität der IgM-Antikörper im Gegensatz zu den IgG-Antikörpern im Laufe der Erkrankung (hier nach einem Beobachtungszeitraum von vier Jahren) im Mittel anzusteigen und die Anzahl der erkannten Epitope abzunehmen (mit Ausnahme der IgM-Antikörper bei einem inaktiven Krankheitsverlauf). Bei den PDH-E2-Peptiden werden von der IgG-Reaktivität gegen die Peptide F12 und G4 angehobene Mittelwerte erreicht, die ohne Therapie nach den ersten vier Jahren unter Beobachtung um 100 [Ax1000] abfallen. Für das G4-Peptid besteht hier ein signifikanter Unterschied $< 0,05$. Bei den IgM-Antikörpern werden bei den Patienten ohne Therapie weder erhöhte Absorptionswerte noch signifikante Unterschiede vor und nach vier Jahren Beobachtung nachgewiesen.

Therapierte Patienten

Bei den PBC-Patienten unter Therapie ($n=32$) steigt die IgM-Reaktivität sowohl gegen M2 als auch gegen M4 an. Im Vergleich zu den Patienten ohne Therapieeinwirkung ist hier zusätzlich ein tendenzieller Anstieg der IgG-Reaktivität zu erkennen, der sich sowohl gegen M2 als auch gegen M4 als signifikant darstellt ($p<0,05$). Im Besonderen ist bei den therapierten Patienten sowohl bei den IgG- als auch bei den IgM-Antikörpern ein signifikanter Abfall der drei am häufigsten erkannten immundominanten Epitope E6, F12 und G4 zu verzeichnen. Bei einem aktiven Krankheitsverlauf werden unter Therapie weniger Epitope erkannt. Bei einem inaktiven Krankheitsverlauf scheint sich unter Therapie an der Anzahl der erkannten Epitope wenig zu ändern.

Ursodesoxycholsäure

Bei den mit Ursodesoxycholsäure therapierten Patienten steigen alle vier Reaktivitäten unter Therapie kontinuierlich an. Dieser Anstieg ist am geringsten bei den Anti-M4 IgM-Antikörpern ausgeprägt. Jedoch ist vor allem bei der Ursodesoxycholsäure der Anstieg der IgG-Antikörper unter den therapierten Patienten am deutlichsten zu erkennen. Die bei den IgG-Antikörpern

auffallenden anfänglichen Reaktivitätserhöhungen unter Therapie bei E9 und F6 stellen ein Artefakt dar und sind von einzelnen Patientenwerten Ausreißerbedingt, was sich durch die Berechnung der nicht bestehenden Signifikanz bestätigen lässt. Ebenso wenig ist der Anstieg der Anti-G4 sowohl der IgG- als auch der IgM-Reaktivität nach zwei Jahren Ursodesoxycholsäure-Therapie signifikant.

Immunsuppressiva

Generell lässt sich bei den beiden Immunsuppressiva Azathioprin und Methotrexat mit ansteigenden IgG- und fallenden oder gleich bleibenden IgM-Reaktivitäten, ein ähnliches Verhalten beobachten. Dementsprechend ist hier bei den Immunsuppressiva ein entgegengesetztes Verhalten zu den Reaktivitäten der untherapierten Patienten zu verzeichnen.

Für die weiteren Berechnungen, ob zwischen den Reaktivitäten gegen die PDH-E2-Peptide vor und unter Therapie signifikante Unterschiede bestehen, wurden die MTX (n=5 Pat.) und AZA (n=3 Pat.) Patienten zu einer immunsupprimierten Gruppe zusammengefasst. Bei den IgG-Antikörpern zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Reaktivitäten vor und unter Therapie bei den Peptiden E9, E11, F12 und G4. Jedoch erreichte nur G4 bei den MTX-Patienten einen nennenswerten Mittelwert der Absorption von ~ 500 [Ax1000], der unter Therapie auf < 400 [Ax1000] abfiel. Die Mittelwerte der IgG-Reaktivitäten bei den drei mit AZA therapierten Patienten erreichen schon vor Therapie (mit Ausnahme von F12 mit 400 [Ax1000]) kaum erhöhte Absorptionswerte. Auffällig ist, dass unter Azathioprinmedikation die IgG-Reaktivität gegen die M2- und M4-Antigene tendenziell anzusteigen scheint, die IgG-Reaktivität gegen die PDH-Peptide bei jedem einzelnen Peptid jedoch deutlich abnimmt. Bis auf einen Ausreißer-bedingten Anstieg gegen das F9-Peptid sind bei den IgM-Antikörpern keine Auffälligkeiten.

Die Aussagekraft der *Abbildung 3.71* ist bei drei mit AZA therapierten Patienten sehr gering. Die Anzahl der Epitoperkennung scheint hier unter immunsuppressiver Therapie bei einem aktiven Krankheitsverlauf stärkere Auswirkungen zu haben als bei einem inaktiven. Sowie bei AZA, als auch bei

MTX wird die Anzahl der erkannten Epitope unter Therapie vor allem bei den IgM-Antikörpern der Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf deutlich weniger. Bei dem inaktiven Krankheitsverlauf zeigen sich kaum Veränderungen der Reaktivitäten und der erkannten Epitope. Jedoch ist auch bei den immunsupprimierten Patienten bei der IgG-Reaktivität die Tendenz eines Anstiegs unter Therapie zu erkennen.

Lebertransplantation

In manchen Fällen erkranken Lebertransplantierte Patienten erneut an der primär-biliären Zirrhose [113-114]. In einer Studie mit 485 Patienten, wurde nach durchschnittlich 76 Monaten bei 23% ein Wiederauftreten der PBC beobachtet [115]. Das erneute Aufflammen der PBC in transplantierten Patienten ist durch das erneut vorliegende histologische Korrelat zu diagnostizieren. Jedoch persistieren die AMA in der Mehrzahl der Patienten nach Transplantation [116-117].

Unsere Daten bestätigen das schon bekannte Phänomen des Wiederanstiegs der AMA nach Lebertransplantation. In *Abbildung 3.72* ist dies in allen vier Reaktivitäten zu beobachten. Bezüglich der IgG-Antikörper sticht bei den Lebertransplantierten Patienten eine gesteigerte Reaktivität gegen das G4-Peptid heraus, die in den ersten 5 Jahren nach OLT abfällt und anschließend wieder deutlich ansteigt. Bei den IgM-Antikörpern tritt die Reaktivität gegen das E11-Peptid deutlich hervor, die ebenfalls in den ersten 5 Jahren postoperativ abfällt und im weiteren Verlauf weit über das Ausgangsniveau ansteigt (keine Signifikanz) (siehe 4.3.). Bezüglich der Anti-G4-Reaktivität zeigen die IgM- das gleiche Verhalten wie die IgG-Antikörper. Sie erreichen erhöhte Absorptionswerte, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, fallen postoperativ zuerst ab und weisen nach 5 Jahren wieder einen nachfolgenden Anstieg der Reaktivität auf. Des Weiteren scheinen die IgM-Antikörper vor allem bei den Lebertransplantierten Patienten, die alle einen aktiven Krankheitsverlauf aufweisen, deutlich mehr Epitope der PDH-E2 zu erkennen als die IgG-Antikörper. Es konnten keine signifikanten Unterschiede für in dieser Arbeit näher behandelten Peptiden nachgewiesen werden.

Allgemein

Tabelle 4.5: Darstellung des ansteigenden oder abfallenden Verhaltens der IgG- und IgM-Reaktivitäten unter Therapie und der Epitoperkennung der IgG- und IgM-Antikörper in Abhängigkeit eines aktiven und inaktiven Krankheitsverlaufs.

