

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

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

**Bedeutung von Autoantikörpern gegen die  
Gallensalzexportpumpe bei Patienten mit autoimmunen  
und anderen chronischen Lebererkrankungen**

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

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

**vorgelegt von**

**Schiller, Johannes Florian**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 06.12.2021

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Gallenflüssigkeit und Gallensalze	1
1.1.1	Funktion und Bedeutung	1
1.1.2	Bildung und hepatobiliärer Transport	2
1.2	Bile Salt Export Pump (BSEP)	4
1.2.1	ABC-Transporter Familie	4
1.2.2	Struktur der BSEP	4
1.2.3	Funktion der BSEP	7
1.2.4	Wirkung von Medikamenten auf die Funktion der BSEP	8
1.2.5	Wirkung von Lipopolysacchariden auf die Funktion der BSEP	9
1.2.6	Wirkung von Ursodeoxycholsäure auf die Funktion der BSEP	10
1.3	Cholestase	10
1.3.1	Definition	10
1.3.2	Symptome und Diagnostik	11
1.4	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2	11
1.5	Autoimmune Lebererkrankungen	13
1.5.1	Primär-biliäre Cholangitis	13
1.5.2	Primär-sklerosierende Cholangitis	14
1.5.3	Autoimmune Hepatitis	15
1.6	Ziel der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Patienten und Kontrollen	18
2.1.1	Erhebung klinischer Daten	21
2.2	Materialien	22
2.2.1	Geräte und Laborbedarf	22
2.2.2	Chemikalien und Reagenzien	23
2.2.3	Zellen	25
2.2.4	Antikörper	25
2.2.5	Vesikel für Western Blot und Transporter Assay	26

2.2.6	Peptide für ELISA _____	27
2.2.7	Molekulargewichtsmarker für Western Blot _____	27
2.2.8	Puffer und Lösungen _____	27
2.3	Methoden _____	29
2.3.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) _____	29
2.3.2	Zellkulturen von TFK-1, Huh-7, HepG2- und HSG-Zelllinien _____	31
2.3.3	Isolierung von Plasmamembranen aus Zellkulturen _____	33
2.3.4	Western Blot _____	34
2.3.5	Färbung der Polyacrylamid-Gele _____	37
2.3.6	Protein Reinigung – Elektroelution _____	38
2.3.7	Proteinbestimmung nach Bradford _____	39
2.3.8	Proteomanalyse der Polyacrylamid Gel Banden _____	39
2.3.9	Ammoniumsulfatfällung _____	40
2.3.10	Vesikulärer Transporter Assay _____	40
2.3.11	Statistische Methoden _____	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse _____</b>	<b>45</b>
3.1	Nachweis von BSEP Protein in der Plasmamembran von HepG2 und Huh7 Zellen mittels Western Blot _____	45
3.2	Detektion von Antikörperreaktionen gegen den ersten extrazellulären Loop (ECL1) des BSEP Proteins mittels ELISA _____	46
3.3	Detektion von Antikörpern gegen die Gallensalzexportpumpe BSEP unter der Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln _____	49
3.3.1	ELISA Ergebnisse mit SF9-BSEP Vesikeln als Antigen _____	49
3.3.2	Ergebnisse des Western Blots unter Verwendung von SF9-BSEP-Vesikeln als Antigen _____	50
3.3.3	Ergebnisse der Proteomanalyse der Gelbanden mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie _____	53
3.3.4	Nachweis von Antikörperreaktionen gegen Proteine der Gelbanden im ELISA _____	55
3.3.5	Ergebnisse des Transporter Assays mit SF9-BSEP Vesikeln _____	57
3.4	Ausschluss von Kreuzreaktionen von Anti-CFTR Autoantikörpern mit der BSEP mittels Western Blot _____	60

3.5	Klinische Merkmale der Patienten mit spezifischer Anti-BSEP-Reaktion im Western Blot	61
3.5.1	Klinische Daten der im Western Blot Anti-BSEP positiven Patienten	61
3.5.2	Vergleich der klinischen Daten	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Bisher verwendete Methoden zum Anti-BSEP Antikörper Nachweis	64
4.2	Spezifität eines ELISA unter Verwendung des ersten extrazellulären Loops zum Nachweis von Autoantikörpern gegen die BSEP	67
4.3	Spezifität eines Western Blots unter Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln zum Nachweis von Anti-BSEP Antikörpern	68
4.4	Spezifität eines Vesikulären Transporter Assays unter Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln zum Nachweis funktioneller Anti-BSEP Antikörpern	70
4.5	Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Primär-biliärer Cholangitis	71
4.6	Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Primär-sklerosierender Cholangitis	71
4.7	Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Sjögren Syndrom	72
4.8	Schlussfolgerung	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

Der Gallensäurestoffwechsel ist von zentraler Bedeutung für den menschlichen Organismus. Wichtiger Bestandteil des Stoffwechsels ist die in der Leber exprimierte Gallensalzexportpumpe („Bile Salt Export Pump“ [BSEP]). Störungen in diesem Transportsystem haben schwerwiegende Folgen für die betroffenen Patienten, da sie zu cholestatischen Lebererkrankungen oder sogar zu Leberzirrhose führen können (Kubitz et al. 2012). Es ist bekannt, dass einige Medikamente die Funktion des Transporters stören können (Zhang et al. 2016). Außerdem wurden bei Patienten mit progressiver familiärer intrahepatischer Cholestase Typ 2 (PFIC2) Antikörper beschrieben, die mit der Gallensalzexportpumpe BSEP interagieren (Keitel et al. 2009; Jara et al. 2009; Stindt et al. 2016). In der vorliegenden Studie sollen weitere Patienten mit unterschiedlichen cholestatischen und autoimmunen Lebererkrankungen auf das Vorkommen solcher Anti-BSEP Autoantikörper untersucht werden. Im Folgenden werden die dafür wichtigen wissenschaftlichen Grundlagen erläutert und bereits durchgeführte Studien präsentiert.

## 1.1 Gallenflüssigkeit und Gallensalze

### 1.1.1 Funktion und Bedeutung

In der Leber werden jeden Tag etwa 600 ml Gallenflüssigkeit produziert (Esteller 2008). Die Galle erfüllt beim Menschen einige wichtige Aufgaben. Neben der Ausscheidung von potenziell toxischen, exogenen, lipophilen Stoffen dient die Galle der Ausscheidung gallenpflichtiger Substanzen, wie Cholesterin oder Bilirubin (Boyer 2013). Außerdem spielt die Galle bei der Aufnahme von lipophilen Stoffen eine wichtige Rolle. Wichtigster Bestandteil hierfür sind die in den Hepatozyten produzierten Gallensalze (GS) bzw. Gallensäuren (Boyer 2013). Im menschlichen Körper liegen sie überwiegend in ihrer konjugierten, wasserlöslichen Form, als Gallensalz vor (Maldonado-Valderrama et al. 2011). Gallensalze bestehen aus einem lipophilen und einem hydrophilen Anteil. Dadurch sind sie amphiphil und können als Emulgatoren wirken (Maldonado-

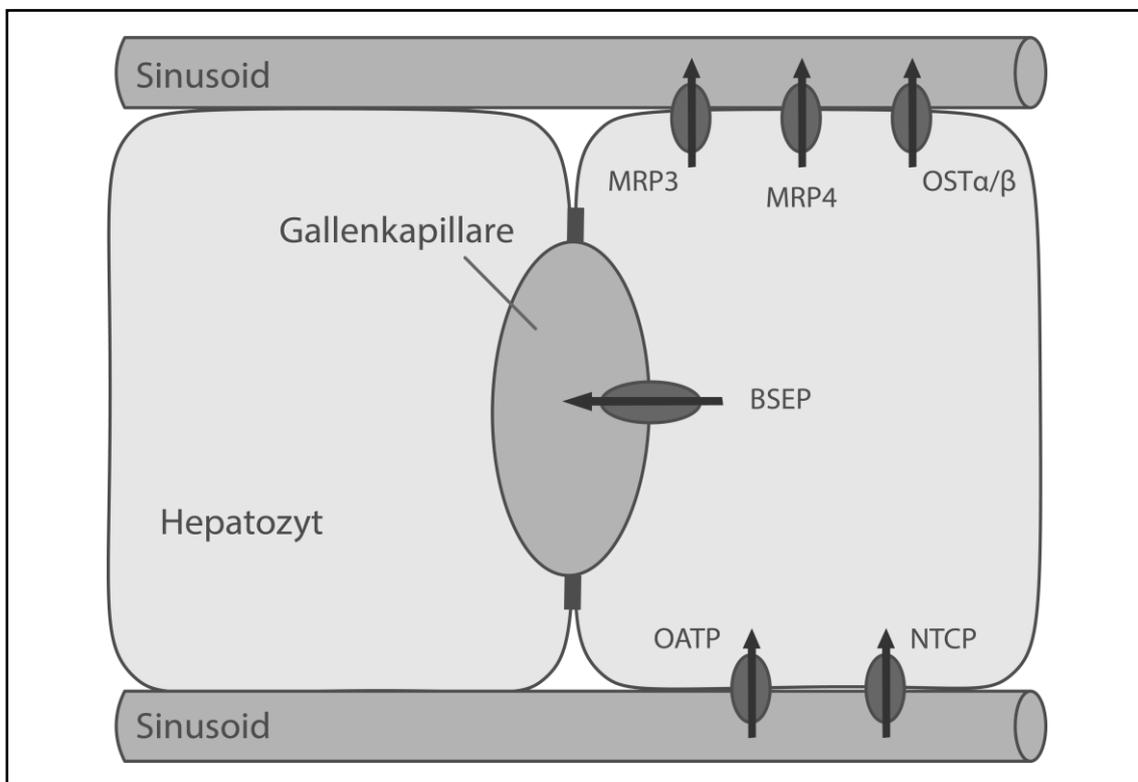
Valderrama et al. 2011). Dies ist entscheidend für die Fettverdauung. Im Darm-lumen bilden die Gallensalze mit den schwer wasserlöslichen Bestandteilen der Lipolyse sogenannte Mizellen. Diese Mizellen sind notwendig, damit lipophile Substanzen im Darm resorbiert werden können (Maldonado-Valderrama et al. 2011). Gallensalze sind also von zentraler Bedeutung, um eine ausreichende Aufnahme von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen aus der Nahrung zu ermöglichen.

### **1.1.2 Bildung und hepatobiliärer Transport**

Die primären Gallensalze Cholat und Chenodesoxycholat werden in den Hepatozyten aus Cholesterin gebildet (Ferdinandusse et al. 2009). Anschließend werden sie mit Taurin oder Glycin konjugiert und damit wasserlöslicher. Dadurch können sie leichter ausgeschieden werden und sind außerdem weniger toxisch. Je hydrophober eine Gallensäure ist, desto schädlicher ist sie für die Zelle (Yang et al. 2013). Werden die Gallensalze in der Peripherie wieder dekonjugiert, bezeichnet man sie als sekundäre Gallensalze (Yang et al. 2013).

Die primären Gallensalze werden apikal durch die Gallensalzexportpumpe BSEP in das Lumen der Gallengänge sezerniert (siehe auch Kapitel 1.2). Hier bilden sie zusammen mit Cholesterin, Phospholipiden, Gallenfarbstoffen (v.a. Bilirubin), Wasser und Elektrolyten die Gallenflüssigkeit (Esteller 2008). Da die Menge an täglich sezernierten Gallensalzen die Menge an täglich synthetisier-ten Gallensalzen deutlich übersteigt, müssen diese reabsorbiert und wieder- verwendet werden (Yang et al. 2013). Die Reabsorption erfolgt im Dünndarm, für unkonjugierte Gallensalze passiv durch Diffusion und für konjugierte Gallen- salze (z.B. Tauro- oder Glykocholat) aktiv durch den Na<sup>+</sup>-Gallensalz-Symporter ASBT (active sodium bile salt transporter); (Yang et al. 2013). Die Gallensalze gelangen dann über das Pfortaderblut zur Leber und werden hier basolateral durch den Na<sup>+</sup>-Symporter Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) oder über Organo-Anion-Transporter (OATPs) in die Hepatozyten aufgenom- men (Yang et al. 2013).

Außerdem können Gallensalze auch basolateral aus den Hepatozyten in das Blut der Sinusoide gepumpt werden (Yang et al. 2013). Hierbei sind drei Transportproteine von Bedeutung: Die Multidrug Resistance-Associated Proteine MRP3 (ABCC3) und MRP4 (ABCC4) sowie der Organic Solute Transporter  $OST\alpha/\beta$  (Yang et al. 2013). Unter physiologischen Umständen ist der Anteil dieser Transporter am GS-Export sehr gering. Bei einer erhöhten intrazellulären Konzentration an GS werden diese Transportproteine jedoch verstärkt exprimiert und ihr Anteil am GS-Export steigt (Yang et al. 2013). Eine schematische Übersicht der Gallensalz Transporter ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Übersicht über die Gallensalz Transportproteine**

Abbildung in Anlehnung an Yang et al. (2013). Die Aufnahme der Gallensalze aus den Sinusoiden erfolgt durch den  $Na^+$ -Symporter NTCP oder durch Organo-Anion-Transporter OATP. Die biliäre Sekretion erfolgt durch die Gallensalz-exportpumpe BSEP. Basolateral können die Gallensalze durch die Multidrug Resistance-Associated Proteine MRP3/MRP4 oder den Organic Solute Transporter  $OST\alpha/\beta$  abgegeben werden. BSEP = Bile Salt Export Pump; MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein; NTCP =  $Na^+$ -taurocholate cotransporting peptide; OATP = Organo-Anion-Transporter;  $OST\alpha/\beta$  = Organic Solute Transporter (Yang et al. 2013).

## **1.2 Bile Salt Export Pump (BSEP)**

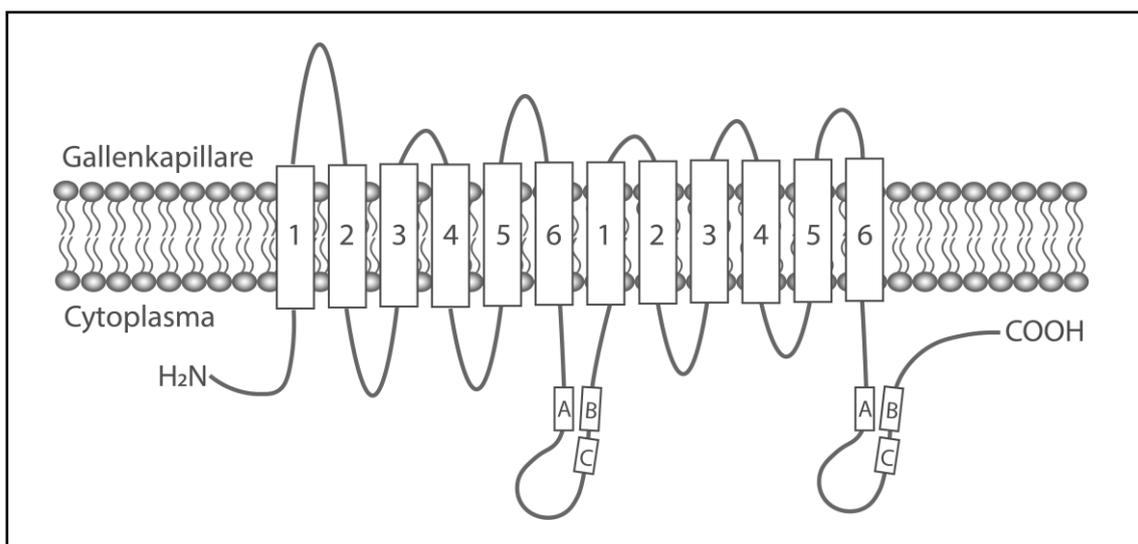
### **1.2.1 ABC-Transporter Familie**

Membran-Transportproteine können in passive und aktive Transporter unterteilt werden. Passive Transporter folgen einem Konzentrationsgradienten und benötigen dadurch keine Energie. Aktive Transporter hingegen nutzen Energie in Form von ATP, um Moleküle gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren (Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009). Zu diesen ATP-abhängigen Transportern zählen auch die ABC-Transportproteine. Diese lassen sich weiterhin in Importer und Exporter unterteilen, abhängig davon, in welche Richtung das Substrat in Bezug auf das Cytoplasma transportiert wird (Saurin, Hofnung, and Dassa 1999). Während Bakterien sowohl Importer als auch Exporter exprimieren, besitzen menschliche Zellen, bis auf wenige Ausnahmen, nur ABC-Transporter vom Export Typ (Wilkins 2015). Insgesamt gibt es 49 unterschiedliche humane ABC-Gene, welche in die sieben Subfamilien A bis G unterteilt werden können (Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009). BSEP (Synonym: ABCB11) zählt hier mit 10 weiteren Transportproteinen zu der Subfamilie B. Da zwei Transporter dieser Subfamilie an Mechanismen der Multiplen Drug Resistance (MDR) beteiligt sind, wird sie auch als MDR-Familie bezeichnet (Juliano and Ling 1976; Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009).

### **1.2.2 Struktur der BSEP**

Beim Menschen ist die genetische Information für die BSEP, ursprünglich auch „Sister of P-glycoprotein“ (SOPG) genannt, auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert (Strautnieks et al. 1997; Gerloff et al. 1998). Das Gen kodiert für ein Protein mit 1.321 Aminosäuren und einer molekularen Masse von ca. 146 kDa (Chan et al. 2018). Die BSEP (Uniprot ID O95342) besteht aus einem einzigen Polypeptid (Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009). Dieses Polypeptid enthält zwei Transmembrandomänen (TMD), mit jeweils sechs Transmembranhelices und zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBD); (Kubitz et al. 2012).

Die Struktur und die Aminosäuresequenz der NBDs sind bei allen ABC-Transportern identisch und daher charakteristisch für diese Transporter Familie (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001; Beis 2015). Jede NBD besteht aus zwei Subdomänen, einer katalytischen Kerndomäne und einer  $\alpha$ -helikalen Domäne (Beis 2015). Die katalytische Kerndomäne enthält zwei Aminosäuresequenzen für das Binden und die Hydrolyse von ATP, das Walker A-Motiv (P-Loop) und das Walker B-Motiv (Beis 2015). Die  $\alpha$ -helikale Domäne enthält das ABC-Signaturmotiv (auch C-Motiv), welches die Konsensussequenz LSGGQ enthält. Dieses ist ebenfalls an der Bindung des ATP Moleküls beteiligt (Beis 2015). Eine ATP-Bindungstasche wird von den Walker A- und B-Motiven einer katalytischen Kerndomäne und dem ABC-Signaturmotiv gebildet, so können zwei ATP-Moleküle binden und hydrolysiert werden (Beis 2015). Die molekulare Struktur der BSEP ist in Abbildung 2 dargestellt.

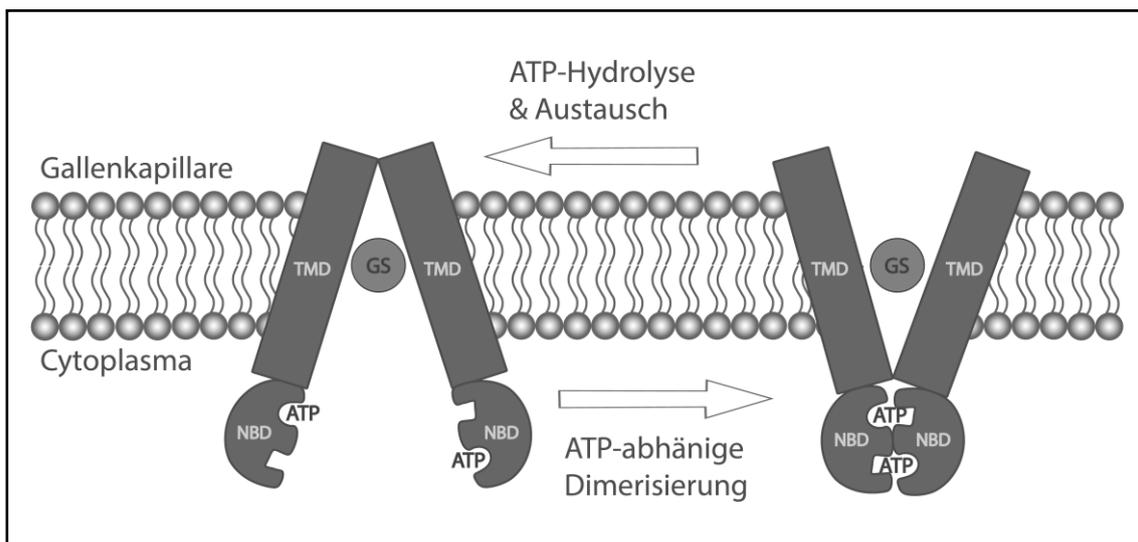


**Abbildung 2: Molekulare Struktur des ABCB11 Proteins (BSEP)**

*Abbildung in Anlehnung an Jansen and Muller (2000). A = Walker A-Motiv; B = Walker B-Motiv; C = ABC-Signaturmotiv (C-Motiv); H<sub>2</sub>N = N-terminale Aminogruppe; COOH = C-terminale Carboxylgruppe; 1-6 = sechs Transmembranhelices der Transmembrandomänen (Beis 2015).*

Die TMD bilden eine Tasche, durch die das Substrat transportiert wird. Die NBD befinden sich im Zytoplasma und generieren durch Dimerisierung und Hydrolyse von zwei ATP Molekülen die Energie für diesen Transport (Wilkins 2015; Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Für den Transport sind die vier Domänen

funktionell gekoppelt. Während die NBD kein ATP gebunden haben, ist die Substrat-Bindungstasche zum Cytoplasma hin geöffnet, die GS können sich anlagern. Wenn die NBD zwei ATP-Moleküle gebunden haben und sich zusammenlagern, kommt es bei den TMD zu einer Konformationsänderung und die Substrat-Bindungstasche öffnet sich zum extrazellulären Raum, die GS werden abgegeben (Procko et al. 2009). Der schematische Ablauf des Gallensalzexports durch die BSEP ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Funktionsweise der Gallensalzexportpumpe BSEP**

Abbildung in Anlehnung an Procko et al. (2009). Die ATP-abhängige Dimerisierung der NBD liefert die Energie für eine Konformationsänderung der TMD und so zu einer Öffnung der Substratbindungstasche zum extrazellulären Raum. Das Gallensalz kann abgegeben werden. Nach Hydrolyse und Abgabe der ATP Moleküle kommt es zu einer erneuten Konformationsänderung, die Substratbindungstasche ist wieder zum intrazellulären Raum geöffnet, ein neues Gallensalz kann sich anlagern. ATP = Adenosintri-phosphat; GS = Gallensalz; NBD = Nukleotid-bindende Domäne; TMD = Transmembrandomäne (Procko et al. 2009; Wilkens 2015; Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001).

### **1.2.3 Funktion der BSEP**

Die Gallensalzexportpumpe BSEP wird an der apikalen Membran der Hepatozyten exprimiert und pumpt, ATP-abhängig, Gallensalze aus dem Zytoplasma in das Lumen der Gallenkapillare (Gerloff et al. 1998). Dabei bildet die BSEP bei der Gallenproduktion eine funktionelle Einheit mit dem Phospholipid-Transporter „Multidrug Resistance Protein 3“ (MDR3) und dem Cholesterin-Transporter „ABCG5/8“ (Kubitz et al. 2012). Die Gallensalzexportpumpe BSEP ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gallenproduktion (Meier, Meier-Abt, and Boyer 1987). Durch eine erhöhte Konzentration von Gallensalzen in den Gallengängen folgt Wasser osmotisch nach (Boyer 2013). Durch den gesteigerten Gallenfluss werden Cholesterin und Phospholipide verstärkt in Mizellen eingebaut, so dass ihre extrazelluläre Konzentration sinkt und ihre Sekretion stimuliert wird (Rahman et al. 1986).

Der Transport durch die BSEP ist der wichtigste Weg, über den Gallensalze die Zelle verlassen (Kubitz et al. 2012). Bei Störungen in diesem Transportsystem kommt es daher zu einer Akkumulation der Gallensalze in den Hepatozyten. Diese erhöhte intrazelluläre Konzentration der Gallensalze führt zu Zellschädigung bis hin zum Zelltod, da erhöhte GS-Konzentrationen zu oxidativem Stress führen und Apoptose und Nekrose induzieren können (Perez and Briz 2009). Da die BSEP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Gallenfluss ist, reguliert sie so auch die Ausscheidung gallepflichtiger Substanzen (Yang et al. 2013). So kommt es bei der Retention von GS auch zu einem Rückstau der gallepflichtigen Substanzen ins Blut und so zu den Symptomen einer Cholestase (Kapitel 1.3); (Pollock and Minuk 2017). Außerdem führen die Zellschäden, welche durch die akkumulierten GS ausgelöst werden, ebenfalls zu einem verminderten Gallefluss und verstärken so die Symptome einer Cholestase (Yang et al. 2013). Ist die intrazelluläre GS-Konzentration über einen längeren Zeitraum erhöht, führt dies zu Leberzellnekrosen und im fortgeschrittenen Stadium zu Fibrosierung und Zirrhose (Stieger et al. 2000).

