

Humorale und zelluläre Immunreaktionen gegenüber dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 3 bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Sarai Ozvatič

aus Gifhorn

Tübingen

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

05. November 2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhild Klein

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

„**I**N DER **W**ISSENSCHAFT **G**LEICHEN **W**IR **A**LLE **N**UR
DEN **K**INDERN, DIE AM **R**ANDE DES **W**ISSENS **H**IER
UND **D**A EINEN **K**IESEL **A**UFHEBEN, **W**ÄHREND **S**ICH
DER **W**EITE **O**ZEAN DES **U**NBEKANNTEN **V**OR
UNSEREN **A**UGEN ERSTRECKT.“

Isaac Newton

Für Marc

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung..... viii

Abstract ix

1 Einleitung 1

1.1 Muskarinischer Acetylcholin Rezeptor 3 4

1.1.1 Die mAChR3 Expression auf Lymphozyten 6

1.1.2 Einfluss von mAChR3 auf die Apoptose 7

1.2 Die Bedeutung von anti-mAChR3 Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen 8

1.2.1 mAChR3 Autoantikörper bei SS-Patienten 8

1.2.2 mAChR3 Autoantikörper bei PBC-Patienten 12

1.3 Beschreibung der in dieser Arbeit erwähnten Erkrankungen 13

1.3.1 Primäre biliäre Cholangitis 13

1.3.2 Autoimmune Hepatitis 15

1.3.3 Primäre sklerosierende Cholangitis..... 16

1.3.4 Virale Hepatitis 17

1.3.5 Alkoholinduzierte Lebererkrankungen..... 18

1.3.6 Sjögren Syndrom 19

1.4 Ziel der Arbeit..... 20

2 Material 23

2.1 Chemikalien 23

2.2 Geräte 28

2.3 Verbrauchsmaterialien 31

2.4 Kits 33

2.5 Eukaryotische Zelllinien 33

2.6 Prokaryotische Zellen..... 34

2.7 Enzyme 35

2.8	Plasmid DNA.....	35
2.8.1	Hergestellte Plasmide	37
2.9	Nährmedien	37
2.10	Antikörper.....	39
2.11	mAChR3 Peptide	44
2.12	Puffer und Lösungen.....	46
2.13	Patientenseren.....	51
2.14	Software.....	53
3	Methoden.....	54
3.1	Zellbiologische Methoden	54
3.1.1	Kultivierung der immortalisierten Zelllinien.....	54
3.1.2	PBMC Isolierung aus heparinisiertem Vollblut	54
3.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	55
3.1.4	Zellzahlbestimmung	56
3.2	Mikrobiologische Methoden	56
3.2.1	Transformation der Plasmid DNA.....	56
3.2.2	Anzucht bakteriologischer Kulturen.....	56
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	57
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	57
3.3.2	Nukleinsäure Quantifizierung.....	57
3.3.3	Restriktion der Plasmid pEX-K4+ und pTrcHis-Topo Plasmid DNA	57
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	57
3.3.5	Isolierung von DNA aus dem Agarosegel	58
3.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
3.3.7	Expression von rekombinanten Fusionsproteinen	58
3.3.8	Pilotexpression von His6-Tag Fusionsprotein	59
3.4	Proteinbiologische Methoden.....	60

3.4.1 Isolierung von Membranfraktionen aus TFK-1-Zellen	60
3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
3.4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	61
3.4.4 Coomassie Färbung / Ponceau S Färbung	61
3.4.5 Western Blot	61
3.4.6 Reinigung von überexprimierten poly-Histidin-markierten Fusionsproteinen durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	62
3.4.7 Elektroelution des Proteins aus dem SDS-Gel.....	63
3.4.8 Isolierung der Immunglobuline aus Seren mittels Ammonium-sulfatfällung	64
3.4.9 On-Cell Western und In-Cell Western	64
3.4.10 Nachweis der Expression von muskarinischen Rezeptoren (mAChR1 - mAChR5) auf Cholangiozyten und Hepatozyten mittels On-Cell Western	64
3.4.11 Einfluss von Immunglobulinen auf die Apoptose von TFK-1-Zellen mittels In-Cell Western	65
3.5 Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen den mAChR3 auf TFK-1- Zellen in Patientenseren	66
3.5.1 Lumineszenz Assay	66
3.5.2 Transfektion der TFK-1-Zellen mit GFP/Aequorin Plasmid DNA.....	66
3.5.3 Durchführung des Lumineszenz-Assay.....	67
3.5.4 Verifizierung der Spezifität von anti-mAChR3 Antikörper für den mAChR3 mittels Adsorptionstest.....	68
3.5.5 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von mAChR3 überexprimierenden TFK-1-Zellen.....	68
3.5.6 Assay zum Nachweis des Einflusses von Immunglobulinen auf die Zellproliferation von TFK-1-Zellen.....	69
3.6 Immunologische Methoden zum Nachweis einer humoralen und zellulären Reaktivität gegenüber rekombinantem mAChR3	70
3.6.1 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels ELISA unter Verwendung des full length mAChR3 sowie mAChR3 Peptiden	70

3.6.2 Bestimmung des Effektes von full length mAChR3 auf die Proliferation von PBMC.....	71
3.6.3 Bestimmung des Effektes von full length mAChR3 auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC	71
3.6.4 Nachweis der Zytokinproduktion durch PBMC nach Inkubation mit dem full-length mAChR3 Protein mittels ELISA	72
3.7 Statistik	73
4 Ergebnisse	75
4.1 Analyse der Expression von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren mAChR1 - mAChR5 auf Cholangiozyten- und Hepatozyten-Zelllinien.....	75
4.2 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie.....	76
4.3 Nachweis von funktionellen anti-mAChR3 Antikörpern in Patientenseren mittels Lumineszenz Assay	77
4.4 Adsorptionstest	78
4.5 Einfluss von Immunglobulinen auf die Proliferation von Cholangiozyten (TFK-1-Zellen).....	79
4.6 Einfluss von Immunglobulinen aus Patientenseren auf die Apoptose bzw. anti-apoptotische Signalkaskade von Cholangiozyten (TFK-1-Zellen).....	79
4.6.1 Einfluss von Ig auf die Bcl-2 Proteinexpression in Cholangiozyten.....	82
4.6.2 Einfluss von Ig auf die Bax Proteinexpression in Cholangiozyten.....	84
4.6.3 Einfluss der Ig Inkubation auf die Caspase-9 Proteinexpression in Cholangiozyten	85
4.7 Einfluss von Immunglobulinen aus Patientenseren auf die Zytokinproduktion von TFK-1-Zellen	86
4.8 Analyse der Epitopbindungsstelle von anti-mACh3 Antikörpern mittels ELISA.....	86
4.8.1 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Antigen in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	87
4.8.2 Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Antigen in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	88

4.8.3 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von PBC-Patienten.....	91
4.8.4 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von PSC-Patienten.....	92
4.8.5 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von AIH-Patienten.....	94
4.8.6 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit Virushepatitis.....	95
4.8.7 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung.....	97
4.8.8 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit primärem Sjögren Syndrom.....	98
4.8.9 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von gesunden Probanden.....	100
4.8.10 Häufigkeit von Antikörpern gegen die einzelnen mAChR3 Peptide bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden.....	101
4.9 Einfluss des mAChR3 auf die Proliferation von Patienten-PBMC.....	108
4.9.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von gesunden Probanden.....	109
4.9.2 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von PBC-Patienten.....	110
4.9.3 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von PSC-Patienten.....	111
4.9.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von AIH-Patienten.....	112
4.10 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Aktivierung immunkompetenter Zellen.....	113
4.10.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19 ⁺ -, CD56 ⁺ -, CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen von gesunden Probanden.....	113
4.10.2 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19 ⁺ -, CD56 ⁺ -, CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen von PBC-Patienten.....	114

4.10.3 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19 ⁺ -, CD56 ⁺ -, CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen von PSC-Patienten	116
4.10.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19 ⁺ -, CD56 ⁺ -, CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen von AIH-Patienten	117
4.11 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Zytokinproduktion von PBMC.....	118
4.11.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-1 α Produktion durch PBMC.....	119
4.11.2 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-6 Produktion durch PBMC.....	120
4.11.3 Einfluss von full length mAChR3 Antigens auf die TNF- α Produktion von PBMC.....	121
4.11.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die TNF- β Produktion durch PBMC.....	122
4.11.5 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IFN- γ Produktion durch PBMC.....	123
4.11.6 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-5 Produktion durch PBMC.....	125
4.11.7 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-13 Produktion durch PBMC.....	126
4.11.8 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-10 Produktion durch PBMC.....	127
4.11.9 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die GM-CSF Produktion durch PBMC.....	128
5 Diskussion.....	130
5.1 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörper in Patientenseren mittels verschiedener Methoden.....	131
5.1.1 Mittels Durchflusszytometrie zum Nachweis von Antikörpern gegen den nativen mAChR3	131
5.1.2 Nachweis funktioneller Antikörper mittels luminometrischer Messung	134
5.2 Analyse der Epitopbindungsstellen von AAK an den mAChR3.....	140
5.3 Zusammenfassung der CD69 Aktivierung, Zytokinsekretion und Zellproliferationsrate von PBMC	144

6	Fazit & Perspektive	154
6.1	Erkenntnisse über den Einfluss von mAChR3 AAK auf Cholangiozyten.....	154
6.2	Erkenntnisse über die exakte Epitopbindungsstelle von AAK an den mAChR3 (B-Zell Epitop).....	156
6.3	Erkenntnisse über den Einfluss von mAChR3 AAK auf Lymphozyten (autoreaktive T-Zellen)	157
7	Anhang.....	159
7.1	Plasmidkarte pG5A	159
7.2	Plasmidkarte pcDNA3.1 (+/-).....	160
7.3	Plasmidkarte pTrcHis-Topo.....	161
7.4	Plasmidkarte pEX-K4	162
7.5	Signifikanzschranken für Ausreißertest nach Dixon	163
7.6	Proliferationsrate der TFK-1-Zellen nach der Inkubation mit Immunglobulinen.....	165
7.7	Bax und Caspase-9 Expression bei gleichzeitiger CCh oder 5-FU- Inkubation in TFK-1-Zellen	166
7.8	Korrelation zwischen der Antikörper Affinität und funktionellen Antikörpern an das full length mAChR3 Protein	170
7.9	Korrelation der IgG und IgM Affinität an das full length mAChR3 Antigen zu der PBMC Aktivierung nach Antigeninkubation.....	174
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	175
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	180
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	183
11	LITERATURVERZEICHNIS	189
12	DANKSAGUNG.....	215

Kurzfassung

In verschiedenen Studien wurden Autoantikörper (AAK) gegen den muskarinischen Acetylcholin Rezeptor 3 (mAChR3) bei Patienten mit Sjögren Syndrom (SS) und primärer biliärer Cholangitis (PBC) beschrieben, und es wurde gezeigt, dass diese Antikörper den Rezeptor aktivieren oder inhibieren können, also funktionell aktiv sind. Diese Untersuchungen wurden insbesondere mit Epithelzellen der Speicheldrüsen durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen, ob AAK gegen den mAChR3 auch bei Patienten mit anderen autoimmunen Lebererkrankungen, wie der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC) und der autoimmunen Hepatitis (AIH), oder bei der Virushepatitis (VH) vorkommen, und ihre Wirkung auf die Rezeptorfunktionalität, Zellproliferation und Apoptosemechanismen von Cholangiozyten unter Verwendung der Zelllinie TFK-1, zu analysieren. Ferner sollte mittels Epitop-Mapping geklärt werden, ob es immundominante Epitope gibt, die von IgG und IgM mAChR3 AAK erkannt werden. Darüber hinaus wird der Einfluss des mAChR3 Antigens auf die humorale Immunantwort der Patientenlymphozyten untersucht. Insgesamt wurden 499 Probanden davon 142 PBC-, 50 PSC-, 44 AIH-, 50 VH-, 25 ALD-, 60 SS-Patienten und 129 gesunde Probanden mittels Lumineszenz Assay, Adsorptionstest, ELISA, Durchflusszytometrie, In-Cell Western und mittels ^3H -Thymidin-Einbau getestet.

In der Durchflusszytometrie haben ein Drittel der 38 PBC- und 74 % der 35 PSC-Patienten IgM-Antikörper gegen mAChR3-exprimierenden TFK-1-Zellen. IgG-Antikörper sind nicht nachweisbar. Immunglobuline (Ig) von 31 % der 142 PBC-, 14 % der 50 PSC- und 44 % der 43 AIH-Patienten stimulieren den mAChR3 auf $1 \cdot 10^4$ TFK-1-Zellen, haben aber keinen Effekt auf deren Proliferationsrate, Zytokinproduktion oder die Expression der Apoptose Proteine Bcl-2, Bax und Caspase-9. Bei Verwendung des rekombinanten mAChR3 Antigens zeigen Seren von Patienten mit SS, VH und alkohol-induzierte Lebererkrankungen (ALD) im ELISA eine verstärkte IgM-Reaktivität. IgG-Antikörper waren insbesondere bei Patienten mit AIH und SS kaum nachweisbar. IgG-AAK binden bevorzugt an den zweiten zytoplasmatischen und dritten extrazellulären Loop. mAChR3 AAK des IgM-Typus an die angrenzenden Transmembranregionen nach dem zytoplasmatischen Loop Nr.1, an die dritte extrazelluläre Schleife und das nachfolgende C-terminale Ende. Das mAChR3 Antigen aktiviert in vitro CD4^+ -Lymphozyten von 20 PBC-Patienten, aber inhibiert sowohl deren Th_1 - als auch deren Th_2 -Zytokinantwort. Bei 20 Patienten mit AIH führt es zu einer Aktivierung von CD4^+ - und CD8^+ -Lymphozyten, einer Stimulation ihrer Proliferation und einer Reduktion der IFN- γ - und IL-10 Produktion. Der Effekt des mAChR3 Antigens auf die PBMC von 20 PSC-Patienten ergibt bereits eine spontane Aktivierung von CD19^+ -Zellen sowie eine verstärkte IL-6- und verminderte IL-5-Sekretion.

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass Antikörper gegen mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen in Seren von PBC-, PSC-, VH-Patienten aber auch von gesunden Probanden nachweisbar sind. Ig's von PBC- und PSC-Patienten stimulieren aber spezifisch den mAChR3 auf Cholangiozyten. Patienten- und Kontrollseren reagieren, abhängig vom IgG- und IgM-Antikörpertypus, mit unterschiedlichen mAChR3-Epitope. Darüber hinaus führt die Inkubation von PBMC von PBC-, PSC- und AIH-Patienten mit dem mAChR3 Antigen in vitro zur Aktivierung unterschiedlicher Zellpopulationen mit Freisetzung verschiedener Zytokine.

Abstract

Introduction: It is known that patients with Sjögren's syndrome (SS) and primary biliary cholangitis (PBC) exhibit autoantibodies (AAbs) against the muscarinic acetylcholine receptor 3 (mAChR3). Further studies indicated an agonistic effect of mAChR3 AAbs to receptor functionality on salivary glands cells.

Aim: Therefore the aim of the study is to analyze the presence of mAChR3 AAbs in patients with autoimmune and viral liver diseases such as primary sclerosing cholangitis (PSC), autoimmune hepatitis (AIH) and viral hepatitis (VH). Furthermore, the agonistic effect of AAbs to receptor functionality, cell proliferation rate and apoptosis mechanisms of the cholangiocyte cell line TFK-1 will be investigated. To get more insights into pathogenetic mechanisms and to obtain probable diagnostic parameters also the correct mAChR3 epitope binding site will be examined. In addition, the influence of IgG and IgM AAbs to the humoral immune response will be investigated by using patients lymphocytes. A total of 499 participants including 142 PBC, 50 PSC, 44 AIH, 50 VH, 25 ALD, 60 SS patients and 129 healthy volunteers was analyzed by using luminescence assay, adsorption assay, ELISA, flow cytometry, In-Cell Western and ³H-Thymidine uptake.

Results: One third of PBC and 74 % of PSC-patients exhibit mAChR3 AAbs of the IgM type, but none of the IgG type. Immunoglobulins (Ig's) of 31 % of PBC, 14 % of PSC and 44 % of AIH-patients increase mAChR3 functionality in TFK-1 cells without influence proliferation rate, cytokine production, or Bcl-2, Bax and Caspase-9 protein expression. AIH and SS-patients demonstrate the lowest IgG antibody binding to the complete mAChR3 protein, while there is a significant IgM antibody binding in sera of SS, VH-patients and controls. Moreover, IgG-AAbs bind epitopes of the second cytoplasm loop and the third extracellular loop. However, mAChR3 AAbs of the IgM type bind the transmembrane region after the first cytoplasm loop as well as peptides of the third extracellular loop and the C-Terminus. Treatment with mAChR3 antigen activate CD4⁺ lymphocytes from PBC patients and reduce the Th₁ and Th₂ cytokine response. In contrast CD19⁺ cells from PSC patients are activated, IL-6 secretion is increased and IL-5 is reduced. mAChR3 antigen treatment resulted in an activation of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from AIH-patients, an increased proliferation rate and a reduced IFN- γ and IL-10 production.

Conclusion: mAChR3 AAbs are present in sera from PBC, PSC, AIH-patients as well as in controls. Especially Ig's from PBC and PSC-patients increase mAChR3 functionality on cholangiocytes. Furthermore sera of patients and controls demonstrate different mAChR3 epitope binding sites depending on IgG or IgM-AAbs type. Also mAChR3 antigen treatment of PBC, PSC, and AIH lymphocytes result in different activation of cell populations and cytokine secretion.

1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein biologisches Abwehrsystem. Es hat die Aufgabe, den Organismus gegen eingedrungene Krankheitserreger und/oder entartete, körpereigene Zellen zu schützen, andererseits muss es körpereigene Zellen von potenziellen Pathogenen bzw. Tumorzellen unterscheiden und dabei körpereigenen Strukturen nicht angreifen. Diese Fähigkeit wird Immuntoleranz genannt. Das Immunsystem wird unterteilt in das angeborene (engl.: innate) und das erworbene (engl.: adaptive) Immunsystem. Die angeborene Immunabwehr reagiert innerhalb von Minuten nach Eindringen des Fremdkörpers. Zu den Zellbestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören Neutrophile Granulozyten, Eosinophile, Basophile, Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen, die sich aus Monozyten entwickeln. Die genannten Zellen zirkulieren in den Blutgefäßen, kommen aber auch in den Geweben vor. Die Immunabwehr verläuft Erregergruppenspezifisch, das heißt neben anatomischen und physiologischen Barrieren, wie z. B. der Haut, Schleimhaut, Magensäure, etc., werden Oberflächenstrukturen der Krankheitserreger von sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: toll-like receptor, TLRs) erkannt. Intrazellulär führt dies zu Signalkaskaden, welche die Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur Folge hat. Eine hohe Anpassung und die Fähigkeit spezifische Strukturen (Antigene) zu erkennen und gegen diese dauerhafte/lebenslange Antikörper zu bilden, welche vor einer erneuten Infektion schützen sollen, sind charakteristisch für das adaptive Immunsystem. Zu den Bestandteilen der adaptiven Immunantwort gehören sowohl T- als auch B-Lymphozyten. Daneben werden die Immunmechanismen in die humorale und die zelluläre Immunantwort eingeteilt. Die humorale Immunantwort ist in Körperflüssigkeiten wie dem Blut, der Lymphe und Gewebeflüssigkeit in Form von Antikörper lokalisiert und wird durch B-Lymphozyten vermittelt. Für die zelluläre Immunantwort sind $CD4^+$ -T-Helfer- und $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen verantwortlich [1, 2, 3].

Kommt es zu einer überschießenden Immunantwort auf körpereigenes Gewebe, also zum Verlust der Immuntoleranz, können Autoimmunerkrankungen die Folge

sein. Die Immunzellen bekämpfen hierbei irrtümlicherweise gesunde bzw. intakte Zellen. Die Folge ist eine dauerhafte Entzündungsreaktion, welche zu massiven Schäden bzw. zum Abbau des betroffenen Gewebes führt. Um einen Angriff des Immunsystems auf körpereigene Strukturen zu vermeiden werden die Immunzellen stetig auf eine Fehlprogrammierung (Autoreaktivität) überprüft. Dieser Prozess wiederum wird in die "zentrale" und "periphere" Immuntoleranz unterschieden. Die *zentrale* Immuntoleranz der B-Zellen findet im Knochenmark und die der T-Zellen im Thymus statt. Zum Schutz vor autoreaktiven Lymphozyten werden diese auf ihre Fähigkeit getestet humane Leukozytenantigen-(HLA)-Moleküle oder andere Autoantigene zu erkennen. Solche die nicht in der Lage dazu sind (positive Selektion) oder gar eine zu hohe Affinität aufweisen (negative Selektion) werden daraufhin mittels Apoptose eliminiert. T-Zellen die eine intermediäre Affinität besitzen können in die Peripherie gelangen und u. a. in regulatorische T-Zellen (T_{reg}) ausdifferenzieren. Die *periphere* Immuntoleranz findet hingegen außerhalb des Thymus statt, wobei autoreaktive T-Zellen ebenfalls durch die Apoptose eliminiert werden. Zudem können die in der Peripherie aktivierten T_{regs} durch Zytokine und Antigenkontakt die Reaktion autoreaktiver T-Zellen unterdrücken [4, 5].

In den späten 1940-er Jahren wurden zum ersten Mal Autoantikörper (AAK) beschrieben, welche ein körpereigenes Antigen binden können. Dabei konnten Antinukleäre Antikörper (ANAs), sowie rheumatoide Faktoren (RFs) als Serumfaktor nachgewiesen werden, die in der Lage waren nukleäre Antigene bzw. Immunglobuline zu binden [6, 7]. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass AAK für systemische Entzündungen und Gewebeverletzungen verantwortlich sind und somit die Pathogenese vieler Krankheiten beeinflussen [8]. Innerhalb der letzten Jahre ist das Interesse an sogenannten "funktionellen" AAK stetig gestiegen, die spezifisch mit einem Oberflächenrezeptor auf der Zelle reagieren und seine Funktion modulieren können. Dabei blockieren die AAK den Rezeptor nicht nur indem sie die Bindung des natürlichen Agonisten verhindern, sondern üben auch einen aktiven Einfluss auf die Zellfunktion aus [9].

Generell können AAK gegen eine Vielzahl von intra- oder extrazellulär lokalisierten Molekülen, wie Nukleinsäuren, Lipide und Proteine gerichtet sein. Die meisten

AAK sind gegen Proteine im Zellkern oder im Zytoplasma gerichtet, die normalerweise für Antikörper oder B-Zellen nicht zu erkennen sind [6]. Derzeit sind zwei Modelle bekannt, wie B-Zellen diese Antigene identifizieren können: (A) Intrazelluläre Selbstantigene werden durch die Mechanismen der Apoptose oder Nekrose in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt. Parallel dazu bilden sich Apoptose-Vesikel bzw. neutrophile extrazelluläre Fallen (engl.: neutrophil extracellular traps, NETs) aus, die jene Selbstantigene unter normalen Umständen eliminieren. Bei unzureichender Beseitigung können diese Antigene durch B-Zellen erkannt und folglich die Autoantikörperproduktion initiiert werden. Ein andere Theorie (B) ist, dass Selbstantigene, die an einen B-Zellrezeptor (BCR) gebunden haben, gleichzeitig mit einem gebundenen Fremdantigen eines (intra- oder extrazellulären) Toll-Like-Rezeptor-(TLR)-Liganden kreuzreagieren. Die daraus resultierende Inflammation führt schließlich zur Freisetzung der intrazellulären oder modifizierten Selbstantigene. Dies wiederum hat eine Antikörper-Effektorfunktion und Induktion der klinischen Symptome bzw. die Ausbreitung der autoreaktiven B-Zellklone zur Folge [6]. Die Effektorfunktionen der AAK sind denen der regulären Antikörper ähnlich und hängen daher von ihrem Isotyp ab. Beispielsweise sind spezifische IgA-Autoantikörper beim Antiphospholipid-Syndrom und vom IgE-Isotyp beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) typisch [10, 11]. Dennoch sind die häufigsten AAK vom IgG- und IgM-Typ, wobei IgM-Autoantikörper auch in gesunden Probanden nachgewiesen werden konnten und daher als weniger pathogen betrachtet werden [12].

Der Nachweis und die Quantifizierung von AAK werden bereits in der Differenzialdiagnose verwendet, wie etwa beim Diabetes mellitus Typ 1 [13], der rheumatoide Arthritis [14], dem Lupus erythematoses [15] oder den autoimmunen Lebererkrankungen. Aber nicht nur in der Diagnostik spielen AAK eine entscheidende Rolle. Parallel steigt das Interesse an AAK gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die agonistische oder antagonistische Wirkungen zeigen und somit einen pathogenetischen Faktor darstellen. Mittlerweile sind AAK gegen verschiedene GPCRs bekannt, wie z. B. den Angiotensin-II-Rezeptor Type I (AT₁) bei Patienten mit Bluthochdruck [16], den

β_1 -adrenerger Rezeptor bei Kardiomyopathien [17] oder den PDGF-Rezeptor bei der Sklerodermie [18], die die jeweiligen Funktionen des Rezeptors verändern, was wiederum krankheitsspezifische Symptome verursacht. Darüber hinaus sind AAK gegen den muskarinischen Acetylcholinrezeptor 3 (mAChR3) bei Patienten mit primärem und sekundärem Sjögren Syndrom (pSS, sSS) nachgewiesen worden [19]. Es wird vermutet, dass mAChR3 AAK eine parasymphatische Dysfunktion hervorrufen können und dies in der typischen Sicca Symptomatik resultiert, welche beim SS und der primären biliären Cholangitis (PBC) charakteristisch ist [20]. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf den AAKs gegen den mAChR3. Um ein besseres Verständnis zu erlangen, welche gravierenden Auswirkungen mAChR3 AAK auf die Funktion des mAChR3s haben könnten, wird nachfolgend der Aufbau, die Funktion und die Expression des Rezeptors erklärt. Zudem werden die aktuellsten Erkenntnisse der Forschung über die AAK gegen den mAChR3 bei Patienten mit primärem und sekundärem Sjögren Syndrom und der PBC erläutert.