	Reaktivität		Epitoperkennung			
	IgG	IgM	In. IgG	A. IgG	In. IgM	A. IgM
Ohne T.	↓	↑	↓	↓	↑	↓
th. Pat.	↑	↑	↑ / ↔	↓	↓	↓
URSO	↑	↑	↑	↓	↓	↓
IS	↑	↓	MTX ↓ AZA ↑	↓	↓	↓
OLT	↓↑	↓↑	-	↔	-	↑↑

(In. = inaktiver Krankheitsverlauf, A. = aktiver Krankheitsverlauf, Ohne T. = untherapierte Patienten. Hier beschreiben die Pfeile das Verhalten nach 4 Jahren unter Beobachtung, th. Pat. = therapierte Patienten zusammengefasst, IS = MTX und AZA Therapie zusammengefasst, ↓↑ = postoperativ abfallend und im Verlauf wieder ansteigend, ↔ = gleich bleibend).

Mit Seren von untherapierten PBC-Patienten scheint die Reaktivität der IgM-Antikörper im Laufe der Zeit anzusteigen und die IgG-Reaktivität abzufallen. Bei den zusammengefassten Patienten verschiedener Therapieformen zeigt sich neben der Reaktivität der IgM- auch ein leichter Anstieg der IgG-Antikörper. Aufgetrennt nach den verschiedenen Therapieformen verhalten sich interessanterweise die IS-Therapeutika entgegengesetzt der Reaktivitäten von Patienten ohne Therapieeinwirkungen mit tendenziell ansteigenden IgG-Antikörpern und abfallender Reaktivität der IgM-Antikörper. Die mit Ursodesoxycholsäure therapierten Patienten zeigen in allen Reaktivitäten einen kontinuierlichen Anstieg. Bei den Lebertransplantierten Patienten bestätigt sich das bereits bekannte Phänomen eines postoperativen Abfalls der AMA-Reaktivitäten, die jedoch nach wenigen Jahren wieder ansteigen.

In Bezug auf die Epitoperkennung ist in *Kapitel 3.5* zu sehen, dass die Anzahl der erkannten Epitope im Laufe der Erkrankung auch ohne Therapie weniger zu werden scheint. Mit Ausnahme der IgM-Antikörper von Patienten mit einem inaktiven Krankheitsverlauf, bei denen die Anzahl der erkannten Epitope ansteigt. Unter Therapie werden sowohl von den IgG- als auch von den IgM-Antikörpern weniger Epitope erkannt. Die IgG-Antikörper, die mit Ursodesoxycholsäure behandelten Patienten scheinen hier jedoch in den ersten beiden Jahren unter Therapie eine Ausnahme zu sein. Bei den AMA-Reaktivitäten nach Lebertransplantation ist ein vollkommen anderes Verhalten zu beobachten als bei den medikamentösen Therapien. Nach Lebertransplantation erkennen die IgG-Antikörper mit im Mittel drei Peptiden verhältnismäßig wenig Epitope der PDH-E2. Die IgM-Antikörper hingegen erkennen im Mittel bereits vor Therapie eine relativ große Anzahl von 12 Epitopen, die nach OLT noch bis zu 17 Epitopen ansteigt.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass unter Therapie der Korrelationskoeffizient der IgM-Reaktivitäten von M2 zu M4 von 0,713 auf 0,839 ansteigt.

Diskussion

Im Allgemeinen können wir mit unseren Daten die schon von Mackay et al. beschriebenen Ergebnisse bestätigen, dass bei den IgM- im Vergleich zu den IgG-Antikörpern generell niedrigere Reaktivitäten erreicht werden und eine größere Anzahl von PDH-E2 Epitopen erkannt wird [10]. Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse einen im Verlauf der Erkrankung auftretenden Anstieg der IgM-Reaktivität sowohl bei den untherapierten (*Abbildung 3.51*) als auch bei den unter Therapie stehenden Patienten (*Abbildung 3.55*). Dieser Anstieg der IgM-Reaktivität scheint lediglich von immunsuppressiven Medikamenten beeinflusst zu werden. Des Weiteren ist besonders auffällig, dass die bei den IgM-Antikörpern schon vor Lebertransplantation bestehende hohe Anzahl erkannter Epitope postoperativ sogar noch weiter ansteigt. Leider liefern unsere Daten keine Aussagen, ob zwischen einer erhöhter Reaktivität und einer gesteigerten Epitoperkennung ein Zusammenhang besteht. Dieses

„epitope spreading“ der IgM-Antikörper könnte, da es am deutlichsten bei den Lebertransplantierten PBC-Patienten und somit bei den Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf auftritt, als eine progressive immunologische Aktivität gewertet werden. Tuohy et al. zeigten in ihrem Modell anhand der multiplen Sklerose (MS) und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dass ein „epitope spreading“ mit einer Krankheitsprogression in Verbindung steht und durch eine bei der Autoimmunkrankheit entstehenden Gewebsschädigung initiiert werden könnte [190]. Tuohy et al. gehen davon aus, dass Autoimmunität einen kontinuierlichen Prozess autoreaktiver Ereignissen voraussetzt und dadurch einen entzündlichen Dauerzustand hervorruft, der zu einer Chronifizierung und zur Autoimmunität führt. Anhand ihres Modells konnten sie außerdem zeigen, dass ein Auftreten von „epitope spreading“ und von neuen gegen zusätzliche Autoantigene gerichteten T-Zellen mit einer Progression der Autoimmunerkrankung verbunden ist. Des Weiteren zeigten sie, dass das „epitope spreading“ mit einer geringeren Autoreaktivität gegen das primäre bei Krankheitsbeginn detektierte Antigen einhergeht und dass es zu einer Weiterentwicklung der Immunantwort in Form eines T-Zell-Shifts kommt, bei dem die neu aufgetretenen autoreaktiven Zellen gegen eine größere Anzahl von Epitopen gerichtet sind. Dieser Prozess soll laut Tuohy et al. die oft bei Autoimmunerkrankungen vorkommende Chronifizierung erklären [191]. Nun wäre theoretisch denkbar, dass der Anstieg der IgM-Reaktivität, der bei den Lebertransplantierten Patienten nach Therapie im Gegensatz zu den anderen Patienten noch über das Anfangsniveau ansteigt und von Medikamenten nicht oder kaum beeinflusst zu werden scheint, ein Zeichen der stattfindenden Chronifizierung darstellt. Dies ist jedoch rein spekulativ und würde Gegenstand weiterer Studien darstellen, die noch den Zusammenhang zwischen Antikörper-Reaktivität und Epitoperkennung untersuchen müssten.

Bezüglich der Epitoperkennung der PBC-Patienten unter medikamentöser Therapie sind die Daten uneinheitlich und schwer zu interpretieren. Es scheint jedoch eher eine Tendenz zu bestehen, dass allgemein unter medikamentöser Therapie von den IgM-Antikörpern weniger Epitope erkannt werden als vor

Therapie. Dies könnte in Anlehnung an den vorhergehenden Absatz als eine positive Wirkung der Medikamente gedeutet werden, die den Chronifizierungsprozess unter Umständen verlangsamen könnte. Es ist bereits nachgewiesen, dass mit der Ursodesoxycholsäure-Therapie eine Verbesserung der pathologischen Leberwerte erreicht sowie langfristig die Progression zu Spätstadien verlangsamt und das Überleben erhöht werden kann [86]. Ob nun die Ursodesoxycholsäure ebenso dazu führt, dass von den IgM-Antikörpern eine reduzierte Anzahl von Epitopen erkannt wird, könnte ebenso Gegenstand weiterer Studien darstellen.

Des Weiteren scheinen sich die Auswirkungen der medikamentösen Therapie auf die AMA der PBC in einer Anhebung der IgG-Reaktivität, und bezüglich der Therapie mit Ursodesoxycholsäure ebenso in einer vermehrten Epitoperkennung der IgG-Antikörper zusammenfassen zu lassen. In unseren Daten fiel eine vorübergehende deutlich angehobene IgG-Reaktivität gegen das E9-Peptid innerhalb der ersten beiden Jahre nach Ursodesoxycholsäure-Therapie auf. Das E9-Peptid stellt das schon mehrmals erwähnte von Gershwin et al. publizierte Peptid dar, welches das Lipoyl-bindende Lysin K173 enthält. Interessanterweise zeigte sich diese selektive Reaktivitätssteigerung nur bei den mit Ursodesoxycholsäure therapierten Patienten, woraufhin wir die Strukturformeln der Ursodesoxychol- und der Liponamidsäure miteinander verglichen. Wie in *Abbildung 4.4* und *Abbildung 4.5* zu sehen ist, weisen beide eine Carboxygruppe auf.