#### **1.2.4 Wirkung von Medikamenten auf die Funktion der BSEP**

Als zentrales Stoffwechselorgan des Menschen ist die Leber auch Ort der Biotransformation (Lee 2003). Durch Oxidation und Konjugation werden körpereigene Stoffwechselprodukte und körperfremde Substanzen, wie z.B. Medikamente, wasserlöslicher gemacht (Lee 2003). Dadurch können toxische Substanzen entgiftet werden. Es ist aber auch möglich, dass aus Medikamenten toxische Substanzen entstehen, welche die Leber schädigen können (Lee 2003). Solche medikamenteninduzierten Leberschäden sind der häufigste Grund für ein akutes Leberversagen (Lee 2003). Die Entstehung von toxischen Metaboliten bei der Biotransformation ist aber nicht der einzige Weg, durch den Medikamente die Leber schädigen können. Aus Studien ist mittlerweile bekannt, dass Medikamente, die eine hemmende Wirkung auf die BSEP haben, ebenfalls zu Leberschäden führen können (Dawson et al. 2012; Stieger et al. 2000; Funk et al. 2001; Bohme et al. 1994). Grund dafür ist die steigende intrazelluläre GS-Konzentration und deren toxische Wirkung auf die Zelle (Kapitel 1.2.3).

In einer Studie von Zhang et al. (2016) wurden 86 Medikamente, von denen bekannt ist, dass sie zu Leberschäden führen können, auf ihre hemmende Wirkung auf die Gallensalzexportpumpe BSEP untersucht. Davon zeigten 31 Medikamente eine Hemmung der BSEP mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration  $IC_{50} < 50\mu M$ . Diese Medikamente sind in Tabelle 1 aufgeführt, sortiert nach absteigender inhibitorischer Potenz (steigende  $IC_{50}$  Konzentration).

**Tabelle 1: Medikamente mit inhibitorischer Wirkung auf den BSEP**

Medikamente mit inhibitorischer Konzentration  $IC_{50} < 50\mu M$  nach der Studie von Zhang et al. (2016). BSEP = Bile Salt Export Pump.

Medikament	BSEP IC50 ( $\mu M$ )	Medikament	BSEP IC50 ( $\mu M$ )
Ciclosporin	0,1	Fluoxetin	5,5
Ritonavir	0,2	Chlorpromazin	6,4
Rosiglitazon	0,2	Bosentan	9,2
Saquinavir	0,4	Cyclofenil	10,7
Troglitazon	0,5	Deferasirox	11,9
Benziodaron	0,76	Disulfiram	12
Ciglitazon	0,78	Glimepirid	14,1
Clotrimazol	1,1	Buspiron	19
Pioglitazon	1,4	Flutamid	21,4
Lovastatin	1,7	Bicalutamid	22,4
Atorvastatin	2,6	Haloperidol	25,3
Benzbromaron	2,8	Diclofenac	31,8
Indinavir	2,8	Trazadon	43
Ketoconazol	3	Lumiracoxib	45,6
Cervistatin	3,9	Leflunomid	50
Fipexid	4,9		

### 1.2.5 Wirkung von Lipopolysacchariden auf die Funktion der BSEP

Weitere Auslöser einer Cholestase sind bakterielle Infektionen und Sepsis, am häufigsten induziert durch gram-negative Bakterien (Trauner, Fickert, and Stauber 1999). Die äußere Zellwand der gram-negativen Bakterien besteht zu einem großen Teil aus Lipopolysacchariden (LPS); (Geier, Fickert, and Trauner 2006). Diese werden bei einer Infektion von Immunzellen erkannt und stimulieren diese zu einer Freisetzung von Zytokinen (Geier, Fickert, and Trauner 2006). So werden durch LPS vor allem Kupffer-Zellen in der Leber zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine stimuliert. Diese führen durch posttranskriptionelle Mechanismen zu einer Abnahme der BSEP-Expression in der Plasmamembran der Hepatozyten und so zu einer Reduktion des Gallensalzexportes (Geier, Fickert, and Trauner 2006; Elferink et al. 2004). Folge ist die Akkumulation von Gallensalzen in den Hepatozyten und die Entwicklung der Cholestase (Kapitel 1.3).

### **1.2.6 Wirkung von Ursodeoxycholsäure auf die Funktion der BSEP**

Ursodeoxycholsäure (UDCS) ist eine hydrophile Gallensäure, die im menschlichen Körper etwa 4 % des Gallensäurepools ausmacht (Roma et al. 2011). UDCS ist bei vielen cholestatischen Lebererkrankungen, wie PBC, PSC oder PFIC2, Therapie der Wahl (Roma et al. 2011). Sie reduziert die Schädigung der Hepatozyten durch toxische Gallensalze oder andere schädliche Stoffe und schützt so vor Apoptose und Nekrose (Roma et al. 2011). Außerdem wirkt sie entzündungshemmend und fördert die Expression von Gallensalzexportern an der basolateralen und an der apikalen Membran der Hepatozyten (Razori et al. 2019). So werden vermehrt BSEP Transportproteine in die Plasmamembran eingebaut. Dadurch werden Gallensalze aus den Zellen und durch die BSEP auch verstärkt in die Gallengänge gepumpt, dies entfernt toxische Gallensalze und fördert zudem den Gallefluss. Dadurch kommt es bei den betroffenen Patienten meist zu einer Besserung der Cholestase-Symptome (Roma et al. 2011; Razori et al. 2019).

## **1.3 Cholestase**

### **1.3.1 Definition**

Unter Cholestase versteht man einen akuten oder chronischen Zustand, bei dem die Bildung, die Sekretion oder der Abfluss der Galle gestört ist (Pollock and Minuk 2017). Dadurch kommt es zu einer Retention von Gallenbestandteilen in den Hepatozyten und zu einem Rückstau ins Blut (Pollock and Minuk 2017). Es werden typischerweise intra- und extrahepatische Cholestase unterschieden. Als intrahepatische Cholestase werden Exkretionsstörungen der Hepatozyten mit verminderter Ausscheidung von gallepflichtigen Substanzen wie Bilirubin, Cholesterin und Gallensalzen bezeichnet. Als extrahepatische Cholestase bezeichnet man hingegen eine Störung im Abfluss der Gallenflüssigkeit im Bereich zwischen Leber und Duodenum (Pollock and Minuk 2017).

### **1.3.2 Symptome und Diagnostik**

Zu den wichtigsten klinischen Symptomen einer Cholestase zählen Ikterus, Pruritus sowie heller, entfärbter Stuhl und dunkler Urin (Pollock and Minuk 2017). Da die in der Galle enthaltenen Gallensäuren zur Resorption lipophiler Stoffe benötigt werden, kommt es bei chronischer Cholestase außerdem zu einem Mangel der fettlöslichen Vitamine A, D, E, K. Dieser kann ebenfalls zu klinischen Symptomen führen. Durch Vitamin A Mangel kann es zu Beeinträchtigungen der Sehleistung kommen. Vitamin D Mangel kann zu Knocheninstabilität und pathologischen Frakturen führen. Ein Mangel an Vitamin E kann zu neurologischen Defiziten und Myopathien und ein Mangel an Vitamin K zu Gerinnungsstörungen führen (Pollock and Minuk 2017). Laborchemisch zeigt sich eine Erhöhung der Enzyme Alkalische Phosphatase (AP) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) sowie eine Erhöhung des direkten, konjugierten Bilirubins im Blut (Pollock and Minuk 2017).

### **1.4 Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2**

Bei der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 2 (PFIC2) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte cholestatische Lebererkrankung (Jacquemin 2012). Durch Mutationen im ABCB11-Gen, welches für die BSEP codiert, kommt es zu einer deutlich geringeren oder fehlenden Expression des Transporters (Jacquemin 2012). Dies führt zu einer Akkumulation der GS in den Hepatozyten und zu einem verminderten Gallefluss. Dadurch treten bei den betroffenen Patienten innerhalb der ersten Lebensmonate Symptome einer Cholestase auf, und innerhalb der ersten Lebensjahre kommt es häufig zu einem Leberversagen (Jacquemin 2012). Auch die erhöhte Inzidenz hepatozellulärer Karzinome beeinflusst den Krankheitsverlauf (Stieger 2009). Laborchemisch lassen sich bei den betroffenen Patienten meist normale Werte des Cholestase Markers  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) aber stark erhöhte GS-Konzentrationen im Serum nachweisen (Jacquemin 2012). Therapie der

Wahl ist hier die oben erwähnte Ursodeoxycholsäure (Jacquemin 2012), kurativ bleibt jedoch häufig nur eine Lebertransplantation. Bei einigen Patienten kommt es jedoch nach erfolgter Transplantation erneut zu den Symptomen einer Cholestase und zu einem Versagen des gespendeten Organs (Keitel et al. 2009).

In einer Studie von 2009 (Keitel et al. 2009) konnten bei einer Patientin mit PFIC2 und wiederholtem Leberversagen erstmals Autoantikörper gegen die BSEP nachgewiesen werden. Bei der betroffenen Patientin kam es nach erfolgter Lebertransplantation (im Alter von 42 Monaten) innerhalb von wenigen Tagen zu einem Leberversagen des Spenderorgans. Dadurch war nach 17 Tagen eine zweite und nach weiteren 17 Monaten eine dritte Lebertransplantation nötig. Klinisch zeigte sich jeweils das Bild einer cholestatischen Lebererkrankung mit den typischen Symptomen einer PFIC Typ 2, mit hohen GS-Serumkonzentrationen und normwertiger  $\gamma$ -GT. Mithilfe von Immunfluoreszenztest und Western Blot Analysen konnten in den Seren nach Lebertransplantation Autoantikörper mit hoher Affinität gegen die BSEP nachgewiesen werden. Diese Antikörper waren gegen den ersten extrazellulären Loop des Proteins (AS 84-147) gerichtet. Mithilfe eines Transporter-Assays konnte dann gezeigt werden, dass diese Antikörper eine stark hemmende Wirkung auf die Transportfähigkeit der BSEP hatten. Die Verfasser der Studie postulierten daher, dass die Autoantikörper Grund für die wiederholt auftretenden Cholestasen und das Transplantversagen sein könnten. Auch in weiteren Studien konnten solche inhibitorischen Anti-BSEP Autoantikörper bei Patienten mit PFIC2 nachgewiesen werden (Jara et al. 2009; Stindt et al. 2016).

## 1.5 Autoimmune Lebererkrankungen

### 1.5.1 Primär-biliäre Cholangitis

Die primär-biliäre Cholangitis (PBC) ist eine chronisch verlaufende cholestatische Lebererkrankung (Reshetnyak 2015). Betroffen sind vor allem Frauen über 40 Jahren (Reshetnyak 2015). Die Ätiologie ist unklar, charakteristisch ist eine T-Zell vermittelte Zerstörung der kleinen Gallengänge und das Auftreten von pathognomonischen antimitochondrialen Antikörpern (AMA); (Reshetnyak 2015; Bowlus and Gershwin 2014). Die PBC ist häufig mit weiteren autoimmunen Erkrankungen, wie einem Sjögren-Syndrom oder einer rheumatoiden Arthritis assoziiert (Reshetnyak 2015). In bis zu 20 % der Fälle kommt es zudem zu einem Overlap-Syndrom mit der autoimmunen Hepatitis (AIH). Hier zeigen sich typische histologische Merkmale und PBC- sowie AIH-spezifische Autoantikörper (Reshetnyak 2015). Klinisch zeigen sich nach einer häufig langen asymptomatischen Phase zunächst Symptome wie Müdigkeit und Pruritus (Reshetnyak 2015). Durch die fortschreitende Zerstörung der kleinen Gallengänge kommt es dann zu Cholestase, Entzündung und Fibrose bis hin zu Zirrhose und Leberversagen (Bowlus and Gershwin 2014). Bei mehr als 90 % der Patienten sind antimitochondriale Antikörper (AMA) nachweisbar, der Subtyp Anti-M2 ist dabei spezifisch für die PBC (Reshetnyak 2015; Jiang et al. 2003). Die Antikörper vom Subtyp M2 richten sich gegen die Pyruvat-Dehydrogenase (PDC), die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (OGDC) oder gegen die Verzweigt-kettigen-Ketosäuren-Dehydrogenasen-Komplexe (BCOADC) auf der inneren Mitochondrienmembran (Jiang et al. 2003). Außerdem sind bei PBC-Patienten hochspezifische antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisbar. Diese richten sich gegen die Antigene Sp100, Gp210 oder p62 (Reshetnyak 2015).

Mindestens zwei der folgenden drei Kriterien müssen erfüllt sein, um die Diagnose „PBC“ stellen zu können: Ein AMA-Titer  $\geq 1:40$ , erhöhte Alkalische Phosphatase im Serum um das 1,5 fache über 24 Wochen sowie eine typische Histologie (Bowlus and Gershwin 2014). Histologisch finden sich in der Leber Nekrose, Entzündung, Fibrose und Leberzellschäden (Reshetnyak 2015). So sind

im Präparat Schäden an den biliären Epithelzellen und vermehrt eingewanderte Entzündungszellen nachweisbar (Reshetnyak 2015). Mithilfe der Histologie wird die PBC in vier Stadien eingeteilt: Stadium I (portales Stadium mit portaler Hepatitis), Stadium II (periportales Stadium mit periportalener Hepatitis), Stadium III (septales Stadium mit Zeichen einer Fibrose) sowie Stadium IV (zirrhosisches Stadium mit dem histologischen Bild einer Zirrhose); (Reshetnyak 2015).

Eine kausale Therapie der PBC existiert nicht. Mittel der Wahl ist die oben genannte Ursodeoxycholsäure (Bowlus and Gershwin 2014). Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium ist häufig eine Lebertransplantation notwendig (Reshetnyak 2015).

### **1.5.2 Primär-sklerosierende Cholangitis**

Bei der primär-sklerosierenden Cholangitis (PSC) handelt es sich um eine fibrosierende Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallengänge (Fricker and Lichtenstein 2019). Durch die Entzündungsprozesse kommt es zu Stenosierung der Gallengänge und so zu Cholestase (Fricker and Lichtenstein 2019). Außerdem ist die Inzidenz einer sekundären-biliären Leberzirrhose und die eines cholangiozellulären Karzinoms deutlich erhöht, dieses ist entscheidend für die Prognose des Patienten (Fricker and Lichtenstein 2019). Die Ätiologie ist auch hier nicht geklärt, wie die PBC zählt die PSC zu den autoimmunen, cholestatischen Lebererkrankungen (Fricker and Lichtenstein 2019).

Im Labor zeigen sich i.d.R. erhöhte Cholestaseenzyme. Außerdem sind Antikörper gegen Granulozyten (p-ANCA) bei über 80 % der PSC-Patienten nachweisbar (Terjung and Worman 2001). Etwa 10 % der Patienten haben außerdem erhöhte IgG4-Antikörper Titer (Lazaridis and LaRusso 2016). Antimitochondriale Antikörper (AMA), typisch für die PBC, sind nicht nachweisbar (Sirpal and Chandok 2017). Zu den Diagnosekriterien zählen erhöhte Cholestaseenzyme für über 6 Monate, charakteristische Gallengangsveränderungen in der Magnetresonanz-Cholangiographie (MRCP, Methode der ersten Wahl) oder in der endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) sowie

der Ausschluss einer sekundären-sklerosierenden Cholangitis (Lazaridis and LaRusso 2016). Charakteristische Gallengangsveränderungen sind multifokale Strikturen und segmentale Dilatationen (Sirpal and Chandok 2017). Eine Leberbiopsie ist für die Diagnose nicht obligat, wird aber bei Verdacht auf einen AIH-Overlap oder den Verdacht einer Small-Duct PSC verwendet, da hier die Cholangiographie häufig unauffällig ist (Eaton et al. 2016). In der Histologie zeigt sich dann eine Entzündung und eine konzentrische Fibrose (zwiebelschalenartig) der kleinen Gallengänge (Sirpal and Chandok 2017). Diese spezifische Histologie ist jedoch nur in weniger als 25 % der Fällen nachweisbar, die überwiegenden histologischen Auffälligkeiten sind unspezifisch (Sirpal and Chandok 2017). Männer erkranken 2-3 mal häufiger als Frauen, ca. 80 % der Fälle sind außerdem mit einer Colitis Ulcerosa assoziiert (Lazaridis and LaRusso 2016). Dadurch ist die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen erhöht (Fricker and Lichtenstein 2019). Klinisch kommt es zu den typischen Symptomen einer Cholestase wie Müdigkeit, Pruritus und Ikterus (Fricker and Lichtenstein 2019). Um die Symptome der Cholestase zu mindern, ist Ursodeoxycholsäure Mittel der Wahl (Fricker and Lichtenstein 2019).

### **1.5.3 Autoimmune Hepatitis**

Bei der autoimmunen Hepatitis (AIH) handelt es sich um eine autoimmune Lebererkrankung, welche durch eine chronische Entzündung der Leber und den Nachweis spezifischer Antikörper charakterisiert ist (Gossard and Lindor 2012). Betroffen sind in ca. 80 % der Fällen Frauen (Gossard and Lindor 2012). Die Pathogenese ist nicht geklärt, möglicherweise kommt es durch genetische Prädisposition und auslösende Umweltfaktoren zu einer Störung der Autoimmuntoleranz und zur Bildung von Antikörper gegen Leberantigene (Gossard and Lindor 2012). Anhand der Antikörpermuster können zwei Typen unterschieden werden: Typ 1, charakterisiert durch antinukleare Antikörper (ANA), Antikörper gegen glatte Muskulatur/Aktin (SMA) sowie Antikörper gegen das Leber-Pankreas/soluble-liver antigen (LP/SLA) und Typ 2 mit Antikörpern gegen Leber-Nieren-Mikrosomen (LKM-1) oder gegen das Leber-Cytosol Antigen (LC-1);

(Liberal et al. 2013). Typisch sind außerdem erhöhte Transaminasen und vermehrt Immunglobulin G im Patientenserum (Liberal et al. 2013). Histologisch zeigt sich typischerweise eine Entzündung der portalen und periportalen Bereiche mit Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen (Liberal et al. 2013). Eine AIH-Diagnose basiert auf der typischen Histologie, den erhöhten Transaminasen und Immunglobulinen und dem Nachweis spezifischer Antikörper (Gossard and Lindor 2012). Klinisch zeigen sich Symptome einer Hepatitis mit Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden, Inappetenz, abdominelle Schmerzen und Juckreiz. Symptome einer Cholestase finden sich nur selten (Liberal et al. 2013). Es erfolgt in der Regel eine immunsuppressive Therapie durch Prednison-Monotherapie oder in Kombination mit Azathioprin (Gossard and Lindor 2012).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ein intaktes BSEP Transportsystem ist für den Gallensäurestoffwechsel von zentraler Bedeutung. Neben dem Export potentiell toxischer Gallensalze aus den Hepatozyten, ist die BSEP auch für den Gallenfluss unabdingbar. Störungen in diesem Transportsystem führen zu Leberschäden und Cholestase (Kubitze et al. 2012). Es sind bereits einige Medikamente bekannt, die eine Wirkung auf die Funktion des Transporters haben (Zhang et al. 2016). In mehreren Studien konnten bei Patienten mit progressiv familiärer intrahepatischer Cholestase Typ 2 (PFIC2) außerdem Autoantikörper gegen BSEP nachgewiesen werden (Keitel et al. 2009; Jara et al. 2009; Stindt et al. 2016). Diese Autoantikörper hatten eine inhibitorische Wirkung auf den Transporter und bei den betroffenen Patienten kam es zu Leberschäden und den Symptomen einer Cholestase.

Die autoimmunen Lebererkrankungen primär-biliäre Cholangitis (PBC) und primär-sklerosierende Cholangitis (PSC) weisen eine ähnliche Symptomatik wie die PFIC2 auf. Hypothese dieser Arbeit ist daher, dass sich bei den genannten Erkrankungen ebenfalls Autoantikörper gegen die BSEP nachweisen lassen.

Ziel dieser Arbeit ist außerdem, bisher bekannte Methoden zum Nachweis der Anti-BSEP Antikörper einschließlich eines funktionellen Transporter-Assays im Immunpathologischen Labor zu etablieren sowie neue Methoden zum Antikörpernachweis zu entwickeln. Mit diesen Assays sollen Seren von Patienten mit PBC, PSC, AIH und anderen Lebererkrankungen sowie von Patienten mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen auf Antikörper gegen BSEP mittels ELISA und Western Blot unter Verwendung verschiedener BSEP-Antigene getestet werden. Mithilfe des funktionellen Transporter-Assays soll außerdem überprüft werden, ob diese Antikörper den Gallensäuretransport inhibieren oder stimulieren können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und Kontrollen**

In der vorliegenden Studie wurden im Zeitraum von Oktober 2019 bis Oktober 2020 Seren von 473 Patienten untersucht. Davon litten 323 Patienten an einer chronischen Lebererkrankung (Zusammenarbeit mit PD Dr. Dr. E. Sturm, Kinderklinik Tübingen und Prof. Dr. C. Berg, Medizinische Klinik Abt. I). Als Kontrollen dienten Seren von 150 Patienten mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, insbesondere Kollagenerkrankungen (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Henes, Medizinische Klinik, Abt. II) sowie von 46 gesunden Blutspendern (Studenten und Mitarbeiter des Immunpathologischen Labors). Eine Übersicht aller Patienten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Unter den Patienten mit chronischen Lebererkrankungen waren auch 80 Kinder, bei denen eine Lebertransplantation durchgeführt wurde. Bei 58 dieser Kinder lagen Seren von vor und nach Lebertransplantation vor, bei 16 Kindern nur Seren vor Lebertransplantation und bei 6 Kindern nur Seren nach Lebertransplantation. Die Diagnosen dieser Kinder sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme ist in Tabelle 4 dargestellt. Hier wurde unterschieden ob die Patienten eine Immunsuppressive Therapie, eine Therapie mit Ursodeoxycholsäure, eine Therapie mit Immunsuppressiva und Ursodeoxycholsäure oder keine Therapie erhielten.

Alle Seren wurden bei -20 °C gelagert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen befürwortet. Außerdem entsprach das Studienprotokoll den ethischen Richtlinien der Helsinki Deklaration von 1975.

**Tabelle 2: Übersicht über die in die Arbeit eingeschlossenen Patienten**

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b> [n]	<b>Altersmedian</b> in Jahren	<b>Streuung</b> in Jahren	<b>Geschlecht</b> männlich; weiblich
Kinder vor LTx (v.LTx)	74	0	0-21	35; 39
Kinder nach LTx (n.LTx)*	64	6	1-20	26; 38
Primär-biliäre Cholangitis (PBC)	61	53	31-73	7; 54
Primär-sklerosierende Cholangitis (PSC)	38	44	13-71	21; 17
Autoimmune Hepatitis (AIH)	47	45	17-74	11; 36
Virale Hepatitis (vir. Hep.)	49	47	18-78	30; 19
Alkoholtoxischer Leberschaden (Alk.)	48	55	34-75	32; 16
Systemischer Lupus erythematoses (SLE)	33	43	22-68	6; 27
Sjögren Syndrom (Sjögren)	28	46	18-79	2; 26
Sharp-Syndrom (Sharp)	25	38	10-69	6; 19
Systemische Sklerose (SSc)	40	58	17-78	7; 33
Rheumatoide Arthritis (RA)	24	61	33-80	6; 18
Gesunde Blutspender (BS)	46	25	19-57	24; 22
<b>Gesamt</b>	<b>577</b>			

*\*Die getesteten Seren wurden zwischen einem Monat und 13 Jahren nach Lebertransplantation abgenommen. Median 2 Jahre.*

**Tabelle 3: Übersicht der Diagnosen der getesteten Kinder mit Lebertransplantation**

<b>Hauptdiagnose</b>	<b>Anzahl der Kinder mit dieser Diagnose</b>
Akute Hepatitis unklarer Ätiologie	1
Akutes Leberversagen unklarer Ätiologie	6
Alagille-Syndrom	4
Alpha-1-Antitrypsinmangel	1
Autoimmune Hepatitis	2
Autoimmunklerosierende Cholangitis	2
Caroli-Syndrom	2
Cholestatische Riesenzellhepatitis	1
Chronische Leberinsuffizienz	1
Fettleber	1
Gallengangsatresie	25
Hepatoblastom	3
Hepatozelluläres Karzinom	1
Leberfibrose unklarer Ätiologie	2
Leberzirrhose	6
Morbus Wilson	4
Mukoviszidose	3
OTC-Mangel	1
Primär-biliäre Cholangitis	1
Primär-sklerosierende Cholangitis	5
Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 1	1
Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2	2
Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3	3
rezidivierende Cholangitiden	1
Syndrom der eingedickten Galle	1
<b>Gesamt</b>	<b>80</b>

**Tabelle 4: Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme**

Diagnose	Anzahl [n]	Anzahl (%) der Patienten mit Therapie			
		Keine Therapie	nur IMSP	IMSP u. UDCS	nur UDCS
Kinder vor LTx (v.LTx) <sup>1</sup>	74	21 (28)	2 (3)	6 (8)	36 (49)
Kinder nach LTx (n.LTx)	64	0	17 (27)	47 (73)	0
Primär-biliäre Cholangitis (PBC)	61	18 (30)	6 (10)	5 (8)	32 (52)
Primär-sklerosierende Cholangitis (PSC)	38	8 (21)	0	7 (18)	23 (61)
Autoimmune Hepatitis (AIH) <sup>2</sup>	47	6 (13)	23 (49)	5 (11)	3 (3)
Virale Hepatitis (vir. Hep.)	49	46 (94)	2 (4)	1 (2)	0
Alkoholtoxischer Leberschaden (Alk.)	48	46 (96)	2 (4)	0	0
Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	33	5 (15)	28 (85)	0	0
Sjögren Syndrom (Sjögren)	28	14 (50)	14 (50)	0	0
Sharp-Syndrom (Sharp)	25	6 (24)	19 (76)	0	0
Systemische Sklerose (SSc)	40	24 (60)	0	14 (35)	2 (5)
Rheumatoide Arthritis (RA)	24	9 (38)	14 (58)	1 (4)	0
Gesunde Blutspender (BS)	46	46 (100)	0	0	0