1.1 Muskarinischer Acetylcholin Rezeptor 3

Die Familie der Acetylcholinrezeptoren (AChR) gehört zu den GPCRs und unterteilt sich in zwei verschiedene Gruppen, welche sich durch die Art der Stimulierung unterscheiden. Die Gruppe der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) wird neben der Erhöhung der AcetylcholinKonzentration durch Nikotin stimuliert und zählt zu den ionotropen Rezeptoren. Bei der zweiten Gruppe, den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChRs), handelt es sich um metabotrope Rezeptoren, deren Stimulierung durch das Alkaloid Muskarin erfolgen kann. Bei metabotropen Rezeptortypen aktiviert die Molekülbindung an den Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade (Second-Messenger Signaltransduktion) [21]. Derzeit sind fünf Subtypen der mAChR-Familie beschrieben: mAChR1, mAChR2, mAChR3, mAChR4 und mAChR5 [21, 22, 23]. Der mAChR2 und der mAChR4 aktivieren den G_{i0} -Protein Reaktionsweg, wodurch die Adenylatcyclase katalysiert wird, was zu einer Reduzierung des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) führt [24]. Hingegen initiieren die mAChR1, mAChR3, und mAChR5 die $G_{\alpha q/11}$ Signaltransduktion [25, 26]. Durch die

Dissoziation der α -Untereinheit schaltet sich das Enzym Phospholipase C (PLC) nach [27]. PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). Das IP_3 wandert zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und bindet dort die Calcium-Kanäle, was zu einer Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytoplasma führt. Das DAG hingegen verbleibt in der Membran und aktiviert zusammen mit dem freigesetzten Ca^{2+} verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC).

Die mAChRs gehören zu den Transmembranproteinen, welche durch sieben Transmembrandomänen charakterisiert sind und in die Plasmamembran eingebettet sind. Dadurch entstehen jeweils drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen ("loops"). Das aminoternale Ende (N-Terminus) ragt in den extrazellulären Raum, das Carboxylende (C-Terminus) befindet sich intrazellulär [28]. Lokalisiert sind mAChR1 in exokrinen Drüsen und dem Zentralnervensystem (ZNS), hier vor allem in der Großhirnrinde und dem Hippocampus [29, 30]. Die Rezeptoren wurden aber auch auf der glatten Muskulatur des Ösophagus [31] und im Blasengewebe gefunden [32]. Die mAChR2 sind im Herzgewebe, im ZNS [33, 29] und ferner an der glatten Muskulatur exprimiert [34]. Neben dem mAChR2 wird auch der mAChR3 an der glatten Muskulatur exprimiert. Darüber hinaus wurden die mAChR3 auch an endokrinen und exokrinen Drüsen, sowie in der Lunge, im Pankreas und im Gehirn nachgewiesen [31, 35, 36, 37, 38]. Im Gehirn findet er sich insbesondere an den neuronalen Zellen, wobei seine Expression weitgehend mit der mAChR1- und mAChR4-Subtypen überlappt. Die primäre Rolle der mAChR3 ist die Kontraktion der glatten Muskulatur, insbesondere der Atemwege, des Ileums, der Iris und der Harnblase [39, 40, 34]. Die mAChR3s werden in verschiedenen Bereichen des Gehirns und auf Beta-Zellen des Pankreas exprimiert, wo sie die cholinerge Regulation der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung beeinflussen [41, 42]. Ferner sind sie auch an der exokrinen Sekretion beteiligt, wie zum Beispiel dem Speichelfluss [43, 44]. Auf Grund der vielfältigen Lokalisation des mAChR3 auf den verschiedenen Geweben könnte der Nachweis von funktionellen anti-mAChR3 Antikörpern bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zu neuen diagnostischen oder therapeutischen Ansätzen führen. Die Verteilung der

mAChR4 und mAChR5 hingegen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Die Expression der beiden Rezeptoren ist vor allem im ZNS und im Gehirn aufgezeigt worden [45], wobei der mAChR5 auch in der glatten Muskulatur des Ösophagus [31] und im Herzen [46] nachgewiesen wurde.

1.1.1 Die mAChR3 Expression auf Lymphozyten

Die nAChR und die mAChR sind mittels radioaktiver Markierung und Fluoreszenzmarkierung sowie Immunhistochemie auf Lymphozyten identifiziert worden [47]. Die Stimulation mit verschiedenen muskarinischen und nikotinischen Agonisten resultiert in einer Regulation der Lymphozyten. Daher wurde zunächst angenommen, dass das parasympathische Nervensystem einen Einfluss auf die Aktivierung der Immunantwort hat. Diese Annahme wurde jedoch revidiert, als gezeigt wurde, dass Lymphozyten selbst ACh produzieren und sekretieren [48]. Weiter wurde aufgezeigt, dass die Cholinacetyltransferase, das ACh-Synthese Enzym, in mononukleären Leukozyten in menschlichen leukämischen T-Zelllinien und in Lymphozyten der Ratte exprimiert wird. Die Expression des mAChR3, mAChR4 und mAChR5 wurde in mononukleären Lymphozyten durch Hellström-Lindahl und Nordberg entdeckt [49], wohingegen Fujino et al. die Expression von mAChR1 und mAChR2 in humanen Lymphozyten aufzeigten [50]. Fujii und Kawashima konnten durch den muskarinischen Agonist Atropin einen Anstieg von Ca^{2+} induzieren und der mAChR1/mAChR3 Agonist Oxotremorin-M steigerte die c-Fos (Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1) mRNA Expression in T- und B-Zellen [51]. Des Weiteren konnte die Wirkung von Oxotremorin-M durch den mAChR3 Antagonisten 4-DAMP (1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium-iodid) aufgehoben werden. Dies lieferte den ersten Hinweis, dass ACh von T-Lymphozyten freigesetzt wird und dadurch die Genexpression in T- und B-Lymphozyten über den mAChR3 hochreguliert wird [52]. Mittlerweile ist bekannt, dass die Ca^{2+} Konzentration regulierend auf die Zelldifferenzierung, die Gentranskription und die Effektorfunktion der Immunzellen wirkt und somit die Balance des Immunsystems steuert [53]. Eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wird z. B. durch die Aktivierung von Immunrezeptoren wie dem T-, dem B-Zellrezeptor, dem Fc-Rezeptor und weiteren kostimulatorischen

Rezeptoren sowie verschiedener Chemokine verursacht. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, resultiert auch die mAChR3 Stimulation in einem Anstieg der Ca^{2+} Konzentration innerhalb der Zelle. Antikörper gegen den mAChR3 könnten daher nicht nur durch Interaktion mit Rezeptoren auf peripheren Organen sondern auch durch Reaktion mit Lymphozyten selbst zur Entwicklung der Autoreaktivität beitragen [54].

1.1.2 Einfluss von mAChR3 auf die Apoptose

GPCRs sind in der Lage, abhängig vom Zelltyp und vom Rezeptor-Subtyp, den programmierten Zelltod durch eine Vielzahl von Mechanismen zu regulieren. Die Aktivierung der $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Subtypen der muskarinischen Rezeptoren, d.h. des mAChR1, des mAChR3 und des mAChR5, resultiert in einer anti-apoptotischen Wirkung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des mAChR3 ein wesentliches Strukturelement für die Signaltransduktion des anti-apoptotischen Signalweges darstellt [55]. Eine weitere Studie von Budd et al. demonstriert, dass der zuvor induzierte Abfall des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins in CHO-Zellen durch die Stimulierung des mAChR3 abgeschwächt werden kann. Es wird postuliert, dass die Aktivierung des mAChR3 eine anti-apoptotische Signalkaskade in Gang setzt, die zur Hochregulierung der Gentranskription sowie des Bcl-2-Proteins führt und unabhängig vom Calcium/PLC-Signalweg ist [56]. Die Gruppe von Reina S. et al. konnte nachweisen, dass IgG anti-mAChR3 Antikörper aus pSS Patientenserum eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), Caspase-3 und Matrix-Metalloprotease-3 (MMP-3) in A253-Zellen (humane Speicheldrüsenzellen) hervorrufen, welche zur Apoptose dieser Zellen führt [57]. Die Arbeit von Bi et al. befasst sich mit dem Einfluss von Acetylcholin auf den Stress im Endoplasmatischen Retikulum in Endothelzellen, der durch Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) induziert wurde. Die Autoren zeigen, dass ACh über den mAChR3 die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) aktiviert und dadurch der ER-Stress und die Apoptose in Endothelzellen gehemmt wird [58], was einen weiteren Beweis für den Einfluss des mAChR3 auf die Zellvitalität liefert.

1.2 Die Bedeutung von anti-mAChR3 Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen

Wie bereits dargelegt dienen AAK als Parameter bei der (Differenzial-) Diagnostik von Autoimmunerkrankungen und es wird postuliert, dass sie auch verantwortlich für ihre Entstehung sein können und/oder ihren Verlauf beeinflussen sowie spezifische Symptome verursachen. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf AAK gegen den mAChR3. Daher soll in diesem Kapitel der aktuelle Stand der Forschung und die Bedeutung von mAChR3 AAK bei Patienten mit SS und PBC dargestellt werden.

1.2.1 mAChR3 Autoantikörper bei SS-Patienten

Antikörper gegen den mAChR3 wurden erstmals 1998 bei Patienten mit SS nachgewiesen und seitdem steigt das Interesse an dem mAChR3 stetig an. Tabelle 1.2-1 gibt eine Übersicht über die Studien, welche sich mit dem Nachweis von mAChR3 AAK und deren Einfluss auf die Rezeptorfunktionalität beschäftigt haben. Sie veranschaulicht, dass Immunglobuline von 55 % der pSS-Patienten und 100 % der sSS-Patienten den mAChR3 auf Muskelzellen der Harnblase binden und in seiner Funktion inhibieren. PBMC von pSS-Patienten, die zusätzlich Anti-SS-A/Ro positiv waren, wiesen eine 66,67 % bis 75 % Affinität zum mAChR3 auf HEK293 Zellen auf, weshalb sich eine Korrelation der beiden Antigen/Antikörpersysteme vermuten lässt. Die meisten anti-mAChR3 Antikörper (4,2 % bis 90 %) reagierten mit dem zweiten extrazellulären Loop des mAChR3. Darüber hinaus zeigen die Studien, dass die AAK eine Inhibition der mAChR3-Funktionalität bewirken.

Tabelle 1.2-1: Übersicht über die Identifikation von AAK gegen den mAChR3 im Serum von Patienten mit pSS oder sSS. Aufgeführt ist der getestete Immunglobulin Typ, die Epitopbindungsstelle der AAK, die AAK Bindungskapazität, das Analyseverfahren, die Auswirkung der AAK auf den mAChR3 und die dazugehörige Quelle.

SS-Form	Ig-Typ	Epitop Domäne	Prävalenz	Methode	Funktion	Jahr
pSS	IgG	2 nd loop	-	IF	-	1998 [59]
pSS	IgG	2 nd loop	-	Inkubation auf LG-Zellen	NOS Aktivierung, cGMP Produktion	1998 [60]
pSS	IgG	mAChR3 ^{fl}	55 %	Kontraktion der glatten Muskulatur	Hemmung	2000 [61]
sSS	IgG	mAChR3 ^{fl}	100 %			
	IgG1, IgG3, IgA	mAChR3 ^{fl}	82 %	FACS	-	2004 [62]
	mAChR3 IgG	2 nd loop	-	ELISA	Hemmung	2004 [63]
	IgG1	mAChR3 ^{fl}	-	Inkubation auf HSG-Zellen	Reduktion des Ca ²⁺ -Einstroms, Hemmung von AQP-5	2004 [20]
pSS		2 nd loop (aa 213-237)	9 %	ELISA	-	2005 [64]
sSS		2 nd loop (aa 213-237)	14 %			
pSS		2 nd loop (aa 213-237)	77,5 % - 90 %	ELISA	-	2005 [59, 65]
		2 nd loop	97 %	ELISA	-	2005 [59]

SS-From	Ig-Typ	Epitop Domäne	Prävalenz	Methode	Funktion	Jahr
pSS	IgG	mAChR3 ^{fl}	-	Patch-Clamp-Technik	Reduktion der Ca ²⁺ Ionen	2006 [66]
Juvenile-SS		2 nd loop (aa 213-237)	52,6 %	ELISA	-	2008 [67]
pSS + sSS		3 rd loop (aa 514-527)	-	SPR-Spektroskopie	Hemmung	2008 [68]
pSS + sSS		N-Terminus (aa 1-68)	42,9 %	ELISA & Funktioneller Fluoreszenz Assay	Stimulation	2010 [69]
		1 st loop (aa 125-144)	47,6 %		Stimulation	
		2 nd loop (aa 213-237)	54,80 %		Hemmung	
		3 rd loop (aa 511-530)	45,20 %		kein Effekt	
SS		1 st + 2 nd + 3 rd MAP	4,2 % - 9,9 %	ELISA	-	2011 [70]
pSS + sSS	IgA	2 nd loop (aa 205-220)	46 %	ELISA	-	2011 [71]
pSS		2 nd loop (aa 205-220)	62,2 %	ELISA	-	2011/12 [72]
	mAChR3	2 nd loop (aa 213-237)	-	Ca ²⁺ -Einstrom Test	Hemmung	2012 [73]
pSS	IgG	mAChR3 ^{fl}	-	IF	mAChR3 Internalisierung	2012 [74]

SS-From	Ig-Typ	Epitop Domäne	Prävalenz	Methode	Funktion	Jahr
SS		2 nd loop (aa 184-227)	17,6 % - 86,5 %	ELISA	-	2013 [75]
		3 rd loop (aa 506-521)				
		3 rd loop (aa 360-377)				
pSS		mAChR3 ^{fl}	50 %	Lumineszenz	Hemmung	2014 [76]
sSS			-	Absorption	kein Effekt	
pSS	IgG	1 st loop (aa 131-145)	-	ELISA	MHC I Internalisierung	2015 [77]
		2 nd loop (aa 201-221)	50 %			
		3 rd loop (aa 520-527)	58,3 %			
	IgG aus Speichel	2 nd loop (aa 205-220)	55,81 %	ELISA	-	2016 [78]
SS	PBMC	mAChR3 ^{fl}	66,67 % - 75 %	In-Cell Western	-	2016 [79]

Abkürzungen: IF: Immunfluoreszenz; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay; aa: Aminosäure; fl: full length Protein; MAP: multi-antigenic peptides; LG: engl. lacrimal glands; cGMP: Cyclisches Guanosinmonophosphat; NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase; FACS: engl. fluorescence-activated cell sorting; HSG: engl. human submandibular gland cells; AQP-5: Aquaporin-5; SPR-Spektroskopie: engl. surface plasmon resonance spectroscopy.

Die Metaanalyse von Deng C et al. fasst ebenfalls verschiedene Ergebnisse über die Präsenz und Auswirkung von AAK gegen den mAChR3 bei Patienten mit Sjögren-Syndrom zusammen. Deren Fazit ist, dass anti-mAChR3 Antikörper zwar eine hohe Spezifität für das SS aufweisen, aber nur bei einem geringen

Prozentsatz der Patienten nachweisbar sind, so dass sie als Markerantikörper für die Diagnose des SS ungeeignet sind [80].

1.2.2 mAChR3 Autoantikörper bei PBC-Patienten

Auch bei der PBC wurden anti-mAChR3 Antikörper mittlerweile in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen. Die Tabelle 1.2-2 fasst hierzu den aktuellen Stand der Forschung zusammen und zeigt den Isotyp der Antikörper, das mAChR3-Epitop, gegen das sie gerichtet sind, die Prävalenz (in Prozent) und die verwendete Nachweismethode. Berg et al. zeigten, dass PBC-Patienten AAK des Typs IgG und IgM gegen den mAChR3 besitzen. Zudem konnten Tsuboi et al. IgG anti-mAChR3 Antikörper gegen extrazelluläre Domänen, insbesondere das N-Terminale Ende des Rezeptors, nachweisen. Jedoch liegt bisher keine Information vor, ob diese AAK die mAChR3-Funktion beeinflussen.

Tabelle 1.2-2: Übersicht über den Nachweis von AAK gegen den mAChR3 im Serum von PBC-Patienten. Aufgeführt ist der getestete Immunglobulin Typ, die Epitopbindungsstelle der AAK, die Häufigkeit der AAK, das Analyseverfahren und die dazugehörige Quelle.

Ig-Typ	Epitop Domäne	Prävalenz	Methode	Jahr
IgG	Membranfraktion von mAChR3 überexprimierten Sf9-Zellen	33 %	WB	2010 [81]
Serum IgG	Extrazellulärer loop 2 ^(aa 213-237)	64 %	ELISA	
Serum IgM		91 %		
Serum IgG	N-Terminus ^(aa 1-67)	90 %	ELISA	2014 [82]
	Extrazellulärer loop 1 ^(aa 125-144)	73,3 %		
	Extrazellulärer loop 2 ^(aa 213-237)	76,7 %		
	Extrazellulärer loop 3 ^(aa 527-546)	66,7 %		

Abkürzungen: WB: Western Blot; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

1.3 Beschreibung der in dieser Arbeit erwähnten Erkrankungen

In der vorliegenden Arbeit werden neben den Seren von Patienten mit SS und PBC Seren von Patienten mit weiteren Lebererkrankungen (autoimmun, viral oder alkoholinduziert) auf AAK gegen den mAChR3 untersucht, um weiteren Aufschluss auf die Krankheits-, Gewebe- und/oder Organspezifität der AAK zu erlangen. Arbeitsrelevante Erkrankungen wie das SS, die PBC, die primäre sklerosierende Cholangitis, die autoimmune und virale Hepatitis, sowie alkoholinduzierte Lebererkrankungen werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.3.1 Primäre biliäre Cholangitis

Die primäre biliäre Cholangitis ist eine seltene autoimmune cholestatische Lebererkrankung, die hauptsächlich bei Frauen zwischen 40 und 60 Jahren auftritt [83]. Sie beginnt mit einer Entzündung der kleinen intrahepatischen Gallengänge, gefolgt von einem chronischen progressiven Prozess, welcher die Gallengänge letztlich zerstört. Dies hat eine Cholestase zur Folge, die in einer Fibrose resultiert und im späteren Krankheitsverlauf zur Leberzirrhose bzw. zur Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms führen kann [84, 85, 86]. Jüngst wurde veröffentlicht, dass eine positive Korrelation zwischen der Prävalenz von PBC und einem hohen sozioökonomischen Status besteht [87]. IZellen ähnelt. [92]. Neben den AMA kommen bei der PBC spezifische Antikörper gegen bestimmte Kernproteine vor (nuclear dots – sp100; Kernmembran, Zentromere). Ferner wurden, wie bereits oben erwähnt (siehe Kapitel 1.2.2), auch Autoantikörper gegen den mAChR3 nachgewiesen [82].

Die PBC wird als eine Erkrankung mit einer typischen Th₁-Zellsignatur, überwiegend der CD4⁺-T-Zellen, beschrieben [93, 94]. Histologisch zeigt sich eine Infiltration von CD4⁺-T-Zellen in den Gallengängen und den Portalfeldern. Die Expression von Zytokinen in Leberzellen von PBC-Patienten zeigt einen erhöhten Gehalt an Interferon-(IFN-) γ , Interleukin-(IL-)2 und IL-5 auf. Das synthetisierte IFN- γ wiederum stimuliert die Expression von HLA-Klasse-I und -II-Antigenen, welches wiederum zu einer vermehrten Interaktion der Lymphozyten mit dem PDC-E2 Antigenen auf den Gallenwegen führt. Dadurch entsteht eine

kreislaufartige Aktivierung und Differenzierung der Th₁- und Th₂-Lymphozyten [95, 96]. Ein weiteres histologisches Merkmal der PBC ist die Infiltration von eosinophilen Granulozyten in den Portalfeldern. Das oben genannte IL-5 ist in der Lage, die Eosinophilen zu aktivieren. Neuere Daten liefern jedoch den Hinweis, dass sich auch Th₁₇-Zellen um die geschädigten Gallengänge anreichern [97]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Th₁₇-Zellen das IL-6, IL-1 β und IL-23 sezernieren, wenn sie über PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns) stimuliert werden. Außerdem sind die TH₁₇-Zellen im Verhältnis zu T_{regs} in PBMC erhöht [98].

Klinisch ist die PBC oft mit extrahepatischen Syndromen assoziiert, wie dem Sjögren Syndrom, der Hashimoto-Thyreoiditis oder der Zöliakie [99]. Aber auch Überlappungen mit anderen autoimmunen Lebererkrankungen, insbesondere der autoimmunen Hepatitis, seltener der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC) oder der IgG4-assoziierte Cholangitis (IgG4-SC) sind zu beobachten [99, 100]. Laborchemisch ist die PBC gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Cholestaseenzyme (Gamma-Glutamyl-Transferase [γ -GT], alkalische Phosphatase [AP] und der IgM-Globuline. Die Pathogenese der PBC ist weitgehend unbekannt. Familienstudien und Studien über monozygote Zwillinge liefern Hinweise auf eine hohe genetische Prädisposition [85, 101]. Des Weiteren können Umweltfaktoren wie Rauchen und Drogenmissbrauch eine entscheidende Rolle spielen [84, 86, 85]. Die Auslösung durch Infektionen mit verschiedenen Bakterien, Viren und Parasiten sowie durch chemische Xenobiotika wird ebenso postuliert [102]. Da überwiegend Frauen betroffen sind, könnte dies auf einen Defekt des Geschlechtschromosoms X [103] hinweisen und/oder auf epigenetische Anomalien [101]. Die einzige Therapie ist die Behandlung mit Ursodesoxycholsäure (UDCA), einer hydrophilen Gallensäure, die die Anreicherung hydrophober toxischer Gallensäure um die Gallengänge verhindern soll, aber auch anti-entzündliche und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt [86]. In Spätstadien ist die Lebertransplantation die Therapie der Wahl.

1.3.2 Autoimmune Hepatitis

Bei der autoimmunen Hepatitis (AIH) handelt es sich ebenfalls um eine chronische, entzündliche autoimmune Lebererkrankung, die sich aber nicht selten erstmals in Form eines akuten Schubes manifestiert. Die AIH ist eine seltene Autoimmunerkrankung, die jede Altersgruppe und alle ethnischen Gruppen betreffen kann. Frauen erkranken 4- bis 6-mal häufiger als Männer [104, 105]. Die Prävalenz variiert stark, in Europa liegt sie bei 10 bis 17 auf 100.000 Personen [106, 107, 108], in Alaska bei 42,9 [109] und in Neuseeland wurden 24,5 Fälle pro 100.000 Einwohner berichtet [110]. Die Ätiologie ist unklar. Es wird postuliert, dass die AIH bei Personen mit genetischer Prädisposition durch die Exposition bestimmter Faktoren wie Mikroben, Viren und Xenobiotika ausgelöst wird. Anschließend wird der Autoimmun-Angriff möglicherweise durch molekulare Mimikry-Mechanismen gegen die Leber fortgesetzt und durch die verminderte Anzahl und beeinträchtigte Funktionalität regulatorischer T-Zellen gefördert [111, 112].

Die Diagnose der AIH beruht auf mehreren Kriterien, die 1999 von der Internationalen AIH-Gruppe (IAIHG) zusammengefasst wurden und stetig evaluiert werden [113]. Zu den Kriterien gehören der Ausschluss (a) von anderen Hauptursachen wie Alkohol-, Virus-, Drogen-, Toxin- oder genetisch induzierten Lebererkrankungen, der Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern (b), ein erhöhter IgG- oder γ -Globulin-Spiegel im Serum (c), der Nachweis von humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) der Klasse DR3 oder DR4 (d) und die Zellinfiltration in das portale Gewebe, sowie eine Grenzflächenhepatitis um das Lebergewebe herum (f). Ein weiteres Merkmal für eine typische AIH ist die positive Reaktion auf eine immunsuppressive Behandlung [113].

Die AIH wird in die zwei Arten Typ 1 und Typ 2 unterteilt. Die Typ-1-AIH ist durch die Anwesenheit von zirkulierenden ANAs und/oder Antikörpern gegen die glatte Muskulatur (SMA) charakterisiert. Bei 60 bis 90 % der Patienten sind die ANA mit perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (p-ANCA) assoziiert. Die AIH-Typ 2 betrifft vor allem Kinder und Jugendliche. Charakterisiert wird sie durch den Nachweis spezifischer Antikörper gegen das endoplasmatische

Retikulum (Mikrosomen) der Leber und der Niere des Typ 1 (Anti-LKM1), seltener sind Anti-LKM3 Antikörper und/oder Antikörper gegen das Leber-Zytosol-Antigen (anti-LC1) [114, 111]. Wichtig bei der Diagnose der AIH ist die Abgrenzung zur PBC und PSC bzw. die Analyse einer Koexistenz von AIH und PBC (7 % bis 13 %) oder PSC (5 % bis 11 %). Die AIH zeigt im Serum in der Regel ein typisches hepatisches Muster mit einer erhöhten Aspartat-Aminotransferase (GOT), während im Serum eines PBC-Patienten eher ein cholestatisches Muster mit einer erhöhten AP und γ -GT zu finden ist. Im Gegensatz zur PBC mit erhöhten Serum-IgM-Spiegeln ist für die AIH die Erhöhung der IgG-Globuline typisch [99, 115].