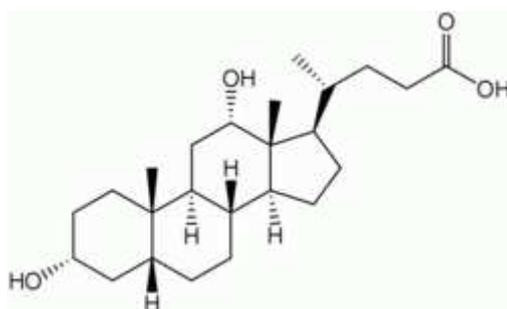


Abbildung 4.4: Ursodesoxycholsäure [187]

Die Ursodesoxycholsäure ist eine natürliche, tertiäre Gallensäure, die als Arzneistoff zur Auflösung von kleinen Gallensteinen und zur Behandlung der primär-biliären Zirrhose Verwendung findet [83]. Chemisch ist sie ein zur Gruppe der Sterine (Sterole) gehörendes Steroid.

Des Weiteren ist bekannt, dass bei früher Verabreichung der Ursodesoxycholsäure eine bis zu 40%ige Senkung der Alkalischen Phosphatase [85], sowie eine Verbesserung der weiteren pathologischen Werte erreicht werden kann und dass langfristig die Progression zu Spätstadien verlangsamt und das Überleben erhöht wird [86].

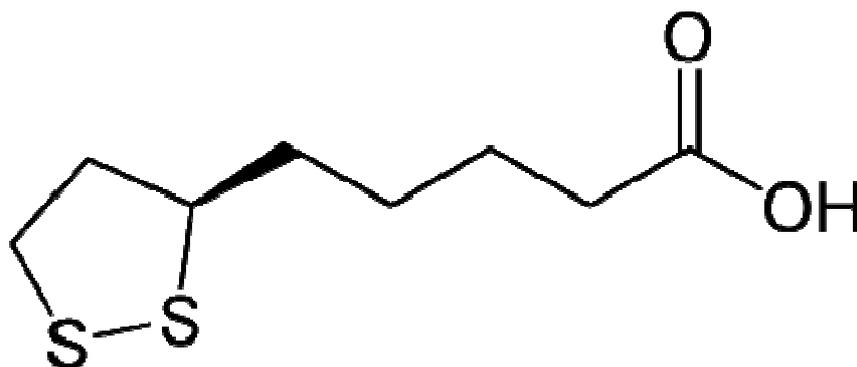


Abbildung 4.5: Liponamidsäure [187]

In der Liponsäure wirkt eine intramolekulare Disulfid-Brücke als redox-aktive Struktur. Durch Reduktion geht sie in das entsprechende Dithiol über. Liponsäure ist in der Regel als prosthetische Gruppe (über die Carboxygruppe) kovalent mit einem Lysin-Rest des Enzyms verknüpft und wird dann als Liponamid bezeichnet. Liponamid ist vor allem an der oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxosäuren beteiligt [13].

Ebenso enthält das schon in mehreren vorherigen Studien getestete Xenobiotikum 2-Octyonicssäure (Abbildung 4.6), das als potentiell PBC-

auslösendes Agens in Erwägung gezogen wurde, eine Carboxygruppe. Amano et al. modifizierten die PDH-E2, indem die Lipoyl-Säure an ihrem Lysin-Anker gegen ein Lipoyl-Säure mimendes Xenobiotikum ersetzt wurde [136]. Auf diese Weise wurden 107 verschiedene Xenobiotika getestet, von denen 33 eine signifikant höhere IgG-Reaktion auf Seren von PBC-Patienten aufwiesen als gesunde Kontrollen. Zusätzlich waren 9 dieser 33 Verbindungen reaktiver als das natürlich vorkommende Lipoyl-Säure tragende Peptid. 8 dieser 9 Verbindungen zeigten eine Kreuzreaktion mit Lipoyl-Säure. Die 2-Octynoic-Säure war einzigartig in der Analyse der quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehung sowie der Reaktivität. Es wurde von PBC-Seren eine hohe Immunglobulin-Reaktion gegen das PDH-E2-Peptid mit gekoppelter 2-Octynoic-Säure gezeigt.

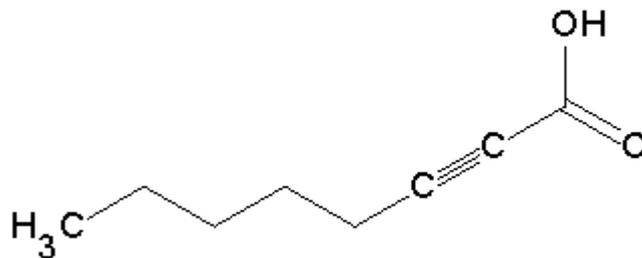


Abbildung 4.6: 2-Octyonicssäure [192]

Die Verwendung von 2-Octynoic-Säure ist weit verbreitet in Parfums, Lippenstift und vielen gebräuchlichen Geschmacksverstärkern, was das gehäufte Auftreten von PBC-Erkrankungen bei häufigem Gebrauch dieser Artikel erklären könnte [136].

Nun wäre theoretisch aufgrund der ähnlichen molekularen Struktur und Größe der Ursodesoxycholsäure denkbar, dass sich diese *in vivo* an den Lysin-Rest K173 bindet und somit eine gesteigerte Reaktivität unter begonnener Therapie hervorruft. Studien, in denen eine Lipoylisierung der Peptide, wie zum Beispiel die Bindung des Kofaktors Liponamid, für die Antikörperreaktion als notwendig publiziert wurden [153, 159], werden kontrovers diskutiert [10, 158, 163]. Jedoch zeigten Amano et al. in der schon oben erwähnten Studie, dass ebenso weitere nicht-körper eigene Moleküle die Reaktivität gegen den Lysin-Rest steigern können.

Aufgrund der Überlegung, dass Ursodesoxycholsäure ebenfalls ein solches Molekül darstellen könnte, selektierten wir die Daten der gegen die lipoylierten und unlipoylierten Peptide getesteten, mit Ursodesoxycholsäure behandelten PBC-Seren heraus und trennten sie nach Abnahmendatum vor Therapie, < 2 Jahre unter Therapie und > 2 Jahre unter Therapie. Auch hier zeigen unsere Ergebnisse im Mittel einen jedoch nicht signifikanten Anstieg der IgG-Reaktivität unter Ursodesoxycholsäure-Therapie.

Dieser unter Therapie signifikante Anstieg der IgG-Reaktivität konnte somit mit unseren Daten nicht auf die Therapie mit Ursodesoxycholsäure zurückgeführt werden. Ebenso zeigten sich hier die angehobenen Absorptionswerte wieder als Ausreißer-bedingt. Jedoch scheinen medikamentöse Maßnahmen signifikant zu einem Anstieg und somit zu einer Stimulation und Reaktion des Immunsystems zu führen, die unter Umständen als eine Art protektive Wirkung interpretiert werden kann.

Ob und inwieweit der Anstieg der IgG-Reaktivität doch mit der Verabreichung von Ursodesoxycholsäure in Verbindung steht, könnte ebenso Gegenstand weiterer Studien darstellen.

5. Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist auf die immundominanten Epitope der E2-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (PDH-E2) gerichtet, die bei der primär-biliären Zirrhose (PBC) das Target der Anti-M2-Antikörper darstellt.