*IMSP: Immunsuppressive Therapie; UDCS: Therapie mit Ursodeoxycholsäure; <sup>1</sup> Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 9 Patienten nicht bekannt; <sup>2</sup> Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 10 Patienten nicht bekannt.*

### **2.1.1 Erhebung klinischer Daten**

Die klinischen Daten wurden retrospektiv aus Arztbriefen und Laboruntersuchungen des Medizinischen Universitätsklinikums Tübingen entnommen.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Geräte und Laborbedarf

**Tabelle 5: Verwendete Geräte und Laborbedarf**

<b>Geräte und Laborbedarf</b>	<b>Hersteller</b>
50 ml Konisches Falcon Röhrchen	Corning Science, Reynosa, Mexiko
Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, DE
Deep Well MegaBlock, 96-Well-Platten, 1,2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, DE
MicroBeta2LumiJet Microplate Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Model 422 Electro-Eluter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
MultiScreen Filter Plates Harvest FB	Merck Milipore Ltd., Tullagreen, IRL
Nitrocellulose Membran	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Nunc – Immuno 96-Well-Platte	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Odyssey 9120 Reader	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
SORVALL LYNX 4000 Centrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SORVALL WX Ultra 90 Centrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Wheaton Mikro-Gewebe-Handhomogenisator Dounce 15 ml	LAT GmbH, Garbsen, DE
Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturflasche, Nunclon Delta Surface, 175 cm <sup>2</sup>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

## 2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 6: Reagenzien für ELISA Verfahren**

Substanz	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	VWR, Radnor, USA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	neoFroxx GmbH, Einhausen, DE
NaCl	VWR, Radnor, USA
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
o-Phenyenediamine dihydrochloride	SIGMA ALDRICH, Steinheim, DE
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100	SERVA, Heidelberg, DE
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, DE

**Tabelle 7: Reagenzien für Zellkulturen und Plasmamembran Isolation**

Substanz	Hersteller
Gibco 0,05 % Trypsin-EDTA	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco DMEM	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco F-12 Nut Mix (Ham)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Protease Inhibitor Tabletten (complete Mini)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
RPMI 1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Gibco Glutamax 100x	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco FCS	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 8: Reagenzien für Western Blot und Färbemethoden**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
3-Amino-9-ethylcarbazole	SIGMA ALDRICH, Steinheim, DE
3-Amino-9-ethylcarbazole	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	SERVA, Heidelberg, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Coomassie Brilliant Blau G 250	SERVA, Heidelberg, DE
Dimethylformamid	SERVA, Heidelberg, DE
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Gibco Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Isopropranol 70 %-ig	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin	SERVA, Heidelberg, DE
Natriumdodecyl-Sulfat	SIGMA ALDRICH, Steinheim, DE
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Silver Staining kit, Protein	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
Tris(hydroxymethylaminomethane)	SIGMA ALDRICH, Steinheim, DE
Tween 20	Merck KgaA, Darmstadt, DE

**Tabelle 9: Reagenzien für vesikulären Transporter Assay**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
10mM MgAMP Solution	GenoMembrane, Yokohama, Japan
10mM MgATP Solution	GenoMembrane, Yokohama, Japan
Beriglobin 2 ml	CSL Behring GmbH, Marburg, DE
Gibco Hank's Balanced Salt Solution	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Microscint PS, LSC-Cocktail	Perkin Elmer, Waltham, USA
Reaction Buffer for BSEP Assay (Puffer A)	GenoMembrane, Yokohama, Japan
Stopping and Washing Buffer for BSEP Assay (Puffer B)	GenoMembrane, Yokohama, Japan
Taurocholic acid [3H(G)] (1 mCi/ml)	ARC, St. Louis, USA

**Tabelle 10: Reagenzien für Proteinbestimmung nach Bradford**

Substanz	Hersteller
Protein Kit (Bradford Method)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

### 2.2.3 Zellen

**Tabelle 11: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Hersteller
Cholangiokarzinom: TFK-1	DSMZ, Braunschweig, DE
Hepatozelluläres Karzinom: HepG2	DSMZ, Braunschweig, DE
Hepatozelluläres Karzinom: Huh7	CLS Cell Lines Service, Eppelheim, DE
Zervixkarzinom: HSG	DSMZ, Braunschweig, DE

### 2.2.4 Antikörper

**Tabelle 12: Antikörper die im ELISA verwendet wurden**

Antikörper	Hersteller
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, FC <sub>γ</sub> Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM, Fc <sub>5μ</sub> Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA

**Tabelle 13: Antikörper die im Western Blot verwendet wurden**

Antikörper	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>	
BSEP (F-6) sc-74500, mouse monoclonal IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>Sekundäre Antikörper</b>	
IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Pierce Goat anti-Human IgM Cross absorbed (DyLight 680) Secondary Antibody	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
IRDye 800CW Donkey anti-Human IgG Secondary Antibody	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA
Dako Polyclonal Rabbit Anti Human IgM/HRP	Agilent, Santa Clara, USA
Dako Polyclonal Rabbit Anti Human IgG/HRP	Agilent, Santa Clara, USA

### 2.2.5 Vesikel für Western Blot und Transporter Assay

**Tabelle 14: Vesikel für Western Blot und Transporter Assay**

Vesikel	Hersteller
<b>Western Blot</b>	
SB-BSEP-SF9 (BSEP-Vesikel)	SOLVO Biotechnology Inc., Szeged, Hungary
SB-beta-gal-SF9-CTRL (Kontroll-Vesikel)	SOLVO Biotechnology Inc., Szeged, Hungary
<b>Transporter Assay</b>	
Human-BSEP-SF9-Vesikel	GenoMembrane, Yokohama, Japan
Control-SF9-Vesikel	GenoMembrane, Yokohama, Japan

## 2.2.6 Peptide für ELISA

Tabelle 15: Oligonukleotide für ELISA

Peptid	Hersteller
First Extracellular Loop of BSEP (63 AS)	NeoBiotech, Nanterre, Frankreich

## 2.2.7 Molekulargewichtsmarker für Western Blot

Tabelle 16: Molekulargewichtsmarker für Western Blot

Präparat	Hersteller
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE

## 2.2.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 17: Puffer und Lösungen

<u>PBS-Puffer:</u> 6,81 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 43,83 g NaCl 44,49 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	<u>Bicarbonatpuffer (0,2 M), pH 9,6:</u> 33,9 g Natriumcarbonat 57,12 g Natriumhydrogencarbonat 5 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<u>Citratpuffer pH 5,0:</u> 82,36 g Natriumcitrat 25,2 g Citronensäure 4 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	<u>ELISA Serumverdünnungspuffer:</u> 2 große Spatel BSA 1,2 ml Triton 1,5 l PBS-Puffer
<u>ELISA-Waschpuffer 1:</u> 25 g BSA 5 l PBS-Puffer	<u>ELISA-Waschpuffer 2:</u> 12,5 g BSA 10 ml Triton 5 l PBS-Puffer
<u>ELISA-Substrat:</u> 50 ml Citrat Puffer 25 mg o-Phenylenediamine 33 µl Wasserstoffperoxid	

<u>WB Elektrodenpuffer:</u> 5 g SDS 30,25 g Tris 112,5 g Glycin 5 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	<u>WB Transferpuffer:</u> 1 g SDS 6,06 g Tris 28,82 g Glycin 1,2 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 800 ml Methanol
<u>WB Waschpuffer:</u> 2,5 g BSA 2,5 ml Tween 20 4,9 l PBS-Puffer	<u>WB-Serumverdünnungspuffer:</u> 3 g BSA 100 ml PBS-Puffer
<u>SDS-Puffer (2-fach konzentriert):</u> 0,485 g Tris 34 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 2 g SDS 5 ml Mercaptoethanol 10 ml Glycerol 1 ml 1 % Bromphenolblau-Stammlsg	<u>Protein Elutions Puffer:</u> 3,95 g Ammoniumhydrogencarbonat 1,0 g SDS 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<u>WB Sammelgel (5 %):</u> 13,2 ml H <sub>2</sub> O, 3,3 ml Rotiphorese, 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 195 µl 10%-ige SDS-Lösung, 195 µl 10%-ige APS-Lösung, 19,5 µl TEMED	<u>WB Trenngel (8 %):</u> 19,5 ml H <sub>2</sub> O, 11,1 ml Rotiphorese, 10,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 420 µl 10 %-ige SDS-Lösung, 420 µl 10 %-ige APS-Lösung, 42 µl TEMED
<u>Coomassieblau-Färbelösung:</u> 25 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassieblau	<u>Coomassieblau-Entfärbelösung:</u> 25 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
<u>Fixierlösung für Silberfärbung:</u> 45 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure	<u>Entwicklerlösung für Silberfärbung:</u> 2 % (w/v) Natriumcarbonat 0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 %ig)

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Das ELISA Verfahren ist eine Methode zur Bestimmung der Antikörperkonzentration gegen ein bestimmtes Antigen. In der vorliegenden Arbeit wurde das ELISA Verfahren zum Nachweis von Autoantikörpern in Patientenseren gegen das ABCB11-/BSEP-Transportprotein bzw. gegen den „ersten extrazellulären Loop“ des Proteins angewandt. Dieses Antigen wurde bereits in anderen Studien im Western Blot Verfahren verwendet (Keitel et al. 2009; Stindt et al. 2016).

In diesem Versuchsaufbau wurde das „Indirekte ELISA-Verfahren“ gewählt. Bei diesem Verfahren werden zunächst 96-Well Platten mit einem Antigen beschichtet. Anschließend werden Seren von Patienten hinzugegeben, sodass die Antikörper aus den Seren an das Antigen binden können. Nach mehreren Waschschritten wird ein sekundärer, antihumaner, Peroxidase-gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet an den primären, humanen Antikörper und macht diesen nach Zugabe eines Substrates durch eine Farbreaktion sichtbar. Mit diesem Verfahren wurde das oben genannte Patientenkollektiv (Tabelle 2) unter der Verwendung mehrerer Antigene getestet. Um zu überprüfen, ob der ELISA immer richtig durchgeführt wurde, und um die Vergleichbarkeit von an verschiedenen Tagen durchgeführten Assays zu gewährleisten, wurden bei jedem Versuchsdurchlauf zwei Positiv- und eine Negativ-Kontrolle verwendet.

#### ***Durchführung des ELISA***

Zunächst wurden die 96-Well-Platten mit dem Antigen beschichtet. Dafür wurde das Antigen in Bicarbonat Puffer verdünnt und 100 µl pro Well in die ELISA-Platten pipettiert und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Nunc-Platten in Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend für 1 h darin blockiert. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und pro Well 100 µl Serumverdünnung (in Serumverdünnungspuffer [SVP]) pipettiert. Nach 90 Minuten Inkubation wurden die Platten in Waschpuffer 2 gewaschen und für weitere 15 Minuten darin belassen. Danach wurde der sekundäre, Anti-Human

Antikörper in Waschpuffer 2 verdünnt und davon 100  $\mu$ l pro Well in die Platten pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation und einem zweiten Waschschrift in Waschpuffer 2 (s.o.), wurden nun pro Well 150  $\mu$ l des Substrates hinzu pipettiert und nach Erreichen der Soll-Extinktionswerte der Kontrollseren mit 50  $\mu$ l Schwefelsäure pro Well abgestoppt. Anschließend wurden die ELISA-Platten im Tecan SPECTRA III Microplate Reader eingelesen und die Extinktionswerte der einzelnen Wells bestimmt.

### ***ELISA mit BSEP-SF9-Vesikeln als Antigen***

SF9-BSEP-Vesikel wurden auf eine Konzentration von 1,25  $\mu$ g/ml in Bicarbonat-Puffer verdünnt, um die ELISA-Platten zu beschichten. Als Kontrolle wurde außerdem dieselbe Anzahl an Platten mit SF9-Kontroll-Vesikeln, die Beta-Galaktosidase beinhalten, beschichtet. Die Seren der Patienten wurden auf eine Konzentration von 1:200 in SVP verdünnt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte wie oben beschrieben.

### ***ELISA mit dem ersten extrazellulären Loop der BSEP als Antigen***

In einem zweiten ELISA wurden die Platten mit dem bereits in früheren Publikationen beschriebenen „ersten extrazellulären Loop“ (ECL1) des BSEP Transportproteins beschichtet (Stindt et al. 2016). Dieses Polypeptid besteht aus 63 Aminosäuren und wurde in DMSO zu einer Lösung mit 50  $\mu$ g/ml gelöst und bei -20 °C gelagert. Um die ELISA-Platten zu beschichten, wurde das Peptid dann auf eine Konzentration von 3  $\mu$ g/ml in Bicarbonatpuffer verdünnt. Die Seren der 473 Patienten und 46 gesunden Kontrollen wurden auf eine Konzentration von 1:500 in Serum Verdünnungspuffer verdünnt. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie oben beschrieben. Die optimalen Antigen- und Serumverdünnungen waren zuvor mittels Verdünnungsreihen ermittelt worden.

### ***ELISA mit Antigen aus Polyacrylamid-Gelen***

In einem dritten ELISA wurden die ELISA Platten mit den Proteinen zweier Gelbanden beschichtet. Die Proteine wurden durch Elektroelution (Kapitel 2.3.6) aus Polyacrylamid-Gelbanden gewonnen, welche durch Coomassie Färbung (Kapitel 2.3.5) angefärbt wurden. Um die gesuchte Bande in der Coomassie Färbung identifizieren zu können wurde parallel ein Western Blot durchgeführt und die gesuchte Bande mit einem primären Antikörper bzw. mit Antikörpern aus Patientenseren sichtbar gemacht. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.3.7) wurden die Proteine jeweils auf eine Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer verdünnt und damit jeweils eine ELISA Platte beschichtet. So wurde Platte 1 mit den Proteinen aus Bande 1 (140 kDa) beschichtet und Platte 2 mit den Proteinen aus Bande 2 (160 kDa). Die Seren der Patienten wurden hier mit einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie oben beschrieben.

### ***2.3.2 Zellkulturen von TFK-1, Huh-7, HepG2- und HSG-Zelllinien***

Da die Gallensalzexportpumpe BSEP an der apikalen Zellmembran von Hepatozyten lokalisiert ist (Kubitz et al. 2015), wurden Hepatozyten- und Cholangiozyten-Zellreihen in Kultur gegeben. Bei der Hepatozyten-Zellreihe HepG2 konnte die BSEP bereits nachgewiesen werden (Qu et al. 2018).

Die BSEP gehört zur Familie der ABC-Transporter. Teil dieser Transporterfamilie ist auch der in den Speichel- und Tränendrüsen exprimierte Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR); (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Da Störungen im CFTR möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie des Sjögren Syndroms spielen (Zeng et al. 2017), sollte überprüft werden, ob sich in Seren von Patienten mit dieser Erkrankung Anti-CFTR Antikörper nachweisen lassen und ob diese womöglich mit dem BSEP interagieren. Dafür wurden HSG-Zelllinien in Kultur gegeben, da diese Zellen CFTR exprimieren (Shin et al. 2016).

Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2-5 Tage, das Passagieren der Zellen erfolgte, wenn die Grundfläche der Platte über 90 % mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren bzw. zum Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen, wurde 0,05 %iges Trypsin-EDTA verwendet.

### ***Huh7 – Zelllinie***

Bei der Huh7-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Hepatozellulären Karzinom isoliert wurde. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet welches mit 10 % GlutaMAX, 0,16 mg/ml Refobacin und 10 % fetalem Kälberserum versetzt wurde.

### ***HepG2 – Zelllinie***

Bei der HepG2-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Hepatozellulären Karzinom isoliert wurde. Als Kulturmedium wurde F-12 Medium verwendet welches mit 0,16 mg/ml Refobacin und 10 % fetalem Kälberserum versetzt wurde.

### ***TFK1 – Zelllinie***

Bei der TFK-1-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Cholangiokarzinom isoliert wurde. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Medium verwendet welches mit 0,16 mg/ml Refobacin und 10 % fetalem Kälberserum versetzt wurde.

### ***HSG – Zelllinie***

Bei der HSG-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Cervixkarzinom isoliert wurde. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet welches mit 10 % GlutaMAX, 0,16 mg/ml Refobacin und 10 % fetalem Kälberserum versetzt wurde.

### **2.3.3 Isolierung von Plasmamembranen aus Zellkulturen**

Da die BSEP- bzw. der CFTR in der Plasmamembran der Zellen exprimiert ist, wurde eine Plasmamembran-Isolierung mit den vier oben genannten Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurde Zellmaterial von jeweils vier konfluent bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Zellplatten verwendet.

Zunächst wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen geerntet und für 10 Minuten bei 361 g zentrifugiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit HBSS für jeweils 10 Minuten bei 361 g. Das verbliebene Zellpellet wurde nun in eiskalter HBSS mit Proteaseinhibitor aufgenommen und zum Zellaufschluss zehn Mal auf Eis in einem Mikro-Gewebe-Handhomogenisator gepottert und anschließend 6 x 15 Sekunden mit Ultraschall beschallt. Nun erfolgte eine einstündige Zentrifugation bei 100 000 g. Das entstandene Pellet wurde in 300 µl HBSS gelöst und bei -20 °C eingefroren.

#### **2.3.4 Western Blot**

Bei der Methode des Western Blots werden einzelne Proteine zunächst über Gelelektrophorese ihres Molekulargewichts entsprechend aufgetrennt. Anschließend werden die Proteinbanden mithilfe eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zum Gel steht, auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und stehen so für unterschiedliche Nachweisverfahren zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die Membranen mit Serumproben bzw. mit Antikörper-Verdünnungen inkubiert, um die Proteinbanden sichtbar zu machen bzw. um spezifische Antikörper in den Seren nachzuweisen.

#### ***SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli***

Zunächst wurden wie von Laemmli (1970) beschrieben, Gele hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde 5 %iges Sammelgel und 8 %iges Trenngel verwendet. Nach der Herstellung der Gele wurden die Antigen-Proben vorbereitet. Hierzu wurden die Proben 1:1 in 2xSDS-Puffer verdünnt und danach für 4 Minuten bei 100 °C in einem Wasserbad gekocht.

Anschließend wurden die Gele in die Gelkammer eingebaut, die Kammer mit Elektrodenpuffer befüllt und die Geltaschen mit den Probenverdünnungen beladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (BIO-RAD, Feldkirchen, DE) verwendet. Die Gele wurden wie folgt gefahren: Zunächst 5 min bei 50 V, dann 10 min bei 100 V danach so lange bei 200 V bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hat (ca. 30 min).

#### ***Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran***

Die in der Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Der Transfer erfolgte durch eine senkrecht angelegte Spannung von dem Gel auf die Membran. Für den Transfer wurde das Tank-Blot-Verfahren gewählt und mithilfe des „Mini Trans-Blot Cell“ – Systems von Bio-Rad durchgeführt.

Der Transfer erfolgte für 60 Minuten bei 100 V. Anschließend wurde die Nitrocellulose Membran für eine Stunde in Blockierlösung (PBS-Puffer + 3 % BSA) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Sheets zur Detektion der Banden mit Anti-BSEP-Antikörper (1:500) oder mit Serum (1:50 in PBS-Puffer + 3 % BSA + 0,2 % Tween-20) für 1 h inkubiert. Nach vier Waschsritten, jeweils 5 Minuten in Waschpuffer 2, wurden die primären Antikörper dann mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden nachgewiesen.

- 1) Mithilfe von Fluoreszenz markierten sekundären Antikörpern (Tabelle 13). Die Fluoreszenz wurde mithilfe des Odyssey Readers sichtbar gemacht.
- 2) Alternativ wurden Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet (Tabelle 13). Als Substrat wurde 3-Amino-9-ethyl-carbazole verwendet um durch eine Farbreaktion die Banden sichtbar zu machen.

In dieser Arbeit wurden drei Western Blot Verfahren durchgeführt, bei denen jeweils unterschiedliche Antigene zur Antikörper Detektion verwendet wurden. Im Folgenden ist der Aufbau dieser Verfahren dargestellt. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

### ***SDS-Page und Western Blot mit Plasmamembranen von Cholangiozyten- und Hepatozyten Zellreihen***

Zunächst erfolgte der Nachweis von BSEP in Plasmamembranen der Zelle mithilfe eines Western Blot Verfahrens. Dafür wurden die Plasmamembran Isolate der HepG2-, Huh7- und TFK-1 Zellen (Kapitel 2.3.3) verwendet. Diese wurden 1:1 in SDS-Puffer verdünnt, für 4 Minuten bei 100 °C gekocht und die Geltaschen jeweils mit 40 µl beladen. Als Kontrolle wurden außerdem SF9-BSEP-Vesikel und SF9-Kontroll-Vesikel verwendet. Diese wurden ebenfalls 1:1 in SDS-Puffer verdünnt, nicht gekocht und die Geltaschen mit 20 µl beladen. Als sekundärer Antikörper wurde hier der HRP-gekoppelte oder der Fluoreszenz markierte Anti Human Antikörper verwendet.

### ***SDS-Page und Western Blot zum Nachweis von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen***

In diesem Versuch wurden die Gele mit den SF9-BSEP bzw. den SF9-CTRL-Vesikeln als Antigen beladen. Dafür wurden die Vesikel 1:1 in SDS-Puffer verdünnt, nicht gekocht und die Geltaschen mit 20 µl (5,6 µg Vesikel) beladen. Als sekundärer Antikörper wurden die oben beschriebenen HRP-gekoppelten Anti Human Antikörper verwendet. Mit dieser Methode wurden insgesamt 125 Patienten getestet.

### ***SDS-Page und Western Blot zum Ausschluss von Kreuzreaktionen von Anti-CFTR Autoantikörpern mit BSEP***

Hierzu wurden die Plasmamembran Isolate der HSG-Zellen verwendet. Diese wurden wie oben beschrieben 1:1 in SDS-Puffer verdünnt, für 4 min bei 100 °C gekocht und die Geltaschen mit 40 µl beladen. Als Kontrollen wurden außerdem die BSEP- bzw. CTRL-Vesikel und Plasmamembran Isolate von HepG2-Zellen verwendet. Angefärbt wurden die Banden in diesem Versuch mit dem oben beschriebenen HRP-gekoppelten Anti-Human-Antikörper.

### **2.3.5 Färbung der Polyacrylamid-Gele**

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine erfolgte nach der Gelelektrophorese eine Coomassie-Brilliant-Blau Färbung oder eine Silberfärbung (siehe unten).

Anschließend wurden jeweils zwei spezifische Banden ausgeschnitten, eine auf der Höhe von etwa 140 kDa und eine auf der Höhe von etwa 160 kDa. Diese Banden wurden gewählt, da auf diesen Höhen im Western Blot spezifische Banden detektiert wurden. Nun sollten die in den Gelbanden enthaltenen Proteine weiter analysiert werden.

#### ***Coomassie Färbung***

Die Hälfte der Gele wurde mit Coomassie gefärbt. Dafür wurden die Gele über Nacht mit Coomassieblau-Färbelösung inkubiert. Um die einzelnen Banden sichtbar zu machen, wurden die Gele anschließend nochmals über Nacht in Coomassieblau-Entfärbelösung inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurden dann die erhaltenen Banden auf der Höhe von 140 kDa und auf der Höhe von 160 kDa ausgeschnitten und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

#### ***MS-kompatible Silberfärbung***

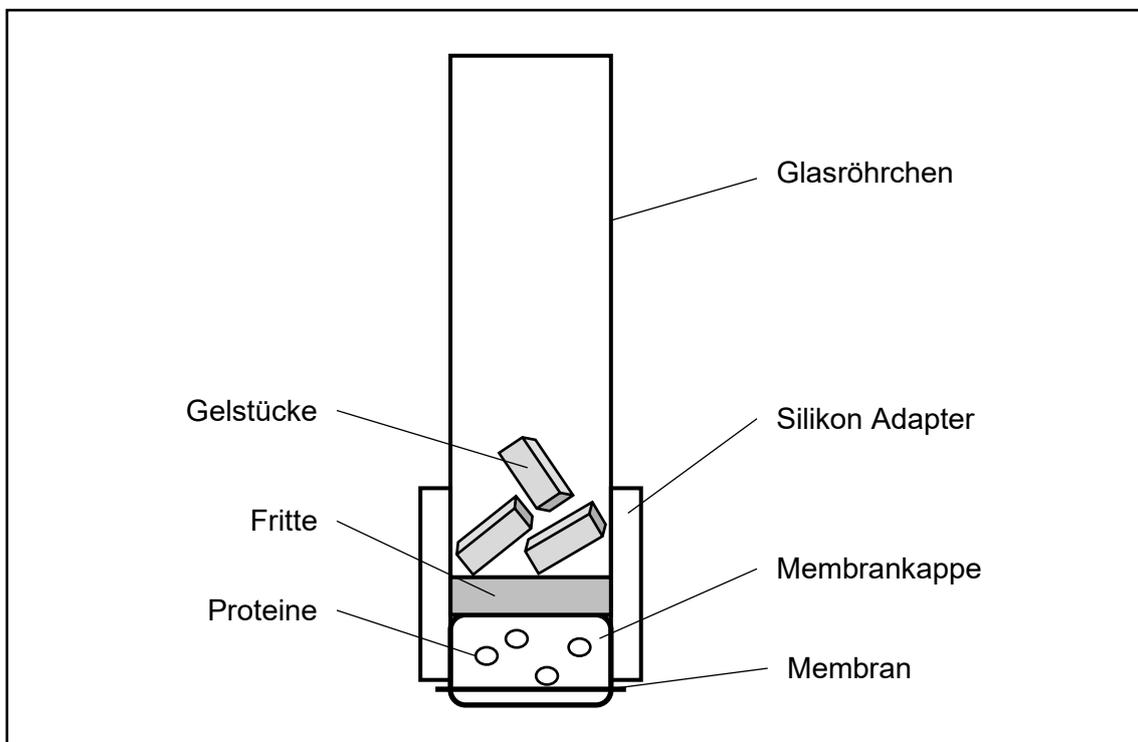
Die Durchführung dieser Methode orientierte sich am Protokoll wie von Shevchenko et al. (1996) beschrieben. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst für 30 Minuten in eine Fixierlösung gegeben. Anschließend wurden die Gele 3 x für 30 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Sensibilisierung, dafür wurden die Gele für 2 Minuten in 0,02 %iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Danach folgte ein zweiter Waschschrift für 2 x 2 Minuten in H<sub>2</sub>O. Im nächsten Schritt wurden die Banden angefärbt, dafür wurde das Gel für 30 Minuten in 0,1 %iger Silbernitratlösung inkubiert. Nun folgte ein dritter Waschschrift für erneut 2 x 2 Minuten in H<sub>2</sub>O. Im nächsten Schritt wurden die Banden sichtbar gemacht, dafür wurden die Gele für wenige Minuten in Entwicklerlösung gegeben und sobald die Banden gut sichtbar waren in 1 %ige Essigsäure gegeben um die Reaktion abzustoppen.