1.3.3 Primäre sklerosierende Cholangitis

Die sklerosierende Cholangitis umfasst ein breites Spektrum chronischer und progressiver cholestatischen Lebererkrankungen, die durch Entzündungen, Fibrose und Verengung der intrahepatischen, sowie der extrahepatischen Gallengänge charakterisiert sind, welche im Verlauf der Erkrankung schließlich zur Leberzirrhose führt. Die sklerosierende Cholangitis kann in die primäre sklerosierende Cholangitis mit nicht identifizierter Ätiologie und die sekundäre sklerosierende Cholangitis, die durch verschiedene identifizierbare Ätiologien verursacht wird, unterteilt werden. Daher erfordert die Diagnose der PSC den Ausschluss von sekundären Ursachen [116]. Die Inzidenz der PSC wird auf 1 pro 100.000 Einwohner weltweit geschätzt [117]. Sie wird zu den Autoimmunerkrankungen gerechnet, wobei ungewöhnlich ist, dass sie Männer doppelt so häufig wie Frauen betrifft mit einem Krankheitsbeginn zwischen 25 und 40 Jahren [118]. Als Ursache der PSC wird das Zusammenspiel zwischen genetischen Varianten und Umweltfaktoren postuliert [119]. Zudem weist die PSC eine starke Assoziation mit entzündlichen Darmerkrankungen auf. Etwa 60 % bis 80 % der PSC-Patienten sind von einer entzündlichen Darmerkrankung betroffen, davon leiden etwa 87 % an Colitis ulcerosa und 13 % an Morbus Crohn [120, 121, 122]. Außerdem zeigt sich ein Überlappungssyndrom von 1,4 % bis 17 % der PSC-Patienten mit einer AIH [123, 124]. Die Diagnose der PSC verläuft über cholestatische Serumenzymmuster, die Histologie der Leber mit einer leichten bis moderaten Portalfeldinfiltration und einer zwiebelschalenförmigen Fibrose um die

Gallengänge und insbesondere einen typischen Befund bei der Cholangiographie. Darüber hinaus weisen 70 % der PSC-Patienten Antikörper gegen neutrophile Granulozyten auf. Wie bei der PBC ist eine portale Infiltration mit Lymphozyten, deren Aktivierung und eine Verschiebung der peripheren und intrahepatischen Zytokinexpression von T-Zellen in Richtung Th₁-Zytokinprofil (IL-2, IFN- γ , TNF- α) sowie die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf biliären Epithelzellen zu beobachten [125]. Eine immunsuppressive Therapie ist unbefriedigend, daher werden Gallenwegsverengungen mechanisch und die Cholestase mittels UDCA behandelt [126]. Die Entwicklung des Cholangiokarzinoms (CC) ist außerdem ein Hauptmerkmal der PSC, das bei 5 % bis 10 % der Patienten auftritt [127, 128, 129, 130].

1.3.4 Virale Hepatitis

Generell ist die Virushepatitis eine systemische akute oder chronische Leberentzündung, hervorgerufen durch Hepatitisviren A bis E. Nachfolgend werden die Hepatitis B und C erläutert.

Die Hepatitis B ist eine Infektionskrankheit der Leber, welche aus der Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) resultiert und sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann. Das HBV ist ein umhülltes doppelstrangiges DNA-Virus, das der Gattung *Orthohepadnaviren* innerhalb der Familie *Hepadnaviridae* zugeordnet wird [131]. Die Virushülle besteht aus dem lipidhaltigen Hepatitis-B-Oberflächenantigen HBsAg (Hepatitis B surface antigen), dieses wiederum beinhaltet das Viruskapsid, welches aus dem Core-Antigen (HBcAg) aufgebaut ist. Die genannten Antigene sind bei dem serologischen Nachweis einer akuten bzw. chronischen Infektion von Bedeutung. Außerdem kann bei stark erkrankten Patienten eine lösliche Form des HBc-Antigens, das HBe-Antigen (HBeAg), das von infizierten Leberzellen sezerniert wird, nachgewiesen werden [131, 132]. Das Virus wird über Blut-zu-Blut-Kontakt und weitere Körperflüssigkeiten durch infizierte Personen übertragen. Schätzungsweise leiden derzeit 240 Mio. Menschen an einer chronischen Hepatitis B. Sie führt häufig zur Ausbildung einer Zirrhose und einem HCC [133]. Mehr als 686.000 Menschen sterben jedes Jahr aufgrund der Komplikationen der Zirrhose und des Leberzellkarzinoms [134]. Die

Therapie einer chronischen Hepatitis B umfasst eine antivirale Therapie mit Interferon- α bzw. Nukleos(t)id-Analoga [135]. Vorbeugend stellt eine Schutzimpfung die wichtigste Maßnahme zur Vermeidung der Infektion dar [136].

Die Hepatitis C entsteht durch eine Hepatitis C-Virus (HCV) Infektion. Das Virus wurde als Erreger der Non-A, Non-B Hepatitis (NANBH) im Jahr 1989 entdeckt [137]. Bei dem HC-Virus handelt es sich um ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus (ss(+))RNA). Auf Grund von Sequenzierungsarbeiten ist das Virus in die Familie der *Flaviviridae* zur Gattung *Hepacivirus* eingruppiert [138]. Die wichtigsten Wirtszellen, welche die HCV-Replikation unterstützen, sind humane Hepatozyten. Innerhalb der ersten 6 Monate spricht man von einer akuten HCV Infektion, danach entwickeln mehr als 75 % der infizierten Personen eine chronische Hepatitis C. Derzeit sind ca. 130 bis 170 Mio. Menschen weltweit (entspricht etwa 2 % bis 3 % der Weltbevölkerung) mit dem HC-Virus infiziert [139]. Somit stellt die Hepatitis C eine weitere Hauptursache der chronischen Hepatitis und eine der führenden Ursachen für das HCC dar [140]. Die HCV-Übertragung geschieht hauptsächlich über einen Blut-zu-Blut-Kontakt. Die Behandlung der Hepatitis C war bisher unbefriedigend, seit der Einführung neuer Virostatika ist aber eine Ausheilung in nahezu 100 % möglich.

1.3.5 Alkoholinduzierte Lebererkrankungen

Bei den alkoholinduzierten Lebererkrankungen (engl.: **alcoholic liver disease**, ALD) unterscheidet man verschiedene Stadien wie die Fettleber (Stadium I), die akute Hepatitis (Stadium II) und die chronische Hepatitis mit Anzeichen der Fibrose oder Zirrhose des Lebergewebes (Stadium III). Die Einteilung der einzelnen Stadien beruht auf histologischen Untersuchungen. Alle Stadien können auch gleichzeitig auftreten [141]. Laborchemische Marker für den chronischen Alkoholkonsum sind Serum- γ GT, AST, ALT, mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten (MCV) und kohlenhydratdefizientes Transferrin (CDT). Häufig sind spezifische IgA-Antikörper, die gegen Acetaldehyd-Addukte gerichtet sind, nachweisbar. Zudem ist ein erhöhtes Verhältnis von Serum-IgA zu -IgG bei ALD-Patienten vorzufinden [142]. Der Alkoholkonsum in den westlichen Ländern liegt höher als in weniger sozioökonomisch entwickelten Ländern. Der höchste Alkoholgehalt in

einem Standardgetränk von 23,5 g/L lässt sich in Japan nachweisen [143] in Europa liegt der durchschnittliche Alkoholgehalt bei 9,8 g/L in einem Standardgetränk. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit eine ALD zu entwickeln nicht nur dosisabhängig, da nur 15 % bis 20 % der Alkoholiker eine Hepatitis oder Zirrhose ausbilden [144]. Demnach kann ausschließlich von Risikofaktoren gesprochen werden, die eine ALD begünstigen. Zu diesen Risikofaktoren gehört die Alkoholmenge (1), die über einen Zeitraum bis zu 20 Jahren konsumiert wird. Bei Männern gilt als obere Grenze die Menge von 60 bis 80 g Alkohol pro Tag (ca. 75–100 ml/Tag) und bei Frauen von 20 g Alkohol täglich (ca. 25 ml/Tag) [145, 146]. Außerdem ist die Art des Alkohols (2) ausschlaggebend. Hierzu zeigt eine Studie, dass der Genuss von Spirituosen und Bier stärker mit Lebererkrankungen assoziiert ist, als der von Wein [147]. Ein weiterer Faktor ist das Trinkverhalten (3). Alkoholkonsum außerhalb der Mahlzeiten erhöht das Risiko einer ALD um das 2,7-fache im Vergleich zu Personen, die Alkohol ausschließlich zu den Mahlzeiten trinken [148]. Darüber hinaus besteht für Frauen ein doppelt so hohes Risiko (4) [149]. Auch eine Mangelernährung (5), insbesondere ein Mangel an Vitamin A und E, kann die Entstehung einer alkoholinduzierten Lebererkrankung begünstigen [150]. Zwillingsstudien zeigen zudem, dass neben Umwelteinflüssen auch die genetische Prädisposition (6) eine Rolle spielt [151]. Auch der Polymorphismus (7) an Enzymen, die am Metabolismus von Alkohol beteiligt sind, wie Alkoholdehydrogenase, Acetaldehyddehydrogenase, dem Cytochrom P450-System und eine mitochondriale Dysfunktion, können Risikofaktoren für eine ALD sein [152, 153]. Darüber hinaus begünstigt eine zusätzliche Hepatitis C Infektion (8) die Erkrankung an einer ALD [154].

1.3.6 Sjögren Syndrom

Beim Sjögren Syndrom handelt es sich um eine systemische entzündliche Autoimmunerkrankung, die zu den Kollagenosen eingestuft wird. Das SS wird klassifiziert in die primäre Form (pSS), bei der das SS isoliert auftritt, und in die sekundäre Form (sSS), bei der neben Überlappungen zur PBC auch Überlappungen zur rheumatoiden Arthritis (RA), dem SLE, der systemischen Sklerodermie und weiteren Autoimmunerkrankungen bestehen [155]. Die

Überlappung von sSS wurde von Lazarus und Isenberg [156] zu 1,8 % bis 4 % mit PBC und mit anderen Lebererkrankungen zu 2,6 % bis 9 % beobachtet [157]. Eine andere Studie weist eine Assoziation von 4,8 % bis 11,9 % zur PBC und AIH auf [158]. Des Weiteren wurde eine weitaus höhere Prävalenz von 35 % des SS bei PBC-Patienten beobachtet [159].

Die pSS tritt vor allem bei der weiblichen kaukasischen Bevölkerung auf (Ratio Frauen:Männer 9:1) [160], García-Carrasco et al. beschreiben sogar ein Verhältnis von 20:1 [161]. Der Ausbruch der Erkrankung beginnt meist bei der hormonellen Umstellung während der Menopause, d. h. in der 4-ten bis 5-ten Lebensdekade. Die Prävalenz von pSS ist stark davon abhängig, welche Einstufungskriterien für das Syndrom verwendet werden. Es liegen hierzu verschiedene Studien vor, die eine Prävalenz von 0,2 % bis 5,3 % belegen [155, 162]. Im Anfangsstadium ist das SS durch eine Hyperaktivität der B-Zellen und infiltrierende Lymphozyten in die exokrinen Drüsen, hauptsächlich Speichel- und Tränendrüsen, gekennzeichnet [163]; sie gehört zu den Th₁-dominanten Erkrankungen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu Sicca Symptomatik (Augen- und Mundtrockenheit) [164]. Im weiteren Verlauf sind die Hypergammaglobulinämie und in ca. 67 % der Fälle die Anwesenheit von anti-Ro (SSA) und/oder anti-La (SSB) Antikörpern gegen den Ro/La Ribonukleoproteinkomplex wichtige diagnostische Parameter [165, 166]. Daneben konnten auch anti-mAChR1 [167] und anti-mAChR3 (siehe Tabelle 1.2-1) Antikörper festgestellt werden. Die Ursachen des SS sind bisher nicht vollständig geklärt. Es wird ein Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition, Umwelteinflüssen und hormonellen Faktoren vermutet [168, 169, 170]. Die Therapie ist in erster Linie symptomatisch, bei schwerer und insbesondere systemischer Verlaufsform ist eine immunsuppressive Therapie notwendig.

1.4 Ziel der Arbeit

Autoantikörper dienen bei der Diagnostik von vielen Autoimmunerkrankungen als wichtiges Werkzeug. Es ist bekannt, dass AAK gewebespezifisch binden und den Ausbruch bzw. den Verlauf einer Erkrankung beeinflussen können. In den letzten Jahren sind AAK gegen den mAChR3 bei Patienten mit Sjögren Syndrom und

PBC vermehrt in den Fokus geraten. Dabei konnte gezeigt werden, dass anti-mAChR3 Antikörper aus dem Patientenserum den mAChR3 auf CHO-Zellen bevorzugt binden und dies in einer Steigerung der Rezeptoraktivität resultiert. Bis zum heutigen Stand der Forschung ist nicht geklärt, ob diese anti-mAChR3 Antikörper den Rezeptor auf anderen Gewebearten, wie etwa Leberzellen, in seiner Funktionalität beeinflussen, und inwiefern die AAK dabei gewebespezifisch interagieren können. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Stimulierung des mAChR3s in einer anti-apoptischen Signalkaskade resultiert. Man kann daher postulieren, dass AAK, die fähig sind, den mAChR3 in seiner Funktionalität zu inhibieren, zu einem systematischen Verlust der Zellen führen und dies den Krankheitsverlauf stark beeinflusst. Studien diesbezüglich liegen aber bisher nicht vor.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Expression der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren mAChR1 bis mAChR5 auf Cholangiozyten und Hepatozyten mittels On-Cell Western, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie überprüft. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, nachzuweisen, ob in Seren von Patienten mit PBC, PSC und AIH Autoantikörper gegen den mAChR3 vorkommen. Gesunde Blutspender dienen als Kontrollgruppe. Desweiteren wird mit einem Lumineszenz-basierenden Assay analysiert, ob anti-mAChR3 Antikörper die Funktion des mAChR3s auf Cholangiozyten beeinflussen können. Mittels eines im Labor etablierten Adsorptionstestes soll zusätzlich die Spezifität der AAK gegen mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten geprüft werden. Ferner wird die Auswirkung der Autoantikörper auf Zellproliferation, Apoptose und Zytokinfreisetzung von Cholangiozyten untersucht.

Derzeit liegen Forschungsberichte vor, die verschiedene Epitopbindungsstellen der AAK innerhalb der extra- sowie der intrazellulären Domänen des mAChR3 beschreiben. Im zweiten Teil der Arbeit wird auf Basis dieser Forschungsarbeiten zum ersten Mal die Reaktion von möglichen IgG- oder IgM-AAK in Seren von Patienten mit PBC, PSC, AIH, Virushepatitis und SS gegen ein rekombinant hergestelltes full length mAChR3 Antigen und 35 synthetisierte mAChR3 Peptide mittels ELISA analysiert.

Um weitere Erkenntnisse zur zellulären und humoralen Immunantwort gegenüber dem mAChR3 bei PBC-, PSC- und AIH-Patienten zu erlangen, ist eine weitere Fragestellung in dieser Arbeit, ob die Inkubation mit dem rekombinant hergestellten full length mAChR3 Antigen immunkompetente Zellen dieser Patienten beeinflusst. Dies soll mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen, der Bestimmung der Antigen-spezifischen Zellproliferation sowie der Analyse der Zytokinsekretion beantwortet werden.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit könnten als zukünftiges Hilfsmittel bei der Diagnose seltener autoimmuner Lebererkrankungen genutzt werden. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse über die agonistische Wirkung der AAK auf den mAChR3 auf Cholangiozyten in weiterführenden Arbeiten als Grundlage für neue Therapien der PBC, PSC und AIH sein.

2 Material

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Chemikalien, Geräte sowie Verbrauchsmaterialien aufgeführt. Zudem erfolgt eine Auflistung über die verwendeten Kits, Zelllinien, Plasmide, Nährmedien, Antikörper, Enzyme, mAChR3 Peptide, Pufferlösungen, Patientenseren und die angewendete Software.

2.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Arzneimittel, Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 2.1-1 aufgelistet.

Tabelle 2.1-1: Aufführung der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
3-Amino-9-ethylcarbazol 20 mg Tablette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Acridinorange	AppliChem, Darmstadt, D
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40, 19:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Amido Black Staining Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ammoniumbicarbonat	AppliChem, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D

Chemikalien	Hersteller
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Avidin–Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol, 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Biocoll Separating Solution Dichte 1,077 g/ml, isotonisch	Biochrom GmbH, Berlin, D
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, D
Calciumchlorid-2-hydrat (CaCl ₂ 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Carbamoylcholine Chloride 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS	Gibco life technologies Europe, Bleiswijk, NL
Citronensäure- Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Coelenterazine h	Biotum, Hayward, CA, USA
<i>cComplete, Mini, EDTA-free</i> Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, D
D(+) - Glucose (Monohydrat) H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Dimethylformamide	Serva, Heidelberg, D
Dimethylsulfoxid	AppliChem, Darmstadt, D
Dithiothreitol	Serva, Heidelberg, D
Essigsäure 100 %, wasserfrei	Merck, Darmstadt, D

Chemikalien	Hersteller
Ethanol Absolut	Merck, Darmstadt, D
5-Fluorouracil 50 mg/ml Injektionslösung	Medac GmbH, Wedel, D
Fetales Kälberserum Gold (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Berlin, D
Formaldehyde min. 35 % reinst	Merck, Darmstadt, D
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim, D
HBSS; alternativ HANKS 1x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine- N'-(2-ethanesulfonic acid)))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Gel Loading Dye, Purple (6X)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
Glycerin 99,5 % p.A.	Merck, Darmstadt, D
Glycin p.A., 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Lectin from <i>Phytolacca americana</i> (pokeweed)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ 7 H ₂ O)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol reinst	Merck, Darmstadt, D

Chemikalien	Hersteller
MicroScint PS	PerkinElmer Inc.; MA, USA
Natriumhydroxid 98 % (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Na ₂ HPO ₄ H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
o-Phenylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, D
Penicillin/Streptomycin 100 x 10,000 U/ml Pen; 10,000 µg/ml Strep	Gibco, Gaithersburg, MD, USA
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Pilocarpinhydrochlorid 2 % Augentropfen	Bausch & Lomb, Berlin, D
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Refobacin 80 mg	Merck Serono GmbH, Darmstadt, D
Roti-Quant universal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, D
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	FLUKA BioChemika, Buchs, CH
Schwefelsäure 25 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
TAE - Puffer (50 X)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Chemikalien	Hersteller
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Thymidine [methyl-H3] 185 MBq (5 mCi)	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Triton X 100 (Octoxinol 9)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
TRIZMA Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) 99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypsin mit EDTA 0,25 %	Gibco Vertrieb: Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypsin mit EDTA 0,05 %	Gibco Vertrieb: Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Tween 20TM	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, D
Urea	Merck KGaA, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.2-1 dargestellt.

Tabelle 2.2-1: Aufführung der verwendeten Laborgeräte.

Geräte	Hersteller
Branson Sonifier B-12	Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, D
Cytoperm 2 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
DNA Pocket block Elektrophoresekammer	Biozym Diagnostics, Oldendorf, D
Dounce Homogenisator	B. Braun, Melsungen, D
Electrophoresis Power Supply ST 606	Gibco BRL, Detroit, MI, USA
Electro-Eluter Model 422	Bio-Rad Laboratories, München, D
Eppendorf Reference (variabel), 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1.000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, D
FastGene Mini Centrifuge	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D
GeneAmp PCR System 9700	Thermo Scientific, München, D Applied Biosystems, Langenselbold, D
HERAsafe HS 12 Sicherheitswerkbank	Heraeus-Christ, Hanau, D
Kern ALT 220-5DAM Analysewaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D

Geräte	Hersteller
Kühl-/Eisschrank 4 °C/ -20 °C/ -80 °C	Wissenschaftlich-technische Werkstätte, Universitätsklinikum Tübingen, D
LKB Wallac Heat Sealer 1295-012 Bag Sealer	PerkinElmer, Rodgau, D
Lyophilisator Hetosicc FD 2.5	Heto Lab Equipment, Allerød, DNK
Magnetrührer IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel, IKA - Labortechnik, Staufen, D
MicroBeta2 LumiJET	PerkinElmer, Rodgau, D
Mikroskop 3,2 x vis photo	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München, D
Mini-Protean 3	Bio-Rad Laboratories, München, D
Mini-Protean Multi-Casting Chamber	Bio-Rad Laboratories, München, D
Nalgene Cryo 1°C Freezing Containers	Thermo Scientific, München, D
NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific, München, D PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Neubauer Zählkammer (0,1 mm Tiefe)	Sigma, Deisenhofen, D
Odyssey Reader (model number 9120)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA
Olympus BX60F5 Immunfluoreszenz Mikroskop	Olympus Optical Co., Hamburg, D
pH Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Universitätsklinikum Tübingen, D

Geräte	Hersteller
Sonifier 250 B-12	Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
UVsolo TS, (UV Transilluminator)	Biometra GmbH, Göttingen, D
T70 UV/Visible Spectrophotometer	PG Instruments Ltd, Leicestershire, UK
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG , Schwabach, D
Research plus (8-Mehrkanal), 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Sorvall LYNX 4000 Superspeed Zentrifuge	Thermo Scientific, Osterode Harz, D
Tecan Spectra Rainbow Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Transferpette -12	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, D
Ultraschallbad	Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäb.-Gmünd, D
Vortex Mixer Classic	VELP Scientifica, Usmate, I
Waage LC 820	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad 3042	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, D
Zellernter Skarton Combi Cell Harvester	Nunc GmbH, Wiesbaden, D

2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller sind in Tabelle 2.3-1 aufgezeigt.

Tabelle 2.3-1: Aufführung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amicon Ultra-15, PLBC Ultracel-PL Membran, 3 kDa	Merck Millipore Ltd, Carrigtwohill, County Cork, IRL
BD Falcon Konische Röhrchen 15/50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Costar 5 ml, 10 ml, 25 ml 50 ml Stabpipette	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Cryo.sTM Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
CELLSTAR Gewebekulturflaschen	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
F 96 well plate, cell culture, clear, with lid, sterile	Thermo Scientific Nunc, Roskilde, DK
Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden(Kaminform), µClear, TC, weiß, steril	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden(Kaminform), µClear, TC, weiß/schwarz, steril	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
MultiScreen Harvest APFB, opak, 100-µl-Well	Merck Millipore Ltd, Tullagreen, County Cork, IRL
Ni-NTA Spin Column Purification of 6xHis-Tagged Proteins	Qiagen, Hilden, D

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Nitrozellulosemembran, Amersham 0,45 µm	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg im Breisgau, D
Nunc-Immuno 96 MicroWell solid plates	Thermo Scientific Nunc, Roskilde, DK
Nunc Zellkultur-Multischalen 24 round wells, Nunclon Delta	Thermo Scientific Nunc, Roskilde, DK
Polypropylene Columns (5ml)	Qiagen, Hilden, D
Premium Tips (steril) 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Standard Reaktionsgefäß 3810X, 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Suspensionskultur Microplatte, 96 Well, PS, U-Boden, Transp., Abdeckplatte, Steril	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Ultratip 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkultur Microplatte, 96 well, PS, F- Foden (Kaminform), weiß, Cellstar TC, steril	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
96 Well MegaBlock 1,2 ml, PP,	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

2.4 Kits

Nachfolgend sind die verwendeten Kit-Systeme in Tabelle 2.4-1 aufgelistet.

Tabelle 2.4-1: Aufführung der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Cells Cell Proliferation Kit XTT	AppliChem, Darmstadt, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SV Total RNA Isolation System	Promega, Madison, WI, USA
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, D
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse des funktionellen mAChR3 Lumineszenz Assays, Zytokin-ELISA, Adsorption Assay, In-Cell und On-Cell Westerns sowie der ^3H -Thymidin Proliferationstest wurden mit den in Tabelle 2.5-1 aufgeführten Zelllinien erarbeitet. Die Kultivierung wurde entsprechend der Vorgaben des Leibniz-Institutes Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) durchgeführt.

Tabelle 2.5-1: Aufführung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Zellen	Ursprung	Referenz
CHO-K1	Spezies: <i>Cricetulus griseus</i> Zelltyp: Ovarialkarzinom	DSMZ, Braunschweig, D, Nr.: ACC CCL-61 (Puck TT, et al. 1958)

Zellen	Ursprung	Referenz
HEP-G2	Spezies: Homo sapiens Zelltyp: Leberzellkarzinom	DSMZ, Braunschweig, D, Nr.: ACC 180 (Aden, D. P. et al, 1979)
HUH-7	Spezies: Homo sapiens Zelltyp: Leberzellkarzinom	CLS. Darmstadt, D, Art.Nr.: 300156 (Nakabayashi et al. 1982)
MMNK-1	Spezies: Homo sapiens Zelltyp: Gallengangsepithel	Kind gift from Dr. Naoya Kobayashi 2004
TFK-1	Spezies: Homo sapiens Zelltyp: Gallengangskarzinom	DSMZ, Braunschweig, D, Nr.: ACC 344 (Saijyo et al., 1995)

2.6 Prokaryotische Zellen

Für die Klonierung, Proteinexpression und Gewinnung der Plasmid DNA wurden die in Tabelle 2.6-1 aufgeführten chemisch kompetenten Escherichia Coli Bakterien verwendet.