Um die Reaktivitäten der PBC-Seren gegen verschiedene potentielle Epitope der PDH-E2 ermitteln zu können, wurde die komplette Länge der PDH-E2 Untereinheit in Form von 35 Peptiden synthetisiert. Jedes dieser linearen Proteine wies eine Länge von 25 Aminosäuren auf und überlappte mit den jeweils 8 Aminosäuren der beiden benachbarten synthetisierten Peptide. Daraufhin testeten wir diese Peptide mit Seren von 91 klinisch, serologisch und histologisch definierten PBC-Patienten, die zuvor ebenfalls auf ihre IgG- und IgM-Reaktivitäten gegen die Antigene M2 und M4 getestet wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass das bedeutendste immundominante Epitop (G4-Peptid), das von den antimitochondrialen Autoimmunantikörpern (AMA) erkannt wird, sich in dem katalytisch aktiven Zentrum der PDH-E2 Untereinheit befindet. Ebenso wurde das bisher als immundominantes Epitop geltende Protein 167-184 der inneren Lipoyl-Domäne mit und ohne gebundenes Liponamid synthetisiert und mit denselben Seren der 91 AMA-positiven PBC-Patienten getestet. Jedoch blieb eine gesteigerte Reaktivität gegen die beiden Peptidvarianten aus. Diese Ergebnisse könnten die schon oft bei der PBC durch die AMA beobachtete Enzymhemmung der PDH-E2 erklären. Die Kenntnis über die von den AMA erkannte Aminosäuresequenz könnte helfen, das die Erkrankung auslösende Agens und die noch ungenügend verstandene Ätiologie der PBC zu entschlüsseln. Unsere Daten deuteten auf eine Kreuzreaktion mit einem Virusantigen hin, was, wenn dieser Virus als auslösendes Agens bestätigt werden sollte, zu einer Impfung (mit einem weiteren, nicht die PBC-auslösenden Virusprotein) von gefährdeten Personen und somit einer Vermeidung des Erkrankungsausbruchs führen könnte.

Außerdem wurden mit den von uns erhobenen Daten Berechnungen durchgeführt, die weitere Hinweise auf die Identität des mit einer schlechten Prognose assoziierten M4-Antigens liefern könnten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass zwischen den Reaktivitäten gegen das M2 und das M4-Antigen ein deutlicher Zusammenhang besteht. Verschieden Berechnungen liefern Korrelationskoeffizienten zwischen 0,71 bis 0,91. Worin diese Verbindung der beiden Antigene genau besteht, kann anhand unserer Daten jedoch nicht geklärt werden. Dies stellt Gegenstand weiterer Forschung dar.

Des Weiteren wurden die PBC-Patienten nach ihrer positiven oder negativen Reaktion in der Komplementbindungsreaktion (KBR) und ihres aktiven oder inaktiven Krankheitsverlaufes in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die AMA-Reaktivitäten der Seren mit und ohne komplementbindende Antikörper sowie von Patienten mit aktivem und inaktivem Krankheitsverlauf wurden jeweils mit den Reaktivitäten gegen die 35 PDH-E2-Peptide korreliert. Hier zeigte sich ein erhöhter Korrelationskoeffizient bis zu 0,8 der Seren mit komplementbindenden Antikörpern und von Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf mit dem Peptid E11. PBC-Seren ohne komplementbindenden Antikörper und von Patienten mit einem inaktiven Krankheitsverlauf zeigten keinerlei Korrelationen zu einem der PDH-Peptide. Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde vermutet, dass das E11-Epitop einen neuen prognostischen Marker schon in Frühstadien der PBC darstellen könnte. Diese Hypothese konnte jedoch nicht mit signifikanten Ergebnissen belegt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit komplementbindenden Antikörpern und einem aktiven Krankheitsverlauf teils mit Extremwerten gegen das E11-Epitop reagieren. Jedoch ist eine erhöhte Reaktivität gegen diese Epitop nicht als prognostischer Marker geeignet.

Der letzte Punkt dieser Arbeit behandelt die Auswirkungen von verschiedenen medikamentösen Therapien und einer Lebertransplantation auf die AMA bei der PBC. Hierfür wurden die PBC-Patienten nach der erhaltenen Therapieform in verschiedene Gruppen eingeteilt und anhand ihrer Absorptionmittelwerte das Verhalten der Reaktivitäten im Verlauf, vor und unter Therapie dargestellt. Es zeigte sich sowohl bei den Patienten ohne Therapieeinfluß als auch bei den Patienten unter Therapie und nach Lebertransplantation ein Anstieg der IgM-

Reaktivität. Dieser Reaktivitätsanstieg scheint sich lediglich von einer immunsuppressiven Therapie einschränken zu lassen. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg der IgG-Antikörper bei den Patienten unter Therapie festgestellt werden. Bezüglich der Auswirkungen einer medikamentösen Therapie auf die Anzahl der von den AMA erkannten Epitope sind unserer Daten nicht aussagekräftig. Generell können wir jedoch die Beobachtungen von Mackay et al. bestätigen, dass im Vergleich zu den IgG-, von den IgM-Antikörpern bei einer niedrigeren Reaktivität eine größere Anzahl von Epitopen erkannt wird. Im Besonderen fällt bei unseren Ergebnissen auf, dass von den IgM-Antikörpern der Lebertransplantierten - im Vergleich zu den medikamentös therapierten Patienten - eine sehr hohe Anzahl von Epitopen erkannt wird, die nach Intervention noch weiter anzusteigen scheint (vor Therapie 12/35, nach Therapie 17/35). Dieses „epitope spreading“ und der kontinuierliche Anstieg der IgM-Reaktivität könnten Teile, des bei Autoimmunerkrankungen bekannten Prozesses der Chronifizierung darstellen. Mithilfe eines besseren Verständnisses der immunologischen Vorgänge bei der PBC und Autoimmunerkrankungen generell und wie diese zu beeinflussen sind, könnte es auf lange Sicht gelingen, den Chronifizierungsprozess zu verlangsamen oder sogar ganz aufzuhalten und PBC-Patienten unter Umständen vor dem Endstadium eines aktiven Krankheitsverlaufes mit all ihrer Komplikationen sowie einer Lebertransplantation zu bewahren.

6. Referenzen

Die im Folgenden angegebenen Referenzen wurden hauptsächlich bei Recherchen im Internet bei Pubmed, Uptodate, Wikipedia und Lehrbüchern, wie "Der Taschenatlas der Biochemie" und "Immunology" (Janeway, 5.Auflage) entnommen.

1. Kaplan, M.M. and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1261-73.
2. Addison, T., Gull, W., *On a Certain Affection of the Skin-Vitiligoidea-Beta-Plana B-Tuberosa*. Guys Hospital Reports 1851: p.:(7):265-77).
3. Ahrens, E.H., Jr., Payne, M. A., Kunkel, H. G., Eisenmenger, W. J., and Blondheim, S. H., *Primary Biliary Cirrhosis*. Medicine (Baltimore) 1950: p.:(4):299-364).
4. Rubin, E., Schaffner, F., Popper, H., *Primary Biliary Cirrhosis. Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis*. Am.J.Pathol., 1965: p. 46:387-407.
5. Walker, J.G., et al., *Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis*. Lancet, 1965. **1**(7390): p. 827-31.
6. Berg, P.A., D. Doniach, and I.M. Roitt, *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes*. J Exp Med, 1967. **126**(2): p. 277-90.
7. Berg, P.A., et al., *ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis*. Lancet, 1982. **2**(8313): p. 1423-6.
8. Lindenborn-Fotinos, J., T.J. Sayers, and P.A. Berg, *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. VI. Association of the complement fixing antigen with a component of the mitochondrial F1-ATPase complex*. Clin Exp Immunol, 1982. **50**(2): p. 267-74.
9. Berg, P.A., et al., *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. II. The complement fixing antigen as a component of mitochondrial inner membranes*. Br J Exp Pathol, 1969. **50**(2): p. 200-8.