Zur weiteren Verwendung wurden die erhaltenen Banden auf der Höhe von 140 kDa und auf der Höhe von 160 kDa ausgeschnitten und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.3.6 Protein Reinigung – Elektroelution

Mit den ausgeschnittenen Gelbanden nach Silberfärbung wurde eine Elektroelution durchgeführt. Bei der Elektroelution handelt es sich um ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem die Proteine durch ein elektrisches Feld vom Minus- zum Plus-Pol wandern und mithilfe einer Dialysemembran aufgefangen werden (Westermeier 2019).

Durchgeführt wurde die Elektroelution mithilfe des „Model 422 Electro-Eluter“ von Bio-Rad und dem beiliegenden Protokoll „Instruction Manual, 6.1 Elution from SDS-PAGE Gels“. Gereinigt wurden Bande 1 (140 kDa) und Bande 2 (160 kDa). Der Aufbau des Eluters ist in Abbildung 4 beschrieben.



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau Model 422 Elektro-Eluter**  
Abbildung in Anlehnung an die Bedienungsanleitung „Model 422 Electro-Eluter“ von Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE

Zunächst wurden die Membrankappen für eine Stunde bei 60 °C in Protein Elution Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Glasröhrchen mit den ausgeschnittenen Gelstücken beladen. Die Elektroelution wurde nach Herstellerangaben für 5 Stunden bei 10 mA pro Glasröhrchen durchgeführt. Mit den erhaltenen Eluaten wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.3.7) durchgeführt und die Eluate bei 20 °C aufbewahrt. Die Eluate wurden dann als Antigene im ELISA verwendet (Kapitel 2.3.1).

### **2.3.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der durch Elektroelution erhaltenen Proteinlösungen (Kapitel 2.3.6) und der durch Ammoniumsulfat-Fällung gewonnenen Antikörperlösungen (Kapitel 2.3.9), wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) verwendet. Bei dieser Methode wird mithilfe von Coomassie-Blau und einer photometrischen Messung die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben (Tabelle 10).

### **2.3.8 Proteomanalyse der Polyacrylamid Gel Banden**

Zur Identifizierung der in den Gelbanden enthaltenen Proteine wurde vom Proteom Center Tübingen ein In-Gel Verdauung mit Trypsin und eine Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie durchgeführt. Die Gele wurden wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben mit BSEP-Vesikeln beladen und nach erfolgter Gelelektrophorese mithilfe der Coomassie-Blau-Färbung angefärbt. Die korrespondierenden Banden wurden ausgeschnitten und die Gelstücke bei 4 °C gelagert und dem Proteom Center Tübingen zur weiteren Analyse übergeben.

### **2.3.9 Ammoniumsulfatfällung**

Dieses Verfahren wurde verwendet, um Antikörper aus Patientenseren zu isolieren um diese in einem vesikulären Transporter-Assay (Kapitel 2.3.10) zu verwenden. Dafür wurde zu 100 µl Serum tropfenweise 100 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung pipettiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat zweimal mit 500 µl Ammoniumsulfatlösung (60 %ig) gewaschen und für jeweils 15 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Das nun verbliebene Präzipitat wurde in 400 µl HBSS resuspendiert und zweimal durch einen „Amicon Ultra 100k Filter“ gefiltert um eine möglichst konzentrierte Antikörper Lösung zu erhalten und evtl. vorhandene Proteinverunreinigungen zu entfernen. Die Antikörperlösung wurde dann bei -20 °C gelagert.

### **2.3.10 Vesikulärer Transporter Assay**

Um die Seren der Patienten auf funktionelle Anti-BSEP-Autoantikörper zu testen, wurde ein „Vesikulärer Transporter Assay“ durchgeführt. Dafür wurden die oben genannten SF9-BSEP bzw. SF9-Kontroll Vesikel und das Protokoll „Vesicular Transport Assay Protocol“ von GenoMembrane verwendet.

Die Vesikel bestehen aus einer Plasmamembran-Präparation von SF9-Insektenzellen, die zuvor mit BSEP exprimierenden Baculoviren transfiziert wurden. Die BSEP Proteine sind dabei so orientiert, dass Gallensäuren von außen in das Lumen der Vesikel transportiert werden (inside-out Vesikel). Durch radioaktiv markierte Gallensäuren kann analysiert werden, wie sich Antikörper aus Patientenseren auf die Transportfähigkeit der BSEP auswirken.

#### ***Überprüfung der Methode***

Um die Funktion der Vesikel und das Prinzip des Assays zu überprüfen, wurde zunächst ein Versuch ohne Patientenseren durchgeführt. Der Versuchsaufbau orientierte sich dabei am Protokoll „Vesicular Transport Assay Protocol“ von GenoMembrane.

Zunächst wurden in vier Ansätzen jeweils 30 µl der Vesikel Lösung (BSEP- bzw. CTRL-Vesikel) mit 27 µl Puffer A (10 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO<sub>3</sub>, 10 mM Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 50 mM Sucrose) vermischt und für 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Parallel dazu wurde der „Assay Mix“ vorbereitet: 80 µl der ATP-Lösung (Reagent C) bzw. der AMP-Lösung (Reagent D) wurden mit 40 µl der <sup>3</sup>H(G)-Taurocholat-Lösung (1:100 in Puffer A) und 4 µl Puffer A vermischt und ebenfalls für 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Anschließend wurden die Vesikel Ansätze mit jeweils einem Assay Mix zusammengeführt, vermischt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden anschließend 200 µl eiskalter Puffer B (10 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO<sub>3</sub>, 50 mM Sucrose) pro Ansatz hinzugegeben. Dadurch sind insgesamt vier verschiedene Ansätze entstanden: 1) BSEP-Vesikel + ATP; 2) BSEP-Vesikel + AMP; 3) CTRL-Vesikel + ATP; 4) CTRL – Vesikel + AMP.

Im nächsten Schritt wurden die Ansätze durch 96-well Filterplatten gefiltert. Dafür wurden alle Wells der Platte mit jeweils 100 µl Puffer B vorbefeuchtet. Anschließend wurden auf jeweils vier Wells 250 µl aus einem Ansatz pipettiert und durch die Platte gefiltert. Im nächsten Schritt wurde die Platte fünfmal mit jeweils 100 µl Puffer B pro Well gewaschen. Nach 48 h wurde dann 25 µl Szintillationsflüssigkeit pro Well aufgetragen und die Platte im MicroBeta2 LumiJet Microplate Counter eingelesen.

### ***Testen von Patientenseren***

Nach Überprüfung der Methode wurde anschließend die Wirkung von Antikörpern aus Patientenseren auf die Transportfähigkeit der BSEP untersucht. Die Antikörper wurden dafür mithilfe einer Ammoniumsulfat-Fällung aus den Seren der Patienten gewonnen. Der Versuchsaufbau orientierte sich an dem „Vesicular Transport Assay Protocol“ von GenoMembrane. Da in diesem Protokoll die Zugabe von Hemmstoffen bzw. Antikörpern nicht weiter beschrieben ist, wurde der Versuchsaufbau mithilfe des „BSEP-Inhibitions Protokoll“ von Stindt et al. (2016) angepasst. Dieses Protokoll ist in den „Supporting Information“ des Papers Stindt et al. (2016) zu finden.

### ***Vorversuch mit Patientenseren***

Zunächst sollte überprüft werden, ob Antikörper mit extrazellulären oder mit intrazellulären Strukturen der BSEP interagieren. Bei den verwendeten Membran Vesikeln ist die BSEP so in der Vesikel-Membran angeordnet, dass sie, anders als in vivo, Gallensalze von außen in das Lumen des Vesikels pumpt. Folglich befinden sich extrazelluläre Bestandteile hier intravesikulär und intrazelluläre Strukturen extravesikulär. Um die Interaktion von Antikörpern mit extrazellulären Strukturen zu untersuchen, müssen die Antikörper also in das Lumen der Vesikel gelangen. Im Versuchsaufbau von Stindt et al. 2016 ist dafür eine „Freeze and Thaw“ Technik beschrieben. Bei dieser Technik gelangen die Antikörper durch mehrmaliges Einfrieren und langsames Auftauen auf Eis in das Lumen der Vesikel und können hier mit den extrazellulären Strukturen der BSEP interagieren.

In diesem Versuch wurden die Seren von zwei Patienten verwendet, bei denen im Western Blot spezifische Banden gegen die BSEP nachgewiesen werden konnten und als Kontrolle die Seren von zwei gesunden Blutspender ohne spezifische Bande. Um intra- und extrazelluläre Interaktionen vergleichen zu können, wurde der Versuch zunächst in zwei getrennten Versuchsreihen aufgeteilt. Versuchsreihe 1 ohne „Freeze and Thaw“ und Versuchsreihe 2 mit „Freeze and Thaw“. In Versuchsreihe 2 wurden dafür 30 µl BSEP-Vesikel Lösung mit 10 µl Antikörper-Lösung vermischt und in einem Methanol/Trockeneisbad für 10 Sekunden schockgefroren und anschließend 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Parallel dazu wurde die Versuchsreihe 1 für die komplette Dauer des Zyklus (ca. 90 min) auf Eis gelagert. Versuchsreihe 1 sollte also die intrazelluläre Antikörper Wirkung untersuchen und Versuchsreihe 2 die extrazelluläre Wirkung.

Nach dieser Vorbereitung der Vesikel wurden beide Versuchsreihen anschließend gleichbehandelt. In jeden Ansatz wurden zunächst jeweils 36 µl Puffer A pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze und der vorbereitete Assay Mix (800 µl ATP-Lösung; 400 µl <sup>3</sup>H(G)-Taurocholat-Lösung (1:100 in Puffer A); 40 µl Puffer A) für 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Im nächsten Schritt wurde in je-

den Ansatz 124 µl Assay Mix pipettiert, gemischt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde anschließend 800 µl eiskalter Puffer B hinzugefügt und die Proben auf Eis gelagert. Anschließend wurden alle Wells der Filterplatte mit jeweils 100 µl Puffer B vorbefeuchtet und 300 µl der Ansätze je Well auf die Filterplatten aufgetragen und fünf Mal mit jeweils 100 µl Puffer B gewaschen. Nach 48 h wurden wieder 25 µl Szintillationsflüssigkeit je Well aufgetragen und die Platte ausgelesen.

### ***Finaler Versuchsaufbau mit Patientenseren***

Nach den Ergebnissen des Vorversuches wurde nun nur noch die Wirkung von Antikörpern auf extrazelluläre bzw. intravesikuläre Strukturen nach „Freeze and Thaw Zyklus“ untersucht. Außerdem wurden die Konzentrationen nochmals angepasst. Mit dem folgenden, finalen Versuchsaufbau, wurden dann Immunglobuline von insgesamt 30 Patienten und 8 gesunden Blutspendern getestet.

Zunächst wurden die durch Ammoniumsulfat Fällung gewonnenen Antikörperlösungen 1:1 in HBSS verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der BSEP Vesikel Lösung mit 6,6 µl der verdünnten Antikörperlösung vermischt und drei Zyklen „Freeze and Thaw“ durchgeführt. Daraufhin wurde in jeden Ansatz jeweils 12 µl Puffer A gegeben. Nun wurden die Ansätze und der vorbereitete Assay Mix (300 µl ATP-Lösung, 150 µl <sup>3</sup>H(G)-Taurocholat-Lösung (1:100 in Puffer A), 15 µl Puffer A) für 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz jeweils 41,25 µl Assay Mix (300 µl ATP-Lösung, 150 µl <sup>3</sup>H(G) -Taurocholat-Lösung (1:100 in Puffer A), 15 µl Puffer A) pipettiert, gut vermischt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden dann in jeden Ansatz 266 µl eiskalter Puffer B gegeben; alle Ansätze wurden für einige Minuten auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurden alle Wells der Platte mit je 100 µl Puffer B vorbefeuchtet. Anschließend wurde als Doppelbestimmung auf jeweils zwei Wells 150 µl der Ansätze aufgetragen und gefiltert. Nach fünfmaligem Waschen mit 100 µl Puffer B pro Well wurden die Platten getrocknet und nach 48 h ausgelesen.

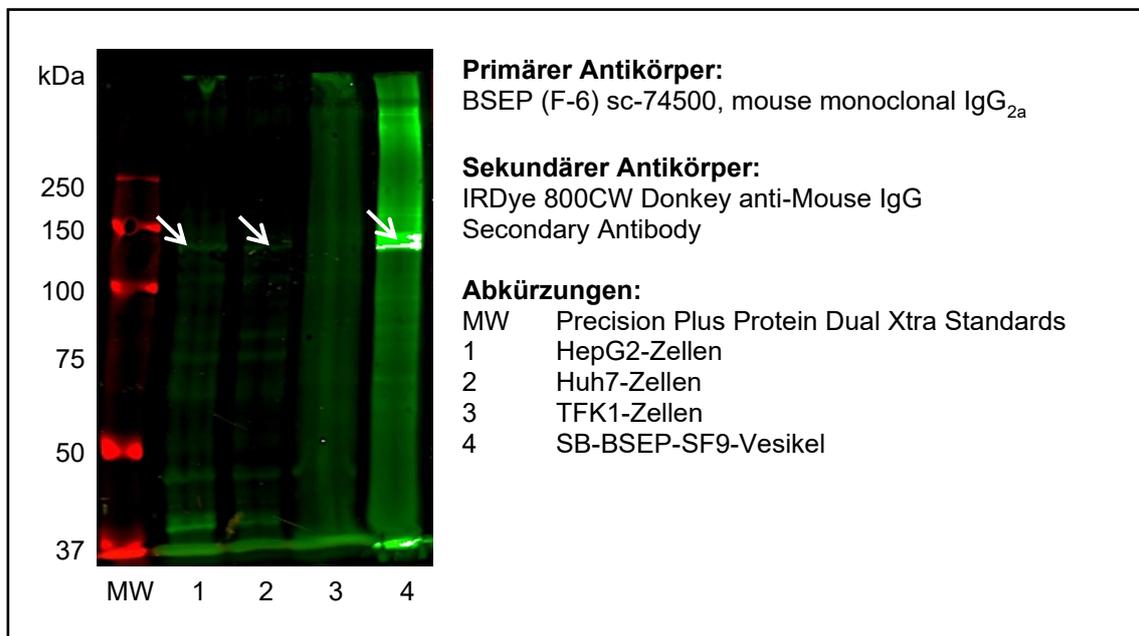
### **2.3.11 Statistische Methoden**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel (Version 16.16.3) und GraphPad Prism (Version 8.4.2) genutzt. Unter der Annahme, dass die Daten nicht normalverteilt sind, wurde der Mann-Whitney-U-Test für die Analyse ungepaarter Daten und der Wilcoxon Paarvergleichstest für die Analyse gepaarter Daten verwendet. Die statistische Überprüfung ob bei Patienten mit (Leber-)Erkrankungen signifikant mehr Antikörper nachgewiesen werden konnten, als bei gesunden Blutspendern erfolgte mit dem Exakten Test nach Fisher.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis von BSEP Protein in der Plasmamembran von HepG2 und Huh7 Zellen mittels Western Blot

Zunächst wurden die SF9-BSEP Vesikel und die Plasmamembranisolate der Hepatozyten-Zelllinien HepG2 und Huh7 sowie der Cholangiozyten-Zelllinie TFK1 mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Unter Verwendung eines monoklonalen Anti-BSEP Antikörpers und eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers konnte sowohl bei den Vesikeln als auch bei den HepG2- und den Huh7-Zellen nicht jedoch den TFK1-Zellen eine spezifische Bande detektiert werden (Abbildung 5). Diese war auf der für die BSEP erwarteten Höhe von ca. 140 kDa und könnte darauf hinweisen, dass sowohl HepG2 als auch Huh7 Zellen die BSEP in ihrer Membran exprimieren. Die Intensität der Banden reichte jedoch nicht aus, um die Plasmamembranisolate der beiden Zellreihen für weitere Versuche nutzen zu können.

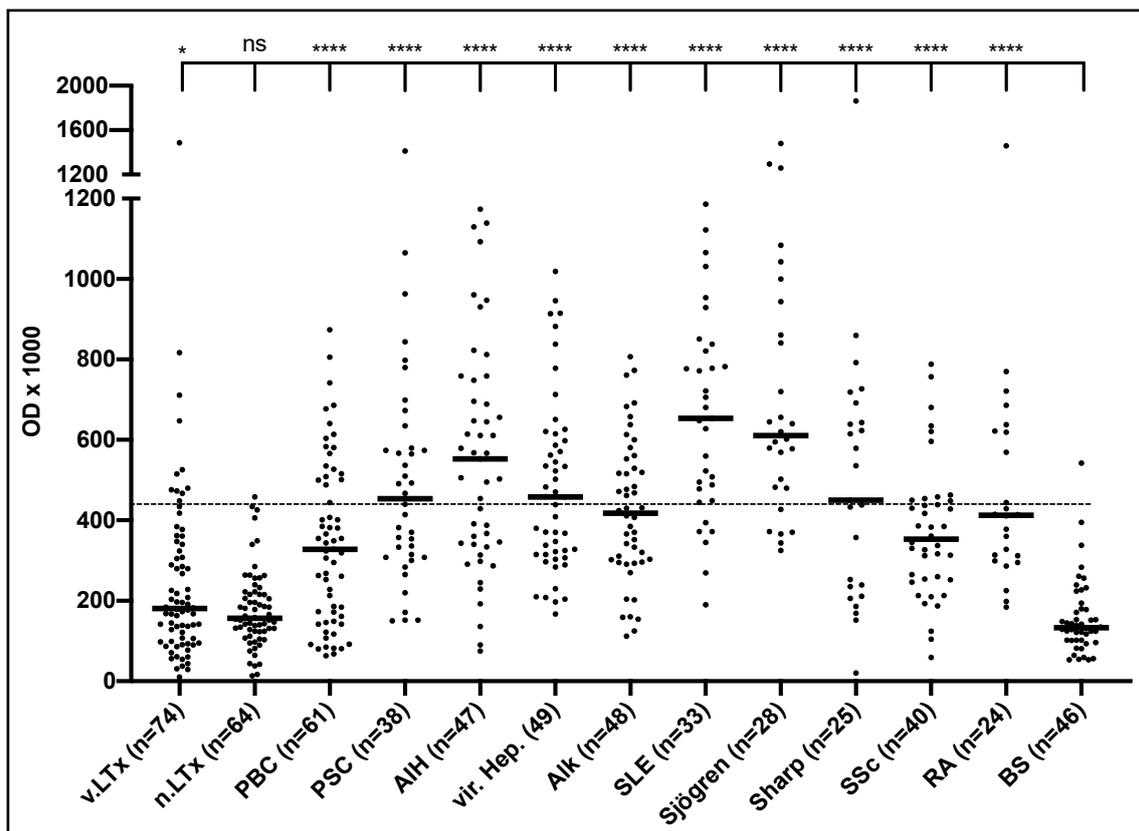


**Abbildung 5: Nachweis von BSEP Protein in der Plasmamembran von HepG2 und Huh7 Zellen mittels Western Blot**

Nachweis von spezifischen 140kDa Banden im Western Blot, mithilfe eines monoklonalen Anti-BSEP Antikörpers, in den Spuren die mit HepG2- und Huh7-Zellen sowie BSEP-Vesikeln beladen wurden. Keine spezifische Bande in der Spur mit TFK1-Zellen.

### 3.2 Detektion von Antikörperreaktionen gegen den ersten extrazellulären Loop (ECL1) des BSEP Proteins mittels ELISA

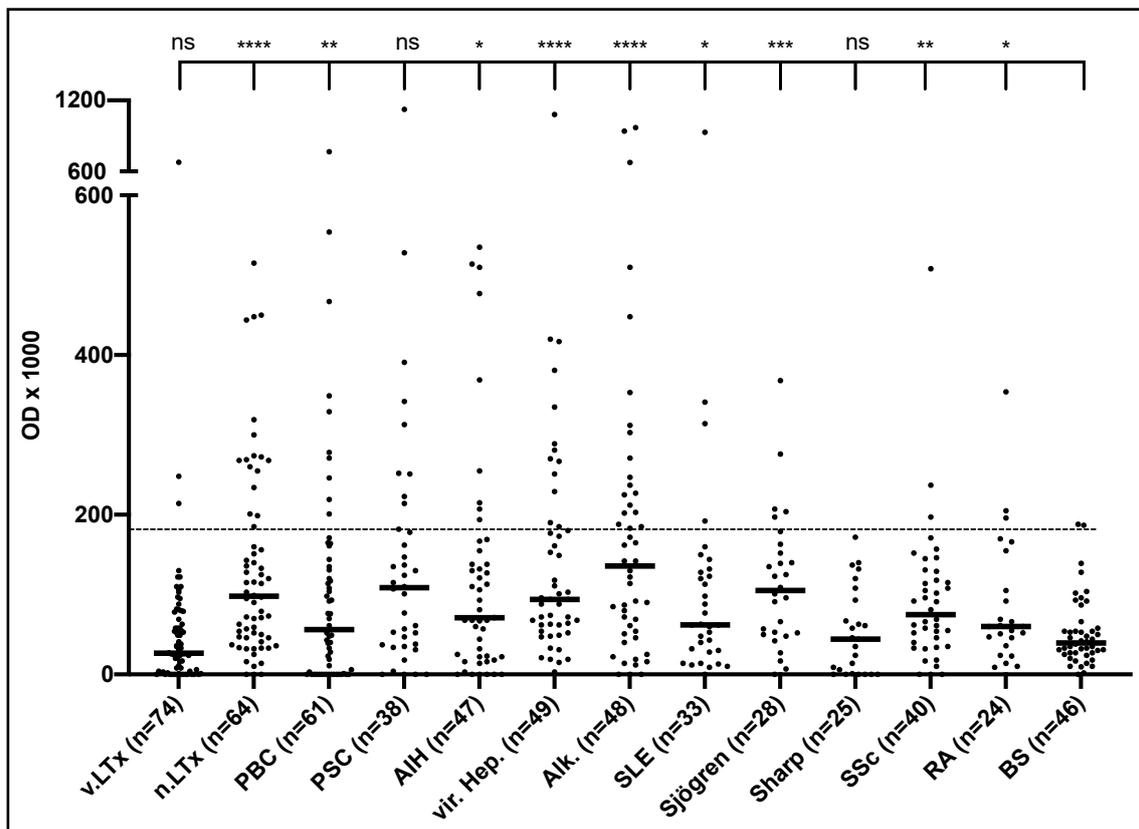
In einem zweiten Versuch wurden mittels ELISA 577 Seren von 473 Patienten und 46 gesunden Blutspendern auf ihre Antikörperaktivität gegen ECL1 untersucht. Werte über dem Mittelwert der gesunden Blutspender plus dreifache Standardabweichung wurden als positiv definiert. Diese Schwelle (OD x 1000) lag für die IgG-Aktivität bei 441 und für die IgM-Aktivität bei 182. Die Anti-ECL1-Antikörperreaktivität vom IgG-Typ lag bei 208 Patientenseren (40 %) und einem Serum eines gesunden Blutspenders (2,2 %) über dem Schwellenwert. Bei elf der zwölf Gruppen zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber den gesunden Blutspendern. Keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den gesunden Blutspendern zeigte die Gruppe der Kinder nach Lebertransplantation, hier lag nur ein gemessener Wert über der Schwelle (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Aktivität der Anti-ECL1-Antikörper vom IgG-Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen.

Gemessene Werte der Optischen Dichte (OD); die individuellen Werte der Patienten ( $\bullet$ ), der Median der Patientengruppe ( $—$ ) und die Schwelle ( $- -$ ) über der ein gemessener Wert liegen muss um als positiv zu gelten. Signifikanzen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

Die Anti-ECL1-Antikörperreaktivität vom IgM-Typ lag bei 95 Patientenseren (18 %) und zwei Seren von gesunden Blutspendern (4,4 %) über dem Schwellenwert. Bei neun der zwölf Gruppen zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber den gesunden Blutspendern. Im Gegensatz zur IgG-Aktivität zeigten die Seren der Kinder nach Lebertransplantation hier einen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Unterschied gegenüber den Seren der Blutspender. In dieser Gruppe lag der gemessene Wert der optischen Dichte bei 16 Patienten (25 %) über dem Schwellenwert. In den Gruppen der Kinder vor Lebertransplantation, den Patienten mit PBC und den Patienten mit Sharp-Syndrom wurde keine erhöhte Aktivität festgestellt (Abbildung 7). Eine Übersicht über die Zahl der mit dieser Methode positiv getesteten Patienten ist in Tabelle 18 dargestellt.