Tabelle 2.6-1: Chemisch kompetente prokaryotische Zellen, welche bei den Klonierungsarbeiten, der Proteinexpression und zur Gewinnung der pG5A Plasmid DNA verwendet wurden.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot TOP10 Chemically Competent	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 n</i> <i>upG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.7 Enzyme

Die für die Klonierungsarbeiten verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2.7-1 aufgelistet.

Tabelle 2.7-1: Restriktionsenzyme und Ligase für die Klonierungsarbeiten.

Enzym	Erkennungssequenz	Referenz
BamHI	5'...GGATCC...3'	New England Biolabs, Frankfurt/Main, D
EcoRI	5'...GAATTC...3'	New England Biolabs, Frankfurt/Main, D
T4 DNA Ligase		New England Biolabs, Frankfurt/Main, D

2.8 Plasmid DNA

Für den funktionellen mAChR3 Lumineszenz Assay wurde die pG5A GFP/Aequorin Plasmid DNA in TFK-1 transfiziert. Kloniert wurde das pG5A Plasmid vom Labor Institut Pasteur, Paris, Frankreich. Das pG5A Plasmid codiert eine Kanamycin-/Neomycin Resistenz und wurde freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim, Abteilung II: Pharmakologie, Prof. Dr. Offermanns, zur Verfügung gestellt. Die dazugehörige pG5A Plasmidkarte befindet sich im Anhang 7.1.

Die mAChR3 Gensequenz wurde von Eurofins Genomics nach der NCBI Reference Sequence: NM_000740.2 mit den beiden Restriktionsenzymsequenzen am 5'-BamHI und am 3'-Sacl synthetisiert und in das pEX-K4 Plasmid subkloniert. Für die Proteinexpression des rekombinanten full length mAChR3 Antigens wurde die mAChR3 Sequenz aus dem pEX-K4-M3R Plasmid mit BAMHI und EcoRI geschnitten und in das pTrcHis-TOPO Plasmid von Invitrogen mit den identischen Restriktionsschnittstellen kloniert/ligiert. Das neue Plasmid wurde pTrcHis-M3R Plasmid genannt. Alle Plasmide sind in Tabelle 2.8-1 dargestellt. Plasmidkarten (soweit vorhanden) befinden sich im Anhang (siehe Kapitel 7.1 bis 7.4).

Tabelle 2.8-1: Plasmide die in dieser Arbeit verwendet wurden mit ihren jeweiligen Eigenschaften und Angabe ihrer Referenz.

Bezeichnung	Insert	Vektor / Eigenschaft	Referenz
pM3R	mAChR3	pcDNA 3.1+ Ampicillinresistenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
pG5A	GFP und Aequorin	Kanamycin-/ Neomycinresistenz	Labor Institut Pasteur, Paris, Frankreich zur Verfügung gestellt von Max-Planck- Institut für Herz- und Lungen- forschung Bad Nauheim
pEX-K3-M3R	mAChR3	Kanamycinresistenz	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
pTrcHis-TOPO	open frame	Ampicillinresistenz, N-terminales Polyhistidin (6xHis) Tag	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.8.1 Hergestellte Plasmide

In der nachfolgenden Tabelle 2.8-2: sind die während dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte aufgeführt. Plasmidkarten (soweit vorhanden) befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.8-2: Plasmidkonstruktionen die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden. Aufgeführt sind die klonierten Inserts und die Vektoreigenschaften.

Bezeichnung	Insert	Vektor / Eigenschaft	Referenz
pTrcHis -M3R	5'...GGATCCC - mAChR3 - GAATTC...3'	Expressionsplasmid für M3R, Ampicillinresistenz, N-terminal Polyhistidin (6xHis) Tag	Ozvatc 2016

2.9 Nährmedien

Die Medien, welche für die pro- und eukaryotischen Zellen verwendet wurden sind in Tabelle 2.9-1 bis Tabelle 2.9-3 aufgezeigt.

Tabelle 2.9-1: Nährmedium der prokaryotischen Zellen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Zusätze
Luria-Bertani Broth (LB)-Agar	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Pepton 10 g/l Natriumchlorid 12 g/l Agar in Reinstwasser; pH 7,0	Kanamycin (50 µg/ml) Ampicillin (100 µg/ml)
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl in Reinstwasser; pH 7,0	Kanamycin (50 µg/ml) Ampicillin (100 µg/ml)

Tabelle 2.9-2: Nährmedium der eukaryotischen Zellen.

Zelllinie	Medium	Zusätze
TFK-1	Zellkultivierung 500 ml RPMI 1640 Roswell Park Memorial Institute	10 % (v/v) FCS 160 µg/ml Gentamycin
HEP-G2		
HUH-7		
TFK-1, HEP-G2, HUH-7	Einfriermedium 70 % RPMI 1640	20 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
MMNK-1	Zellkultivierung 500 ml DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium	10 % (v/v) FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 100 x
CHO-K1	Zellkultivierung 500 ml Ham's F-12 Medium	10 % (v/v) FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 100 x

Tabelle 2.9-3: Nährmedium der eukaryotischen Zellen.

Zelllinie	Medium	Zusätze
PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)	Kulturmedium 500 ml RPMI 1640	10 % (v/v) autologes Spender Serum 1 % Penicillin/Streptomycin 100 x
	Auftaumedium 500 ml RPMI 1640	2,5 % (v/v) autologes Spender Serum 1 % Penicillin/Streptomycin 100 x 3 µg/ml Dnase
	Einfriermedium 500 ml RPMI 1640	90 % (v/v) autologes Spender Serum 10 % (w/v) DMSO

2.10 Antikörper

Die Antikörper, die In-Cell- und On-Cell-Western-Analyse, in durchflusszytometrischen Untersuchungen und im ELISA eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.10-1 bis Tabelle 2.10-5 aufgeführt.

Tabelle 2.10-1: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Primärantikörper				
Zielprotein	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor 2 [31-1D1]	Maus	OCW 1:2.000	Abcam	ab2805
Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M3	Kaninchen	FACS 1:500		ab154835
BAX (BAX/962)	Maus	ICW 1:200	NSJ Bioreagents	V2827
		OCW 1:200		
cleaved caspase-9 p10 (h331)	Ziege	ICW 1:50	Santa Cruz	sc-22182
		OCW 1:50		sc-22182
mAChR M1 (N-19)		OCW 1:250		sc-7471
mAChR M3 (H-20)		ICW/OCW 1:250		sc-31486
mAChR M3 (H-20)		OCW 1:250		sc-31486

Primärantikörper				
Zielprotein	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
mAChR M4 (N-19)	Ziege	OCW 1:250	Santa Cruz	sc-7477
mAChR M5 (N-19)		OCW 1:250		sc-7479
Purified Mouse Anti-Bcl-2 Clone 7/Bcl-2	Maus	ICW 1:5.000	BD Bioscience	610538
		OCW 1:5.000		
β-Actin	Kaninchen	ICW 1:250 - 500	Santa Cruz	sc-130656
		OCW 1:250		
		WB 1:500		

Abkürzungen: ICW: In-Cell Western; OCW: On-Cell Western; WB: Western Blot; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay; IF: Immunfluoreszenz; FACS: Messungen mit den *BD FACSCalibur* Durchflusszytometer

Tabelle 2.10-2: Liste der Capture Antikörper mit denen die 96-well Platten für den Zytokin ELISA beschichtet wurden.

Capture Antikörper Zytokin ELISA			
Antikörperspezifität	Konzentration	Hersteller	Artikelnr.
purified mouse Anti-Human IL-1α	0,5 mg/ml	BioLegend	500104
purified rat Anti-human IL-5	0,5 mg/ml	BD Biosciences	554393

Capture Antikörper Zytokin ELISA			
Antikörperspezifität	Konzentration	Hersteller	Artikelnr.
purified rat Anti-human IL-6	0,5 mg/ml	BD	554543
purified rat Anti-human IL-10	0,5 mg/ml	Biosciences	554497
purified rat Anti-human IL-13	0,5 mg/ml		554570
purified mouse Anti-human IFN- γ	0,5 mg/ml		551221
purified rat Anti-human GM-CSF	0,5 mg/ml		554502
purified mouse Anti-human TNF- α	0,5 mg/ml		551220
purified mouse Anti-human TNF- β	0,5 mg/ml		551222

Abkürzungen: IL: Interleukin; IFN: Interferon; TNF: Tumornekrosefaktor; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

Tabelle 2.10-3: Liste der Standards, die im Zytokin ELISA benutzt wurden.

Standards der Zytokin ELISA				
Zielprotein	Konzentration		Hersteller	Artikelnr.
IL-1 α	16.000	250	BD	551838
Recombinant Human IL-5	15.000	234	Biosciences	554606
Recombinant Human IL-6	8.000	125		550071
Recombinant Human IL-10	5.000	78		554611
Recombinant Human IL-13	10.000	156		R&D Systems
Recombinant Human IFN- γ	40.000	625	BD	554616
Recombinant Human GM-CSF	10.000	156	Biosciences	550068
Recombinant Human (LT-a) TNF- α	10.000	156		554619

Standards der Zytokin ELISA				
Zielprotein	Konzentration		Hersteller	Artikelnr.
Recombinant Human TNF- β	2.500	39	BD Biosciences	554618

Abkürzungen: IL: Interleukin; IFN: Interferon; TNF: Tumornekrosefaktor; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

Tabelle 2.10-4: Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.

Detektions-Antikörper				
Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
CD4 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP	PerCP PE FITC	FACS 1:8	BD Bioscience	340365
CD8 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP				340367
CD19 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP				340418
CD56 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP				340417
Donkey anti-Goat IgG (H + L)	IRDye 800 CW	ICW + OCW 1:800	LI-COR Biosciences	926-32214
Donkey anti-Mouse IgG (H + L)				926-32212
Donkey anti-Rabbit IgG (H + L)				926-68073
donkey anti-rabbit IgG- PerCP-Cy5.5	PerCP	FACS 1:200	Santa Cruz	sc-45106

Detektions-Antikörper				
Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
FITC Mouse Anti-Human IgM Clone G20-127	FITC	FACS 12:100	BD Bioscience	555782
goat anti-rabbit IgG-PerCP-Cy5.5	PerCP	FACS 1:200	Santa Cruz	sc-45101
PE Mouse Anti-Human IgG Clone G18-145	PE	FACS 12:100	BD Bioscience	555787
Tritest γ1(FITC)/γ1(PE)/CD45(PerCP)	PerCP PE FITC	FACS 20:100	BD Bioscience	342415
Ziege IgG anti-Human IgG (Fc)-HRPO, MinX Bo, Ho, Ms	HRP	ELISA 1:3.000	Jackson Immuno Research	109-035-098
Ziege IgG anti-Human IgM (μ)-HRPO, MinX keine		ELISA 1:2.000		109-035-043

Abkürzungen: FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: Phycoerythrin; PerCP: peridinin-chlorophyll-protein complex; HRP: Horseradish Peroxidase, IRDye: infrared dyes.

Tabelle 2.10-5: Liste der Detektionsantikörper, die beim Zytokin ELISA gebraucht wurden.

Detektionsantikörper Zytokin ELISA			
Antikörperspezifität	Konzentration	Hersteller	Artikelnr.
Biotin anti-human IL-1α clone BH0110	0,5mg/ml	BioLegend	515703
Biotin Rat Anti-human IL-5	0,5mg/ml	BD Bioscience	554491

Detektionsantikörper Zytokin ELISA			
Antikörperspezifität	Konzentration	Hersteller	Artikelnr.
Biotin Rat Anti-human IL-6	0,5mg/ml	BD Bioscience	554546
Biotin Anti-human IL-10	0,5mg/ml		554499
Biotin Mouse Anti-human IL-13	0,5mg/ml		555054
Biotin Mouse Anti-human IFN- γ	0,5mg/ml		554550
Biotin Rat Anti-human GM-CSF	0,5mg/ml		554505
Biotin Mouse Anti-human TNF- α	0,5mg/ml		554511
Biotin Mouse Anti-human TNF- β	0,5mg/ml		554555

Abkürzungen: IL: Interleukin; IFN: Interferon; TNF: Tumornekrosefaktor; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor.

2.11 mAChR3 Peptide

Die Synthetisierung der einzelnen mAChR3 Peptide (siehe Tabelle 2.11-1) wurde von der Firma BioTrend (Köln, D) durchgeführt. Die einzelnen Peptide wurden in 1.000 μ l DMSO gelöst, so dass eine Endkonzentration von ca. 50 μ g/ml vorlag.

Tabelle 2.11-1: Lokalisation, Länge, Überlappung und Aminosäuresequenz der mAChR3 Peptide.

Domäne	Position	Überlappung der Sequenz	Aminosäuresequenz
N-Terminus	1-25	8	MTLHNNSTTSPLFPNIISSSWIHSPS
	18-42	8	SSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNV
	35-59	8	THFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDP
	52-76	8	PDGTTDDPLGGHTVWQVVFIAFLTG
Trans-membran	70-94	7	FIAFLTGILALVTIIGNILVIVSFK

Domäne	Position	Überlappung der Sequenz	Aminosäuresequenz
Cyto-Loop_1	88-112	7	LVIVSFKVNKQLKTVNNYFLLSLAC
Trans- membran	106-130	7	FLLSLACADLIIGVISMNLFTTYII
Extra- Loop_1	124-148	7	LFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAI
Trans- membran	142-166	7	DLWLAIIDYVNASVMNLLVISFDR
Cyto-Loop_2	160-184	7	LVISFDRIYFSITRPLTYRAKRTTKR
Tran- smembran	177-201	8	RAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVLWA
	194-218	8	VISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPP
Extra- Loop_2	205-229	13	LFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEP
Trans- membran	222-246	8	FIQFLSEPTITFGTAIAAFYMPVTI
	240-264	7	FYMPVTIMTILYWRIYKETEKRKE
Cyto-Loop_3	253-277	0	RIYKETEKRTELKELAGLQASGTEAET
	270-294	8	ASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSYE
	287-311	8	SRSCSSYELQQQSMKRSNRRKYGRC
	304-328	8	NRRKYGRCHFWFTTKSWKPSSEQM D
	321-345	8	KPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAA S
	338-362	8	NNNDAAASLENSASSDEEDIGSETR
	355-379	8	EDIGSETRAIYSIVLKLPGHSTILN
	372-396	8	PGHSTILNSTKLPSSDNLQVPEEEL

Domäne	Position	Überlappung der Sequenz	Aminosäuresequenz
	389-413	8	LQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKS
	406-430	8	DKLQAQKSVDDGGSPKSFSLPIQ
	423-447	8	SFSKLPIQLESAVDTAKTSDVNSSV
	440-464	8	TSDVNSSVGKSTATLPLSFKEATLA
Cyto-Loop_3	457-481	8	SFKEATLAKRFALKTRSQITKRKRM
	474-498	8	QITKRKRMSLVKEKAAQTLSAILL
Trans-membran	491-515	8	QTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNT
Extra-Loop_3	508-532	8	NIMVLVNTFCDSICIPKTFWNLYWL
Trans-membran	525-549	8	FWNLGYWLCYINSTVNPVCYALCNK
C-Terminus	542-566	8	VCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKK
	559-583	8	LLCQCDKKKRRKQQYQQRQSVIFHK
	576-590	8	RQSVIFHKRAPEQAL

2.12 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer sowie Lösungen und Gelsubstanzen werden in Tabelle 2.12-1 aufgezeigt.

Tabelle 2.12-1: Puffer, Lösungen und Gelbestandteile, die zur Anfertigung der Arbeit benötigt wurden.

Agarose-Gelelektrophorese	
TAE Puffer (50 x)	1 % (v/v) Agarose

Coomassie Färbung	
Coomassielösung	650 ml dH ₂ O
	250 ml Methanol
	100 ml Essigsäure
	1 g Coomassie Brilliant Blue
Coomassie Färbung	
Entfärbelösung	650 ml dH ₂ O
	250 ml Ethanol
	100 ml Essigsäure
Elektroelutionspuffer	
Ammoniumbicarbonat	50 mM
SDS	0,1 % (v/v)
ELISA	
PBS-Puffer (60 mM) pH 7,5 (5 L)	43,83 g NaCl
	44,49 g Na ₂ HPO ₄
	6,81 g KH ₂ PO ₄
Bicarbonat-Puffer (0,2 M) pH 9,6 (5 L)	33,9 g Na ₂ CO ₃
	57,12 g NaHCO ₃
Waschpuffer I	PBS-Puffer
	0,5 % (v/v) BSA
Waschpuffer II und Serumverdünnungspuffer	PBS-Puffer
	0,25 % (v/v) BSA
	0,2 % (v/v) Triton X-100

ELISA	
Citratpuffer (0,1 M) pH 5,0 (4 L)	82,36 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	25,2 g Citronensäure-Monohydrat
Substrat-Lösung	100 ml Citratpuffer
	50 mg <i>o</i> -Phenylenediamine dihydrochloride
	33 µl H ₂ O ₂
Stopp-Lösung	25 % (v/v) Schwefelsäure
Funktioneller M3R Assay	
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	120 mM Natriumchlorid
	5,4 mM Kaliumchlorid
	0,8 mM Magnesiumsulfat
	10 mM Glucose
	10 mM Hepes
HBSS + Ca ²⁺	Siehe HBSS + 2 mM CaCl ₂
In-Cell und On-Cell Western Analyse	
Fixierlösung	PBS
	3 % (v/v) Formaldehyde
Blockierlösung	PBS
	3 % (v/v) BSA
	1 % (v/v) Tween-20
Triton Waschpuffer	PBS
	1 % (v/v) Triton
Tween Waschpuffer	PBS
	1 % (v/v) Tween 20

In-Cell und On-Cell Western Analyse	
TBS-T (10 x) pH 7,5	200 mM Tris
	1,5 M NaCl
	1 % (v/v) Tween -20
Ni-NTA Protein Aufreinigung	
Lysispuffer (Puffer B) pH 8.0	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl
Waschpuffer (Puffer C) pH 6.3	8 M Urea
Elutionspuffer (Puffer E) pH 4.5	
SDS-Page (für 8 Gele)	
Trenngel 10 % Polyacrylamid	51,6 ml Aqua dest.
	21,2 ml Acrylamid-Bisacrylamid 40
	10,3 ml 3M Tris-HCl (pH 8,9)
	825 µl SDS 10 %
	413 µl Ammoniumpersulfat 10 %
	43 µl Temed (Tetramethylethyldiamin)
Sammelgel 3,7 % Polyacrylamid	30 ml Aqua dest.
	3,6 ml Acrylamid-Bisacrylamid 40
	4,8 ml 3M Tris-HCl (pH 8,9)
	400 µl SDS 10 %
	200 µl Ammoniumpersulfat 10 %
	40 µl Temed (Tetramethylethyldiamin)

SDS-Page (für 8 Gele)	
Elektrodenpuffer pH 8,3	0,1 % (v/v) SDS
	25 mM Tris
	192 mM Glycin
SDS-Probenpuffer (5X) pH 6,8	0,225 M Tris-Cl
	5 % (v/v) SDS
	5 % (v/v) Beta-Mercaptoethanol
	50 % (v/v) Glycerol
	0,05 % (v/v) Bromphenolblau
Western Blot Analyse	
Transferpuffer pH 8,3	1,3 mM SDS
	48 mM Tris
	39 mM Glycin
	40 % (v/v) Methanol
PBS pH 7,4	10 mM KH_2PO_4
	150 mM NaCl
	63 mM Na_2HPO_4
Western Blot Analyse	
Blockierlösung	PBS
	3 % (v/v) BSA
TBS-T (10 x)	200 mM Tris (Tris-aminomethan)
	1,5 M NaCl
	1 % (v/v) Tween-20

Western Blot Analyse	
Färbelösung	1 Tbl. 3-Amino-9-ethylcarbazol
	2,5 ml Dimethylformamid
	47,5 ml dH ₂ O
	25 µl H ₂ O ₂

2.13 Patientenserien

In diese Arbeit wurden insgesamt 499 Probanden aufgenommen (Patienten mit primärer biliärer Cholangitis [PBC] n=142, mit primärer sklerosierender Cholangitis [PSC] n=50, mit autoimmunen Hepatitis [AIH] n=44, mit Virushepatitis [VH] n=50, mit alkohol-induzierter Lebererkrankung n=25, mit Sjögren Syndrom [SS] n=60 und gesunde Probanden n=129). Die klinischen Daten der Patienten, deren Seren bzw. PBMC in den einzelnen Assays eingesetzt wurden, sind in den Tabelle 2.13-1 bis Tabelle 2.13-3 aufgeführt. Seren, PBMC und klinische Daten dieser Patienten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. C. Berg, Medizinische Klinik Tübingen, Abt. I, zur Verfügung gestellt. Die Diagnosen waren entsprechend internationaler Kriterien klinisch, laborchemisch, histologisch und serologisch gesichert. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, das Einverständnis der lokalen Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor (Projektnr. 681/2011BO2, 076/201BO1). Seren dieser Patienten wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.13-1: Klinische Parameter von Patienten, aus deren Seren Immunglobuline isoliert wurden.

Immunglobuline		Alter (Jahre)		Geschlecht	
Diagnose	Anzahl	MW \pm SD	Bereich	Frauen (n)	Männer (n)
PBC	142	51 \pm 15,2	12 - 90	129	13
PSC	50	38,7 \pm 3,3	18 - 71	22	28
AIH	43	48,2 \pm 16,8	13 - 81	34	9
VH	50	40,3 \pm 12,5	16 - 63	21	29
SS	60	56 \pm 16,1	25 - 84	57	3
gesunde Probanden	129	28,5 \pm 9,8	17 - 69	56	72

Tabelle 2.13-2: Klinische Parameter von Patienten, deren Seren gegen rekombinantes mAChR3 und seine einzelnen Peptide mittels ELISA getestet wurden.

Serum		Alter (Jahre)		Geschlecht	
Diagnose	Anzahl	MW \pm SD	Bereich	Frauen (n)	Männer (n)
PBC	76	52,3 \pm 16,7	17 - 90	70	6
PSC	29	41,3 \pm 11,7	19 - 71	13	16
AIH	44	43,3 \pm 18,7	14 - 81	37	7
VH	31	41 \pm 11,8	16 - 60	10	21
ALD	25	52,5 \pm 11,7	28 - 70	7	18
SS	22	55 \pm 14,4	29 - 77	21	1
gesunde Probanden	15	26,9 \pm 28,3	18 - 48	9	6

Tabelle 2.13-3: Klinische Daten der Patienten, deren PBMC auf ihre Reaktivität gegenüber dem rekombinanten mAChR3 Antigen analysiert wurden.

PBMC		Alter (Jahre)		Geschlecht	
Diagnose	Anzahl	MW±SD	Bereich	Frauen (n)	Männer (n)
PBC	20	56,8 ± 11,3	40 - 78	20	0
PSC	20	45,5 ± 14,4	20 - 72	8	12
AIH	20	50,3 ± 14,6	20 - 76	16	4
gesunde Probanden	14	29,9 ± 11,1	20 - 56	9	3

2.14 Software

In Tabelle 2.14-1 ist die Software erfasst, welche zur Erstellung dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Tabelle 2.14-1: Eingesetzte Software.

Software	Hersteller
BD CellQuest Pro Software	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen, D
GraphPad Prism 6.02	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D
MicroBeta2 LumiJET	PerkinElmer's AequoScreen and PhotoScreen technology, Turku, FIN
Magellan Data Analysis Software	Tecan Software Competence Center GmbH, Mainz-Kastel, D
Odyssey Software 3.0.30	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA

3 Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewandten zell-, mikro-, molekular-, und proteinbiologischen Methoden, der Lumineszenz Assay zum Nachweis von funktionellen Antikörpern sowie immunologische Methoden zum Nachweis einer humoralen und zellulären Reaktivität gegenüber dem mAChR3 beschrieben.

3.1 Zellbiologische Methoden

Sofern nicht explizit erwähnt erfolgten die Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank. Die Zellen wurden entsprechend der Empfehlung des Vertreibers bei einer Temperatur von 37 °C mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert (siehe Kapitel 2.5). Die Zellen wurden vor jedem Gebrauch auf Kontaminationen geprüft.

3.1.1 Kultivierung der immortalisierten Zelllinien

Die Passagierung erfolgte entsprechend des Standardprotokolls des Immunpathologischen Labors. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgenommen, der Zellrasen mit 10 ml HANKS gewaschen und schließlich mit 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert, bis ein Ablösen der Zellen erreicht war. Der Verdau wurde daraufhin mittels der Zugabe des entsprechenden Mediums gestoppt, die Zellen wurden gesplittet wie vom Vertreiber empfohlen. Das Volumen wurde mit dem jeweiligen Medium auf 25 ml aufgefüllt.