10. Mackay, I.R., et al., *The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 226-37.
11. Van de Water, J., et al., *The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase*. J Exp Med, 1988. **167**(6): p. 1791-9.
12. Yeaman, S.J., *The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances*. Biochem J, 1989. **257**(3): p. 625-32.
13. Koolman, J., Röhm, K.H., , *Taschenatlas der Biochemie*. 1994: p. 134.
14. Hanada, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma directly impair epithelial barrier function in cultured mouse cholangiocytes*. Liver Int, 2003. **23**(1): p. 3-11.
15. Kaplan, M.M., Gershwin, M.E., , *Primary Biliary Cirrhosis*. N. Engl. J. Med., 2005: p. 353:1261.
16. Klein R., B., P.A., , *Autoantibodies in Chronic Liver Diseases Clinical and diagnostic Relevance*. Klin.Lab. , 1993: p. 39:611 626.
17. Scheuer, P., *the histological diagnostic factor in primary biliary cirrhosis*. hepatology Rapid Literature Review 14, 1985: p. 11-13.
18. Portman, B., Popper, J., Neuberger,R., Williams, *Sequential and diagnostic features in primary biliary cirrhosis based on serial histological study in 209 patients*. Gastroenterology, 1985: p. 1777-1790.
19. Nishio, A., Keefe, E.B., Ishibashi, H., Gershwin, E.M., *Diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis*. Clin Exp Med. , 2001: p. 1(4):165 78.
20. Hatzis, G.S., et al., *Prevalence and longterm course of primary biliary cirrhosis in primary Sjogren's syndrome*. J Rheumatol, 2008. **35**(10): p. 2012-6.

21. Murray-Lyon, I.M., Thompson, R. P., Ansell, I. D., and Williams, R., *Scleroderma and Primary Biliary Cirrhosis*. Br.Med.J. 1-8-, 1970: p. 1(717):258-9.
22. Powell, F.C., Schroeter, A. L., and Dickson, E. R., *Primary Biliary Cirrhosis and the CREST Syndrome: a Report of 22 Cases*. Q.J.Med., 1987: p. 62(237):75-82.
23. Watt, F.E., O.F. James, and D.E. Jones, *Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study*. QJM, 2004. **97**(7): p. 397-406.
24. Leuschner, U., *Primary Biliary Cirrhosis--Presentation and Diagnosis*. Clin.Liver Dis., 2003: p. 7(4):741-58.
25. Scheuer, P., *Primary Biliary Cirrhosis*. Proc. R. Soc. Med 1967 Dec: p. 60(12):1257 1260:.
26. Dahlan, Y., Smith, L., Simmonds, D. et al. , *Pediatric onset primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 2003: p. 125:1476.
27. Prince, M.I. and O.F. James, *The epidemiology of primary biliary cirrhosis*. Clin Liver Dis, 2003. **7**(4): p. 795-819.
28. Parikh-Patel. A., G., E., Mackay, I., Gershwin, M.E. , *The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: contrasts and comparisons with the spectrum of autoimmune diseases*. Clin Immunol. , 1999: p. 91(2):206 18.
29. Lazaridis, K., Talwalkar, J., *Clinical Epidemiology of Primary Biliary Cirrhosis Incidence, Prevalence, and Impact of Therapy*. J Clin Gastroenterol., 2007: p. 41(5):494 500.
30. Kim, W., Lindor, KD, Locke III, GR, et al. , *Epidemiologie and nature history of primary biliary cirrhosis in a U.S. community*. Gastroenterology, 2000: p. 119:1631.
31. Sood, S., Gow, PJ, Christie, JM, Angus, PW, *Epidemiology of primary biliary Cirrhosis in Victoria, Australia: High prevalence in migrant population*. Gastroenterology 2004: p. 127:470.

32. Kingham, J., Parker, DR., , *The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: a study of relative prevalence* Gut, 1998: p. 42:120.
33. Witt-Sullivan, H., Heathcote, J., Cauch, K., et al., *The demography of primary biliary cirrhosis, Cirrhosis in Ontario, Canada*. Hepatology, 1990: p. 12:98.
34. Watson, R., Angus, PW., Dewar, M., et al., *Low prevalence of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia. Melbourne Liver Group*. Gut, 1995: p. 12:98.
35. Peters MG, D.B.A., Kowdley KV, Flye NL, Luketic VA, Munoz SJ, Garcia-Tsao G, Boyer TD, Lake JR, Bonacini M, Combes B; PUMPS Group, *Differences between Caucasian, African American, and Hispanic patients with primary biliary cirrhosis in the United States*. Hepatology, 2007: p. 46(3):769-75.
36. GC., F., *Primary biliary cirrhosis in Asians: less common than in Europeans, but just as depressing*. J Gastroenterol Hepatol., 2008: p. 23(4):508-11.
37. Jones, D., *Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis*. Clin Liver Dis., 2008: p. 12(2):305 21.
38. Lazaridis, K.N. and J.A. Talwalkar, *Clinical epidemiology of primary biliary cirrhosis: incidence, prevalence, and impact of therapy*. J Clin Gastroenterol, 2007. **41**(5): p. 494-500.
39. Tanaka, A., et al., *Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(1): p. 8-15.
40. Jones, D.E., et al., *Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study*. J Hepatol, 1999. **30**(3): p. 402-7.
41. Bach, N. and F. Schaffner, *Familial primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 698-701.
42. Talwalkar, J.A. and K.D. Lindor, *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2003. **362**(9377): p. 53-61.

43. Miller, K.B., et al., *Genetic abnormalities of immunoregulation in primary biliary cirrhosis*. Am J Med, 1983. **75**(1): p. 75-80.
44. Galbraith, R.M., et al., *High prevalence of seroimmunologic abnormalities in relatives of patients with active chronic hepatitis or primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 1974. **290**(2): p. 63-9.
45. Caldwell, S.H., et al., *Antimitochondrial antibodies in kindreds of patients with primary biliary cirrhosis: antimitochondrial antibodies are unique to clinical disease and are absent in asymptomatic family members*. Hepatology, 1992. **16**(4): p. 899-905.
46. Underhill, J., et al., *Susceptibility to primary biliary cirrhosis is associated with the HLA-DR8-DQB1*0402 haplotype*. Hepatology, 1992. **16**(6): p. 1404-8.
47. Mella, J.G., et al., *Association of primary biliary cirrhosis with the allele HLA-DPB1*0301 in a German population*. Hepatology, 1995. **21**(2): p. 398-402.
48. Seki, T., et al., *Association of primary biliary cirrhosis with human leukocyte antigen DPB1*0501 in Japanese patients*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 73-8.
49. Juran, B.D., et al., *Interacting alleles of the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 563-70.
50. Invernizzi, P., et al., *Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2004. **363**(9408): p. 533-5.
51. Invernizzi, P., et al., *X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 575-8.
52. Gershwin, M.E., et al., *Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1194-202.

53. Zein, C.O., et al., *Smoking and increased severity of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis: A cross validated retrospective assessment*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1564-71.
54. Klein, R., Mündliche Überlieferung.
55. Roll, J., et al., *The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 1983. **308**(1): p. 1-7.
56. Springer, J., et al., *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 47-53.
57. Poupon, R.E., et al., *Quality of life in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2004. **40**(2): p. 489-94.
58. Newton, J.L., et al., *Fatigue in primary biliary cirrhosis is associated with excessive daytime somnolence*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 91-8.
59. Hollingsworth, K.G., et al., *Pilot study of peripheral muscle function in primary biliary cirrhosis: potential implications for fatigue pathogenesis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(9): p. 1041-8.
60. Mills, P.R., C.J. Skerrow, and R.M. MacKie, *Melanin pigmentation of the skin in primary biliary cirrhosis*. J Cutan Pathol, 1981. **8**(6): p. 404-10.
61. Koulentaki, M., Ioannidou, D., Stefanidou, M., et al., *Dermatological Manifestation in Primary Biliary Cirrhosis*. World J Gastroenterol: p. 101:541.
62. Lanspa, S.J., et al., *Pathogenesis of steatorrhea in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1985. **5**(5): p. 837-42.
63. Sorokin, A., J.L. Brown, and P.D. Thompson, *Primary biliary cirrhosis, hyperlipidemia, and atherosclerotic risk: a systematic review*. Atherosclerosis, 2007. **194**(2): p. 293-9.
64. Jahn, C.E., et al., *Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification*. Gastroenterology, 1985. **89**(6): p. 1266-78.