**Abbildung 7:** Aktivität der Anti-ECL1-Antikörper vom IgM-Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen.

Gemessene Werte der Optischen Dichte (OD); die individuellen Werte der Patienten ( $\bullet$ ), der Median der Patientengruppe ( $-$ ) und die Schwelle ( $- -$ ) über der ein gemessener Wert liegen muss um als positiv zu gelten. Signifikanzen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

**Tabelle 18: Häufigkeit von Anti-ECL1-Antikörpern im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen**

Patientengruppe	Anzahl der Patienten [n]	n (%) Anti-ECL1 positiv			
		IgG	IgG+IgM	IgM	Gesamt
Kinder vor LTx	74	10 (13)	1 (1)	2 (3)	13 (17)
Kinder nach LTx	64	1 (1)	0	16 (25)*	17 (27)*
Primär-biliäre Cholangitis	61	13 (21)*	7 (11)*	2 (3)	22 (36)*
Primär-sklerosierende Cholangitis	38	12 (32)*	7 (18)*	2 (5)	21 (55)*
Autoimmune Hepatitis	47	21 (45)*	7 (15)*	2 (4)	30 (64)*
Virale Hepatitiden	49	16 (33)*	9 (18)*	4 (8)	29 (59)*
Alkoholtoxischer Leberschaden	48	10 (21)*	11 (23)*	8 (17)	29 (60)*
Systemischer Lupus Erythematodes	33	24 (73)*	3 (9)	1 (3)	28 (85)*
Sjögren Syndrom	28	18 (64)*	4 (14)*	1 (4)	23 (82)*
Sharp Syndrom	25	13 (52)*	0	0	13 (52)*
Systemische Sklerose	40	11 (28)*	0	3 (8)	14 (35)*
Rheumatoide Arthritis	24	8 (33)*	1 (4)	2 (8)	11 (46)*
Gesunde Blutspender	46	1 (2)	0	2 (4)	3 (7)
<b>Gesamt</b>	<b>577</b>	<b>158 (27)</b>	<b>50 (9)</b>	<b>45 (8)</b>	<b>253 (44)</b>

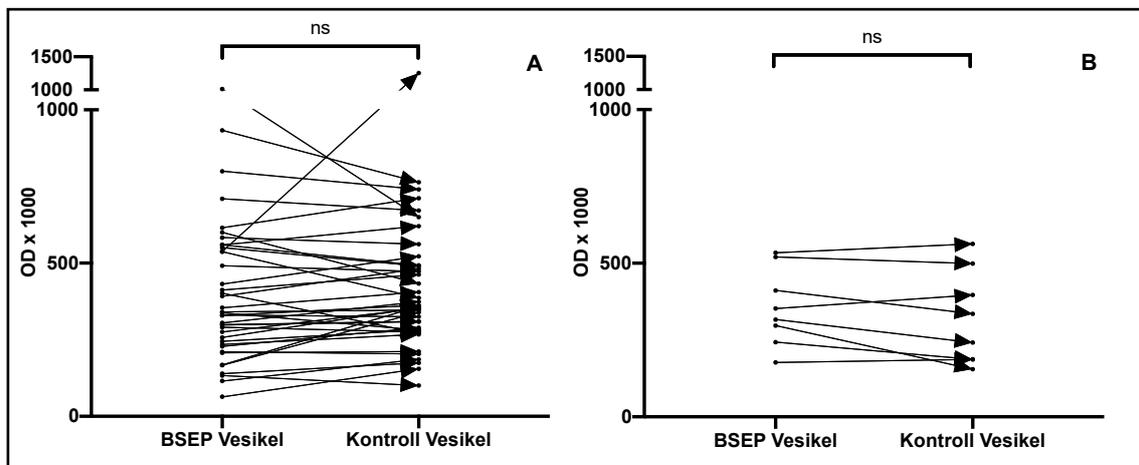
\*signifikant im Vergleich zu gesunden Blutspendern  $p < 0,05$ .

### 3.3 Detektion von Antikörpern gegen die Gallensalzexportpumpe BSEP unter der Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln

Die Antikörperreaktivität gegen die BSEP wurde ferner mithilfe von SF9-BSEP Vesikeln bestimmt. Als Methoden wurden ELISA, Western Blot und ein vesikulärer Transporter-Assay verwendet.

#### 3.3.1 ELISA Ergebnisse mit SF9-BSEP Vesikeln als Antigen

Im ELISA wurden die Seren von 30 Patienten und 8 gesunden Blutspendern getestet. Dafür wurde eine Platte mit SF9-BSEP und eine Platte mit SF9-Kontroll Vesikeln beschichtet und gegen die Patientenserum getestet. Die Messung ergab eine unspezifische Reaktion und keinen signifikanten Unterschied der Antikörperreaktivität gegen BSEP-Vesikel im Vergleich zu Kontroll-Vesikeln. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht weiterverwendet (Abbildung 8).



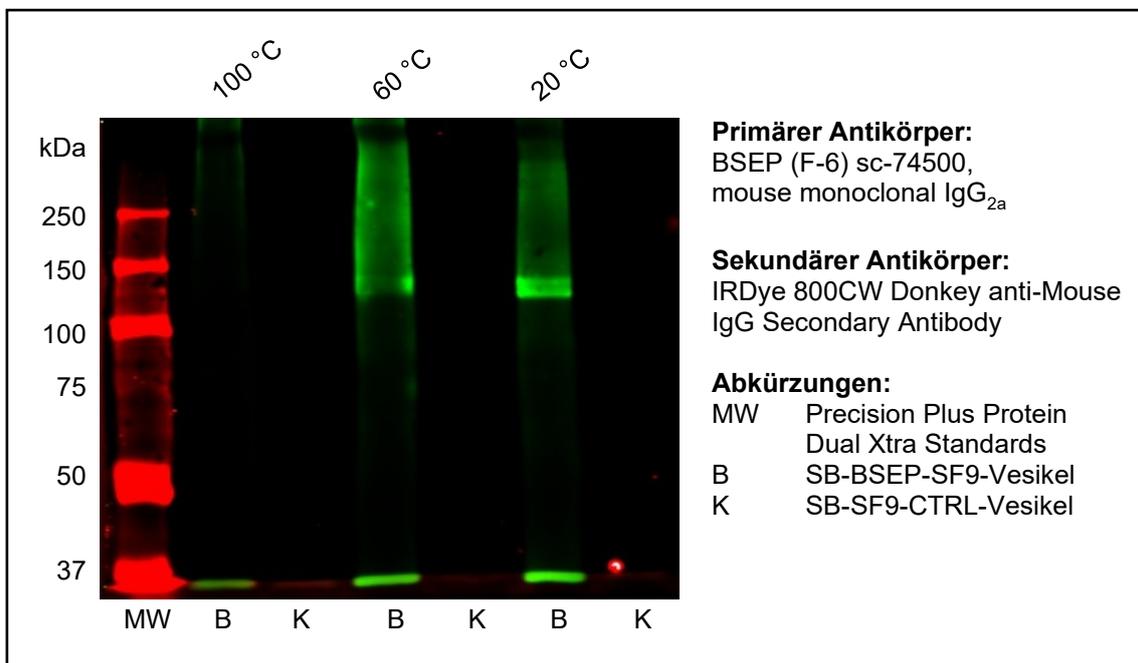
**Abbildung 8:** IgG-Reaktivität von Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (A) sowie gesunden Blutspendern (B) mit BSEP- bzw. Kontroll-Vesikeln im ELISA

Vergleich der Antikörper Reaktivität gegen BSEP- bzw. Kontroll-Vesikel in Seren von 30 Patienten und 8 gesunden Blutspendern. Gegeben sind die Werte der optischen Dichte (OD) nach ELISA Verfahren. Kein signifikanter Unterschied der Antikörper Reaktivität. BSEP = Bile Salt Export Pump ; ns = nicht signifikant.

### 3.3.2 Ergebnisse des Western Blots unter Verwendung von SF9-BSEP-Vesikeln als Antigen

Mithilfe eines Western Blot Verfahrens mit Peroxidase gekoppeltem sekundärem Antikörper wurden die Seren von 125 Patienten (AIH: n=9; Alkohol-Tox.: n=3; Kinder nach LTx: n=65, davon 62 auch vor LTx; PBC: n=10; PSC: n=14; RA: n=1; Sharp n=3; Sjögren: n=7; SSc: n=2; SLE: n=5; BS n=6;) auf Anti-BSEP Antikörper getestet. Verwendet wurden SF9-BSEP und SF9-Kontroll Vesikel. Mithilfe eines monoklonalen Anti-BSEP Antikörpers (primärer AK) ergab sich eine spezifische Bande auf der Höhe von ca. 140 kDa (Abbildung 10).

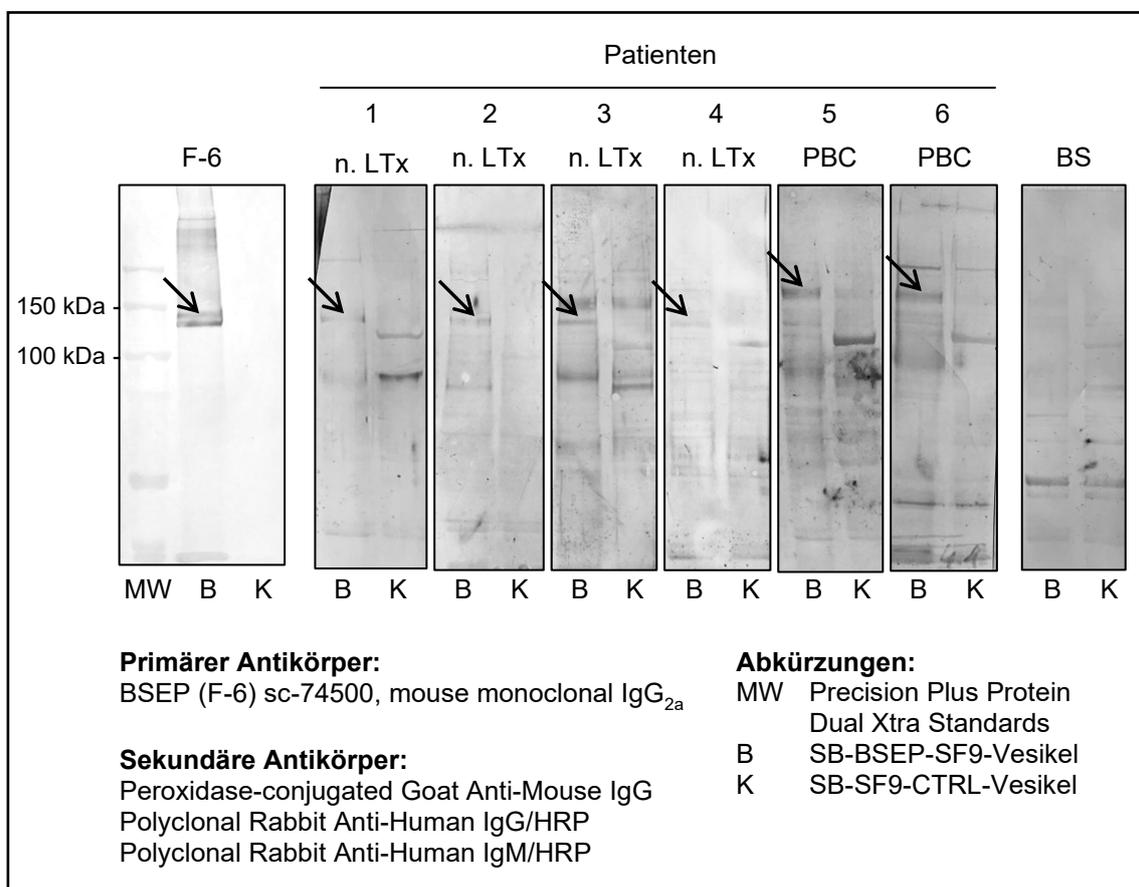
In einem Vorversuch mit Fluoreszenz markiertem sekundären Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Abgrenzung der Bande deutlicher wurde, wenn die Probe vor der Elektrophorese nicht erhitzt wurde (Abbildung 9). Daher wurden die Vesikel in den folgenden Versuchen bei Raumtemperatur mit dem SDS-Puffer vermischt und in die Geltaschen geladen.



**Abbildung 9:** *Optimierung des Western Blots mit SF9-BSEP-Vesikeln mithilfe eines Fluoreszenz markierten sekundären Antikörpers*  
Zum Nachweis des BSEP-Proteins in den BSEP-Vesikeln wurde ein monoklonaler Maus-Anti BSEP Antikörper verwendet. Die spezifische 140kDa Bande war besser zu erkennen, wenn die Vesikellösung vor dem SDS-Page nicht erhitzt, sondern bei Raumtemperatur mit dem SDS-Puffer vermischt wurde.

Nur vier der 125 im Western Blot getesteten Patientenseren zeigten die BSEP-spezifische Bande bei 140 kDa (Abbildung 10); alle stammten von Kindern nach Lebertransplantation. Diese Bande konnte bei Inkubation der Sheets mit Seren, die vor der Lebertransplantation abgenommen wurden, nicht nachgewiesen werden. Die klinischen Daten dieser Kinder sind in Kapitel 3.5 dargestellt.

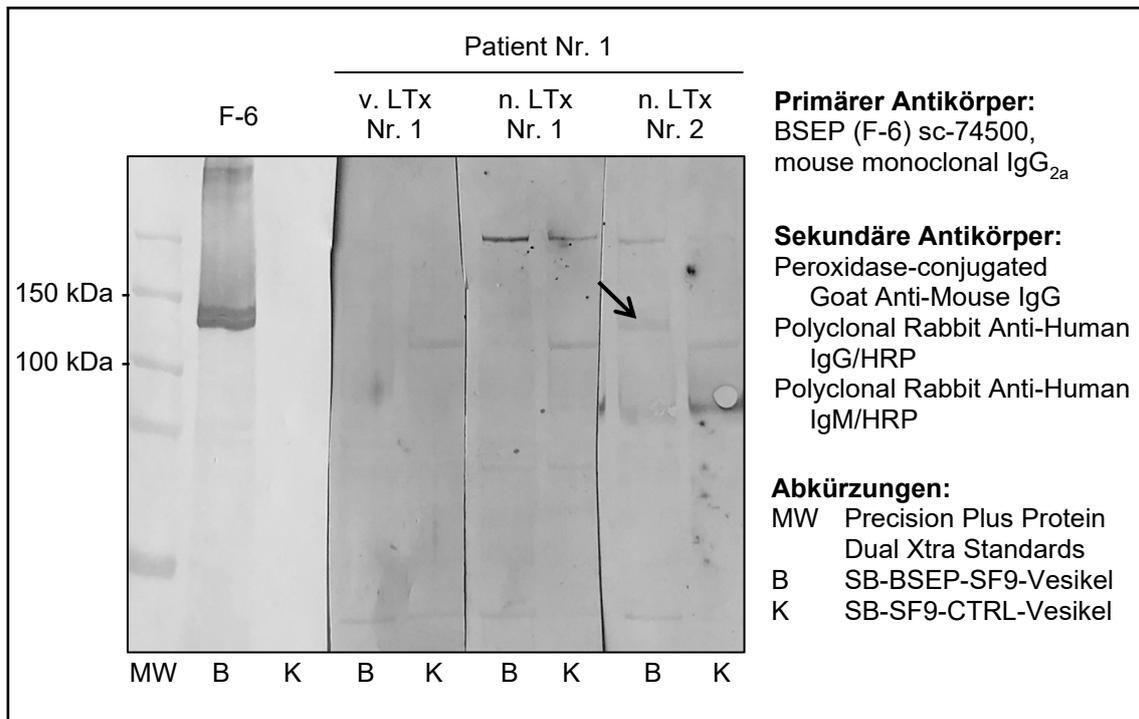
Zwei weitere Seren, beide von PBC-Patienten, reagierten mit einer weiteren Determinante bei 160 kDa (Abbildung 10). Die klinischen Daten dieser Patienten sind in Kapitel 4.5 dargestellt. Keine der beiden Banden konnten mit Seren von gesunden Blutspendern nachgewiesen werden.



**Abbildung 10: Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern im Western Blot unter Verwendung von BSEP- und Kontroll-Vesikeln**

Unter der Verwendung eines monoklonalen Anti-BSEP Antikörpers (F-6) kam es in der Spur mit BSEP-Vesikeln zu einer spezifischen Bande bei 140kDa. Auf dieser Höhe konnten bei den Patienten 1-4 ebenfalls spezifische Banden nachgewiesen werden. Bei Patient 5 und 6 kam es zu einer spezifischen Bande bei 160kDa. Bei gesunden Blutspendern (BS) konnte keine dieser Banden nachgewiesen werden. F-6 = monoklonaler F6 Anti-BSEP-Antikörper; n.LTx = nach Lebertransplantation; PBC = Primär-biliäre Cholangitis; BS = Blutspender; die Pfeile markieren die spezifischen Banden.

Bei Patient 1 wurden zwei Lebertransplantationen (LTx) durchgeführt und es lagen drei Seren vor. Zur Ausbildung einer spezifischen Bande kam es nur unter der Verwendung des Serums nach der zweiten Lebertransplantation. Mit den Seren vor der ersten bzw. zweiten Transplantation gab es keine Reaktion (Abbildung 11).



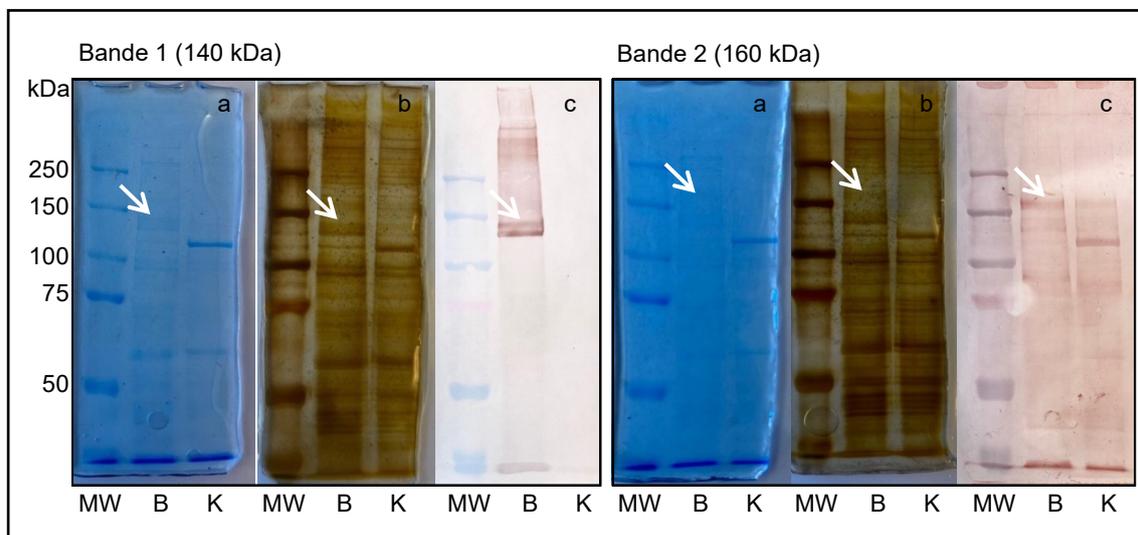
**Abbildung 11: Western Blot gegen BSEP-Vesikel unter der Verwendung von drei Seren eines Patienten vor und nach Lebertransplantation**

Bei Patient 1 konnte eine spezifische 140kDa Bande nur mit dem Serum nach der zweiten Lebertransplantation nachgewiesen werden. In den Seren vor der ersten bzw. nach der ersten Lebertransplantation kam es zu keiner spezifischen Reaktion. F-6 = monoklonaler F6 Anti-BSEP-Antikörper; n.LTx = nach Lebertransplantation; v.LTx = vor Lebertransplantation; der Pfeil markiert die spezifische Bande.

### 3.3.3 Ergebnisse der Proteomanalyse der Gelbanden mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie

Um zu überprüfen, ob die Antikörperreaktionen bei 140 kDa und 160 kDa tatsächlich gegen BSEP-Epitope gerichtet sind, wurde eine Proteomanalyse durchgeführt.

Dafür wurden SF9-BSEP Vesikel mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch eine Silber- bzw. Coomassie-Färbung konnten die Banden auf Höhe 140 kDa und 160 kDa angefärbt und anschließend ausgeschnitten werden (Abbildung 12).



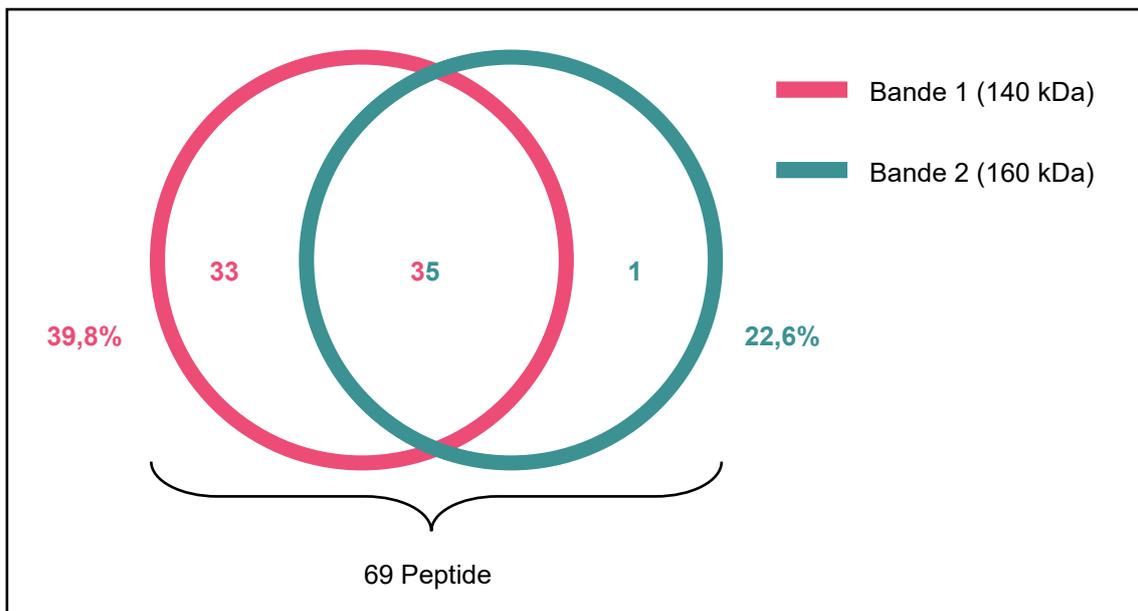
**Abbildung 12: Polyacrylamid Gele nach Gelelektrophorese und Silber- bzw. Coomassie Färbung**

Anfärbung zweier Polyacrylamid Gele nach SDS-Page mit Coomassie Färbung (a) und Silber Färbung (b) sowie nach Western Blot (c). Sichtbar waren Bande 1 (140 kDa) und Bande 2 (160 kDa). MW = Molekulargewichtsmarker; B = BSEP-Vesikel; K = Kontroll-Vesikel.

Die Banden der Silberfärbung wurden zur Proteomanalyse an das Proteome Center Tübingen übergeben (Kapitel 2.3.8). Mit den Banden der Coomassie-Färbung wurde eine Elektroelution durchgeführt und mit dem erhaltenen Eluat zwei ELISA Platten beschichtet (Kapitel 2.3.6).

Der Trypsin In-Gel-Verdau und die Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie ergaben folgende Ergebnisse:

Das BSEP Protein konnte in beiden Banden nachgewiesen werden. In Bande 1 (140 kDa) wurden 68 Peptide nachgewiesen. Die Sequenzabdeckung betrug 39,8 %, die Intensität  $1,3 \times 10^{11}$  und der iBAQ Wert  $1,99 \times 10^9$ . In Bande 2 (160 kDa) wurden 36 Peptide nachgewiesen. Die Sequenzabdeckung betrug hier 22,6 %, die Intensität  $4,9 \times 10^9$  und der iBAQ Wert  $7,4 \times 10^7$  (Abbildung 13).