3.1.2 PBMC Isolierung aus heparinisiertem Vollblut

Die PBMC wurden aus heparinisiertem Vollblut wie folgt isoliert. Ca. 20 bis 30 ml Vollblut wurden in ein 50 ml Falcontube gegeben und mit 5 ml HANKS verdünnt. In ein weiteres 50 ml Falcontube wurden 15 ml Ficoll gegeben, auf das das Vollblut vorsichtig geschichtet wurde. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 740g für 30 Minuten, um das Blut in vier Phasen zu separieren. Die oberste Schicht, das Plasma, wurde vorsichtig mit einer Stabpipette abgenommen. Das Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Als nächstes

wurde die Lymphozytenschicht, mit möglichst wenig Ficoll, ebenfalls mit einer Stabpipette unter kreisförmigen Bewegungen abgenommen und in ein frisches 50 ml Falcontube überführt. Die verbleibende letzte Schicht des Bluts wurde ohne weitere Verwendung entsorgt. Das gewonnene Lymphozyten-Ficoll-Gemisch wurde mit HANKs auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und bei 370 g für 10 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Zellpellet aufgewirbelt und mit 25 ml HANKs wie zuvor zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Medium pro 10 ml gewonnenem Vollblut vermengt und gezählt.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Das Einfrieren der verschiedenen Zelllinien erfolgte auf Eis. Die immortalisierten Zelllinien wurden auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und die PBMC auf $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml unter Verwendung des Einfriermediums (siehe Kapitel 2.9) eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden ca. 1,5 ml in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde daraufhin in den Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container gestellt, so dass das Einfrieren bei einer Rate von 1 °C pro Minute bis -80 °C gewährleistet war. Die weitere Lagerung der Zelllinien erfolgte bei -80 °C.

Beim Auftauen von Zellen wurde das Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C langsam angetaut, so dass ein Eiskristall vorhanden blieb. Immortalisierte Zelllinien wurden zügig in die Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Medium überführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums, das im Falle der Hepatozyten in der ersten Woche 20 % FCS enthielt.

Die PBMC wurden zügig in 5 ml Auftaumedium überführt und bei 1.300 g für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet aufgewirbelt. Darauf folgten die Zugabe von 5 ml Waschmedium und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Wieder wurde der Überstand dekantiert, die Zellen wurden aufgewirbelt, je nach Test auf die jeweilige Zellzahl eingestellt und vor Testbeginn für ca. 12 Stunden stehen gelassen.

3.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde die Neubauerzählkammer verwendet. Die immortalisierten Zellen wurden mit Trypanblau und die PBMC mit Acridinorange gefärbt. Anschließend wurden die lebenden Zellen aus vier großen Quadraten zusammengezählt. Die Zellkonzentration pro ml ergab sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellzahl, welcher mit dem Verdünnungsfaktor des Farbstoffes und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert wurde.

3.2 Mikrobiologische Methoden

Die Synthese der full length mAChR3 DNA-Sequenz, sowie die Klonierungsarbeiten der mAChR3 Sequenz in den Standardvektor pEX-K4 wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, D) durchgeführt.

3.2.1 Transformation der Plasmid DNA

Das pEX-K4_M3R Plasmid wurde in *Escherichia coli Top10F'* (Invitrogen) transformiert. Die Transformation der Bakterien wurde mit 500 ng/ μ l Plasmid DNA nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Danach wurde der Transformationsansatz auf eine Agarplatte mit entsprechender Antibiotikaresistenz (Kanamycin) ausgestrichen und für maximal 16 h bei 30 °C kultiviert. Zur dauerhaften Lagerung in *Escherichia coli Top10F'* wurde die Bakteriensuspension in einem Verhältnis 1:2, mit einer 50 % Glycerinlösung verdünnt und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Anzucht bakteriologischer Kulturen

Die Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mittels Impföse auf eine Agarplatte mit entsprechender Antibiotikaresistenz ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und in äquivalentem LB-Medium (Kapitel 2.9) überführt. Für einen präparativen Ansatz erfolgte unter Schütteln zuerst die Kultivierung in einer 5 ml Vorkultur für ungefähr 8 h bei 37 °C. Für 500 ml Hauptkultur wurden 50 μ l aus der Vorkultur entnommen und für maximal 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Dieser Methodenteil beschäftigt sich mit der Gewinnung, der Quantifizierung und der Auftrennung von DNA-Materialien sowie den Klonierungsarbeiten.

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde für den analytischen Ansatz das Qiagen Spin Miniprep Kit und für den präparativen Ansatz das Qiagen Plasmid Midi Kit (Kapitel 2.4) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.2 Nukleinsäure Quantifizierung

Die Bestimmung der DNA-, bzw. RNA-Konzentration und ihrer Reinheit erfolgte mittels des NanoDrop 2000 entsprechend der Herstellerempfehlungen.

3.3.3 Restriktion der Plasmid pEX-K4+ und pTrcHis-Topo Plasmid DNA

Die subklonierte mAChR3 Sequenz aus dem pEX-K4-M3R Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI aus dem Vektor isoliert. Mit denselben Enzymen wurde das pTrcHis-Topo Plasmid verdaut. Die Restriktionsenzyme von NEB wurden laut Herstellervorgabe in der Konzentration 10 units/ μg DNA verwendet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymreaktion durch Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten gestoppt.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der zuvor verdauten DNA Fragmente wurde ein 1 %-iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (1-fach) aufgekocht und in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Erkalten wurden den Proben ein 6-fach konzentrierter DNA-Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple (6X), NEB), entsprechend dem vom Hersteller vorgeschlagenen Verhältnis, hinzugefügt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenorientierung wurden die 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) und die 100 bp DNA Ladder verwendet. Die elektrische

Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 bis 8 V/cm. Zur Visualisierung und Dokumentation des Gels wurde der UVsolo TS (UV Transilluminator, Biometra) verwendet.

3.3.5 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nano Drop 2000 (siehe Kapitel 3.3.2).

3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wurde das zuvor gewonnene mAChR3-insert in das pTrcHis-Topo Plasmid (Vektor) eingebracht. Die Ligationsansätze entsprachen einem Gesamtvolumen von 20 µl und einer eingesetzten T4-DNA Ligase von 1 unit/50 ng Vektorplasmid, welches in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 und 1:7 mit dem Insert unter ATP Verbrauch verknüpft wurde. Es wurde grundsätzlich eine Negativkontrolle ohne Insert mitgeführt, in der nur der Vektor religiert wurde. Die Ligation erfolgte für 10 Minute bei RT. Anschließend wurden die Ligationsansätze in *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* Bakterien transformiert und ausplattiert (siehe Kapitel 3.2.1). Die Ergebnis der Klonierung wurde durch Sequenzierung (Firma Eurofins Genomics, Ebersberg) verifiziert.

3.3.7 Expression von rekombinanten Fusionsproteinen

Für die Expression des His-getaggten Fusionsproteins wurde der Expressionsvektor pTrcHis-Topo (Invitrogen) verwendet. Die Überexpression des mAChR3 Fusionsproteins erfolgte in dem E. coli-Stamm One Shot Top 10 (Kapitel 2.6). Dieser Stamm enthält ein Gen, welches unter Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Der Expressionsvektor verfügt über einen pTrc Promotor, d. h. einen Hybrid Promotor, der Sequenzen aus dem trpB enthält. Zugabe von IPTG startet die Transkription durch Aktivierung des lacUV5-Promotors. Das Plasmid

pTrcHis-M3R enthält zur Optimierung der Translation zusätzlich eine T7 gene translational enhancer- (g10) und Ribosomenbindungsstelle (RBS).

3.3.8 Pilotexpression von His6-Tag Fusionsprotein

Im Anschluss der Klonierungsarbeiten (siehe Kapitel 3.3.6) wurde eine Pilot-Proteinexpression nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu Beginn wurde die optimale Ausbeute des rekombinanten Proteins ermittelt. Hierfür wurden der zeitliche Verlauf der Expression und die geeignete IPTG-Konzentration ermittelt.

Für die Pilotexpression wurde, wie in Kapitel 3.2.2 erläutert, eine Vorkultur hergestellt. 500 µl der Vorkultur wurden in 10 ml antibiotikahaltiges LB Medium inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 (bei 600 nm) inkubiert. Die Hauptkultur wurde dann in zwei 5 ml Kulturen aufgeteilt. Eine diente als Negativkontrolle, die andere Kultur wurde mit IPTG auf eine IPTG-Endkonzentration von 0,5 bis 1 mM eingestellt und bei RT bis 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach 60 Minuten wurden jeweils 500 µl von den beiden Kulturen abgenommen. Dieser Schritt wiederholte sich für die nächsten 4 bis 6 Stunden. Die Aliquots von den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit, von 15.500 g, für 30 Sekunden zentrifugiert und die Überstände abgenommen.

Für den Zellaufschluss wurden alle Zellpellets in 600 µl Lysepuffer B (Tabelle 2.12-1: Puffer, Lösungen und Gelbestandteile, die zur Anfertigung der Arbeit benötigt wurden. Tabelle 2.12-1) aufgenommen und auf Eis für 5 Minuten sonifiziert. Durch 3 Zyklen Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurden die Zellen zusätzlich aufgeschlossen. Anschließend wurden lösliche und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 25 Minuten bei 13.000 g getrennt. Zu dem die löslichen Proteinen beinhaltenden Überstand wurde die gleiche Menge 2-fach konzentrierter SDS Puffer hinzugegeben. Das Zellpellet wurde in 100 µl 2-fach SDS Puffer aufgenommen. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-Page analysiert.

3.4 Proteinbiologische Methoden

Nachfolgend werden die Proteinisolierung, die Proteintrennung, die Visualisierung der Proteine und die Proteinexpression des mAChR3 Antigen erläutert.

3.4.1 Isolierung von Membranfraktionen aus TFK-1-Zellen

Das Zellpellet von mindestens $3 \cdot 10^6$ TFK-1-Zellen wurde durch einen Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 370 g gewonnen. Daraufhin erfolgten zwei Waschschriffe mit HANKs bei Zentrifugation mit 370 g für jeweils 10 Minuten. Für die weitere Isolierung wurde der Protease Inhibitor *cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* in HANKs nach Angaben des Herstellers aufgelöst. Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem HANKs-Proteaseinhibitor-Gemisch aufgenommen und in einem Potter auf Eis zerkleinert. Im Anschluss daran wurden die Zelltrümmer sechs Mal für je 15 Sek. beschallt. Es folgte ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 1.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und auf Eis aufgehoben. Das Zellpellet wurde erneut sechs Mal für jeweils 15 Minuten sonifiziert und wie zuvor abzentrifugiert. Wiederholt wurde der Überstand dekantiert und mit dem vorherigen vermengt, das Zellpellet wurde verworfen. Das Überstandgemisch wurde dann für 30 Minuten und 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert [171]. Das neue Zellpellet enthält sowohl die Plasma- als auch intrazellulären Membranen. Es wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben zuvor in verschiedenen Konzentrationen mit destilliertem Wasser als Doppelansatz verdünnt. Danach wurden 25 µl verdünnte Probe in 1,25 ml *Roti-Quant universal Lösung* gegeben, vermischt und nach 2 Minuten die Extinktion bei 595 nm mit dem Photometer ermittelt. Anhand einer zuvor ermittelten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration abgelesen.

3.4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die Denaturierung der Zellmembranen wurden diese mit 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer in einem Verhältnis 1:1 versetzt und für 4 Minute bei 95 °C aufgekocht. Die Reagenzien für die SDS-Gele wurden, wie in Tabelle 2.12-1 beschrieben, im Vorfeld pipettiert. Nach Polymerisierung der Gele wurden sie in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel 2.12) beschichtet. Außerdem wurden die Geltaschen vorsichtig ausgespült, um Polymerisations-Reste zu entfernen. Nachfolgend wurden 10 µg Protein pro Geltasche pipettiert. Als Größenstandard wurde der *unstained SDS Standard low range* (Biorad) verwendet. Die Elektrophorese wurde für 5 Minute bei 50 V gestartet, für weitere 10 Minuten auf 100 V und schließlich auf 200 V erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.4.4 Coomassie Färbung / Ponceau S Färbung

Zum Anfärben von Proteinen auf dem SDS-Gel wurde das Gel für ca. 18 h bei RT in Coomassie Blue auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde das Gel mit Entfärbelösung (siehe Kapitel 2.12) für ca. 2 h entfärbt. Hierbei wurde die Entfärbelösung im 20 bis 30 Minutentakt so lange gewechselt, bis der Hintergrund auf dem Gel wieder fast transparent war und nur noch die aufgetrennten Proteinbanden blau angefärbt waren.

Für die rasche Kontrolle des Proteintransfers auf die Nitrocellulose Membran wurde die Membran mit *Ponceau S* Lösung (Sigma Aldrich) für ca. 2 bis 3 Minuten bei RT inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.4.5 Western Blot

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine des Gels auf eine Nitrocellulose (NC) Membran (GE Healthcare Life Sciences) wurde mit einer Wet Blot Kammer (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Die dazugehörigen Utensilien wurden zuvor in Transferpuffer (siehe Kapitel 2.12) eingeweicht. Der Aufbau der Blotkassette war

wie folgt: zuerst ein Schwamm, nachfolgend 3 Lagen Filterpapier, darauf das SDS-Gel und die NC Membran, wieder 3 Lagen Filterpapier und abschließend ein weiterer Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in die Blot-Kammer gesteckt. Des Weiteren wurden ein Kühleinsatz und ein Rührfisch in die Transferkammer gegeben. Die Durchführung des Blotvorgangs erfolgte auf dem Magnetrührer bei 100 V für 60 Minuten. Zum Abblocken von freien Bindungsstellen wurde die Membran daraufhin für eine Stunde in Blockierlösung (siehe Kapitel 2.12) bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper in Blockierlösung verdünnt (für die AK Verdünnung siehe Kapitel 2.10). Zur Quantifizierung der Proteinladung wurde zusätzlich ein anti- β -Aktin Antikörper in der Verdünnung 1:500 hinzugegeben. Die primären Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Darauffolgend wurde die NC Membran dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T (siehe Kapitel 2.12) gewaschen. Die beiden IRDye sekundären Antikörper wurden ebenfalls in Blockierlösung 1:800 verdünnt und 60 Minuten bei RT auf dem Schüttler in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde die Membran abermals für jeweils dreimal 10 Minute mit TBS-T gewaschen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit dem *Odyssey Imager* von Licor Odyssey.

3.4.6 Reinigung von überexprimierten poly-Histidin-markierten Fusionsproteinen durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Das *E.Coli Top Ten* Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 15 ml Lysepuffer B (Tabelle 2.12-1) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 30 Minuten auf Eis sonifiziert und für 25 Minuten bei RT mit 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und im Anschluss wurde das 6xHis-getaggte mAChR3 Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurden im Vorfeld Polypropylen Säulen (Qiagen) mit 10 ml slurry Ni-NTA Agarose gepackt und unter Schwerkraft mit Puffer B äquilibriert. Daraufhin wurde das Lysat ebenfalls unter Schwerkraft durch die Säule durchlaufen gelassen, gefolgt von fünf Waschschritten mit je 10 ml Puffer C (Kapitel 2.12). Die Elution des Proteins erfolgte mit 3 ml Puffer E (Kapitel 2.12) und wurde siebenmal wiederholt [172]. Jede einzelne Fraktion der Eluierung wurde aufgefangen und ihr Proteingehalt mittels Bradford (Kapitel 3.4.2) bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden

schließlich gepoolt und mittels SDS-Page getrennt. Das Gel wurde nach der Coomassie Färbung analysiert.

3.4.7 Elektroelution des Proteins aus dem SDS-Gel

Das synthetisierte rekombinante mAChR3 Protein, welches mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt wurde, wurde zur weiteren Aufreinigung mittels SDS-Page aufgetrennt und mit der Coomassie Färbung sichtbar gemacht. Die mAChR3 Protein Bande bei 66 kDa wurde ausgeschnitten und das Protein aus dem SDS-Gel mittels Elektroelution nach Angaben des Herstellers (Electro-Eluter Model 422, Bio Rad, München, D) eluiert.

Die Dialysemembran wurde vor Verwendung für 1 h bei 60 °C in Elutionspuffer (siehe Kapitel 2.12) aktiviert. Das Elutionsröhrchen wurde wie folgt zusammengebaut: eine Fritte wurde pro Röhrchen in das untere Ende eingefügt, so dass es mit dem Röhrchenboden schließt. Das Röhrchen wurde in das Electro-Eluter Modul eingelassen. Die Dialysemembran wurde in das untere Ende eines Silikon-Adapters gedrückt. Der Silikon-Adapter wurde unter Vermeidung von Luftblasen mit Elutionspuffer befüllt. Daraufhin wurde der Dialyse-Silikon Adapter auf das untere Ende des Elutionsröhrchen gesteckt und das Röhrchen mit Elutionspuffer vollständig befüllt. Nachfolgend wurden die ausgeschnittenen Gelstücke vorsichtig in das Elutionsröhrchen gegeben. Schließlich wurde die Pufferkammer mit 600 ml Elutionspuffer gefüllt, das Electro-Eluter Modul in die Pufferkammer gesteckt und die obere Pufferkammer wurde ebenfalls mit Puffer bedeckt. Die Proteine wurden bei 8-10 mA pro Elutionsröhrchen über 5 h eluiert. Zur Entfernung des SDS im Eluat wurde der Elutionspuffer in der unteren Pufferkammer gegen einen Puffer ohne SDS ausgetauscht und für weitere 30 Minuten bei 58 mA laufen gelassen. Beim Abbau wurde das Electro-Eluter Modul aus der Pufferkammer genommen, der Puffer aus den Elutionsröhrchen vorsichtig abgegossen und schließlich der Silikon-Adapter vom Röhrchen abgezogen. Das darin beinhaltete Eluat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Dialysemembran wurde nochmals mit 200 µl Puffer gewaschen, die ebenfalls zum Eluat hinzugefügt wurden. Im Anschluss erfolgten eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und die Lyophilisierung des

Proteins. Das Protein wurde in PBS gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.8 Isolierung der Immunglobuline aus Seren mittels Ammoniumsulfatfällung

Immunglobuline wurden mittels Ammoniumsulfat (AS) gefällt. Hierfür wurde das humane Serum tropfenweise in die identische Menge einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (767 g/l) gegeben. Das Serum-Ammoniumsulfat-Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 30 minütiger Zentrifugationsschritt bei 5.000 g. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert und das Präzipitat wurde zweimal mit je 500 µl einer 60 %-igen Ammoniumsulfatlösung (390 g/l) bei 5.000 g für jeweils 30 Minuten gewaschen. Das Präzipitat wurde mit HANKS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.9 On-Cell Western und In-Cell Western

Beim On-Cell Western werden Proteine auf der Zellmembran und im In-Cell Western intrazelluläre Proteine direkt in der Zellkulturplatte mit dem entsprechenden Antikörper detektiert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von $1 * 10^4$ je Vertiefung in eine *schwarze Greiner CELLSTAR 96 well plates clear polystyrene wells flat bottom* ausgesät und über Nacht bei 37 °C bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert.

3.4.10 Nachweis der Expression von muskarinischen Rezeptoren (mAChR1 - mAChR5) auf Cholangiozyten und Hepatozyten mittels On-Cell Western

Für die Analyse der mAChR1, mAChR2, mAChR3, mAChR4 und mAChR5 Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche wurden $1 * 10^4$ der TFK-1 und MMNK-1 Zellen und $1,2 * 10^4$ der HEP-G2 und HUH-7 Zellen pro well ausgesät und bis zum darauffolgenden Tag bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde dekantiert und die Zellen wurden mit einer 3 %-igen Formaldehyd Lösung schüttelnd fixiert. Daraufhin

wurden die Zellen einmalig mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden freie Bindungsstellen mit Blockierlösung (siehe Kapitel 2.12) blockiert, gefolgt von der Zugabe der primären Antikörper (AK-Verdünnung siehe Tabelle 2.10-1), die über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Zur genauen Quantifizierung der Rezeptorexpression wurde zusätzlich ein anti- β -Aktin Antikörper in der Verdünnung 1:250 hinzugegeben. Bevor die Zugabe der sekundären Antikörper erfolgte, wurden die Platten viermal für jeweils fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Dann wurden die IRDye sekundären Antikörper im Verhältnis 1:800 in Blockierlösung mit 0,1 % Tween verdünnt und die Zellen damit für eine weitere Stunde bei RT und in Dunkelheit schüttelnd inkubiert, gefolgt von vier weiteren Waschschritten für jeweils 5 Minuten bei RT im Dunkeln. Nach dem Dekantieren des Inhaltes wurden die Platten bei 4 °C bis zur Messung aufbewahrt. Die Visualisierung erfolgte mittels *Odyssey Imager* von Licor Odyssey.

3.4.11 Einfluss von Immunglobulinen auf die Apoptose von TFK-1-Zellen mittels In-Cell Western

Die TFK-1-Zellen wurden wie in Kapitel 3.4.9 beschrieben in 96-well Platten ausgesät. Zur Induktion der Apoptose wurde am darauffolgenden Tag je well eine 250 μ M/ml 5-FU-Lösung hinzugegeben und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Einfluss von Immunglobulinen auf die Apoptose wurde jeweils nach 24-stündiger und nach einstündiger Inkubation analysiert. Für die 24 Stunden Inkubation wurden 10 μ l von der Immunglobulin-Verdünnung im doppelten Ansatz in die Vertiefungen hinzugegeben. Als weitere Kontrolle wurde 10 μ M Carbachol für 24 Stunden und für eine Stunde mitgeführt. Für die einstündige Untersuchung wurden die Immunglobuline in der 23-igsten Stunde dazu pipettiert. Nach dem Ende der 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platten abgekippt. Die Zellen wurden mit 3 % Formaldehyd α 100 μ l/well für 20 Minuten bei RT auf dem Schüttler fixiert, gefolgt von der Permeabilisierung der Zellmembran mittels viermaligen Waschen mit Triton Waschpuffer für jeweils 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler. Im Anschluss wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit Blockierlösung inkubiert. Auch hier wurde ein anti- β -Aktin Antikörper in der Verdünnung 1:250 als Ladekontrolle mitgeführt, um die Expression von Bcl-2 bzw.

Bax und Caspase-9 quantifizieren zu können. Daraufhin wurden die primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (AK-Verdünnungen siehe Kapitel 2.10). Am folgenden Tag wurden die Platten fünf Mal für jeweils 5 Minuten mit Tween Waschpuffer (Kapitel 2.12) gewaschen. Die IRDye sekundären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:800 in Blockierlösung verdünnt, 50 µl pro well aufgetragen und für eine Stunde bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Zuletzt wurden die Platten kräftig ausgeklopft bzw. getrocknet und bei Dunkelheit aufbewahrt. Die Visualisierung erfolgte mittels *Odyssey Imager* von Licor Odyssey.

3.5 Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen den mAChR3 auf TFK-1-Zellen in Patientenseren

Die Bestimmung von Antikörpern gegen den mAChR3 auf TFK-Zellen erfolgte mittels Lumineszenz Assay, Adsorption Assay und Durchflusszytometrie. Die Auswirkung von anti-mAChR3 Antikörper auf die Zellvitalität wurde unter Verwendung von 3^H -Thymidin ermittelt.

3.5.1 Lumineszenz Assay

Die Etablierung des lumineszenzbasierenden Assays zum Nachweis funktioneller Antikörper gegen den mAChR3 unter Verwendung von CHO- und TFK-1-Zellen wurde bereits früher beschrieben [76, 173]. Der Test ist in die folgenden Schritte der Transfektion der TFK-1-Zellen mit dem pG5A Reporter-Plasmid, die Inkubation mit Immunglobulinen aus Patientenseren und Blutspendern und die Messung am Luminometer aufgeteilt.

3.5.2 Transfektion der TFK-1-Zellen mit GFP/Aequorin Plasmid DNA

Die Zellen wurden transient mit 1 µg/ml pG5A Plasmid unter der Verwendung von *Fugene 6 Transfection Reagenz* nach Angaben des Herstellers transfiziert. Das Reporter Plasmid und das Transfektionsreagenz wurden in einem serumfreien Medium in einem Verhältnis 3:1 Fugene6:DNA verdünnt und in eine 10 ml Zellsuspension à $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml überführt. Die transfizierten Zellen wurden zu je

100 µl in eine *Greiner CELLSTAR 96 well plates clear polystyrene wells flat bottom* pipettiert. Als Negativkontrolle dienten wells mit untransfizierten Zellen. Die Zellen wurden für circa 24 Stunden bei 37 °C bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % inkubiert.

3.5.3 Durchführung des Lumineszenz-Assay

Zu Beginn wurden die Platten (siehe Kapitel 3.5.2) mit 5 µM Coelenterazine HBSS (ohne Calcium) für eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschrift mit HBSS+Ca²⁺. Anschließend wurden 100 µl HBSS+Ca²⁺ pro Well pipettiert. Immunglobuline wurden 1:10 in HBSS+Ca²⁺ vorverdünnt. Je 10 µl des Immunglobulingemischs wurden als Vierfachansatz in die 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert, so dass eine Endverdünnung von 1:100 pro well resultierte. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation bei 37 °C. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte unbehandelte Zellen verwendet. Für die Positivkontrolle dienten transfizierte nichtbehandelte Zellen.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe (30 µl/well) des mAChR3 Agonisten Carbachol (CCh; 10 µM) über einen Dispenser gestartet. Die Messung erfolgte im Luminometer in einem Integrationsintervall von je 20 Sekunden. Angegeben sind die Messergebnisse als Prozentwert, welcher sich aus der Relativen Lumineszenz-Einheit (RLU) bezogen auf die transfizierten Zellen ergibt.

$$\frac{RLU \text{ der Messung}}{RLU \text{ der transfizierten Zellen}} \times 10 = \text{Werte bezogen auf die transfizierte Zellen [\%]}$$

Normwerte wurden anhand der Messung von Immunglobulinen aus Seren von gesunden Probanden ermittelt. Werte, die ≥ 150 % lagen, galten als Hinweis auf Autoantikörper, die die mAChR3-Funktion stimulieren, Werte ≤ 50 % als Hinweis auf inhibierende Antikörper. Immunglobuline die Werte zwischen 50 % und 150 % erreichten wurden als neutral, d.h. ohne Effekt, auf die Rezeptorfunktion angesehen.