65. Newton, J.L., et al., *Cognitive impairment in primary biliary cirrhosis: symptom impact and potential etiology*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 541-9.
66. Long, R.G., P.J. Scheuer, and S. Sherlock, *Presentation and course of asymptomatic primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1977. **72**(6): p. 1204-7.
67. Balasubramaniam, K., et al., *Diminished survival in asymptomatic primary biliary cirrhosis. A prospective study*. Gastroenterology, 1990. **98**(6): p. 1567-71.
68. Tornay, A.S., Jr., *Primary biliary cirrhosis: natural history*. Am J Gastroenterol, 1980. **73**(3): p. 223-6.
69. Prince, M.I., et al., *Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort*. Gut, 2004. **53**(6): p. 865-70.
70. Reshetnyak, V.I., *Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(45): p. 7250-62.
71. Jones, D.E., et al., *Bacterial motif DNA as an adjuvant for the breakdown of immune self-tolerance to pyruvate dehydrogenase complex*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 679-86.
72. Berg PA, K.R., *Immunology of primary biliary cirrhosis*. Baillieres Clin Gastroenterol. , 1987: p. 1(3):675-706.
73. Nickowitz, R.E. and H.J. Worman, *Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2237-42.
74. Muratori, P., et al., *Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(2): p. 431-7.
75. Nishio, A., et al., *Diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis*. Med Sci Monit, 2000. **6**(1): p. 181-93.

76. Christensen, E., et al., *Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients*. Gastroenterology, 1980. **78**(2): p. 236-46.
77. Dickson, E.R., et al., *Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making*. Hepatology, 1989. **10**(1): p. 1-7.
78. Klein, R., Berg, P.A., *Immunopathien der Leber*. Baenkler, H.-W. Medizinische Immunologie. Landsberg: ecomed; 1995: p. pp.14-33.
79. Yamazaki, K., et al., *Eosinophilia in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1996. **91**(3): p. 516-22.
80. Terasaki, S., et al., *Eosinophilic infiltration of the liver in primary biliary cirrhosis: a morphological study*. Hepatology, 1993. **17**(2): p. 206-12.
81. Poupon, R.E., et al., *Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1993. **17**(4): p. 577-82.
82. Poupon, R.E., et al., *Predictive factors in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cirrhosis: role of serum markers of connective tissue*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 635-40.
83. Heathcote, E.J., *Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines*. Hepatology, 2000: p. 31(4):1005-13.
84. Lindor, K., *Ursodeoxycholic acid for the treatment of primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2007: p. 357: 1524–1529.
85. Pares, A., L. Caballeria, and J. Rodes, *Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 715-20.
86. Poupon, R., *[Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary liver cirrhosis]*. Gastroenterol Clin Biol, 1994. **18**(2 Pt 3): p. T5-8.

87. Terasaki, S., et al., *Hepatocellular and biliary expression of HLA antigens in primary biliary cirrhosis before and after ursodeoxycholic acid therapy*. Am J Gastroenterol, 1991. **86**(9): p. 1194-9.
88. Vuoristo, M., et al., *A placebo-controlled trial of primary biliary cirrhosis treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1470-8.
89. Yoshikawa, M., et al., *Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 358-64.
90. Angulo, P., et al., *Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1999. **29**(3): p. 644-7.
91. Siegel, J.L., et al., *Treatment with ursodeoxycholic acid is associated with weight gain in patients with primary biliary cirrhosis*. J Clin Gastroenterol, 2003. **37**(2): p. 183-5.
92. Poupon, R., et al., *Genetic factors of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2008. **49**(6): p. 1038-45.
93. Cronstein, B.N., D. Naime, and E. Ostad, *The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2675-82.
94. Kaplan, M.M., R.A. DeLellis, and H.J. Wolfe, *Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment*. Ann Intern Med, 1997. **126**(9): p. 682-8.
95. Bonis, P.A. and M. Kaplan, *Methotrexate improves biochemical tests in patients with primary biliary cirrhosis who respond incompletely to ursodiol*. Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 395-9.
96. Hendrickse, M.T., et al., *Low-dose methotrexate is ineffective in primary biliary cirrhosis: long-term results of a placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 400-7.
97. Bach, N., et al., *Methotrexate therapy for primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(1): p. 187-93.

98. Combes, B., et al., *Methotrexate (MTX) plus ursodeoxycholic acid (UDCA) in the treatment of primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2005. **42**(5): p. 1184-93.
99. Wangoo, A., et al., *Modulation of platelet-derived growth factor B mRNA abundance in macrophages by colchicine and dibutyryl-cAMP*. *Mol Pharmacol*, 1992. **42**(4): p. 584-9.
100. Kershenovich, D., et al., *Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1990. **11**(2): p. 205-9.
101. Miller, L.C. and M.M. Kaplan, *Serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha in primary biliary cirrhosis: decrease by colchicine and relationship to HLA-DR4*. *Am J Gastroenterol*, 1992. **87**(4): p. 465-70.
102. Gong, Y. and C. Gluud, *Colchicine for primary biliary cirrhosis: a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review of randomized clinical trials*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(8): p. 1876-85.
103. Mitchison, H.C., et al., *A controlled trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis. Three-year results*. *J Hepatol*, 1992. **15**(3): p. 336-44.
104. Angulo, P., et al., *Silymarin in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid*. *Hepatology*, 2000. **32**(5): p. 897-900.
105. Christensen, E., et al., *Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial*. *Gastroenterology*, 1985. **89**(5): p. 1084-91.
106. Gong, Y., E. Christensen, and C. Gluud, *Azathioprine for primary biliary cirrhosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(3): p. CD006000.
107. Gong, Y., S.L. Klingenberg, and C. Gluud, *Systematic review and meta-analysis: D-Penicillamine vs. placebo/no intervention in patients with primary biliary cirrhosis--Cochrane Hepato-Biliary Group*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **24**(11-12): p. 1535-44.

108. Minuk, G.Y., et al., *Pilot study of cyclosporin A in patients with symptomatic primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1988. **95**(5): p. 1356-63.
109. Lombard, M., et al., *Cyclosporin A treatment in primary biliary cirrhosis: results of a long-term placebo controlled trial*. Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 519-26.
110. Markus, B.H., et al., *Efficiency of liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 1989. **320**(26): p. 1709-13.
111. Griffin, M.D., et al., *Prolonged anuria complicating primary sclerosing cholangitis: successful outcome following orthotopic liver transplantation*. Am J Kidney Dis, 1998. **31**(2): p. 360-3.
112. Ishibashi, H., S. Shimoda, and M.E. Gershwin, *The immune response to mitochondrial autoantigens*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(3): p. 337-46.
113. Polson, R.J., et al., *Evidence for disease recurrence after liver transplantation for primary biliary cirrhosis. Clinical and histologic follow-up studies*. Gastroenterology, 1989. **97**(3): p. 715-25.
114. Balan, V., et al., *Histological evidence for recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplantation*. Hepatology, 1993. **18**(6): p. 1392-8.
115. Neuberger, J., et al., *Immunosuppression affects the rate of recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation*. Liver Transpl, 2004. **10**(4): p. 488-91.
116. Luettig, B., et al., *The antinuclear autoantibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1998. **28**(5): p. 824-8.
117. Dubel, L., et al., *Kinetics of anti-M2 antibodies after liver transplantation for primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1995. **23**(6): p. 674-80.
118. Charatchoenwittaya, P., et al., *Long-term survival and impact of ursodeoxycholic acid treatment for recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation*. Liver Transpl, 2007. **13**(9): p. 1236-45.