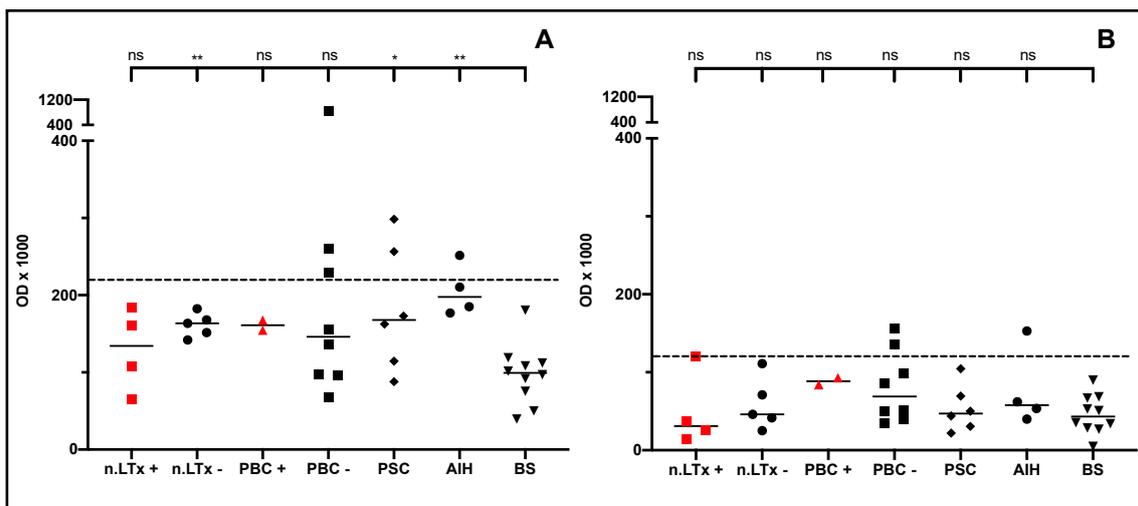
**Abbildung 13: Ergebnisse der Proteomanalyse von Bande 1 (140 kDa) und Bande 2 (160 kDa)**

*In der Massenspektrometrie mit den Geldbanden nach SDS-Page konnten insgesamt 69 BSEP-Peptide nachgewiesen werden. Davon waren 33 Peptide nur in Bande 1, 35 Peptide in beiden Banden und ein Peptid nur in Bande 2 nachweisbar. Die Sequenzabdeckung betrug in Bande 1 39,8 % und in Bande 2 22,6 %.*

### 3.3.4 Nachweis von Antikörperreaktionen gegen Proteine der Gelbände im ELISA

Gegen die aus den beiden Gelbänden bei 140 kDa und 160 kDa eluierten Proteine wurden Seren von 29 Patienten und 10 gesunden Blutspendern im ELISA getestet. Die Schwelle (OD x 1000) für positive Werte wurde als dreifache Standardabweichung vom Mittelwert der Blutspender definiert und lag für Bande 1 bei 215 (IgG) bzw. 121 (IgM) und für Bande 2 bei 156 (IgG) bzw. 196 (IgM).

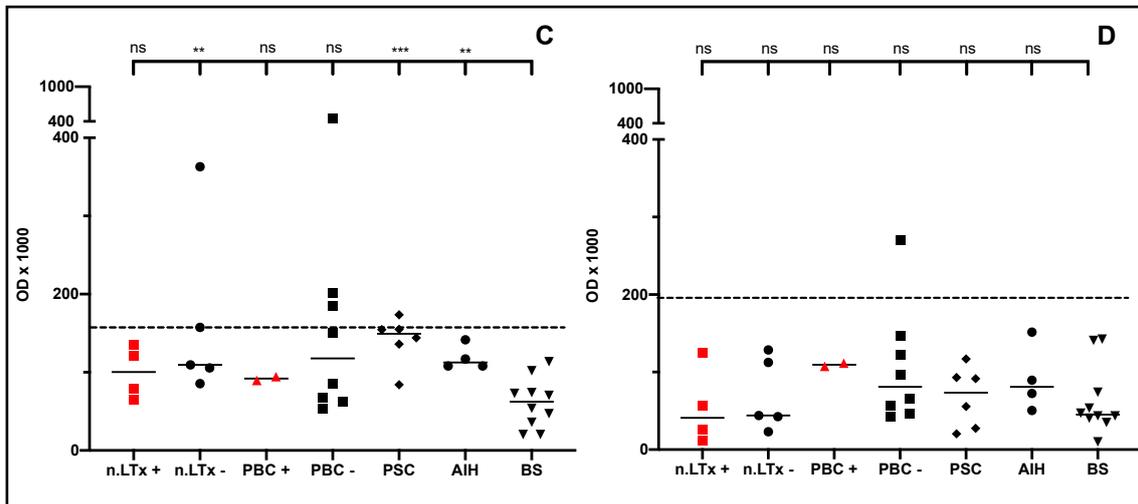
Seren von drei PBC-Patienten zeigten IgG-Reaktivität, davon zwei zusätzlich IgM-Reaktivität gegen die Proteine aus Bande 1 (140 kDa). Ferner hatten zwei PSC-Patienten IgG-Antikörper und ein AIH-Patient IgG- und IgM-Antikörper (Abbildung 14). Die Seren von Kindern mit Gallengangsatresie nach LTx waren negativ.



**Abbildung 14: Antikörper Aktivität vom IgG-Typ (A) und vom IgM Typ (B) gegen die Proteine der 140 kDa Gelbände im ELISA**

Gemessene Werte der Optischen Dichte (OD); die individuellen Werte der Patienten, der Median der Patientengruppe (—) und die Schwelle (- -) über der ein gemessener Wert liegen muss, um als positiv zu gelten. Signifikanzen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; n.LTx = nach Lebertransplantation; PBC = Primär-biliäre Cholangitis; AIH = Autoimmune Hepatitis; BS = gesunde Blutspender; + = mit spezifischer Bande im Western Blot (rot); - = ohne spezifische Bande im Western Blot.

Gegen die Proteine aus Bande 2 (160 kDa) konnte bei drei Patienten mit PBC eine erhöhte IgG- und bei einem Patienten zusätzlich eine erhöhte IgM-Aktivität festgestellt werden. Außerdem zeigten ein Patient mit PSC und ein Kind nach Lebertransplantation eine erhöhte Aktivität vom IgG Typ (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Antikörper Aktivität vom IgG Typ (C) und vom IgM Typ (D) gegen die Proteine der 160 kDa Gelbande im ELISA**

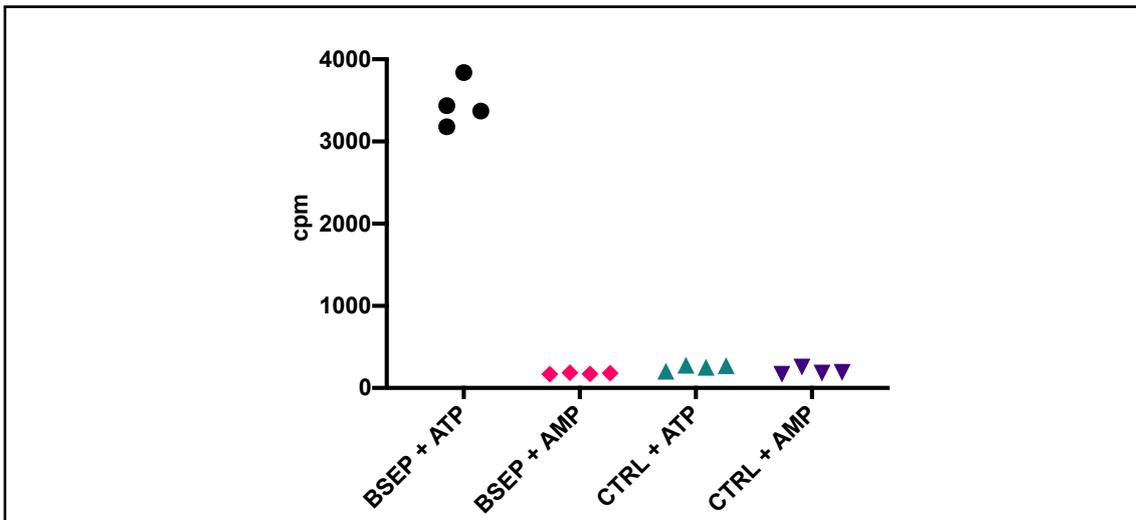
Gemessene Werte der Optischen Dichte (OD); die individuellen Werte der Patienten, der Median der Patientengruppe (—) und die Schwelle (- -) über der ein gemessener Wert liegen muss um als positiv zu gelten. Signifikanzen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; n.LTx = nach Lebertransplantation; PBC = Primär-biliäre Cholangitis; AIH = Autoimmune Hepatitis; BS = gesunde Blutspender; + = mit spezifischer Bande im Western Blot (rot); - = ohne spezifische Bande im Western Blot.

Von den im Western Blot positiv getesteten Patienten (in Abbildung 13 und Abbildung 14 rot markiert) lag bei keinem die Antikörperaktivität über dem Normwert.

### 3.3.5 Ergebnisse des Transporter Assays mit SF9-BSEP Vesikeln

Die funktionelle Bedeutung der Anti-BSEP Antikörper wurde mittels vesikulärem Transporter Assay untersucht. Dafür wurden die SF9-BSEP Vesikel von Genomembrane und radioaktiv markierte Gallensäuren verwendet (Tabelle 9).

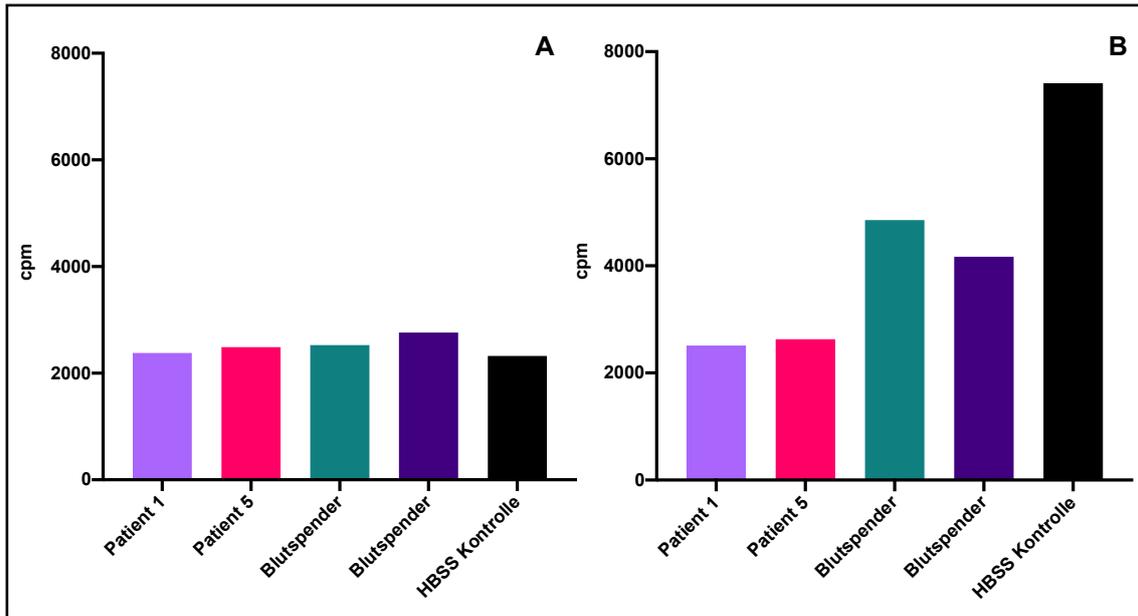
In einem Vorversuch wurde die Methode überprüft und es konnte gezeigt werden, dass der BSEP Transporter Gallensäuren nur unter der Zugabe von ATP in das Lumen der Vesikel pumpt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Überprüfung der Methode des vesikulären Transporter Assays und der Funktion der SF9-BSEP-Vesikel**

Radioaktivität in „Counts per Minute“ (cpm) im Lumen der BSEP bzw. Kontroll (CTRL) Vesikel unter der Zugabe von Adenosintri-phosphat (ATP) oder Adenosinmonophosphat (AMP). Nur unter Zugabe von ATP kam es zu einer Aufnahme von radioaktiv markierten Gallensäuren in das Lumen der Vesikel.

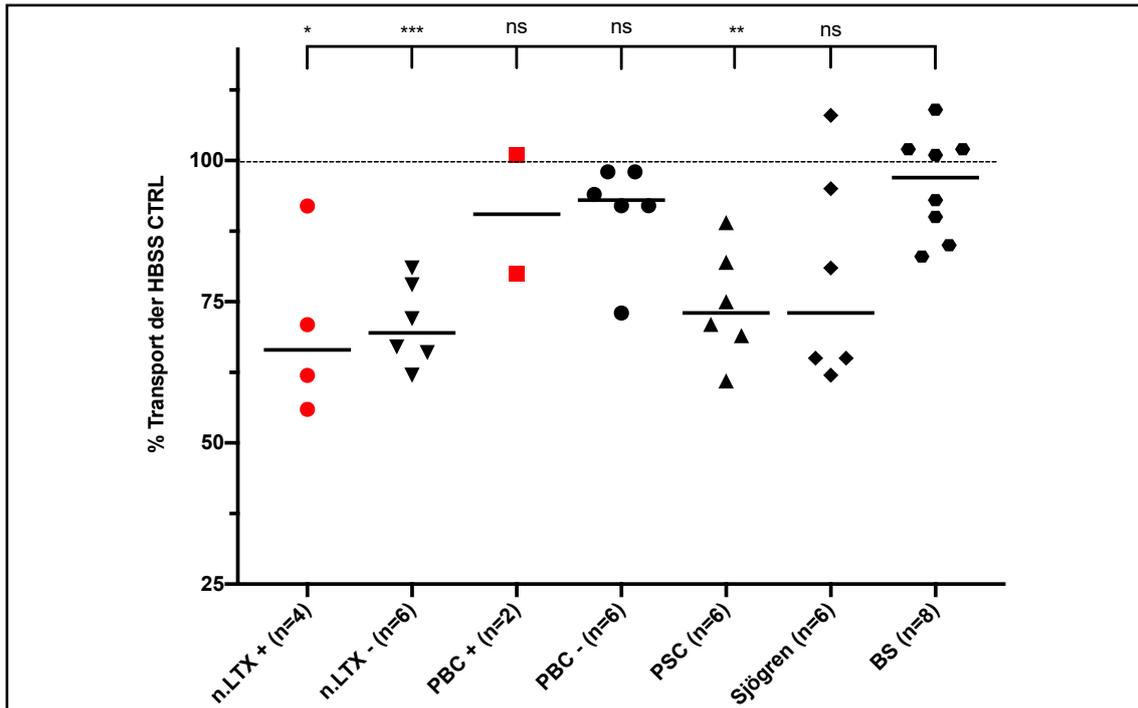
In einem weiteren Vorversuch konnte außerdem gezeigt werden, dass es nur zu einer Hemmung der BSEP Transport-Aktivität kam, wenn vor dem Assay ein „Freeze and Thaw Zyklus“ durchgeführt wurde. Antikörper hemmen die Gallensalzexportpumpe BSEP also durch eine Wirkung auf intravesikuläre bzw. extrazelluläre Strukturen (Abbildung 17).



**Abbildung 17: BSEP Transporter Aktivität nach vesikulärem Transporter Assay.**  
 Intravesikuläre Radioaktivität (BSEP-Vesikel) nach Transporter-Assay in cpm (Counts per minute) nach Inkubation mit Patientenseren oder HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ohne „Freeze and Thaw Zyklus“ (A) und mit „Freeze and Thaw Zyklus“ (B).

Nach Optimierung der Konzentrationen wurden dann die Seren von 30 Patienten und 8 gesunde Blutspender getestet. Die Transporter Aktivität wurde nach „Freeze and Thaw Zyklus“ und Transporter Assay gemessen und als prozentuale Aktivität im Vergleich zur HBSS Kontrolle angegeben.

Zu einer signifikanten Hemmung kam es bei den Kindern nach Lebertransplantation und bei Patienten mit PSC. Bei den Patienten mit Morbus Sjögren kam es zu keiner signifikanten Hemmung, drei der sechs getesteten Patienten haben den Transport im Vergleich zur HBSS Kontrolle jedoch um mehr als 30 % gehemmt (Abbildung 18).

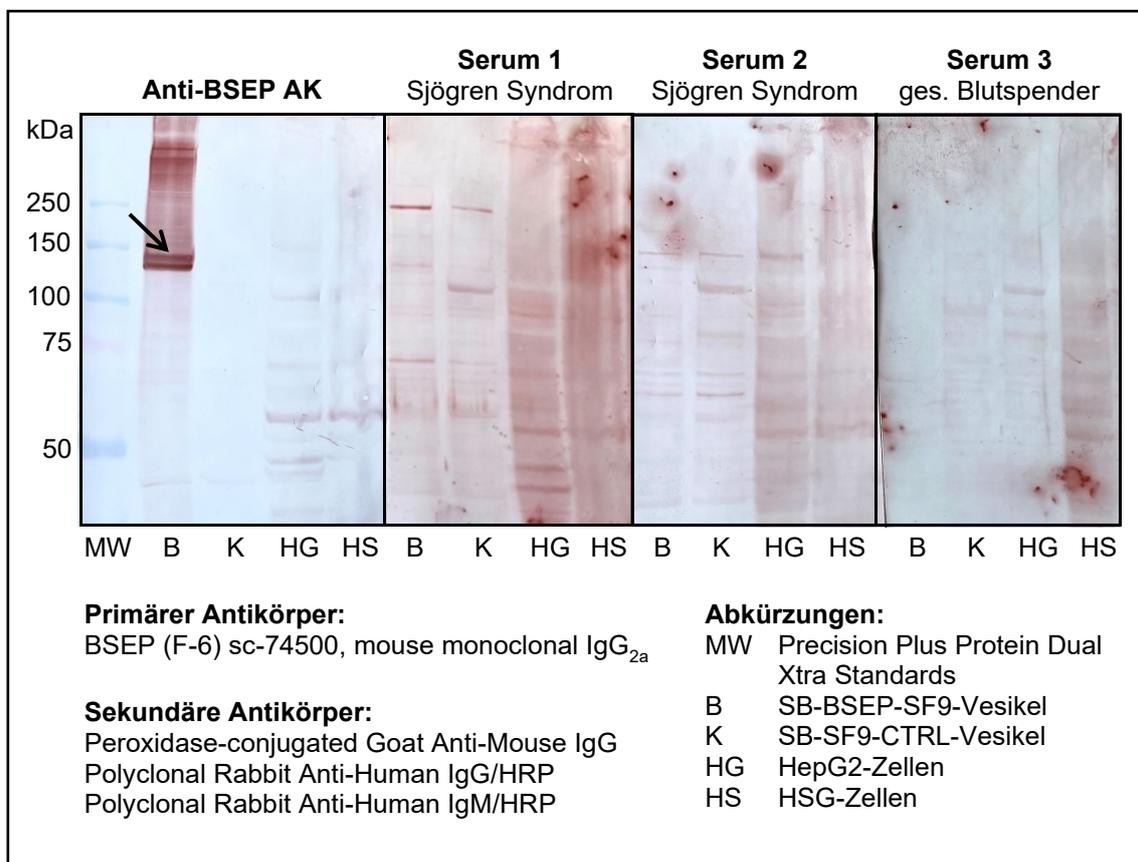


**Abbildung 18: Ergebnisse des vesikulären Transporter Assays mit BSEP-Vesikeln**

Prozentuale Hemmung der BSEP-Transportaktivität der BSEP-Vesikel nach Inkubation mit Antikörpern aus Patientenseren im Vergleich zu einer HBSS Kontrolle. Gegeben sind die gemessenen Werte der Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen, der Median der Patientengruppe (—) und die Transporter Aktivität nach Inkubation mit HBSS (- -). Signifikanzen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant. n.LTx = nach Lebertransplantation; BS = gesunde Blutspender; + = Patienten mit spezifischer Bande im Western Blot; - = Patienten ohne spezifische Bande im Western Blot; HBSS = Hank's Balanced Salt Solution.

### 3.4 Ausschluss von Kreuzreaktionen von Anti-CFTR Autoantikörpern mit der BSEP mittels Western Blot

Mit einem Western Blot Verfahren wurden die Seren von 6 Patienten mit Sjögren Syndrom auf eine Antikörper Reaktion gegen HSG- und HepG2-Zellen sowie gegen BSEP-Vesikel getestet. Es konnten keine spezifischen Banden und somit keine Anti-CFTR oder Anti-BSEP Autoantikörper in den Seren nachgewiesen werden. Auch der monoklonale Anti-BSEP Antikörper reagierte nicht mit den HSG Zellen. In Abbildung 19 sind zwei der Western Blot Sheets exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 19: Ausschluss von Kreuzreaktionen von Anti-CFTR Autoantikörpern mit BSEP mittels Western Blot**

Western Blot Sheets nach Inkubation von BSEP-SF9 Vesikeln, CTRL-SF9 Vesikeln, Plasmamembranen von HepG2-Zellen und Plasmamembranen von HSG-Zellen mit einem monoklonalen Anti-BSEP Antikörper bzw. mit Seren von Patienten mit Sjögren Syndrom und einem gesunden Blutspender. Nach Inkubation mit monoklonalem Anti-BSEP Antikörper kam es zu einer spezifischen Antikörper Reaktion bei 140kDa mit den BSEP-Vesikeln. Bei Inkubation mit Patientenserum kam es zu keiner spezifischen Reaktion.

### **3.5 Klinische Merkmale der Patienten mit spezifischer Anti-BSEP-Reaktion im Western Blot**

Die klinischen Daten der vier Patienten, mit deren Seren im Western Blot mit SF9-BSEP Vesikeln eine spezifische Bande auf Höhe 140 kDa nachgewiesen werden konnte, sind in Kapitel 3.5.1 dargestellt. Ein zusammenfassender Vergleich dieser Daten erfolgt im Kapitel 3.5.2.

#### ***3.5.1 Klinische Daten der im Western Blot Anti-BSEP positiven Patienten***

Bei Patient 1 handelt es sich um einen Jungen (Jg. 2016). Seit Geburt bestanden eine beidseitige Choanalatresie, eine Mikrozephalie, eine Dextroposition des Herzens, ein persistierender Ductus arteriosus Botalli und ein Vorhofseptumdefekt. Aufgrund einer Gallengangsatresie mit sekundärer biliärer Zirrhose erfolgte im Alter von 4,5 Monaten die erste Full-Size Lebertransplantation. Nach weiteren 16,5 Monaten erfolgte aufgrund einer Transplantcholangiopathie im Sinne einer Ischaemic Type Biliary Lesion eine zweite Lebertransplantation. Von diesem Kind konnten 3 Seren im Verlauf getestet werden: Das erste Serum wurde 3,5 Monate vor der ersten Lebertransplantation entnommen. Das zweite 6,5 Monate nach der ersten Transplantation und 8 Monate vor der zweiten Transplantation. Das dritte Serum wurde 10 Monate nach der zweiten Lebertransplantation entnommen. Im Western Blot ließen sich nur im letzten Serum (nach der zweiten LTx) Antikörper gegen den BSEP-Transporter nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt war das Kind 2,6 Jahre alt und hatte weder klinisch die Symptome einer Cholestase noch erhöhte Leberwerte. Grund der Vorstellung war eine Verlaufskontrolle zwei Jahre nach Lebertransplantation.

Bei Patient 2 handelt es sich um einen Jungen (Jg. 2012) mit der Diagnose Alagille Syndrom mit chronischer Leberinsuffizienz und Cholestase. Außerdem lagen eine chronische Niereninsuffizienz Grad 2 (Z.n. Nephrektomie rechts) und Gedeihstörungen mit vorwiegend sprachlich-kognitiver Entwicklungsverzögerung vor. Im Alter von 16 Monaten erfolgte eine Split-Lebertransplantation nach postmortalen Spende. Nach der Transplantation kam es zu leichten Transplantabstoßungen und rezidivierenden Cholangitiden. Von diesem Kind wurden 5 Seren im Verlauf getestet. Die Seren 1 und 2 wurden 4 bzw. 3 Mona-

te vor Transplantation und die Seren 3, 4 und 5 wurden 2, 4 und 6 Jahre nach Transplantation entnommen. Anti-BSEP Antikörper konnten nur im letzten dieser Seren sechs Jahre nach LTx nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme dieses Serums war der Patient 6,5 Jahre alt und befand sich in einem körperlich guten Zustand ohne Symptome einer Cholestase. Im Labor zeigte sich ein normwertiges Bilirubin und eine erhöhte GPT und  $\gamma$ -GT.

Bei Patient 3 handelt es sich um einen Jungen (Jg. 2015). Aufgrund einer extrahepatischen Gallengangsatresie mit sekundärer biliärer Zirrhose wurde im Alter von 5 Monaten eine Full-Size Lebertransplantation durchgeführt. Von diesem Kind wurden 4 Seren getestet. Serum 1 wurde einige Tage vor Lebertransplantation, die Seren 2, 3 und 4 wurden 1, 2 und 3 Jahre nach Transplantation entnommen. Hier ließen sich im Serum, welches 3 Jahre nach Lebertransplantation entnommen wurde, Antikörper nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt war das Kind 3,6 Jahre alt und zeigte klinisch und laborchemisch keine Hinweise auf eine Cholestase.

Bei Patient 4 handelt es sich um ein Mädchen (Jg. 2018). Bei der Patientin wurde im Alter von 5 Monaten aufgrund einer extrahepatischen Gallengangsatresie mit rezidivierenden Cholangitiden und sekundärer Zirrhose eine Lebertransplantation mit Lebendspende der Mutter durchgeführt. Von dieser Patientin wurden zwei Seren getestet. Das erste wurde unmittelbar vor der Lebertransplantation entnommen, das zweite 11 Monate nach Lebertransplantation. Anti-BSEP Antikörper waren nur in dem Serum nach Transplantation nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war die Patientin 1,3 Jahre alt und zeigte klinisch und laborchemisch keine Hinweise auf eine Cholestase.

### **3.5.2 Vergleich der klinischen Daten**

Die oben beschriebenen Patienten weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Bei allen vier Patienten handelt es sich um Kinder bei denen es innerhalb der ersten Lebensmonate zu den Symptomen einer Cholestase und zu einem Leberversagen kam. Daher war bei allen vier Patienten innerhalb des ersten bzw. des zweiten Lebensjahres eine Lebertransplantation nötig. Bei den Patienten 1 und 2 kam es nach Lebertransplantation zu erneuten rezidivierenden Cholangitiden und Abstoßungsreaktionen, bei Patient 1 war aus diesem Grund eine zweite Lebertransplantation notwendig. Ursache der Cholestase und sekundärer Zirrhose mit Leberversagen war bei den Patienten 1, 3 und 4 eine Gallengangsatresie, bei Patient 2 ein Alagille-Syndrom.