3.5.4 Verifizierung der Spezifität von anti-mAChR3 Antikörper für den mAChR3 mittels Adsorptionstest

Um zu verifizieren, dass die im Lumineszenz-Assay nachgewiesenen funktionellen Antikörper tatsächlich gegen den mAChR3 gerichtet sind, wurde ein Adsorptionstest etabliert. Hierfür wurden CHO-Zellen in einer Konzentration von $1 * 10^5$ Zellen/ml mit $1 \mu\text{g/ml}$ pM3R-Plasmid unter Verwendung von Fugene 6 in einer Verdünnung 1:2 transfiziert. Von dieser Zellsuspension wurden $100 \mu\text{l/well}$ in eine 96-Loch Vertiefungsplatte ausgesät und für ca. 24 h bei 37°C inkubiert, so dass eine Überexpression des mAChR3 garantiert werden konnte. Des Weiteren wurden 96-Loch Vertiefungsplatten mit TFK-1-Zellen à $1 * 10^4$ Zellen/well, wie unter Kapitel 3.5.2 beschrieben, mit dem pG5A-Plasmid transfiziert und inkubiert. Daraufhin wurden Immunglobuline von PBC-, PSC-, AIH-, SS-Patienten und gesunden Probanden in einer 1:100 Verdünnung für eine Stunde mit den CHO-Zellen inkubiert zur Adsorption evtl. darin enthaltener anti-mAChR3 Antikörper. Der Überstand wurde anschließend auf die TFK-1-Zellen gegeben und ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde die mAChR3-Funktionalität, wie in Kapitel 3.5.3 erläutert, analysiert. Das Prinzip des Test basiert darauf, dass anti-mAChR3 Antikörper an den Rezeptor auf den CHO-Zellen binden, so dass der Überstand keine Antikörper mehr enthält, die den Rezeptor auf den TFK-1 Zellen stimulieren oder inhibieren könnten.

3.5.5 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von mAChR3 überexprimierenden TFK-1-Zellen

Für den Nachweis von anti-mAChR3 Antikörper vom IgG- oder IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie wurden TFK-1-Zellen verwendet, die mit dem M3R-Plasmid transfiziert worden waren und daher den mAChR3 überexprimierten. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen um unspezifische Reaktionen auszuschließen. Die Transfektion wurde wie beim Lumineszenztest mit *Fugene6* in einem Fugene6:DNA Verhältnis von 2:1 durchgeführt. TFK-1-Zellen wurden in einer Konzentration von $1 * 10^6$ Zellen/ml in eine 12 Loch-Vertiefungs-

platte ausgesät und bis zum nachfolgenden Tag bei 37 °C kultiviert. Nach Zugabe der Patientenseren in einer 1:20 Verdünnung wurden sie für weitere 24 Stunden inkubiert. Der Überstand in den einzelnen Vertiefungen wurde in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 200 µl *Cell Dissociation Buffer enzyme-free* abgelöst, so dass das Intakt bleiben der Zellmembran garantiert war. Die Zellen wurden in die entsprechenden FACS-Röhrchen mit den jeweiligen Überständen überführt und dann bei 3.000 g für 7 Minute zentrifugiert. Die Zellen wurden leicht aufgewirbelt und mit 1 ml eiskaltem FACS Puffer (PBS-Puffer mit 3 % BSA) befüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3.000 g für 7 Minuten Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. In einem weiteren Schritt wurden der Fluoreszenz-konjugierte Anti-Human-IgG bzw. -IgM-Antikörper in einer 1:8 Verdünnung und, für die Kontrolle, der primäre anti-mAChR3 Antikörper in einer 1:500 Verdünnung mit dem zugehörigen sekundären Antikörper in einer 1:200 Verdünnung in FACS-Puffer zu den Zellen pipettiert. Nicht-konjugierte Antikörper wurden für eine Stunde bei 4 °C und Fluoreszenzgekoppelte Antikörper für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte, wie zuvor beschrieben, ein dreimaliger Waschschrift mit eiskaltem FACS-Puffer. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt sowie Zellen, die nur mit dem primären bzw. sekundären Antikörper inkubiert wurden. Die relative Fluoreszenzintensität wurde sofort unter vierfachem Logarithmus mittels Durchflusszytometer, *FACSCalibur* (Becton-Dickinson), analysiert. Zehntausend Events wurden pro Probe analysiert. Die Kompensation wurde für jedes Experiment erneut mit vier einzeln gefärbten Kontrollen eingestellt. Die Auswertung wurde mit der *BD CellQuest* Software durchgeführt.

3.5.6 Assay zum Nachweis des Einflusses von Immunglobulinen auf die Zellproliferation von TFK-1-Zellen

Zur Analyse des Einflusses von Immunglobulinen auf die Zellproliferation von TFK-1-Zellen wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen pro well in eine *Greiner CELLSTAR 96 well-Platte* pipettiert und bis zu einer 80 - 90 %-igen Konfluenz bei 37 °C am Folgetag inkubiert. Die Immunglobuline wurden wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben zu den TFK-1-Zellen hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. 16 Stunden

vor Testende erfolgte die Zugabe von 20 µl ^3H -Thymidin mit 14,8 KiloBecquerel (KBq) pro well. Daraufhin wurden die Platten ausgeklopft, dreimal mit 50 µl destilliertem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Vor der Messung wurden 25 µl Szintillationsflüssigkeit in die Vertiefungen gegeben. Nach Überführung der Platten in das Luminometer wurden sie zunächst für mindestens zwei Minuten ruhen gelassen. Die Lichtabsorption des Thymidins wurde nach den Werkseinstellungen von Perkin Elmer in Counts per Minutes (CPM) ermittelt.

Der Effekt der Immunglobuline auf die Zellproliferation wurde wie im Lumineszenz Assay in inhibierend (< 50 %), neutral (50 % bis <150 %) und stimulierend (\geq 150 %), eingeteilt. Als Negativkontrolle diente der ^3H -Thymidin uptake von Zellen, die nicht mit Immunglobulinen behandelt worden waren.

3.6 Immunologische Methoden zum Nachweis einer humoralen und zellulären Reaktivität gegenüber rekombinantem mAChR3

Die IgG- und IgM-Antikörperbindung aus dem Patientenserum an das mAChR3 Antigen wurde mittels ELISA untersucht. Weiterführend wird der Einfluss des mAChR3 Antigens auf die Aktivierung des CD69-Expression, Zellproliferationsrate und Zytokinsekretion von PBMC analysiert.

3.6.1 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels ELISA unter Verwendung des full length mAChR3 Protein sowie mAChR3 Peptiden

Der Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen das rekombinante full length mAChR3 Protein sowie die 35 Peptide (Tabelle 2.11-1) erfolgte mittels ELISA. Das full length mAChR3 Protein und die einzelnen Peptide wurden jeweils auf 10 µg/ml (Kapitel 2.12) mit Bicarbonatpuffer verdünnt. *Nunc-Immuno 96 MicroWell solid plates* (Thermo Scientific Nunc) wurden mit 50 µl/well über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten zum Blockieren freier Bindungsstellen mit Waschpuffer I (WPI) gewaschen und in diesem für

60 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl/well natives Patientenserum in einer 1:500 Verdünnung im Doppelansatz für 90 Minuten bei RT inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit WP II und eine Inkubation in diesem für 15 Minuten bei RT. Im Anschluss wurden 100 µl/well Peroxidase-konjugierte Anti-Human-IgG (Verdünnung 1:3.000) und -IgM-Antikörper (Verdünnung 1:2.000) zugegeben und für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Platten wie zuvor beschrieben mit WP II gewaschen und 150 µl Substrat pro well hinzugegeben. Die darauf einsetzende, farblich sichtbare enzymatische Reaktion wurde mit 50 µl einer 25 %-igen Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 595 nm mit dem Tecan Rainbow Reader und der Software MAGELAN bestimmt.

3.6.2 Bestimmung des Effektes von full length mAChR3 Antigen auf die Proliferation von PBMC

Die Auswirkung des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau bestimmt [174]. Hierfür wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen/well in eine 96-well Platte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Vor der Zugabe der Peptide wurden die Zellen für mindestens 12 Stunden ruhen gelassen. Daraufhin wurden 10 µl Peptid (Kapitel 2.11) in einer 1:500 Verdünnung für 7 Tage inkubiert. Am 6. Tag wurden 18 Stunden vor Testende 20 µl ³H-Thymidin mit 14,8 KBq je well pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurden die PBMC auf eine *MultiScreen Harvest APFB Filter* 96-well Platte überführt und unter Vakuum in die Membran aufgezogen. Nach Trocknung der Platte wurden 25 µl Szintillationsflüssigkeit auf die Membranen gegeben. Die Messung der Platte erfolgte im Micro Beta LumiJet wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben.

3.6.3 Bestimmung des Effektes von full length mAChR3 Antigen auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC

Die Auswirkung des full length mAChR3 Antigens auf die Aktivierung von PBMC wurde mittels Durchflusszytometrie erfasst. PBMC wurden wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben aufgetaut und auf 3 bis max. $10 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Davon

wurden 100 µl in eine *96 Well Suspensionskultur Microplatte mit U-Boden* (Greiner-Bio-One) verteilt und für 2 bis 18 Stunden vor Testbeginn bei 37 °C ruhen gelassen. Von dem full length mAChR3 Antigen wurden 100 µl in den Konzentrationen 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml und 0,0001 µg/ml zu den Zellen gegeben und für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Aktivierungskontrolle wurden 10 µg/ml Pokeweed-Mitogen (Lectin der Kermesbeere) mitgeführt. Zur Negativkontrolle wurden nicht behandelte Zellen verwendet.

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellplatten für 6 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in 100 µl kaltem PBS Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde erneut der Überstand abgekippt; je Vertiefung wurden 100 µl CD19 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP-, CD56 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP-, CD8 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP- und CD4 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP-Antikörper in einer Verdünnung 1:25 hinzugeben (siehe Kapitel 2.10). Als Isotypkontrolle wurde der Tritest γ 1(FITC)/ γ 1(PE)/CD45(PerCP) verwendet. Nach 30 minütiger Inkubationszeit der Antikörper bei 4 °C und in Dunkelheit erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Schließlich wurde der Überstanddekantiert, die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und sofort mit dem FACS-Calibur analysiert. Der Einfluss des full length mAChR3 Protein auf die Aktivierung der PBMC wurde einmalig mit 10^3 Zellen pro FACS-Ansatz erfasst.

3.6.4 Nachweis der Zytokinproduktion durch PBMC nach Inkubation mit dem full-length mAChR3 Protein mittels ELISA

Die Zytokinsekretion von PBMC nach Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen wurde mittels ELISA nachgewiesen. PBMC wurden in einer Konzentration von $1 * 10^6$ Zellen/ml mit dem full length mAChR3 Antigen in den Konzentrationen 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml und 0,0001 µg/ml in einer *Nunc Zellkultur-Multischale 24 round wells* (Thermo Scientific Nunc) für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit Pokeweed-Mitogen (Konzentration 10 µg/ml)

stimuliert. Die Kulturüberstände wurden nach 7 Tagen abgezogen und bei -20 °C aufbewahrt.

Für den Zytokin ELISA wurden *Nunc-Immuno 96 MicroWell solid plates* (Thermo Scientific Nunc) mit monoklonalen anti-human Zytokin-Antikörpern (Tabelle 2.10-1) nach Angaben des Herstellers über Nacht im Kühlschrank bei 4°C beschichtet. Vor Testbeginn wurden die Platten dreimal mit PBS-Puffer + 0,5 % BSA gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer für eine Stunde bei RT in den Platten stehen gelassen. Nach Ausklopfen des Waschpuffers wurden 75 µl der Kulturüberstände pro well pipettiert. Von den Zytokinstandards (Tabelle 2.10-3) wurden 100 µl pro well in Spalte 1A-H gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C. Wiederholt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Als Nächstes wurden 100 µl pro well des biotinylierten Detektionsantikörpers hinzugeben und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen der Platten. Anschließend wurden 100 µl Avidin-Peroxidase je well zugegeben und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 150 µl Substrat-Lösung pro well. Die Farbreaktion wurde nach Erreichen einer definierten Intensität durch Zugabe von 50 µl 25 %-iger Schwefelsäure pro well gestoppt und bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 595 nm mit dem Tecan Rainbow Reader und der Software MAGELLAN gemessen. Die Zytokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen wurden anhand der mitgeführten Standards ermittelt.

3.7 Statistik

Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Im Lumineszenz Assay, Adsorptions Assay sowie bei der Bestimmung der Zellproliferation von Cholangiozyten und PBMC wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Ausreißer der Vierfachbestimmungen innerhalb eines Tests wurden mit dem *Ausreißertest nach Dixon* geprüft, wobei die Stichproben mit zwei Prüfwerten PW („nach oben“ und „nach unten“) berechnet wurden. Der untere PW prüft den kleinsten Wert und der obere den größten in der geordneten Zahlenreihe. Die beiden Prüfwerte wurden verglichen mit einer von Dixon

vorgegebenen tabellarischen statistischen Sicherheit (siehe Anhang B). Lag der Prüfwert über der Signifikanzschranke von P 95 %, so handelte es sich um einen signifikanten Ausreißer und er wurde aus der Datenreihe eliminiert. Die Bestimmungen der Zytokinproduktion durch PBMC nach Inkubation mit dem full length mAChR3 Protein und die Antikörperbestimmungen in Patientenseren mittels ELISA wurden als Doppelansätze durchgeführt.

Versuchsansätze die voneinander unabhängig waren wurden, unter Annahme einer Nullhypothese der Messergebnisse, mit dem *Kruskal-Wallis-Test* und *Mann-Whitney-U-Test* verglichen. P-Werte < 0.05 galten als statistisch signifikant. Die Signifikanz unter gepaarten Stichproben sind mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* ermittelt worden. Signifikanzen wurden in den Abbildungen mit Sternen gekennzeichnet (* \triangleq p < 0,0500; ** \triangleq p < 0,010, *** \triangleq p < 0,001, **** \triangleq p < 0,0001). Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der in Kapitel 2.14 aufgezeigten Software.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Expression von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren mAChR1 - mAChR5 auf Cholangiozyten- und Hepatozyten-Zelllinien

Um zu sehen, ob in Seren von Patienten mit verschiedenen autoimmunen Lebererkrankungen Antikörper nachweisbar sind, die mit dem mAChR3 auf Leberzellen reagieren, wurde im Vorfeld nach einer geeigneten Zelllinie für die Versuchsdurchführung gesucht. Zwei Cholangiozyten-Zelllinien, TFK-1 und MMNK-1, sowie zwei Hepatozyten-Zelllinien, HEP-G2 und HUH-7, wurden auf die Expression der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren mAChR1 bis mAChR5 mittels Durchflusszytometrie, Western Blot, On-Cell Western und Immunfluoreszenztest analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1-1 zusammengefasst. Es wurde deutlich, dass die Hepatozyten-Zelllinie HEP-G2 den mAChR2 und mAChR5 auf der Zelloberfläche exprimieren, die HUH-7 Zelllinie hingegen ausschließlich den mAChR2. MMNK-1 Zellen exprimieren dagegen den mAChR2, mAChR3 und mAChR4. Der mAChR3 ist am stärksten auf TFK-1-Zellen exprimiert, diese Zelllinie exprimiert keinen der anderen muskarinischen Rezeptoren. Zusammengefasst sind daher die TFK-1-Zellen für die nachfolgenden Untersuchungen am besten geeignet.

Tabelle 4.1-1: Zusammenfassung der Expressionsanalysen der muskarinischen Rezeptoren mAChR1 bis mAChR5 auf Hepatozyten (HEP-G2, HUH-7) und Cholangiozyten (MMNK-1, TFK-1) Zelllinien.

Zelllinie	mAChR1	mAChR2	mAChR3	mAChR4	mAChR5
HEPG2	-	+	-	-	+
HUH-7	-	+	-	-	-
MMNK-1	(+/-)	+	+	+	-
TFK-1	-	-	+	-	-

4.2 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis von AAK des Typs IgG und des Typs IgM im Serum von SS-, PBC-, PSC-, AIH-, Virushepatitis-Patienten und gesunden Probanden erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung der TFK-1-Zellen als Target, wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben. In Tabelle 4.2-1 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung mittels FACSCalibur zusammengefasst. Laut Literatur weisen Patienten mit SS häufig AAK gegen den mAChR3 auf. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine IgG-Antikörper gegen Cholangiozyten nachgewiesen werden, die den mAChR3 exprimieren. Auch in Seren von Patienten mit AIH, Virushepatitis und gesunden Probanden waren mit dieser Methode keine IgG AAK nachweisbar. Lediglich ein PBC-Patient und zwei PSC-Patienten hatten Antikörper gegen Cholangiozyten vom IgG-Typ. Dagegen waren Antikörper vom IgM-Typ bei 29 % bis 88 % der Patienten mit PBC-, PSC- und Virushepatitis und in bis zu 20 % bei gesunden Probanden zu beobachten. Für Patienten mit SS und AIH liegen diesbezüglich derzeit keine Untersuchungsergebnisse vor.

Tabelle 4.2-1: Nachweis von Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ gegen mAChR3-exprimierende Cholangiozyten in Seren von Patienten mit SS und verschiedenen Lebererkrankungen sowie gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie.

Erkrankung	Anzahl getestet	Anzahl (%) anti-mAChR3 positiv	
		IgG	IgM
SS	59	0	n. g.
PBC	38	1 (3)	11 (29)
PSC	35	2 (6)	26 (74)
AIH	33	0	n. g.
Hepatitis B	10	0	8 (80)
Hepatitis C	16	0	14 (88)
Gesunde Probanden	51	0	10 (20)

Abkürzung: n. g. = nicht getestet

4.3 Nachweis von funktionellen anti-mAChR3 Antikörpern in Patientenseren mittels Lumineszenz Assay

Zum Nachweis funktioneller Antikörper gegen den mAChR3 wurden Cholangiozyten (TFK-1-Zellen), welche mit dem pG5A Reporter Plasmid transfiziert worden waren (s. Kapitel 3.5.2), mit *Coelenterazin h* vorstimuliert und anschließend mit Immunglobulinen aus Patientenseren für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die einstündige Inkubation war in Vorversuchen ermittelt worden. Daneben zeigten die Vorversuche den Start der Rezeptorinternalisierung nach 60 Minuten, ein Recycling des Rezeptors an die Zelloberfläche konnte nach einer 24-stündigen Inkubation beobachtet werden. Die Reaktion des Lumineszenz Assays wurde mit der Zugabe von 10 mM des mAChR3 Agonisten Carbachol über einen Injektor gestartet. Nach Zugabe von Immunglobulinen aus Patientenseren wurde über eine Abnahme bzw. Zunahme des Lichtsignals eine Inhibition oder Stimulation des Rezeptors gemessen (Tabelle 4.3-1).

Ein Drittel der Ig's aus PBC-Seren und 19 der 43 Ig's aus AIH-Seren führten zu einer Stimulation des mAChR3. Eine Inhibition des mAChR3 wurde mit 4 % bzw. 7 % der Igs aus Seren von PBC- und AIH-Patienten und 6 % der Ig's aus Seren gesunder Blutspender beobachtet.

Tabelle 4.3-1: Effekt der Immunglobuline aus Seren von Patienten mit SS und verschiedenen Lebererkrankungen auf die mAChR3-Funktion auf TFK-1-Zellen.

Erkrankung	Anzahl getestet	Effekt von Ig's auf den mAChR3		
		kein Effekt	Inhibition	Stimulation
		Anzahl (%)		
SS	60	58 (97)	0	2 (3)
PBC	142	92 (65)	6 (4)	44 (31)
PSC	50	43 (86)	0	7 (14)
AIH	43	21 (49)	3 (7)	19 (44)
Virushepatitis	50	50 (100)	0	0
Gesunde Probanden	129	115 (89)	8 (6)	6 (5)

4.4 Adsorptionstest

Um zu überprüfen, ob die funktionellen Antikörper auch tatsächlich gegen den mAChR3 gerichtet sind, wurden Adsorptionsversuche durchgeführt. Hierfür wurden Immunglobuline zunächst mit CHO-Zellen inkubiert, die den mAChR3 überexprimierten (siehe Kapitel 3.5.4). Der Einfluss des Überstands wurde anschließend nochmals auf TFK-1-Zellen getestet. Verwendet wurden hierbei Ig's von verschiedenen Patienten mit inhibierenden und stimulierenden anti-mAChR3 Antikörpern. Wie in Abbildung 4.4-1 zu sehen, nahm sowohl der stimulierende als auch der inhibierende Effekt von PBC- und PSC-Ig's auf die Funktionalität des mAChR3 auf TFK-1-Zellen nach einmaliger Adsorption ab. Dagegen bewirkt die Inkubation mit dem Überstand von AIH- sowie SS-Ig's nach der Adsorption eher eine Stimulation der mAChR3-Aktivität. Die Inkubation der Ig's von gesunden Probanden resultiert nach Adsorption auf CHO-Zellen gleichermaßen in einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der mAChR3-Funktionalität von Cholangiozyten.

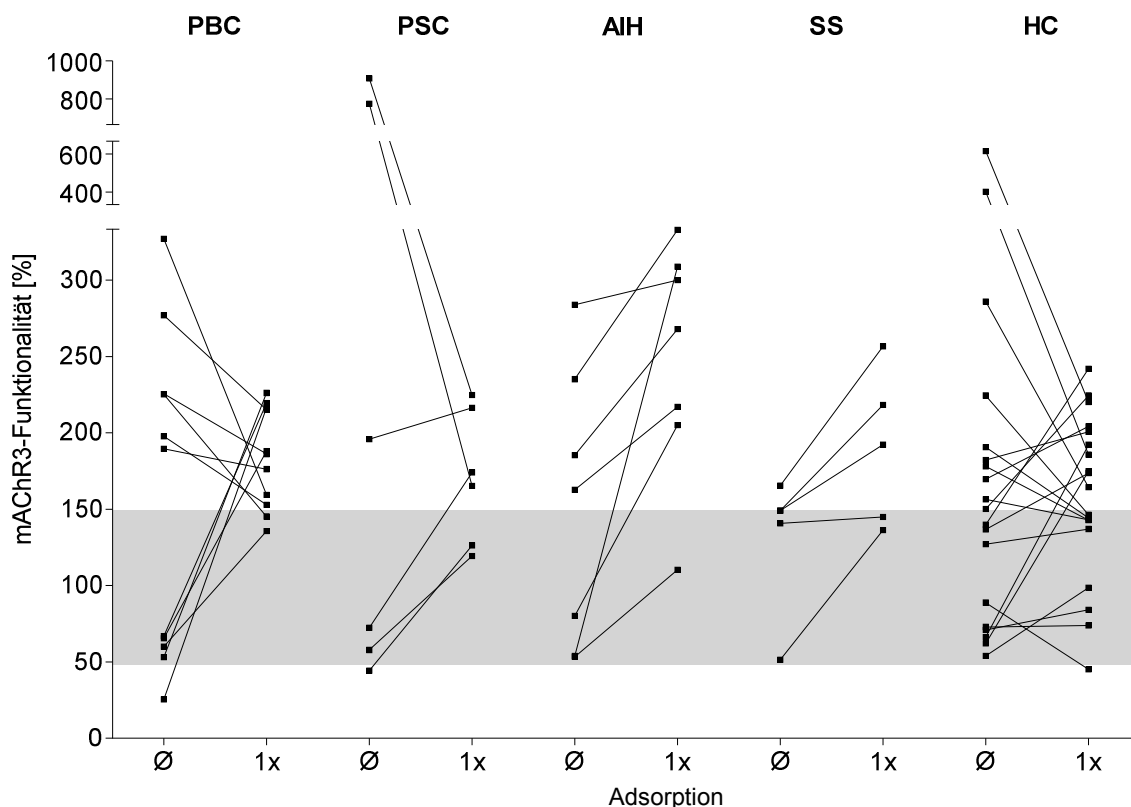


Abbildung 4.4-1: Effekt einer einmaligen Adsorption von Ig's aus Seren von Patienten mit PBC, PSC, AIH und Sjögren-Syndrom sowie gesunden Probanden mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen. Ausgewählt wurden Ig's mit bekannten stimulierenden, inhibierenden oder keinen

Effekten auf die mAChR3-Funktionalität auf TFK-1-Zellen. [\emptyset = vor Adsorption; 1x = Effekt nach einmaliger Adsorption mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen]. Die graue Fläche entspricht dem Bereich, der als ‚neutral‘ gilt; dieser wurde durch die Normalverteilung von gesunden Probanden ermittelt.

Insgesamt konnte eine signifikante Reduzierung der mAChR3-Funktionalität ($P = 0,0453$) aller stimulierenden Ig's ($n = 24$) nach der Adsorption festgestellt werden. Immunglobuline, die keinen oder einen inhibitorischen Effekt ($n = 22$) auf die mAChR3 auf TFK-1-Zellen hatten, weisen eine signifikante höhere ($P < 0,0001$) mAChR3-Funktionalität nach Adsorption mit CHO-Zellen auf.