119. Prince, M., et al., *Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1044-51.
120. Mahl, T.C., W. Shockcor, and J.L. Boyer, *Primary biliary cirrhosis: survival of a large cohort of symptomatic and asymptomatic patients followed for 24 years*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 707-13.
121. Yang, W.H., et al., *Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(12): p. 1116-22.
122. Klein, R. and P.A. Berg, *[Prognostic significance of antimitochondrial antibody profiles A-D in primary biliary cirrhosis]*. Dtsch Med Wochenschr, 1988. **113**(40): p. 1549-53.
123. Berg, C.P., et al., *Apoptosis-associated antigens recognized by autoantibodies in patients with the autoimmune liver disease primary biliary cirrhosis*. Apoptosis, 2008. **13**(1): p. 63-75.
124. Kouroumalis, E. and G. Notas, *Pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a unifying model*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(15): p. 2320-7.
125. Butler P, H.-M.J., Baum H, Burroughs AK, *Detection of M2 antibodies in patients with recurrent urinary tract infection using an ELISA and purified PBC specific antigens. Evidence for a molecular mimicry mechanism in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis?* Biochem Mol Biol Int 1995: p. 35: 473-485.
126. Jones, D., *Pathogenesis of primary biliary Cirrhosis*. Hepatology, 2005: p. 30:639.
127. Gershwin, M., Selmi, C., Worman, HJ., et al., *Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: A controlled interview-based study of 1032 patients* Hepatology, 2005: p. 42:1194.
128. Berg, C.P., et al., *Mycoplasma antigens as a possible trigger for the induction of antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. Liver Int, 2009. **29**(6): p. 797-809.

129. Junge, W., et al., *Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F0F1-ATPase*. FEBS Lett, 2001. **504**(3): p. 152-60.
130. Mason, A. and S. Nair, *Primary biliary cirrhosis: new thoughts on pathophysiology and treatment*. Curr Gastroenterol Rep, 2002. **4**(1): p. 45-51.
131. Gershwin, M.E., et al., *Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 210-25.
132. Selmi, C., et al., *Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1250-7.
133. Walden, H.R., et al., *Xenobiotic incorporation into pyruvate dehydrogenase complex can occur via the exogenous lipoylation pathway*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1874-84.
134. Kaplan, M.M., *Novosphingobium aromaticivorans: a potential initiator of primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(11): p. 2147-9.
135. Leung, P.S., et al., *Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5326-32.
136. Amano, K., et al., *Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5874-83.
137. Christiani, L.A., et al., *Severe tricuspid stenosis during percutaneous occlusion of perimembranous ventricular septal defect with the new Amplatzer device*. Congenit Heart Dis, 2006. **1**(5): p. 239-43.
138. Jorge, A.D., et al., *Steroid receptors and heat-shock proteins in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1108-14.
139. Trauner, M., P. Fickert, and M. Wagner, *MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(1): p. 77-98.

140. Trauner, M., et al., *Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(4 Suppl 2): p. S111-24.
141. Neuman, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(2): p. 196-202.
142. Jones, D.E., et al., *Experimental autoimmune cholangitis: a mouse model of immune-mediated cholangiopathy*. Liver, 2000. **20**(5): p. 351-6.
143. Tanaka, A., et al., *Mucosal immunity and primary biliary cirrhosis: presence of antimitochondrial antibodies in urine*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 910-5.
144. Berg, P.A. and R. Klein, *Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited*. Liver, 1995. **15**(6): p. 281-92.
145. Berg, P.A. and R. Klein, *Mitochondrial antigens and autoantibodies: from anti-M1 to anti-M9*. Klin Wochenschr, 1986. **64**(19): p. 897-909.
146. Berg PA, K.R., *Autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. Springer Semin Immunopathol, 1990: p. 12: 85-99.
147. Lindenborn-Fotinos, J., H. Baum, and P.A. Berg, *Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: species and nonspecies specific determinants of M2 antigen*. Hepatology, 1985. **5**(5): p. 763-9.
148. Feuchtinger, M., et al., *Detection of novel non-M2-related antimitochondrial antibodies in patients with anti-M2 negative primary biliary cirrhosis*. Gut, 2009. **58**(7): p. 983-9.
149. Berg, P.A., et al., *Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the use of two different types of antimitochondrial antibodies*. Lancet, 1980. **2**(8208-8209): p. 1329-32.
150. Berg, C.P., et al., *Demonstration of PDC-E1 subunits as major antigens in the complement-fixing fraction M4 and re-evaluation of PDC-E1-specific antibodies in PBC patients*. Liver Int, 2006. **26**(7): p. 846-55.

151. Klein, R. and P.A. Berg, *Anti-M4 antibodies in primary biliary cirrhosis react with sulphite oxidase, an enzyme of the mitochondrial inter-membrane space*. Clin Exp Immunol, 1991. **84**(3): p. 445-8.
152. Klein, R., et al., *High antibody levels against mouse laminin with specificity for galactosyl-(alpha 1-3)galactose in patients with inner ear diseases*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1989. **98**(7 Pt 1): p. 537-42.
153. Tuailleon, N., et al., *A lipoyl synthetic octadecapeptide of dihydrolipoamide acetyltransferase specifically recognized by anti-M2 autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 445-50.
154. Davis, P.A., et al., *M4 and M9 antibodies in the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis: epitopes or epiphenomena?* Hepatology, 1992. **16**(5): p. 1128-36.
155. Palmer, J.M., et al., *M4 and M9 autoantigens in primary biliary cirrhosis--a negative study*. J Hepatol, 1993. **18**(2): p. 251-4.
156. Preuss B, B.C., Altenberend F, Gregor M, Stevanovic S, Klein R., *Demonstration of autoantibodies to recombinant human sulphite oxidase in patients with chronic liver disorders and analysis of their clinical relevance*. Clin Exp Immunol., 2007: p. 150(2):312-21.
157. Mattevi A, O.G., Kalk KH, Teplyakov A, Hol WG "Crystallographic analysis of substrate binding and catalysis in dihydrolipoyl transacetylase (E2p)". Biochemistry, 1993. **32 (15): 3887-901**.
158. Koike, K., H. Ishibashi, and M. Koike, *Immunoreactivity of porcine heart dihydrolipoamide acetyl- and succinyl-transferases (PDC-E2, OGDC-E2) with primary biliary cirrhosis sera: characterization of the autoantigenic region and effects of enzymatic delipoylation and relipoylation*. Hepatology, 1998. **27**(6): p. 1467-74.
159. Fussey, S.P., et al., *Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with Escherichia coli dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p): characterization of the main immunogenic region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 3987-91.
160. Rowley, M.J., et al., *Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3413-9.

161. Fussey, S.P., et al., *Characterisation of the reactivity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. FEBS Lett, 1989. **246**(1-2): p. 49-53.
162. Surh, C.D., R. Coppel, and M.E. Gershwin, *Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope*. J Immunol, 1990. **144**(9): p. 3367-74.
163. Flannery, G.R., et al., *Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis recognize both specific peptides and shared epitopes of the M2 family of antigens*. Hepatology, 1989. **10**(3): p. 370-4.
164. Bellucci, R., et al., *Differential epitope mapping of antibodies to PDC-E2 in patients with hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and primary biliary cirrhosis*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2001-7.
165. Chen, Q.Y., et al., *Natural and disease associated autoantibodies to the autoantigen, dihydrolipoamide acetyltransferase, recognise different epitopes*. J Autoimmun, 1998. **11**(2): p. 151-61.
166. Kilshaw, P.J., et al., *Studies on the specificity of antibodies to ovalbumin in normal human serum: technical considerations in the use of ELISA methods*. Clin Exp Immunol, 1986. **66**(2): p. 481-9.
167. Mattevi, A., et al., *Refined crystal structure of the catalytic domain of dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p) from Azotobacter vinelandii at 2.6 Å resolution*. J Mol Biol, 1993. **230**(4): p. 1183-99.
168. Reed, L.J. and M.L. Hackert, *Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 8971-4.
169. Jois, J., et al., *Enzyme inhibitory antibody to pyruvate dehydrogenase: diagnostic utility in primary biliary cirrhosis*. Ann Clin Biochem, 2000. **37** (Pt 1): p. 67-73.
170. Robertson, C.A., et al., *The relative affinity of recombinant dihydrolipoamide acetyltransferase for autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1990. **11**(5): p. 717-22.