Von allen vier Patienten wurden sowohl Seren von vor, als auch nach Lebertransplantation auf eine Antikörper Reaktion gegen die BSEP untersucht. Dennoch ließen sich bei allen vier Patienten nur in den Seren nach Transplantation Antikörper nachweisen.

Nur Patient 2 hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhöhte Leberwerte. Bei den anderen Patienten zeigte sich sowohl klinisch als auch laborchemisch kein Hinweis auf eine Cholestase.

## **4 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden und Antigene verwendet, um Antikörper gegen die Gallensalzexportpumpe BSEP nachzuweisen. Die Aussagekraft dieser Methoden soll im Folgenden bewertet und mit den Methoden anderer Arbeiten verglichen werden. Außerdem soll diskutiert werden, welche Bedeutung der Nachweis von Autoantikörpern gegen die BSEP bei Patienten mit PBC, PSC und Sjögren Syndrom haben könnte.

Als Grundlage werden im Folgenden zunächst die Methoden anderer Arbeitsgruppen zum Nachweis von Anti-BSEP Antikörpern vorgestellt.

### **4.1 Bisher verwendete Methoden zum Anti-BSEP Antikörper Nachweis**

Seit der Erstbeschreibung von Anti-BSEP Autoantikörpern (Keitel et al. 2009) wurden mehrere Studien veröffentlicht, die unterschiedliche Methoden zum Antikörpernachweis nutzten (Jara et al. 2009; Maggiore et al. 2010; Siebold et al. 2010; Stindt et al. 2016)

In einer Studie von Keitel et al. (2009) konnten bei einer jungen Patientin mit PFIC2 und wiederholtem Leberversagen nach LTx erstmals Anti-BSEP-Autoantikörper nachgewiesen werden (Kapitel 1.4). Den Hinweis auf eine Antikörperreaktion brachte hier eine Immunfluoreszenzfärbung der explantierten Lebertransplantate der Patientin. Mithilfe eines Anti-Human-Antikörpers konnten im Bereich der Gallengänge Autoantikörper nachgewiesen werden. Diese waren in Transplantbiopsaten anderer Kinder mit ähnlicher Symptomatik nicht nachweisbar. Bei Inkubation von gesundem Lebergewebe mit dem Serum der Patientin zeigte sich ebenfalls eine Antikörper-Akkumulation in den Gallengängen. Diese Antikörper waren vom IgG-Typ und ließen sich nur in Seren nach der zweiten bzw. der dritten Lebertransplantation nachweisen und nicht im Serum vor Transplantation. Die Hypothese, dass es sich bei dem Antigen um die BSEP handelt, konnte anschließend mithilfe von HEK293 Zellen bestätigt werden, die mit dem BSEP Protein (gekoppelt an ein gelbes Fluoreszenz Pro-

tein) transfiziert worden waren. Nach Isolierung der Zellmembranen wurde im anschließenden Western Blot mit Patientenserum eine BSEP-Bande bei 180 kDa detektiert. Mit der Membranfraktion nicht-transfizierter Zellen zeigte sich keine Antikörperreaktion. Mithilfe eines Dot Blots unter Verwendung überlappender BSEP-Peptide konnte gezeigt werden, dass das Epitop der Antikörper auf dem ersten extrazellulären Loop (ECL1) der BSEP lokalisiert ist. Zur funktionellen Analyse wurden in dieser Studie Rattenhepatozyten bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Bei Konfluenz verschließen tight junctions die Räume zwischen den Zellen und bilden so Pseudocanaliculi. Mithilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Anti-BSEP Antikörper in das Lumen der Gallengänge gelangen und den transepithelialen Transport der Gallensäuren hemmen.

In einer zweiten Studie (Jara et al. 2009) wurden drei Patienten mit PFIC2 und post-transplant Cholestase auf Anti-BSEP Autoantikörper untersucht. Auch hier konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass Antikörper aus den Seren mit Antigenen in den Gallengängen reagieren. Zur Bestätigung, dass es sich hier ebenfalls um Anti-BSEP Antikörper handelte, wurde ein Western Blot mit SF9-BSEP Vesikeln durchgeführt. Nach Gelelektrophorese, Western-Blotting und Inkubation mit den Seren der Patienten konnte bei den SF9-BSEP-Lysaten eine Antikörperreaktion mit Proteinen einer molekularen Masse von 140 kDa nachgewiesen werden. Diese zeigte sich auch nach Inkubation mit einem monoklonalen Anti-BSEP Antikörper, nicht jedoch bei den Kontroll-Vesikel-Lysaten oder nach Inkubation mit Kontrollseren. Zur funktionellen Analyse wurde mit den SF9-BSEP Vesikeln ein Transporter Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Vesikel für 30 min bei 37 °C mit Patientenserum oder Kontrollserum inkubiert. Dann wurden radioaktiv markierte Gallensäuren hinzugegeben und anschließend die intravesikuläre Radioaktivität gemessen. Hier zeigte sich eine vollständige Hemmung der Gallensäureaufnahme nach Inkubation mit Patientenserum oder dem BSEP-Inhibitor Cyclosporin. Bei den Kontrollseren kam es zu keiner Hemmung. In einem zweiten funktionellen Versuch wurde lebenden Ratten ein Anti-human-BSEP Antikörper oder steriles Patientenserum intravenös injiziert. Postmortem konnten mittels Immunfluoreszenztest Antikörper

per in den Gallengängen der Rattenleber detektiert werden. Dies bestätigte erneut die Hypothese, dass das Epitop der Antikörper auf extrazellulären, canaliculären Strukturen der BSEP lokalisiert ist und dass humane Antikörper mit der BSEP der Ratte kreuzreagieren.

In einer dritten Arbeit (Stindt et al. 2016) wurden 9 Patienten mit PFIC2 und posttransplant auftretender Cholestase untersucht. Auch hier konnten durch Immunfluoreszenzfärbung Antikörperreaktionen mit canaliculären Strukturen nachgewiesen werden. Dass es sich dabei um Strukturen des BSEP Transporters handelt, wurde wie schon bei Keitel et al. (2009) mit transfizierten HEK293 Zellen und Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Außerdem wurde wie bei Jara et al. (2009) ein Western Blot mit SF9-BSEP-Vesikeln durchgeführt. Hier zeigte sich ebenfalls eine spezifische Bande auf Höhe 140 kDa. Durch diese Tests wurde bei 7 der 9 Patienten die Diagnose „Autoimmun induziertes BSEP Defizit (AIBD)“ gestellt und die Seren für weitere Tests verwendet. Zur Überprüfung der Hypothese, dass das Epitop der Anti-BSEP Antikörper auf dem ersten extrazellulären Loop (ECL1) des Proteins lokalisiert ist (Keitel et al. 2009), wurde ein WB mit dem ECL1 (gekoppelt an ein gelb fluoreszierendes Protein) durchgeführt. Hier zeigte sich bei 6 der 7 Patienten eine spezifische Bande. Zur funktionellen Analyse wurde ein Zell-Monolayer aus doppelt transfizierten LLC-PK1 Zellen verwendet. Diese exprimierten an der basalen Seite den NTCP (Kapitel 1.1.2) und an der apikalen Seite den BSEP Transporter. Nach Inkubation der apikalen Seite mit Patientenseren kam es bei Zugabe von radioaktiv markierten Gallensäuren zu einem verminderten transepithelialen Transport und zu einer Akkumulation der Gallensäuren im Lumen der Zellen. Dies bestätigte erneut, dass die Hemmung des Transporters an extrazellulären, canaliculären Strukturen des Transporters erfolgt. Wie bei Jara et al. (2009) wurde außerdem ein vesikulärer Transporter Assay mit SF9-BSEP Vesikeln durchgeführt. Anders als Jara et al. (2009) inkubierten Stindt et al. (2016) die Vesikel jedoch nicht bei 37 °C mit den Patientenseren, sondern entweder auf Eis oder nach Freeze and Thaw Zyklus (siehe „Supporting Information“ (Stindt et al. 2016)). Hier zeigte sich eine signifikant stärkere Hemmung nach Freeze and Thaw Zyklus. Die Autoren postulierten, dass es durch den Freeze and Thaw Zyklus zur Aufnahme

der Antikörper in das Vesikellumen kommt und diese so mit den intravesikulären, also extrazellulären Strukturen des BSEP interagieren können (Kapitel 2.3.10).

Bereits erwähnte und ähnliche Methoden wurden außerdem in den Arbeiten von Siebold et al. (2010) und Maggiore et al. (2010) verwendet.

In all diesen Studien wurden jedoch keine Seren von Patienten mit anderen cholestatischen Lebererkrankungen bzw. anderen Kontrollen untersucht.

#### **4.2 Spezifität eines ELISA unter Verwendung des ersten extrazellulären Loops zum Nachweis von Autoantikörpern gegen die BSEP**

Wie oben erwähnt, konnten Keitel et al. (2009) und Stindt et al. (2016) zeigen, dass Anti-BSEP Autoantikörper, welche bei Kindern mit PFIC2 nach LTx nachweisbar waren, gegen ein Epitop gerichtet waren, welches auf dem ersten extrazellulären Loop (ECL1) der BSEP lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ECL1 aus diesem Grund ebenfalls als Antigen zur Antikörper-Detektion verwendet – allerdings im Gegensatz zu den genannten Studien – auch bei Patienten mit anderen Leber- bzw. chronisch entzündlichen Erkrankungen. Das Protein lag als synthetisiertes Peptid (63 AS) ohne Kopplung an ein Fluoreszenzprotein vor. Um eine mögliche Alternative zum bereits etablierten Western Blot Verfahren zu entwickeln, wurde das Antigen für einen ELISA genutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit einem ECL1 ELISA-Verfahren Seren von 323 Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen (Kapitel 2.1) sowie von 150 Patienten mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen und 46 gesunden Blutspendern auf eine Antikörperreaktion gegen den ECL1 getestet (Kapitel 2.3.1). Sowohl bei den Patienten mit Leber- als auch den Patienten mit nicht-Lebererkrankungen lag die IgG- und/oder IgM-Reaktivität signifikant höher als bei den gesunden Blutspendern. Interessant war die Beobachtung, dass Seren von Kindern mit Gallengangsatresie vor oder nach LTx nicht oder nur niedertitrig reagierten.

Dieser Befund lässt darauf schließen, dass der ELISA unter Verwendung des ECL1 als Antigen nicht geeignet ist, um möglicherweise pathogenetisch relevante Anti-BSEP Antikörper vor oder nach LTx nachzuweisen. Ein möglicher Grund für die unspezifische Reaktion könnte sein, dass der synthetische ECL1 als lineare Aminosäurekette und nicht in der physiologischen nativen dreidimensionalen Konformation des ECL1 im Protein vorlag und sich deshalb Anti-BSEP Antikörper, die gegen die native BSEP gerichtet sind, im ELISA nicht erfassen lassen. Außerdem ist es möglich, dass es gegen das Peptid gerichtete natürlich vorkommende Antikörper gibt, die insgesamt bei chronisch entzündlichen Prozessen aktiviert werden. Das würde auch erklären, warum die Antikörper bei Patienten mit Kollagenerkrankungen häufiger nachweisbar waren als bei Kindern nach Lebertransplantation oder gesunden Blutspendern (Kapitel 3.2).

#### **4.3 Spezifität eines Western Blots unter Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln zum Nachweis von Anti-BSEP Antikörpern**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BSEP von HepG2 und Huh7-Zellen exprimiert wird. Allerdings war diese Expression zu gering, um die BSEP aus den Plasmamembranen der Zellen zu isolieren und für weitere Verfahren wie ELISA oder Western Blot einsetzen zu können. Es wurden daher – in Anlehnung an frühere Arbeiten (Stindt et al. 2016; Jara et al. 2009) - SF9-BSEP-Vesikel verwendet, und zwar sowohl im ELISA als auch im Western Blot und in einem funktionellen Transporter Assay. Im ELISA (Kapitel 2.3.1) zeigten sich keine Unterschiede in der Reaktivität zwischen BSEP- und Kontroll-Vesikeln, möglicherweise durch eine unspezifische Reaktion mit den Proteinen der SF9-Proteine, ein Phänomen, das wir schon früher beobachten konnten (Preuß et al., unveröffentlichte Beobachtung). Diese Unspezifitäten könnten eliminiert werden, indem man das BSEP Protein von den Proteinen der Vesikelmembran isoliert.

Bei Verwendung der BSEP-Vesikel im Western Blot reagierten vier der getesteten Patientenseren mit der spezifischen Bande bei 140 kDa. Alle vier Seren stammen von Kindern (Patient 1-4) nach Lebertransplantation, die unter PFIC 2

ähnlichen Symptomen litten, und bei denen es zu einem Leberversagen kam (Kapitel 3.3). Bei gesunden Blutspendern und Patienten mit anderen Lebererkrankungen ließ sich diese spezifische Bande nicht nachweisen. Allerdings reagierten Seren von zwei Patienten mit PBC mit einer weiteren Determinante bei 160 kDa. Die mögliche Bedeutung dieser Reaktion wird in Kapitel 4.5 thematisiert.

Mittels Massenspektrometrie konnte verifiziert werden, dass es sich sowohl bei der 140 kDa wie auch der 160 kDa Determinante um Proteine der BSEP handelt (Kapitel 3.3.3). Da die Patienten 1-4 auch klinisch ähnliche Symptome, wie die Patienten der oben erwähnten Studien zeigten, scheint die Methode des Western Blots sehr spezifisch und gut geeignet, um bei Patienten nach LTx wegen einer Gallengangsatresie Antikörper gegen die BSEP nachzuweisen. Es ist jedoch eine sehr aufwendige Methode, bei der pro Durchlauf deutlich weniger Patienten getestet werden können, als zum Beispiel im ELISA Verfahren. Außerdem konnten die Antikörper bei allen vier Patienten nur in jeweils einem Serum nach Transplantation nachgewiesen werden, obwohl von drei Patienten mehrere post-transplant Seren getestet wurden.

Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Sensitivität des Western Blots zu gering ist, um niedrigere Antikörper Titer nachzuweisen – zumal nur diskrete Banden nachweisbar waren. Möglich ist auch, dass die Antikörper nur in bestimmten Phasen nachweisbar sind. Da die Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme wenig Symptome aufwiesen, scheinen hohe Antikörper-Titer und klinische Symptome nicht unbedingt zu korrelieren. Um dies zu überprüfen, sollten weitere Verlaufsseren von positiv getesteten Patienten untersucht und insbesondere Seren aus mehr oder weniger symptomatischen Episoden miteinander verglichen werden.

#### **4.4 Spezifität eines Vesikulären Transporter Assays unter Verwendung von SF9-BSEP Vesikeln zum Nachweis funktioneller Anti-BSEP Antikörpern**

Um die funktionelle Bedeutung der detektierten Antikörper zu untersuchen, wurde abschließend ein Transporter Assay mit den BSEP-Vesikeln durchgeführt; der Versuchsaufbau orientierte sich an der Studie von Stindt et al. (2016). So wurden die Vesikel in einem Freeze and Thaw Zyklus mit den Antikörpern inkubiert und nicht wie bei Jara et al. (2009) bei einer Temperatur von 37 °C. Dieser Inkubationsschritt ist wichtig, damit möglicherweise in der Immunglobulinlösung vorhandene Anti-BSEP Autoantikörper mit der BSEP in der Vesikelmembran interagieren können. Immunglobuline von drei der vier Patienten, deren Seren mit der 140 kDa-Determinante im Western Blot reagierten, hatten einen inhibitorischen Effekt auf den Transporter (Abbildung 18). Aber auch Immunglobuline der Kinder, deren Seren nicht im Western Blot reagierten, reduzierten die Transporteraktivität. Dagegen beeinflussten die Immunglobuline aus Seren von PBC-Patienten, die eine 160 kDa Determinante erkannten, die Transporteraktivität nicht.

Interessant war die Beobachtung, dass auch Immunglobuline von PSC-Patienten und sogar von Patienten mit Sjögren-Syndrom einen inhibitorischen Effekt auf den Transporter hatten, obwohl sie im Western Blot nicht reagierten. Dies konnte bei diesen Erkrankungen zuvor nicht nachgewiesen werden.

Es ist daher möglich, dass die Antikörper der Patienten mit PSC bzw. Sjögren Syndrom mit anderen Strukturen der BSEP interagieren, als die Antikörper bei Kindern nach LTx. Das genaue Epitop der Antikörperreaktion sollte daher in weiteren Studien ermittelt werden, z.B. indem im ELISA Patientenserum gegen überlappende Peptide der BSEP untersucht werden. Um einen hemmenden Einfluss niedriger Temperaturen auszuschließen, könnten die Vesikel künftig zusätzlich bei 37 °C (Jara et al. 2009) mit den Patientenserum inkubiert und die Ergebnisse anschließend verglichen werden. Der Transporter Assay ist folglich geeignet, eine hemmende Antikörper Reaktion nachzuweisen.

#### **4.5 Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Primär-biliärer Cholangitis**

Neben den vier Kindern nach Lebertransplantation konnte auch bei zwei Patienten mit PBC eine Antikörperreaktion im Western Blot nachgewiesen werden. Dort zeigte sich eine Bande auf der Höhe von 160 kDa. Eine Massenspektrometrie konnte in dieser Bande ebenfalls BSEP-Proteine nachweisen (Kapitel 3.3.3). Die Antikörper der PBC Patienten reagieren daher vermutlich mit anderen Strukturen des Proteins als die Antikörper der PFIC2 Patienten. Im funktionellen Assay konnten diese Anti-BSEP Autoantikörper nur bei Patient 5 bestätigt werden. Hier zeigte sich eine Hemmung der Transport-Aktivität um 20%. Bei Patient 6 kam es zu keiner Hemmung der Aktivität. Klinisch zeigten beide Patienten einige Unterschiede zu den Patienten bei denen bisher Autoantikörper nachgewiesen wurden. So waren beide Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Kinder mehr – Patient 5 war zu diesem Zeitpunkt 32 Jahre alt, Patient 6 war 39 Jahre alt. Außerdem wurde bei keinem der beiden Patienten eine Lebertransplantation durchgeführt und zum Zeitpunkt der Blutentnahme lagen keine Cholestase Symptome und normale Leberwerte vor. Da Patienten mit PBC grundsätzlich jedoch unter ähnlichen Symptomen wie PFIC2 Patienten leiden, wäre es interessant, ein größeres Kollektiv dieser Patientengruppe weiter auf Anti-BSEP Autoantikörper zu untersuchen.

#### **4.6 Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Primär-sklerosierender Cholangitis**

Die Ätiologie und Pathogenese der PSC ist unklar, klinisch zeigen Patienten mit PSC - wie Patienten mit PFIC2 – Symptome einer Cholestase und erhöhte Gallensäurewerte im Serum (Jorge et al. 1988; Strautnieks et al. 1998). Es scheint daher wahrscheinlich, dass auch Patienten mit PSC Störungen im BSEP-Transportsystem aufweisen. Eine genetisch bedingte Ursache für eine Dysfunktion der BSEP wurde bereits untersucht, konnte jedoch nicht bestätigt werden (Pauli-Magnus et al. 2004). In der Studie von Pauli-Magnus et al. (2004) zeigten

sich keine Mutationen in den BSEP-Genen bei Patienten mit PSC gegenüber gesunden Kontrollen.

Ob PSC-Patienten Antikörper gegen die BSEP bilden, wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Seren von 38 Patienten mit PSC auf Autoantikörper gegen die BSEP untersucht. Während im Western Blot keine Antikörper nachweisbar waren, zeigte sich im funktionellen Transporter Assay - unter der Verwendung von PSC-Seren - eine deutliche Hemmung der BSEP-Transporter Aktivität. Von den getesteten 6 Patienten zeigten zwei Patienten eine Hemmung von über 30 %, zwei Patienten über 20 % und zwei Patienten über 10 %. Dagegen zeigten gesunde Blutspender (n=8) nur eine Hemmung von durchschnittlich 4 %. Aufgrund der stark hemmenden Wirkung der Antikörper auf die Transportfähigkeit des Transporters ist es wahrscheinlich, dass BSEP-Autoantikörper bei Patienten mit PSC auch pathophysiologisch eine Rolle spielen. Dieser These soll in folgenden Studien nachgegangen werden.

#### **4.7 Bedeutung von Anti-BSEP Autoantikörpern bei Patienten mit Sjögren Syndrom**

Das Sjögren Syndrom (SS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer autoimmunvermittelten Zerstörung der Speichel- und Tränendrüsen kommt (Borchers et al. 2003). Die Atrophie der Drüsen führt zu der für das Sjögren Syndrom typischen „Sicca Symptomatik“ mit Mund- und Augentrockenheit (Borchers et al. 2003). Es ist häufig mit anderen Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoider Arthritis, Systemischer Sklerose, Systemischem Lupus erythematoses oder Polymyositis assoziiert (Borchers et al. 2003).

Beim Sjögren Syndrom konnten bereits einige Autoantikörperspezifitäten nachgewiesen werden. Bei 50-70 % der Patienten sind RO/SSA-Antikörper und bei 25-40 % LA/SS-B-Antikörper nachweisbar. Diese Antikörper richten sich gegen Proteinbestandteile der humanen zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexe und sind Teil der Diagnosekriterien für das Sjögren Syndrom (Fayyaz, Kurien, and Scofield 2016). Ferner nachweisbar sind Rheumafaktoren (RF), Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPA), antimitochondriale Anti-

körper (AMA), Anti-Centromer-Antikörper (ACA), Antikörper gegen den muskarinischen Acetylcholinrezeptor M3 (M3AChR-AK) und antinukleäre Antikörper (ANA) (Fayyaz, Kurien, and Scofield 2016; Borchers et al. 2003). Studien zum Vorkommen von Anti-BSEP-Antikörpern bei Patienten mit Sjögren Syndrom wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

In der vorliegenden Studie wurden die Seren von 28 Patienten mit Sjögren Syndrom auf Anti-BSEP Autoantikörper untersucht. Wie bei den Patienten mit PSC konnten im funktionellen Transporter Assay Antikörper gegen die BSEP nachgewiesen werden. Drei der mit dieser Methode getesteten sechs Patienten zeigten eine Hemmung der Transporter Aktivität von über 30 %, ein Patient von über 10 %.

Patienten mit Sjögren Syndrom leiden in der Regel nicht an Cholestase-Symptomen. Es ist jedoch denkbar, dass Autoantikörper in Seren dieser Patienten, die eigentlich gegen andere Strukturen gerichtet sind, mit der BSEP kreuzreagieren. Ein Protein das strukturelle Ähnlichkeiten mit der BSEP aufweist ist der in exokrinen Drüsen exprimierte Chloridkanal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Dieser gehört wie die BSEP zur Familie der ABC-Transporter welche alle eine ähnliche Aminosäuresequenz und Organisation ihrer ATP-bindenden Domäne aufweisen (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Mutationen im CFTR führen zu Cystischer Fibrose (Zeng et al. 2017). In Speichel- bzw. Tränendrüsen ist der CFTR für den Fluss des Speichels bzw. der Tränenflüssigkeit und die Sekretion von  $\text{HCO}_3^-$  von zentraler Bedeutung. (Zeng et al. 2017). Studien zeigen, dass Störungen im CFTR möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie des Sjögren Syndroms spielen (Zeng et al. 2017). Anti-CFTR-Autoantikörper wurden in der Literatur noch nicht beschrieben.

Aus diesem Grund und auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zur BSEP wurde die Hypothese aufgestellt, dass Patienten mit Sjögren Syndrom Antikörper gegen CFTR bilden und diese mit der BSEP kreuzreagieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Western Blot mit Plasmamembranen von HSG-Zellen als Antigen durchgeführt. Diese Zellen exprimieren den CFTR (Shin et al.

2016). Mit dieser Methode gelang es jedoch nicht, Antikörper Reaktionen nachzuweisen. Außerdem reagierte der monoklonale Anti-BSEP Antikörper nicht mit den HSG Zellen.

#### **4.8 Schlussfolgerung**

Autoantikörper gegen die Gallensalzexportpumpe BSEP konnten bislang nur bei Patienten mit progressiver familiärer intrahepatischer Cholestase Typ 2, bei denen eine Lebertransplantation durchgeführt worden war, nachgewiesen werden. Hier sind sie sowohl diagnostisch als auch pathophysiologisch von großer Bedeutung. Die Fragestellung dieser Arbeit war daher, ob sich bei anderen cholestatischen Lebererkrankungen ebenfalls Autoantikörper gegen die BSEP nachweisen lassen.