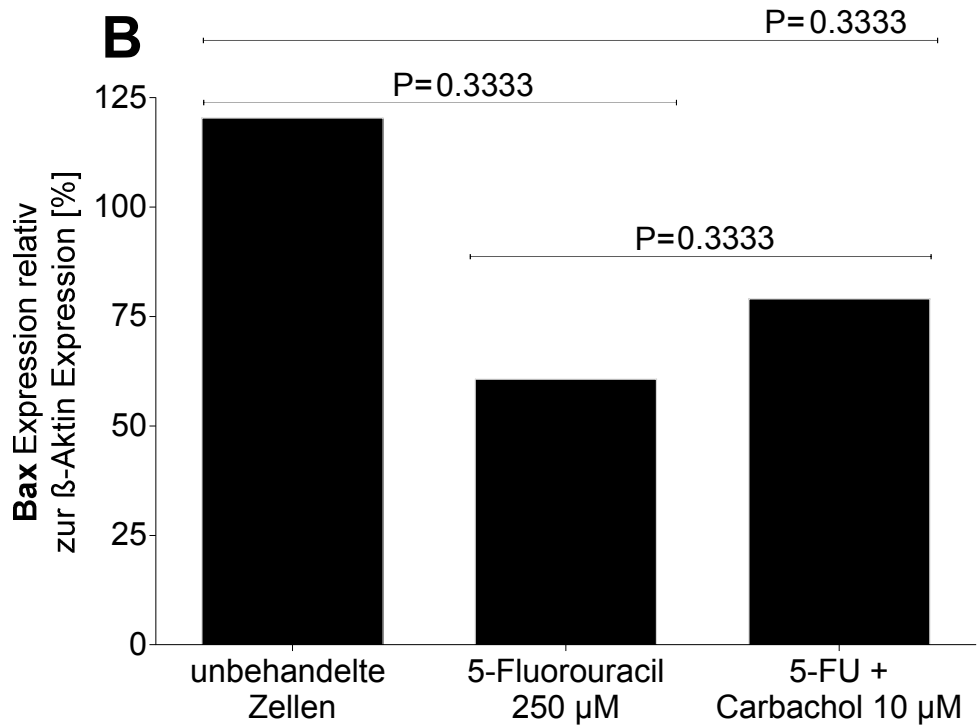
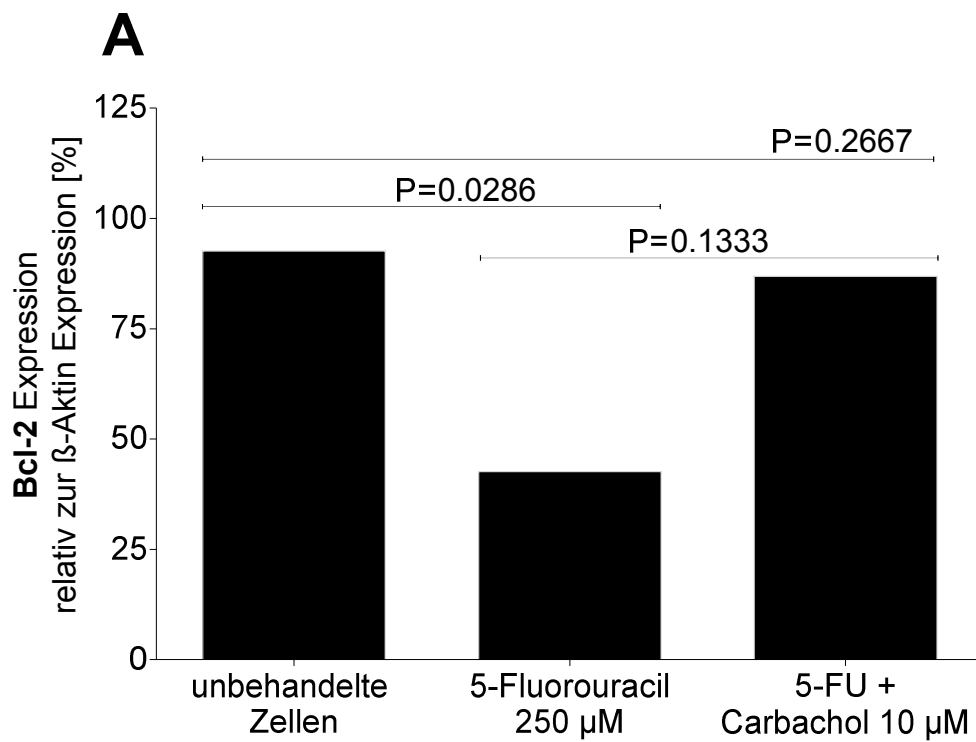
4.5 Einfluss von Immunglobulinen auf die Proliferation von Cholangiozyten (TFK-1-Zellen)

Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Stimulation des mAChR3 eine Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration zur Folge hat und diese wiederum einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausübt (siehe Kapitel 1.1), wurde zunächst der Effekt von Ig's aus Patientenseren auf die Proliferationsrate von TFK-1-Zellen analysiert. TFK-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Immunglobulinen inkubiert, anschließend wurde 3H -Thymidin für weitere 16 h hinzugegeben (siehe Kapitel 3.5.6) und der 3H -Thymidin uptake mit dem von unbehandelten Zellen verglichen. Die Untersuchungen ergaben, dass Ig's aus Seren von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, Sjögren Syndrom und von gesunden Probanden keinerlei Auswirkung auf die Proliferationsrate von TFK-1-Zellen hatten (Daten nicht dargestellt, siehe Anhang 7.6).

4.6 Einfluss von Immunglobulinen aus Patientenseren auf die Apoptose bzw. anti-apoptische Signalkaskade von Cholangiozyten (TFK-1-Zellen)

Seit 2004 ist bekannt, dass die Stimulierung des mAChR3 in einer Erhöhung des anti-apoptischen Bcl-2 Proteins resultiert (Kapitel 1.1.2). Aus diesem Grund sollte der Einfluss von Immunglobulinen von PBC-, PSC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden auf die apoptotische Signalkaskade in TFK-1-Zellen

untersucht werden. Da die Aktivierung des mAChR3 in einer Erhöhung des Calciumeinstroms aus dem Endoplasmatischen Retikulum resultiert und dies wiederum einen intrinsischen Apoptoseweg zur Folge hätte, wird parallel zu dem Bcl-2 Protein das pro-apoptotische Protein Bax untersucht. Des Weiteren wird das in der Signalkaskade folgende cleaved Caspase-9 Protein analysiert. Die Cholangiozyten wurden für 24 h und 1 h mit Immunglobulinen, wie in Kapitel 3.4.11 beschrieben, inkubiert und die Bcl-2, Bax sowie die Caspase-9 Protein Expressionen mittels In-Cell Western analysiert. Als Kontrolle wurden die TFK-1-Zellen mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (FU) inkubiert, so dass in 50 % der Zellen die Apoptose initiiert war. Zusätzlich wurde 1 h vor Testbeginn der mAChR3 Agonist Carbachol hinzugefügt, um zu testen, ob die Stimulierung des Rezeptors einen Effekt auf die anti- bzw. pro-apoptotischen Proteine hat. Die nachfolgende Abbildung 4.6-1 zeigt die Ergebnisse der In-Cell Western Untersuchung zur Bcl-2, Bax und Caspase-9 Expression in unbehandelten TFK-1 Zellen sowie in 5-FU behandelten Zellen mit apoptotischen Merkmalen. Der Einfluss der Inkubation der TFK-1-Zellen ausschließlich mit Carbachol (CCh) für 1 h und 24 h auf die Bax und Caspase-9 Expression ist hier nicht dargestellt (siehe dafür Anhang 7.7). Inkubation der TFK-1-Zellen mit 5-FU führt zu einer signifikanten Abnahme sowohl des pro-apoptotischen Proteins BAX als auch des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, (Abbildung 4.6-1, A). Die Zugabe von Carbachol hebt diesen inhibierenden Effekt von 5-FU auf die Bcl-2-Expression auf, so dass sie mit 85 % annähernd der Bcl-2-Expression der unbehandelten Zellen entspricht (90 %). Dies konnte jedoch nicht bei der Bax (Abbildung 4.6-1, B) und Caspase-9 (Abbildung 4.6-1, C) Expression festgestellt werden. Das bedeutet, dass Stimulation des mAChR3 anti-apoptotische Prozesse unterstützt, aber pro-apoptotische Prozesse nicht verhindert.



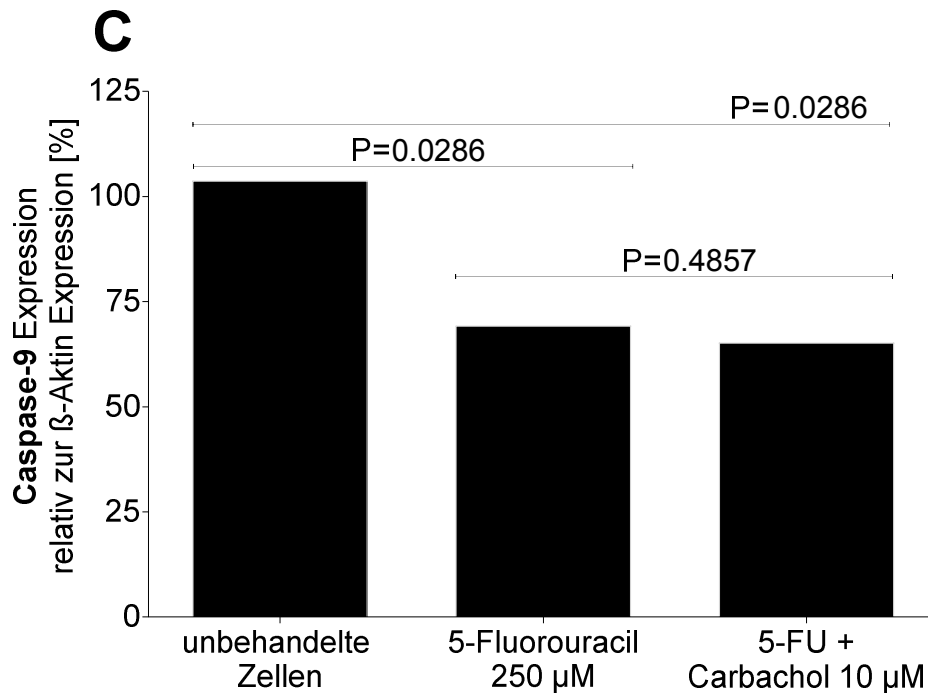


Abbildung 4.6-1: In-Cell Western von TFK-1-Zellen zur Etablierung der pro- bzw. anti-apoptotischen Protein Kontrollen relativ zur β -Aktin Expression in Prozent [%]. In A) ist die Bcl-2 Expression, in B) die Bax Expression und in C) die Caspase-9 Expression nach der 24 stündigen Inkubation mit dem Zytostatikum 5-FU (250 μ M) aufgezeigt sowie der Einfluss einer zusätzlichen einstündigen Stimulation der TFK-1-Zellen mit dem mAChR3 Agonisten Carbachol (10 mM). p = Signifikanzlevel; als signifikant gilt $p < 0,05$.

4.6.1 Einfluss von Ig auf die Bcl-2 Proteinexpression in Cholangiozyten

Als zweiter Schritt wurde der Effekt von Ig's auf die Bcl-2 Expression in TFK-1-Zellen analysiert. Hierbei wurden die Ig's von PBC-, PSC-, AIH- und SS-Patienten sowie von gesunden Probanden für 1 h und 24 h, ohne Zugabe von 5-FU und Carbachol, mit den Cholangiozyten inkubiert (Abbildung 4.6-2).

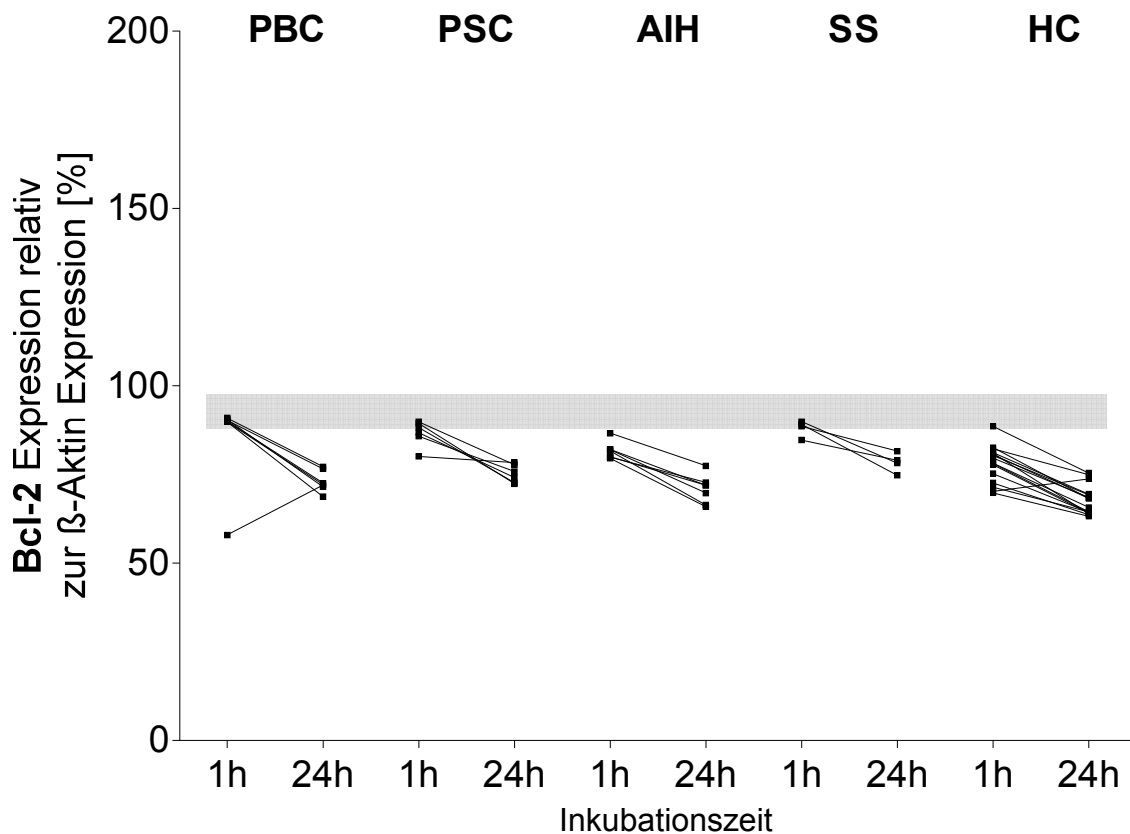


Abbildung 4.6-2: Bcl-2 Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC). Die Bcl-2 Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Bcl-2 Expression relativ zur mitgeführten β-Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

Immunglobuline aller Patienten sowie der gesunden Probanden führten zu einer signifikanten Reduktion der Bcl-2 Expression der TFK-1-Zellen nach einer Inkubation von 24 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach einstündiger Inkubation war dieser Effekt nur für die Ig's von AIH-Patienten und gesunden Probanden zu beobachten. Nach einer Inkubation für 24 h war die Expression von Bcl-2 signifikant geringer als nach Inkubation für 1 h ($P < 0,0001$) für die Ig's aller Probandengruppen.

4.6.2 Einfluss von Ig auf die Bax Proteinexpression in Cholangiozyten

Zusätzlich wurde der Einfluss von Ig's von PBC-, PSC-, AIH- und SS-Patienten sowie von gesunden Probanden auf die Bax Expression in TFK-1 Zellen nach 1 h und 24 h Inkubation analysiert (Abbildung 4.6-3). Auch hier ist nach 24 stündiger Inkubation eine signifikant reduzierte Bax Expression im Vergleich zu einstündiger Inkubation zu beobachten (ohne gesunde Probanden [n = 17] P = 0,0305; mit gesunden Probanden [n = 21] P = 0,0022).

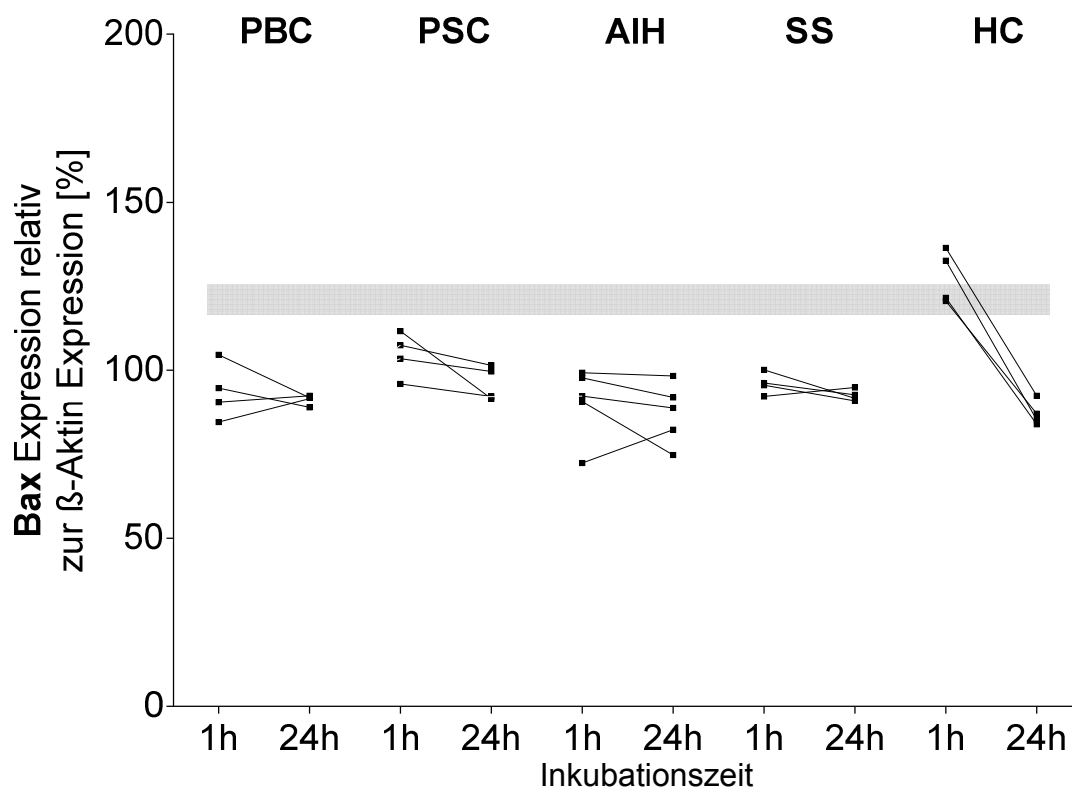


Abbildung 4.6-3: Bax Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC). Die Bax Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Bax Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

Im Vergleich zu unbehandelten TFK-Zellen war nach Inkubation der Zellen mit Ig's von PBC-, AIH-, SS-Patienten und gesunden Probanden für 1 h die Bax Expression signifikant geringer. Nach 24 h war dieser Effekt auch bei PSC-Patienten und gesunden Probanden zu beobachten.

4.6.3 Einfluss der Ig Inkubation auf die Caspase-9 Proteinexpression in Cholangiozyten

Darüber hinaus wurde die Caspase-9 Protein Expression nach der Ig Inkubation untersucht. Die Inkubation mit Ig's von PSC-Patienten für 24 h resultiert in der höchsten Caspase-9 Expression (Abbildung 4.6-4). Hingegen der Bcl-2 und Bax Expression hat die 24 h Inkubation mit den Ig's im Vergleich zu der einstündigen Inkubation eine signifikante Erhöhung der Caspase-9 Detektion zur Folge (ohne gesunde Probanden [n = 16] P = 0,034 inklusive gesunder Probanden [n = 21] P = 0,0003).

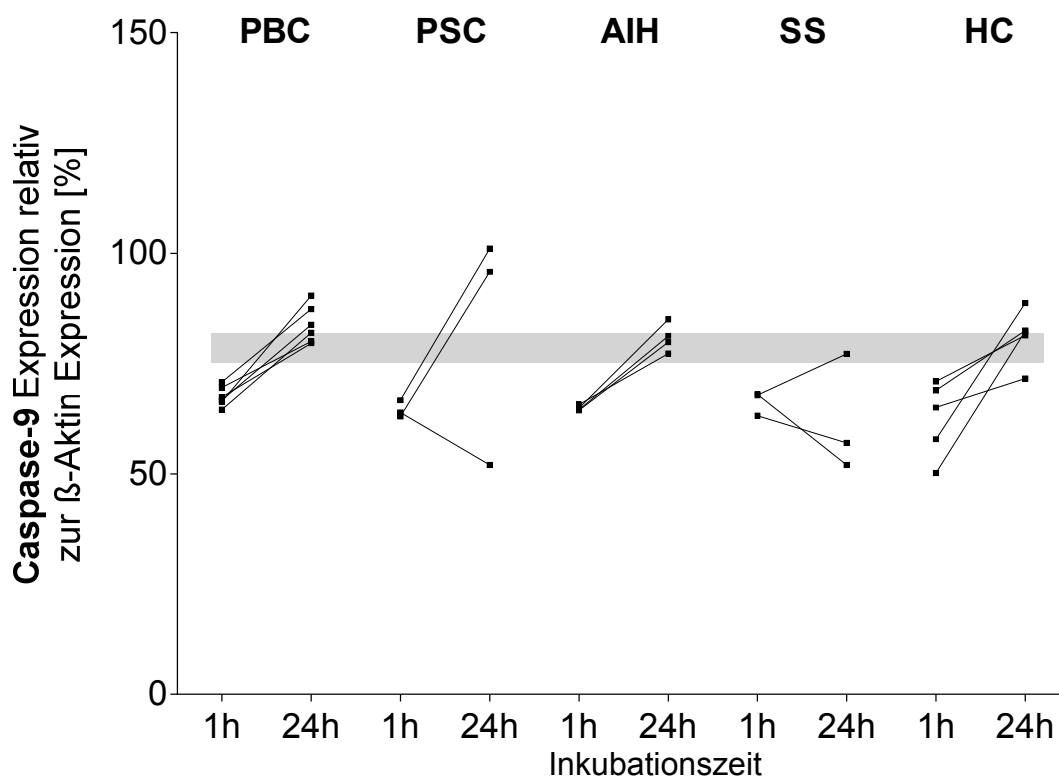


Abbildung 4.6-4: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC). Die Caspase-9 Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Caspase-9 Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

Im Vergleich der Caspase-9 Expression von unbehandelten zu Ig behandelten TFK-1-Zellen kann nach einstündiger Inkubation kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, während nach 24 h Inkubation eine signifikante Erhöhung durch die Ig's von PBC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden zu beobachten ist.

Diese Befunde zeigen, dass die Immunglobuline aus Patientenseren einen ähnlichen Effekt auf die Expression pro- und antiapoptotisch Proteine durch TFK-1-Zellen haben wie 5-FU. In weiteren Tests wurden die TFK-1-Zellen zuvor mit Carbachol oder 5-FU stimuliert und im Anschluss daran mit Ig's inkubiert. Jedoch konnte kein Unterschied zu den zuvor aufgeführten Daten in Kapitel 4.6.1 bis Kapitel 4.6.3 auf die Auswirkung der Bax oder Caspase-9 Expression festgestellt werden (Daten nicht dargestellt, siehe Anhang 7.7).

4.7 Einfluss von Immunglobulinen aus Patientenseren auf die Zytokinproduktion von TFK-1-Zellen

Um den Einfluss der mAChR3 Antikörper in Patientenseren auf die Zytokinproduktion von TFK-1-Zellen zu überprüfen wurden diese mit Ig's von je fünf SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten, sowie von je fünf gesunden Probanden, für 1 h und 24 h inkubiert. Die hierfür ausgewählten Ig's hatten im Lumineszenz Assay (siehe Kapitel 4.3) einen stimulatorischen bzw. inhibitorischen Effekt auf den mAChR3. Im Anschluss wurde die Zytokinsekretion von IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α und TNF- β mittels ELISA in den Zellüberständen getestet. Ferner wurden die Zellen über die Zeiträume von 1 h und 24 h mit dem mAChR3 Agonisten Carbachol stimuliert und mit dem Antagonisten Atropin gehemmt. Weder die Immunglobuline aus Patientenseren – unabhängig ob positiv für anti-mAChR3 Antikörper oder nicht – noch der mAChR3 Agonist oder -Antagonist führten zu einer Freisetzung eines der getesteten Zytokine (Daten nicht gezeigt).

4.8 Analyse der Epitopbindungsstelle von anti-mACh3 Antikörpern mittels ELISA

Um weiteren Aufschluss über die exakte Bindungsstelle der IgG- und IgM-Antikörper gegen den mAChR3 zu erlangen, wurden Seren von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, dem Sjögren Syndrom und gesunden Probanden gegen 35 verschiedene Peptidsequenzen (Kapitel 2.11) des mAChR3s im ELISA getestet. Die jeweiligen Peptide sind maximal 25 Aminosäuren lang und

weisen an beiden Enden eine Überlappung von 7 bis zu 13 Aminosäuren auf. Außerdem wurden alle Seren auf ihre Reaktion mit dem gesamten rekombinant-hergestellten mAChR3 Protein (als "full length" aufgeführt) untersucht. In den nachfolgenden Ergebnissen Kapitel 4.8.1 bis 4.8.9 sind die Mittelwerte plus Standardabweichung der gemessenen Absorption im ELISA dargestellt.