171. Teoh, K.L., et al., *Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis differ for mammalian, yeast and bacterial enzymes: implications for molecular mimicry*. Hepatology, 1994. **19**(4): p. 1029-33.
172. Van de Water, J., et al., *Autoantibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acetyltransferase and inhibit enzyme function*. J Immunol, 1988. **141**(7): p. 2321-4.
173. Bogdanos, D.P. and G.N. Dalekos, *Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s*. Curr Med Chem, 2008. **15**(22): p. 2285-92.
174. Xu, L., et al., *Cloning the human betaretrovirus proviral genome from patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 151-6.
175. van Os, E., et al., *Depression in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2007. **46**(6): p. 1099-103.
176. Jones, D.E., et al., *Four year follow up of fatigue in a geographically defined primary biliary cirrhosis patient cohort*. Gut, 2006. **55**(4): p. 536-41.
177. Biagini, M.R., et al., *Muscle fatigue in women with primary biliary cirrhosis: Spectral analysis of surface electromyography*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(32): p. 5186-90.
178. Newton, J.L., et al., *Autonomic dysfunction in primary biliary cirrhosis correlates with fatigue severity*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007. **19**(2): p. 125-32.
179. Blundell, T.L., et al., *Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules*. Nature, 1987. **326**(6111): p. 347-52.
180. Horsfall, A.C., et al., *Epitope mapping*. Immunol Today, 1991. **12**(7): p. 211-3.
181. Mahler, M., M. Bluthner, and K.M. Pollard, *Advances in B-cell epitope analysis of autoantigens in connective tissue diseases*. Clin Immunol, 2003. **107**(2): p. 65-79.

182. Immunology, C.A.J., (5. Auflage).
183. Ghadiminejad I, B.H., *Discrimination between M2 and M4 antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. Biosci Rep. 1986 Dec, 1986.
184. Fusconi M, G.I., Bianchi FB, Baum H, Bottazzo GF, Pisi E., *Heterogeneity of antimitochondrial antibodies with the M2-M4 pattern by immunofluorescence as assessed by Western immunoblotting and enzyme linked immunosorbent assay*. Gut, 1988: p. 29(4):440-7.
185. Ono, H.e.a., *Evidence for participation of the inner membrane in the import of sulfite oxidase into the intermembrane space of liver mitochondria*. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982.
186. OMIM, O.M.I.i.M., Homepage der Johns Hopkins University. MIM ID +276 000.
187. *Wikipedia.org*.
188. Flisiak, R., et al., *High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(36): p. 5706-9.
189. Preuss, B., et al., *Demonstration of autoantibodies to recombinant human sulphite oxidase in patients with chronic liver disorders and analysis of their clinical relevance*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(2): p. 312-21.
190. Tuohy, V.K., et al., *The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Immunol Rev, 1998. **164**: p. 93-100.
191. Tuohy, V.K. and R.P. Kinkel, *Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2000. **48**(5): p. 347-51.
192. *Google - Strukturformel 2-Octyonicssäure*.

7. Danksagung

Im Besonderen möchte ich Frau Prof. Dr. Reinhild Klein danken, dass sie mich nach erstem Ablehnen aufgrund mangelnder Kapazitäten nach einem halben Jahr als Doktorandin angenommen haben. Sie standen mir stets bei allen Fragen sehr geduldig zu Seite, wussten einen, selbst wenn man kurz vor der Verzweiflung stand, immer zu motivieren. Ich hatte stets das Gefühl in guten Händen zu sein. Vielen Dank für Alles.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Immunpathologischen Labors für die Unterstützung in jeglichen Angelegenheiten und die vielen humorvollen Labortage bedanken. Ich bin immer gerne in das Labor gegangen und habe mich in dem Team sehr wohl gefühlt. Mein besonderer Dank geht an Elwira Herdt für die Einweisung in den ELISA und an Silke Tamasii für die Einweisung in die KBR, an Sandra Plankenhorn (Buck), die bereitwillig die PBC-Seren mit mir teilte und an Maja Wilczek, Tanja Flohr, Gülay Demirel, Beate Preuss und Radmila Maksimovic, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ausserdem möchte ich mich noch bei den wenigen männlichen Mitwirkenden im Impala-Labor bedanken, wie Thomas Müntefering und Daniel Hirnet, die mir ebenso wann immer möglich bei Organisatorischem unter die Arme griffen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglichten und mich stets unterstützen.

Des Weiteren danke ich Philipp Geiger, der mir mit viel Geduld bei den statistischen Auswertungen behilflich war. Andreas Haag, der trotz Abgabestress der eigenen Diplomarbeit meine Doktorarbeit Korrektur gelesen hat und Guy Goren, der mich während des Schreibens stets motivierte.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sandra Daniela Braun
Geburtstag: 25.02.1983
Geburtsort: Schwäbisch Gmünd
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Berufserfahrung:

2011 / 10 – aktuell Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin in dem „Maria von den Aposteln“ Klinikum Neuwerk in Mönchengladbach

2011 / 03 - 07 Forschungsaufenthalt in dem Legacy Heritage Clinical Research Institute of Rambam (LHCRIR) in Haifa, Israel bei Prof. Derek LeRoith

2010 / 12 – 2011 / 2 Fertigstellen der Doktorarbeit

2010 / 04 – 09 Assistenzärztin in der Allgemein- & Viszeralchirurgie und der Unfallchirurgie in der Asklepios Klinik in Lindau

Promotion:

2008 - 2012 bei Prof. Dr. Reinhild Klein, Immunpathologisches Labor, Universitätsklinikum Tübingen

Publikationen:

2011 – August Braun Sandra, Bitton-Worms Keren, LeRoith Derek (2011) The Link between the Metabolic Syndrome and Cancer. *International Journal of Biological Sciences*.

2010 - Februar Braun S., Klein R. (2010) The catalytic domain of PDC-E2 contains epitopes recognized by AMA in PBC. *World Journal Gastroenterology*.

Hochschulausbildung:

2003 - 2009 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität Tübingen

2009 / 03. Dezember Approbation

2009 / 19. November 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (neueAO), Note „gut“

2005 / 31. August Physikum, Note „gut“

Praktisches Jahr:

2009 / 04 – 07

Neurologie, Neurodegenerative Station und Stroke Unit, Universitätsklinikum Tübingen

2009 / 02 - 03

Innere Medizin, Sub-Internships in Critical Care Medicine und Clinical Medicine and Oncology, Memorial Sloan Kettering Hospital in New York City, USA

2008 / 12 - 2009 / 01

Innere Medizin, Notaufnahme, Universitätsklinikum Tübingen

2008 / 08 - 12

Chirurgie, Neurochirurgie, Viszeral-, HTG- und orthopädische Chirurgie, Kindertraumatologie, Hospital Carlos Haya in Malaga, Spanien**Famulaturen:**

2007 / 09 -10

Neurologie, Praxisfamulatur mit Rotation in die Neurochirurgie des Presbyterian Hospitals in New York City, USA

2007 / 08

Neurologie und *Chirurgie*, USP Klinikum Marbella, Spanien

2006 / 08

Innere Medizin, Angiologie, Universitätsklinikum Tübingen

2006 / 03

Gynäkologie / Geburtshilfe, Vivantes Klinikum Berlin**Freiwilliges Soziales Jahr:**

2002 - 2003

DRK Ludwigsburg, Rettungssanitäterin

Schulbildung:

1989 - 2002

Grundschule & Gymnasium in Heubach, Abitur Note 2,6

Sprachen:

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Spanisch (fließend), Hebräisch (Grundkenntnisse)