Bisher verwendete Methoden zum Nachweis der Anti-BSEP Antikörper sind relativ aufwendig. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Methoden zu entwickeln und diese mit etablierten Methoden zu vergleichen. So konnten bereits verwendete Methoden wie der Western Blot mit SF9-BSEP Vesikeln und der vesikuläre Transporter Assay überprüft und in ihrer Aussagekraft bestätigt werden. Die für diese Studie entwickelten ELISA Verfahren unter Verwendung von ECL1 oder BSEP-Vesikeln erwiesen sich als ungeeignet, um Anti-BSEP Antikörper zuverlässig und spezifisch nachzuweisen. Diese Ergebnisse können jedoch als Grundlage dienen, um künftig einen ELISA zum Antikörpernachweis zu entwickeln. Dieses Verfahren wäre besonders geeignet, da es einfach durchzuführen ist und große Patientenkollektive auf einmal getestet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Seren von 473 Patienten mit unterschiedlichen (Leber-)Erkrankungen untersucht. Bei vier Kindern, bei denen wegen Gallengangsatresie eine Lebertransplantation durchgeführt werden musste, konnten Antikörper gegen die BSEP nachgewiesen werden. Diese hatten einen inhibitorischen Effekt und traten erst nach Lebertransplantation auf. Dies deckt sich mit den Ergebnissen bereits publizierter Untersuchungen mit PFIC2 Patienten. Da es sich bei den genannten vier Patienten jedoch nicht um Patienten mit PFIC2 handelt, scheinen Antikörper gegen die BSEP auch bei anderen Erkran-

kungen eine Rolle zu spielen. Diese Erkenntnis ist wichtig, um Patienten mit entsprechender Symptomatik künftig gezielt auf Anti-BSEP Autoantikörper zu untersuchen und adäquat zu therapieren. Die klinische Bedeutung der Antikörper könnte Gegenstand künftiger Studien sein.

Außerdem wurde gezeigt, dass sich auch bei Patienten mit PBC, PSC und interessanterweise auch bei Patienten mit Sjögren Syndrom Antikörperreaktionen gegen die BSEP nachweisen lassen. Anders als bei den oben genannten Patienten mit Gallengangsatresie standen diese Antikörperreaktionen jedoch nicht im Zusammenhang mit einer Lebertransplantation. Die Antikörper dieser Patienten reagierten in anderen Tests bzw. auf eine andere Weise mit der BSEP als die Antikörper der oben genannten Patienten. Allerdings hatten sie insbesondere auch bei Patienten mit PSC eine inhibitorische Wirkung auf die BSEP. Daher scheinen Anti-BSEP Autoantikörper je nach Grunderkrankung mit unterschiedlichen Strukturen der BSEP zu interagieren. Folglich sollten auch diese Erkrankungen weiter auf BSEP-Antikörper hin untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die in der Leber exprimierte Gallensalzexportpumpe BSEP ist wichtiger Bestandteil des Gallensäurestoffwechsels. Störungen dieses Transportsystems führen zu einer Akkumulation von Gallensalzen in den Hepatozyten und so zu Leberzellschäden. Antikörper gegen die BSEP konnten bisher nur bei Patienten mit progressiver familiärer intrahepatischer Cholestase Typ 2 (PFIC2), ausschließlich bei Kindern nach Lebertransplantation, nachgewiesen werden. Diese Antikörper hatten eine inhibitorische Wirkung auf die BSEP, wodurch es bei den betroffenen Patienten zu den Symptomen einer Cholestase und häufig zu erneutem Leberversagen kam.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Antikörper gegen die BSEP auch bei Patienten mit anderen cholestatischen Lebererkrankungen, insbesondere PBC und PSC, sowie mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen nachweisbar sind. Dafür sollten bisher bekannte Methoden zum Antikörpernachweis etabliert sowie neue Methoden entwickelt werden.

In einem ELISA wurden 577 Seren von 473 Patienten und 46 gesunden Blutspendern auf eine Antikörper Reaktion gegen den ersten extrazellulären Loop (ECL1) des BSEP-Proteins getestet. In 208 Patientenseren (40%) und einem Serum eines gesunden Blutspenders (2,2%) konnten IgG-Antikörper und in 95 Patientenseren (18%) und zwei Seren von gesunden Blutspendern (4,4%) IgM-Antikörper gegen den ECL1 nachgewiesen werden.

Mittels Western Blot wurden die Seren von 125 Patienten auf Antikörper gegen BSEP-exprimierende SF9-Vesikel getestet. Vier der Seren zeigten die BSEP-spezifische Bande bei 140 kDa; die Spezifität dieser Reaktion konnte mit Hilfe eines monoklonalen Anti-BSEP Antikörpers verifiziert werden. Alle vier Seren stammten von Kindern bei denen zuvor eine Lebertransplantation durchgeführt werden musste. In den Seren, die vor der Lebertransplantation abgenommen worden waren, konnte diese Bande nicht nachgewiesen werden. Zwei Seren von Patienten mit PBC, reagierten mit einer weiteren Determinante bei 160 kDa. Keine der beiden Banden konnte bei gesunden Blutspendern nach-

gewiesen werden. Mittels Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Proteinen beider Banden um Proteine der BSEP handelt. Ein ELISA mit SF9-BSEP-Vesikeln erwies sich als nicht geeignet, um Antikörper Reaktionen in den Seren nachzuweisen. Es kam zu keinem signifikanten Unterschied der Antikörper Reaktionen gegen BSEP- bzw. Kontroll-Vesikel.

In einem funktionellen Transporter Assay mit SF9-BSEP Vesikeln konnte eine inhibitorische Wirkung der Anti-BSEP Antikörper nachgewiesen werden. Getestet wurden 30 Patienten (Kinder nach Lebertransplantation: n = 10; PBC: n = 8; PSC: n = 6; Sjögren Syndrom: n = 6) und 6 gesunde Blutspender. Zu einer signifikanten Hemmung des Transporters kam es bei Seren von Kindern nach Lebertransplantation und von Patienten mit PSC. Außerdem hemmten die Seren von drei Patienten mit Sjögren Syndrom den Transporter um mehr als 30%.

Die für diese Studie entwickelten ELISA Verfahren unter Verwendung des ECL1 oder BSEP-Vesikeln erwiesen sich als nicht spezifisch genug, um Anti-BSEP Antikörper zuverlässig nachzuweisen. Jedoch konnten Methoden wie der Western Blot mit SF9-BSEP Vesikeln und ein vesikulärer BSEP Transporter Assay erfolgreich durchgeführt und in ihrer Aussagekraft bestätigt werden. Mit diesen Methoden gelang es, Anti-BSEP Antikörper in den Seren von Patienten mit PBC, PSC und Sjögren Syndrom nachzuweisen. Außerdem konnten auch bei vier Kindern, bei denen wegen Gallengangsatresie eine Lebertransplantation durchgeführt werden musste, Antikörper gegen die BSEP nachgewiesen werden. Diese Antikörper hatten einen inhibitorischen Effekt und traten erst nach Lebertransplantation auf. Folglich scheinen Antikörper gegen die BSEP auch bei anderen Erkrankungen als der PFIC 2 eine Rolle zu spielen. Da die Seren der Patienten je nach Erkrankung in unterschiedlichen Tests bzw. auf eine andere Weise mit der BSEP reagierten, scheinen Anti-BSEP Autoantikörper je nach Grunderkrankung mit unterschiedlichen Strukturen der BSEP zu interagieren. Zunehmende Kenntnis zu Anti-BSEP Antikörpern bei Patienten mit den oben genannten Erkrankungen könnte künftig eine spezifische Diagnostik und Therapie dieser Patienten ermöglichen und so deren Prognose verbessern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Beis, K. 2015. 'Structural basis for the mechanism of ABC transporters', *Biochemical Society Transactions*, 43: 889-93.
- Bohme, M., M. Muller, I. Leier, G. Jedlitschky, and D. Keppler. 1994. 'Cholestasis caused by inhibition of the adenosine triphosphate-dependent bile salt transport in rat liver', *Gastroenterology*, 107: 255-65.
- Borchers, A. T., S. M. Naguwa, C. L. Keen, and M. E. Gershwin. 2003. 'Immunopathogenesis of Sjogren's syndrome', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 25: 89-104.
- Bowlus, C. L., and M. E. Gershwin. 2014. 'The diagnosis of primary biliary cirrhosis', *Autoimmun Rev*, 13: 441-4.
- Boyer, J. L. 2013. 'Bile formation and secretion', *Compr Physiol*, 3: 1035-78.
- Bradford, M. M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Chan, K. M., C. H. Cheng, T. H. Wu, C. F. Lee, T. J. Wu, H. S. Chou, and W. C. Lee. 2018. 'De Novo Endotoxin-Induced Production of Antibodies against the Bile Salt Export Pump Associated with Bacterial Infection following Major Hepatectomy', *Biomed Res Int*, 2018: 6197152.
- Dawson, S., S. Stahl, N. Paul, J. Barber, and J. G. Kenna. 2012. 'In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40: 130-8.
- Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets. 2001. 'The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily', *Genome Research*, 11: 1156-66.
- Eaton, J. E., B. Dzyubak, S. K. Venkatesh, T. C. Smyrk, G. J. Gores, R. L. Ehman, N. F. LaRusso, A. A. Gossard, and K. N. Lazaridis. 2016. 'Performance of magnetic resonance elastography in primary sclerosing cholangitis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31: 1184-90.
- Elferink, M. G., P. Olinga, A. L. Draaisma, M. T. Merema, K. N. Faber, M. J. Slooff, D. K. Meijer, and G. M. Groothuis. 2004. 'LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287: G1008-16.
- Esteller, A. 2008. 'Physiology of bile secretion', *World Journal of Gastroenterology*, 14: 5641-9.
- Fayyaz, A., B. T. Kurien, and R. H. Scofield. 2016. 'Autoantibodies in Sjogren's Syndrome', *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 42: 419-34.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, P. L. Faust, and R. J. Wanders. 2009. 'Bile acids: the role of peroxisomes', *Journal of Lipid Research*, 50: 2139-47.
- Fricker, Z. P., and D. R. Lichtenstein. 2019. 'Primary Sclerosing Cholangitis: A Concise Review of Diagnosis and Management', *Digestive Diseases and Sciences*, 64: 632-42.

- Funk, C., M. Pantze, L. Jehle, C. Ponelle, G. Scheuermann, M. Lazendic, and R. Gasser. 2001. 'Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate', *Toxicology*, 167: 83-98.
- Geier, A., P. Fickert, and M. Trauner. 2006. 'Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis', *Nature Clinical Practice: Gastroenterology & Hepatology*, 3: 574-85.
- Gerloff, T., B. Stieger, B. Hagenbuch, J. Madon, L. Landmann, J. Roth, A. F. Hofmann, and P. J. Meier. 1998. 'The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver', *Journal of Biological Chemistry*, 273: 10046-50.
- Gossard, A. A., and K. D. Lindor. 2012. 'Autoimmune hepatitis: a review', *Journal of Gastroenterology*, 47: 498-503.
- Jacquemin, E. 2012. 'Progressive familial intrahepatic cholestasis', *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36 Suppl 1: S26-35.
- Jansen, P. L., and M. Muller. 2000. 'The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis', *Gut*, 47: 1-5.
- Jara, P., L. Hierro, P. Martinez-Fernandez, R. Alvarez-Doforno, F. Yanez, M. C. Diaz, C. Camarena, A. De la Vega, E. Frauca, G. Munoz-Bartolo, M. Lopez-Santamaria, J. Larrauri, and L. Alvarez. 2009. 'Recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation', *New England Journal of Medicine*, 361: 1359-67.
- Jiang, X. H., R. Q. Zhong, S. Q. Yu, Y. Hu, W. W. Li, and X. T. Kong. 2003. 'Construction and expression of a humanized M2 autoantigen trimer and its application in the diagnosis of primary biliary cirrhosis', *World Journal of Gastroenterology*, 9: 1352-5.
- Jorge, A., J. Findor, C. Esley, and E. Bruch. 1988. 'Primary sclerosing cholangitis', *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 26: 322-30.
- Juliano, R. L., and V. Ling. 1976. 'A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants', *Biochimica et Biophysica Acta*, 455: 152-62.
- Keitel, V., M. Burdelski, Z. Vojnisek, L. Schmitt, D. Haussinger, and R. Kubitz. 2009. 'De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis', *Hepatology*, 50: 510-7.
- Kubitz, R., C. Droge, S. Kluge, C. Stross, N. Walter, V. Keitel, D. Haussinger, and J. Stindt. 2015. 'Autoimmune BSEP disease: disease recurrence after liver transplantation for progressive familial intrahepatic cholestasis', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 48: 273-84.
- Kubitz, R., C. Droge, J. Stindt, K. Weissenberger, and D. Haussinger. 2012. 'The bile salt export pump (BSEP) in health and disease', *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36: 536-53.
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.
- Lazaridis, K. N., and N. F. LaRusso. 2016. 'Primary Sclerosing Cholangitis', *New England Journal of Medicine*, 375: 2501-02.

- Lee, W. M. 2003. 'Drug-induced hepatotoxicity', *New England Journal of Medicine*, 349: 474-85.
- Liberal, R., C. R. Grant, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2013. 'Autoimmune hepatitis: a comprehensive review', *Journal of Autoimmunity*, 41: 126-39.
- Maggiore, G., E. Gonzales, M. Sciveres, M. J. Redon, B. Grosse, B. Stieger, A. Davit-Spraul, M. Fabre, and E. Jacquemin. 2010. 'Relapsing features of bile salt export pump deficiency after liver transplantation in two patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2', *Journal of Hepatology*, 53: 981-6.
- Maldonado-Valderrama, J., P. Wilde, A. Macierzanka, and A. Mackie. 2011. 'The role of bile salts in digestion', *Advances in Colloid and Interface Science*, 165: 36-46.
- Meier, P. J., A. S. Meier-Abt, and J. L. Boyer. 1987. 'Properties of the canalicular bile acid transport system in rat liver', *Biochemical Journal*, 242: 465-9.
- Pauli-Magnus, C., R. Kerb, K. Fattinger, T. Lang, B. Anwald, G. A. Kullak-Ublick, U. Beuers, and P. J. Meier. 2004. 'BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis', *Hepatology*, 39: 779-91.
- Perez, M. J., and O. Briz. 2009. 'Bile-acid-induced cell injury and protection', *World Journal of Gastroenterology*, 15: 1677-89.
- Pollock, G., and G. Y. Minuk. 2017. 'Diagnostic considerations for cholestatic liver disease', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32: 1303-09.
- Procko, E., M. L. O'Mara, W. F. Bennett, D. P. Tieleman, and R. Gaudet. 2009. 'The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter', *FASEB Journal*, 23: 1287-302.
- Qu, X., Y. Zhang, S. Zhang, J. Zhai, H. Gao, L. Tao, and Y. Song. 2018. 'Dysregulation of BSEP and MRP2 May Play an Important Role in Isoniazid-Induced Liver Injury via the SIRT1/FXR Pathway in Rats and HepG2 Cells', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41: 1211-18.
- Rahman, K., T. G. Hammond, P. J. Lowe, S. G. Barnwell, B. Clark, and R. Coleman. 1986. 'Control of biliary phospholipid secretion. Effect of continuous and discontinuous infusion of taurocholate on biliary phospholipid secretion', *Biochemical Journal*, 234: 421-7.
- Razori, M. V., P. M. Maidagan, N. Ciriaci, R. B. Andermatten, I. R. Barosso, P. L. Martin, C. L. Basiglio, E. J. Sanchez Pozzi, M. L. Ruiz, and M. G. Roma. 2019. 'Anticholestatic mechanisms of ursodeoxycholic acid in lipopolysaccharide-induced cholestasis', *Biochemical Pharmacology*, 168: 48-56.
- Reshetnyak, V. I. 2015. 'Primary biliary cirrhosis: Clinical and laboratory criteria for its diagnosis', *World Journal of Gastroenterology*, 21: 7683-708.
- Roma, M. G., F. D. Toledo, A. C. Boaglio, C. L. Basiglio, F. A. Crocenzi, and E. J. Sanchez Pozzi. 2011. 'Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications', *Clinical Science (London, England: 1979)*, 121: 523-44.
- Saurin, W., M. Hofnung, and E. Dassa. 1999. 'Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-

- binding cassette (ABC) transporters', *Journal of Molecular Evolution*, 48: 22-41.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. 'Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels', *Analytical Chemistry*, 68: 850-8.
- Shin, Y. H., S. W. Lee, M. Kim, S. Y. Choi, X. Cong, G. Y. Yu, and K. Park. 2016. 'Epigenetic regulation of CFTR in salivary gland', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 481: 31-37.
- Siebold, L., A. A. Dick, R. Thompson, G. Maggiore, E. Jacquemin, R. Jaffe, S. Strautnieks, T. Grammatikopoulos, S. Horslen, P. F. Whittington, and B. L. Schneider. 2010. 'Recurrent low gamma-glutamyl transpeptidase cholestasis following liver transplantation for bile salt export pump (BSEP) disease (posttransplant recurrent BSEP disease)', *Liver Transplantation*, 16: 856-63.
- Sirpal, S., and N. Chandok. 2017. 'Primary sclerosing cholangitis: diagnostic and management challenges', *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 10: 265-73.
- Stieger, B. 2009. 'Recent insights into the function and regulation of the bile salt export pump (ABCB11)', *Current Opinion in Lipidology*, 20: 176-81.
- Stieger, B., K. Fattinger, J. Madon, G. A. Kullak-Ublick, and P. J. Meier. 2000. 'Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver', *Gastroenterology*, 118: 422-30.
- Stindt, J., S. Kluge, C. Droge, V. Keitel, C. Stross, U. Baumann, F. Brinkert, A. Dhawan, G. Engelmann, R. Ganschow, P. Gerner, E. Grabhorn, A. S. Knisely, K. A. Noli, I. Pukite, R. W. Shepherd, T. Ueno, L. Schmitt, C. Wiek, H. Hanenberg, D. Haussinger, and R. Kubitz. 2016. 'Bile salt export pump-reactive antibodies form a polyclonal, multi-inhibitory response in antibody-induced bile salt export pump deficiency', *Hepatology*, 63: 524-37.
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M. S. Tanner, A. F. Kagalwalla, A. Nemeth, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N. B. Freimer, R. M. Gardiner, and R. J. Thompson. 1998. 'A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis', *Nature Genetics*, 20: 233-8.
- Strautnieks, S. S., A. F. Kagalwalla, M. S. Tanner, A. S. Knisely, L. Bull, N. Freimer, S. A. Kocoshis, R. M. Gardiner, and R. J. Thompson. 1997. 'Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24', *American Journal of Human Genetics*, 61: 630-3.
- Terjung, B., and H. J. Worman. 2001. 'Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis', *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, 15: 629-42.
- Trauner, M., P. Fickert, and R. E. Stauber. 1999. 'Inflammation-induced cholestasis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14: 946-59.
- Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D. W. Nebert. 2009. 'Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family', *Hum Genomics*, 3: 281-90.

- Westermeier, R. 2019. 'Elektroelution.' in Arndt T. Gressner A.M. (ed.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. (Springer: Berlin, Heidelberg).
- Wilkens, S. 2015. 'Structure and mechanism of ABC transporters', *F1000Prime Rep*, 7: 14.
- Yang, K., K. Kock, A. Sedykh, A. Tropsha, and K. L. Brouwer. 2013. 'An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102: 3037-57.
- Zeng, M., M. Szymczak, M. Ahuja, C. Zheng, H. Yin, W. Swaim, J. A. Chiorini, R. J. Bridges, and S. Muallem. 2017. 'Restoration of CFTR Activity in Ducts Rescues Acinar Cell Function and Reduces Inflammation in Pancreatic and Salivary Glands of Mice', *Gastroenterology*, 153: 1148-59.
- Zhang, J., K. He, L. Cai, Y. C. Chen, Y. Yang, Q. Shi, T. F. Woolf, W. Ge, L. Guo, J. Borlak, and W. Tong. 2016. 'Inhibition of bile salt transport by drugs associated with liver injury in primary hepatocytes from human, monkey, dog, rat, and mouse', *Chemico-Biological Interactions*, 255: 45-54.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über die Gallensalz Transportproteine .....	3
Abbildung 2:	Molekulare Struktur des ABCB11 Proteins (BSEP) .....	5
Abbildung 3:	Funktionsweise der Gallensalzexportpumpe BSEP .....	6
Abbildung 4:	Schematischer Aufbau Model 422 Elektro-Eluter.....	38
Abbildung 5:	Nachweis von BSEP Protein in der Plasmamembran von HepG2 und Huh7 Zellen mittels Western Blot.....	45
Abbildung 6:	Aktivität der Anti-ECL1-Antikörper vom IgG-Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen. ....	46
Abbildung 7:	Aktivität der Anti-ECL1-Antikörper vom IgM-Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen. ....	47
Abbildung 8:	IgG-Reaktivität von Seren von Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (A) sowie gesunden Blutspendern (B) mit BSEP- bzw. Kontroll-Vesikeln im ELISA	49
Abbildung 9:	Optimierung des Western Blots mit SF9-BSEP-Vesikeln mithilfe eines Fluoreszenz markierten sekundären Antikörpers .....	50
Abbildung 10:	Nachweis von Anti-BSEP-Antikörpern im Western Blot unter Verwendung von BSEP- und Kontroll-Vesikeln.....	51
Abbildung 11:	Western Blot gegen BSEP-Vesikel unter der Verwendung von drei Seren eines Patienten vor und nach Lebertransplantation .....	52
Abbildung 12:	Polyacrylamid Gele nach Gelelektrophorese und Silber- bzw. Coomassie Färbung.....	53
Abbildung 13:	Ergebnisse der Proteomanalyse von Bande 1 (140 kDa) und Bande 2 (160 kDa).....	54
Abbildung 14:	Antikörper Aktivität vom IgG-Typ (A) und vom IgM Typ (B) gegen die Proteine der 140 kDa Gelbande im ELISA .....	55
Abbildung 15:	Antikörper Aktivität vom IgG Typ (C) und vom IgM Typ (D) gegen die Proteine der 160 kDa Gelbande im ELISA .....	56
Abbildung 16:	Überprüfung der Methode des vesikulären Transporter Assays und der Funktion der SF9-BSEP-Vesikel .....	57
Abbildung 17:	BSEP Transporter Aktivität nach vesikulärem Transporter Assay. ....	58
Abbildung 18:	Ergebnisse des vesikulären Transporter Assays mit BSEP-Vesikeln .....	59

Abbildung 19: Ausschluss von Kreuzreaktionen von Anti-CFTR  
Autoantikörpern mit BSEP mittels Western Blot..... 60

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Medikamente mit inhibitorischer Wirkung auf den BSEP .....	9
Tabelle 2:	Übersicht über die in die Arbeit eingeschlossenen Patienten .	19
Tabelle 3:	Übersicht der Diagnosen der getesteten Kinder mit Lebertransplantation .....	20
Tabelle 4:	Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme .....	21
Tabelle 5:	Verwendete Geräte und Laborbedarf.....	22
Tabelle 6:	Reagenzien für ELISA Verfahren.....	23
Tabelle 7:	Reagenzien für Zellkulturen und Plasmamembran Isolation ...	23
Tabelle 8:	Reagenzien für Western Blot und Färbemethoden .....	24
Tabelle 9:	Reagenzien für vesikulären Transporter Assay .....	24
Tabelle 10:	Reagenzien für Proteinbestimmung nach Bradford .....	25
Tabelle 11:	Verwendete Zelllinien.....	25
Tabelle 12:	Antikörper die im ELISA verwendet wurden .....	25
Tabelle 13:	Antikörper die im Western Blot verwendet wurden .....	26
Tabelle 14:	Vesikel für Western Blot und Transporter Assay.....	26
Tabelle 15:	Oligonukleotide für ELISA.....	27
Tabelle 16:	Molekulargewichtsmarker für Western Blot.....	27
Tabelle 17:	Puffer und Lösungen.....	27
Tabelle 18:	Häufigkeit von Anti-ECL1-Antikörpern im ELISA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.....	48

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AIH	Autoimmune Hepatitis
ASBT	Active sodium bile salt Transporter
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile Salt Export Pump
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL1	Erster extrazellulärer Loop des BSEP-Transporters
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
GS	Gallensalz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
LTX	Lebertransplantation
MDR	Multiple Drug Resistance
MRP3/4	Multidrug Resistance-Associated Proteine
MS	Massenspektrometrie
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NTCP	Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide
OAT	Organic Anion Transporter
OST <sub>α/β</sub>	Organic Solute Transporter
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PFIC 2	Primär familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
SDS – PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
SOPG	Sister of P-glycoprotein
SVP	Serumverdünnungspuffer
TMD	Transmembrandomäne
UDCS	Ursodeoxycholsäure

## 10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen – Department für Innere Medizin im Immunpathologischen Labor unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Reinhild Klein und Frau Dr. Beate Preuß.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Beate Preuß von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Frau Irina Droste-Borel, Proteome Center Tübingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. Reinhild Klein und Frau Dr. Beate Preuß durch mich.

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

Tübingen, den 31.05.2021

---

Johannes Schiller

## 11 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Reinhild Klein für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung sowie die zahlreichen Laborbesprechungen und wertvollen Ratschläge bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Beate Preuß für die Einarbeitung in die Methodik sowie die unermüdliche Unterstützung und Motivation während meiner Zeit im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund und Mitdoktoranden Lukas Bankamp, mit dem ich die Zeit im Labor gemeinsam verbringen durfte und der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen des Immunpathologischen Labors für die Unterstützung und den herzlichen Umgang bedanken. Vielen Dank an Martina Bruder, Gülay Demirel, Susanne Duman, Elwira Herdt, Sandra Plankenhorn, Ute Rückwaldt, Silke Tamasi und Maja Wilczek.

Für die finanzielle Förderung sowie die zahlreichen interessanten Veranstaltungen bin ich dem IZKF Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und den Koordinatorinnen Frau Dr. Inka Montero und Frau Dr. Tanja Rieß sehr dankbar.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Berg, Herrn Prof. Dr. Jörg Henes und Herrn PD Dr. Dr. Ekkehard Sturm für die Unterstützung und die Bereitstellung der Patientenseren für meine Untersuchungen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, meiner Schwester Anne sowie meinen Freunden, die mich während meiner Doktorarbeit und während des gesamten Studiums immer unterstützt und diese Zeit für mich so besonders gemacht haben.