4.8.1 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Antigen in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Seren von Patienten mit alkoholinduzierter Lebererkrankung, Virushepatitis und PSC zeigten die stärkste IgG-Reaktion mit dem full length mAChR3 Protein, die aber nicht signifikant höher war als die von Seren gesunder Probanden (Abbildung 4.8-1). Dagegen war die Reaktion von Seren der Patienten mit AIH oder SS mit dem full length mAChR3 Protein signifikant niedriger als die der gesunden Probanden.

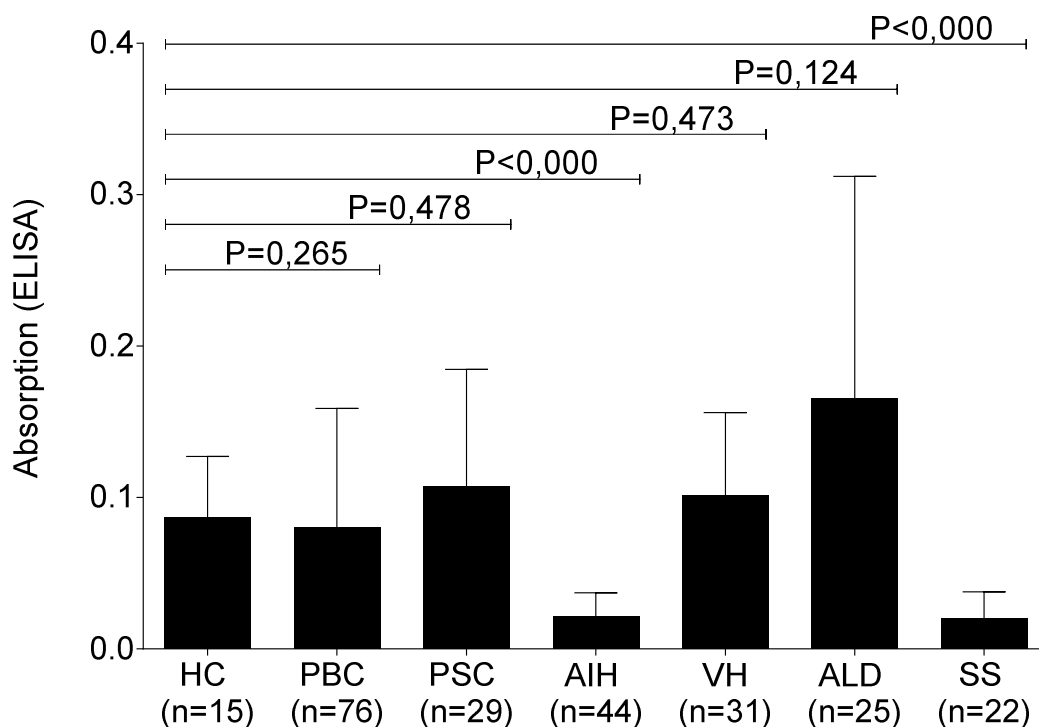


Abbildung 4.8-1: IgG-Reaktivität von Seren von Patienten mit PBC-, PSC-, AIH-, SS-, Virushepatitis (VH) und alkoholinduzierter Lebererkrankung (ALD) sowie von gesunden Probanden (HC) mit dem full length mAChR3 Protein, nachgewiesen mittels ELISA [Absorption der optischen Dichte (OD)]. p = Signifikanzlevel; als signifikant gilt $p < 0,05$.

In Tabelle 4.8-1 sind die Unterschiede der IgG-Antikörperbindungen der jeweiligen Patientengruppen dargestellt. Seren von Patienten mit AIH und SS zeigten eine signifikant geringere Reaktion mit dem full length mAChR3 Protein als Seren von Patienten mit PBC, PSC, Virushepatitis oder mit alkoholinduzierten Lebererkrankungen. Jedoch liegt kein signifikanter Unterschied in der Antikörperbindung zwischen den AIH- und SS-Patienten vor.

Tabelle 4.8-1: Unterschied der IgG-Antikörperbindung an das full length mAChR3 Protein innerhalb der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden. Hervorgehoben sind P-Werte < 0,05.

vs	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
HC	0,265	0,478	<0,001	0,473	0,124	<0,001
PBC	-	0,062	0,002	0,036	0,002	0,009
PSC	-	-	<0,001	0,988	0,254	<0,001
AIH	-	-	-	<0,001	<0,001	0,798
VH	-	-	-	-	0,165	<0,001
ALD	-	-	-	-	-	<0,001

4.8.2 Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Antigen in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Die IgM-Antikörperbindung an das full length mAChR3 Protein ist in Abbildung 4.8-2 dargestellt. Wieder wiesen Seren von Patienten mit alkoholinduzierten Lebererkrankungen die höchste Reaktion mit dem full length mAChR3 Protein auf. Patienten mit AIH, Virushepatitis und SS zeigen eine geringfügig höhere Antikörperbindung als gesunde Probanden. Wie zuvor bei den IgG-Antikörpern gibt es auch für die IgM-Reaktion keinen signifikanten Unterschied zwischen PBC-Patienten und gesunden Probanden. Nur für Seren von Patienten mit Virushepatitis, SS und ALD wurden signifikant höhere Reaktionen mit dem full length mAChR3 beobachtet als mit Seren gesunder Probanden.

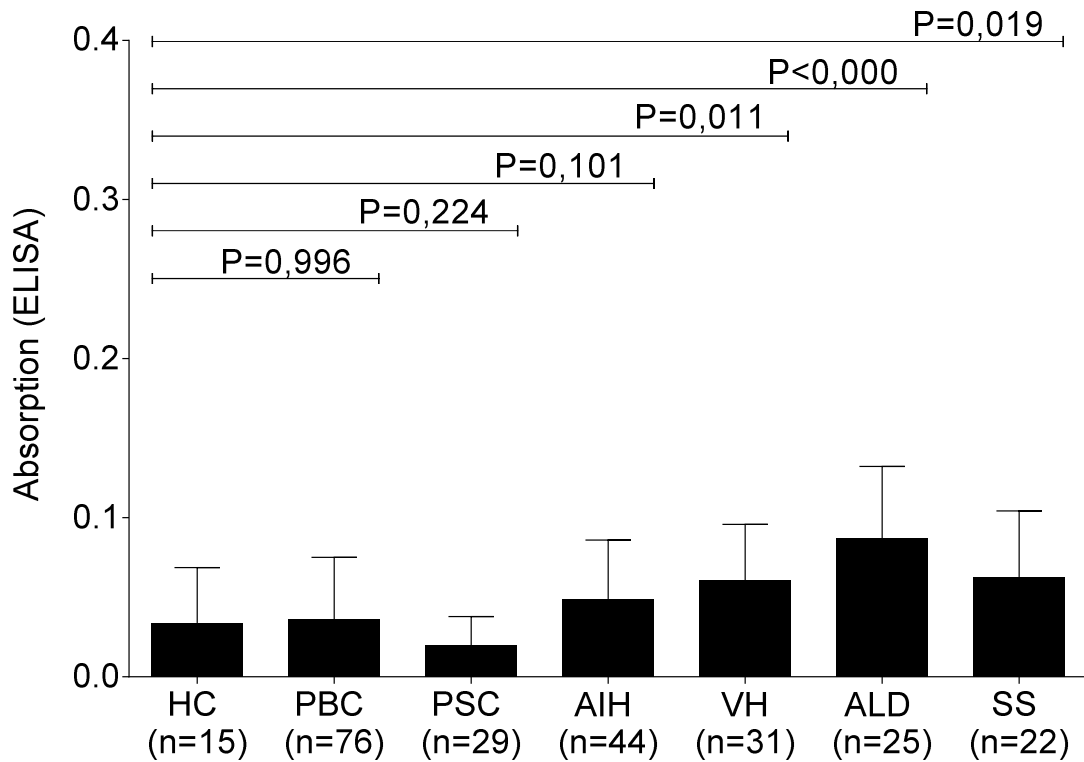


Abbildung 4.8-2: IgM-Reaktivität von Seren von Patienten mit PBC-, PSC-, AIH-, SS-, Virushepatitis (VH) und alkoholinduzierter Lebererkrankung (ALD) sowie von gesunden Probanden (HC) mit dem full length mAChR3 Protein, nachgewiesen mittels ELISA. [Absorption der optischen Dichte (OD)]. p = Signifikanzlevel; als signifikant gilt $p < 0,05$.

Bei dem Vergleich der IgM-Antikörperbindung der jeweiligen Patientengruppen zueinander zeigt sich, dass Patientenserum von alkoholinduzierten Lebererkrankungen eine signifikant höhere Reaktivität gegenüber dem full length mAChR3-Protein aufweisen als Patienten mit PBC-, PSC-, AIH- oder Virushepatitis (Tabelle 4.8-2). Gleichzeitig ist die IgM-Antikörperbindung an das mAChR3 Antigen von AIH-, VH- und SS-Patientenserum signifikant höher als die von PBC- und PSC-Patientenserum.

Tabelle 4.8-2: Unterschied der IgM-Antikörperbindung an das full length mAChR3 Protein innerhalb der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden. Hervorgehoben sind P-Werte < 0,05.

vs	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
HC	0,996	0,224	0,101	0,011	<0,001	0,019
PBC	-	0,073	0,014	<0,001	<0,001	0,002
PSC	-	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
AIH	-	-	-	0,110	<0,001	0,221
VH	-	-	-	-	0,039	0,957
ALD	-	-	-	-	-	0,072

Neben dem zuvor dargestellten Unterschied der IgG- und IgM-Antikörperreaktivität ist in Tabelle 4.8-3 überdies die Häufigkeit der IgG- und IgM-Antikörper gegen das full length mAChR3 Protein innerhalb der Patientenkollektive und bei gesunden Probanden zusammengefasst. Lediglich Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung hatten signifikant häufiger IgG-Antikörper gegen das full length mAChR3 Protein als gesunde Probanden, für alle anderen Patientengruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.8-3: Häufigkeit von IgG- und IgM-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Protein bei Patienten mit PBC, PSC, AIH, VH und ALD sowie bei gesunden Probanden.

Diagnose	Anzahl getestet	Häufigkeit (%) von AAK gegen fl mAChR3			
		IgG		IgM	
HC	15	1	(7)	1	(7)
PBC	76	11	(14)	5	(7)
PSC	29	3	(10)	0	
AIH	44	0		5	(11)
VH	31	5	(16)	5	(16)
ALD	25	11	(44)*	7	(28)
SS	22	0		4	(18)

(*) signifikant gegenüber den HC (p < 0,05)

4.8.3 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von PBC-Patienten

In Abbildung 4.8-3 ist die IgG-Reaktivität von 76 PBC-Patientenseren gegenüber den 35 mAChR3 Peptiden dargestellt. Zu beobachten ist eine starke Reaktion mit dem Peptid 52-76 sowie den nachfolgenden Peptiden bis zu dem Peptid 205-229. Ferner reagieren die Seren mit den Peptiden 287-311, 355-379 und 457-481 sowie den C-terminalen Peptiden ab Peptid 559-583 und folgende.

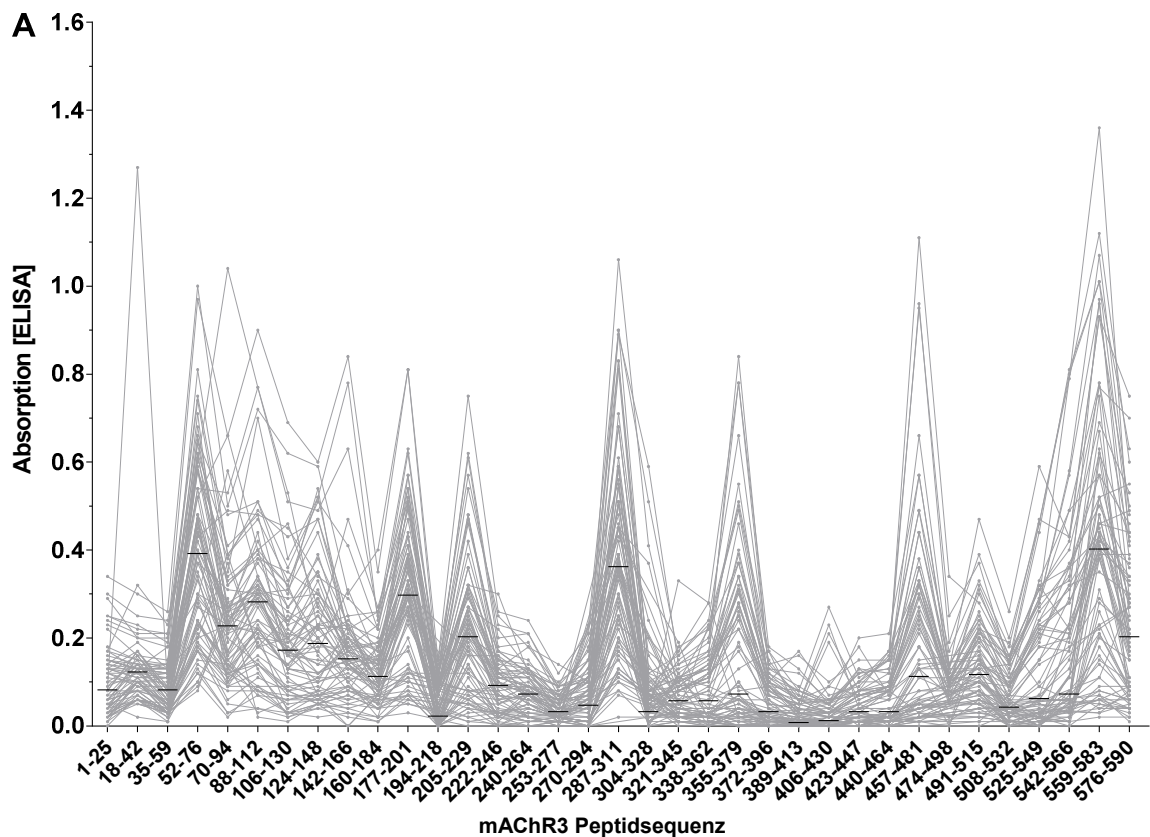


Abbildung 4.8-3: IgG-Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten mit 35 mAChR3 Peptiden. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

Die IgM-Antikörperreaktivität der 76 PBC-Seren gegenüber den unterschiedlichen Peptiden ist in Abbildung 4.8-4 dargestellt. Die stärkste Reaktion findet sich mit den Peptiden 52 - 76, 88 - 112, 177 - 184, 457 - 481, 542 - 566 und insbesondere dem Peptid 287 - 311.

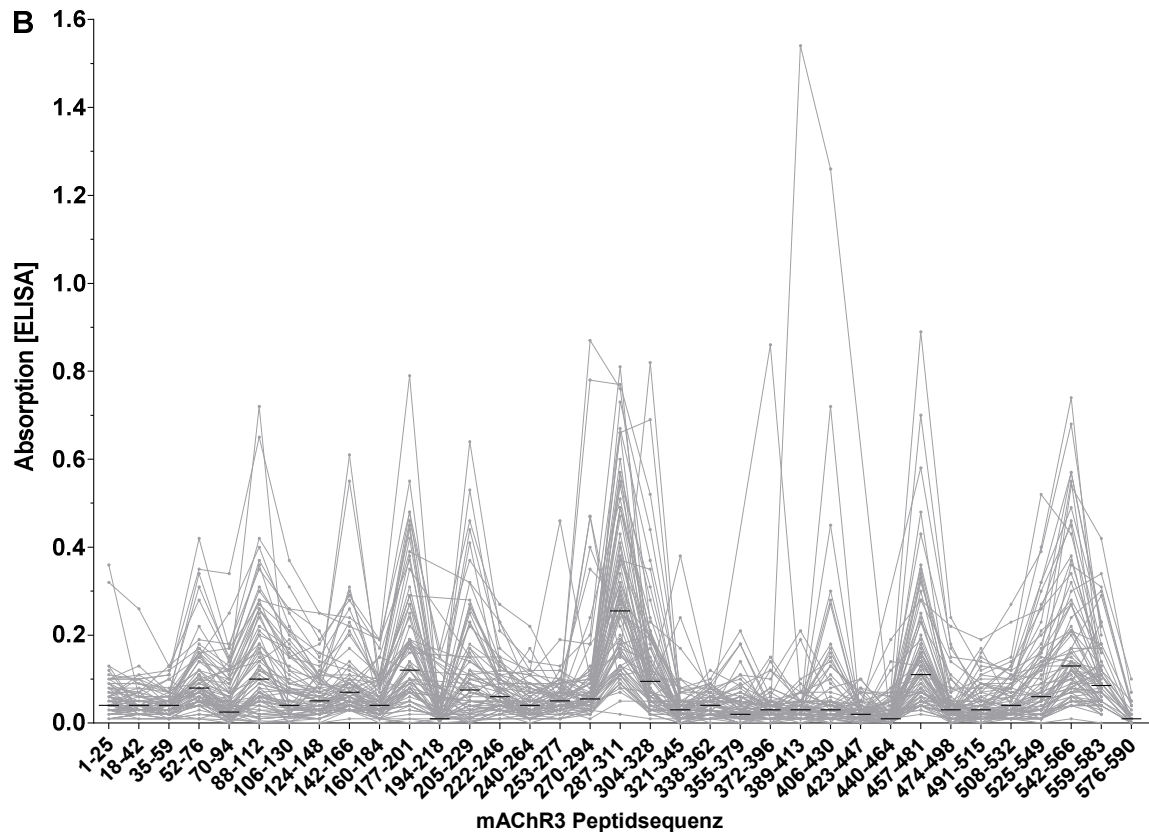


Abbildung 4.8-4: IgM-Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.4 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von PSC-Patienten

Auch Seren von PSC-Patienten zeigen eine starke IgG-Reaktivität gegenüber den Peptiden 52 - 76, 88 - 112 und 287 - 311 (Abbildung 4.8-5, A). Eine verstärkte IgM-Reaktivität war insbesondere gegen die Peptide 287-311, 487-481 und 559-583 festzustellen (Abbildung 4.8-5, B).

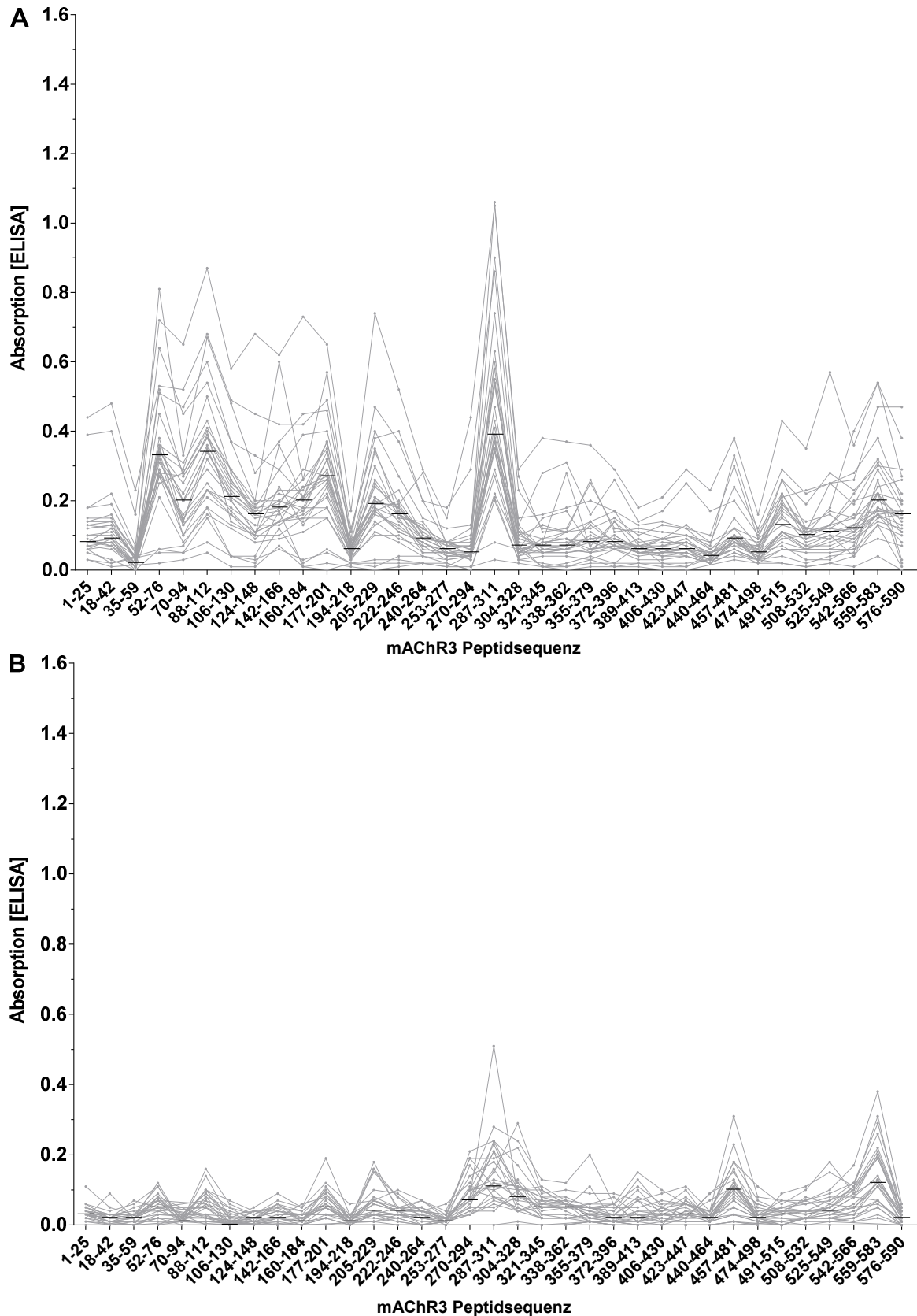
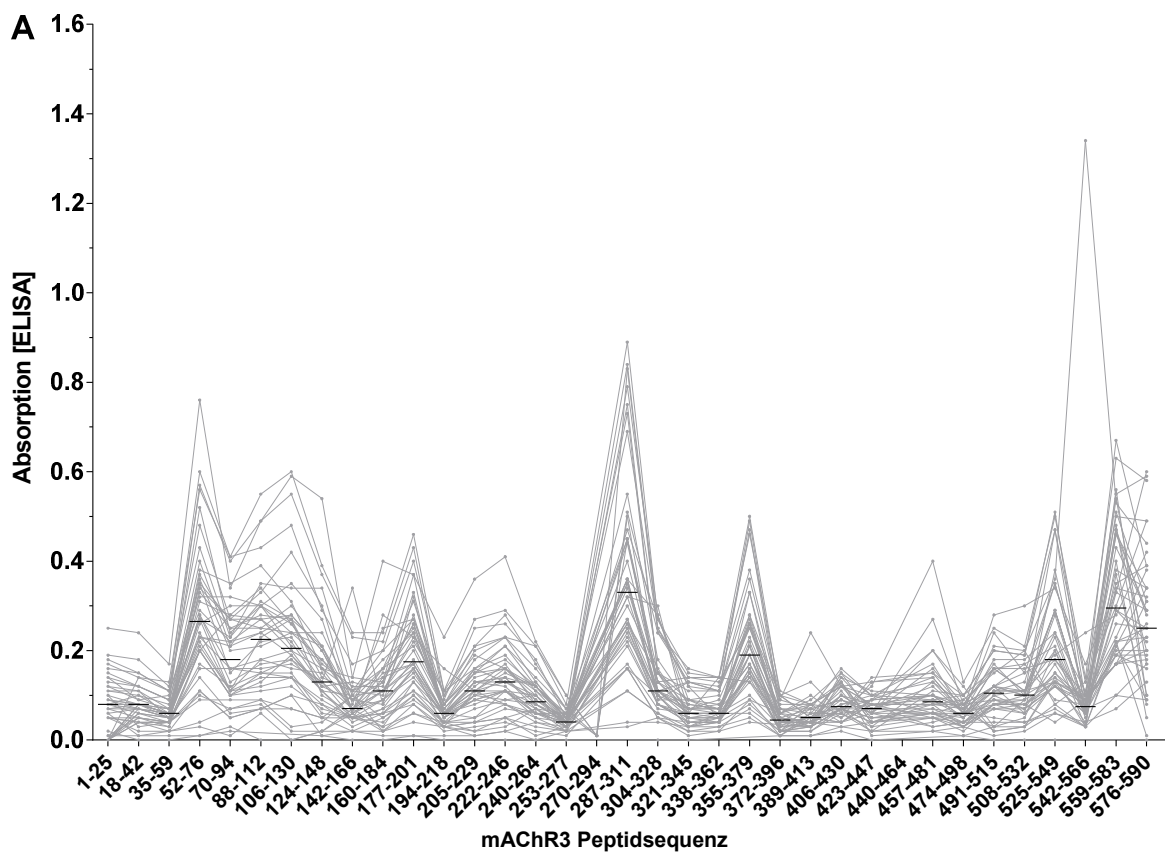


Abbildung 4.8-5: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 29 PSC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.5 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von AIH-Patienten

IgG- und IgM-Antikörper in Seren von 44 AIH-Patienten weisen eine ähnliche Affinität zu den mAChR3 Peptiden auf wie PBC- und PSC-Seren. Wieder werden die Peptide 287-311 und 559-583 am stärksten von beiden Antikörper-Subtypen erkannt (Abbildung 4.8-6, A und B). IgG-Antikörper reagieren zudem mit dem Peptid 52-76 sowie den darauffolgenden Peptide bis zu Peptid 177-201 (Abbildung 4.8-6, A).



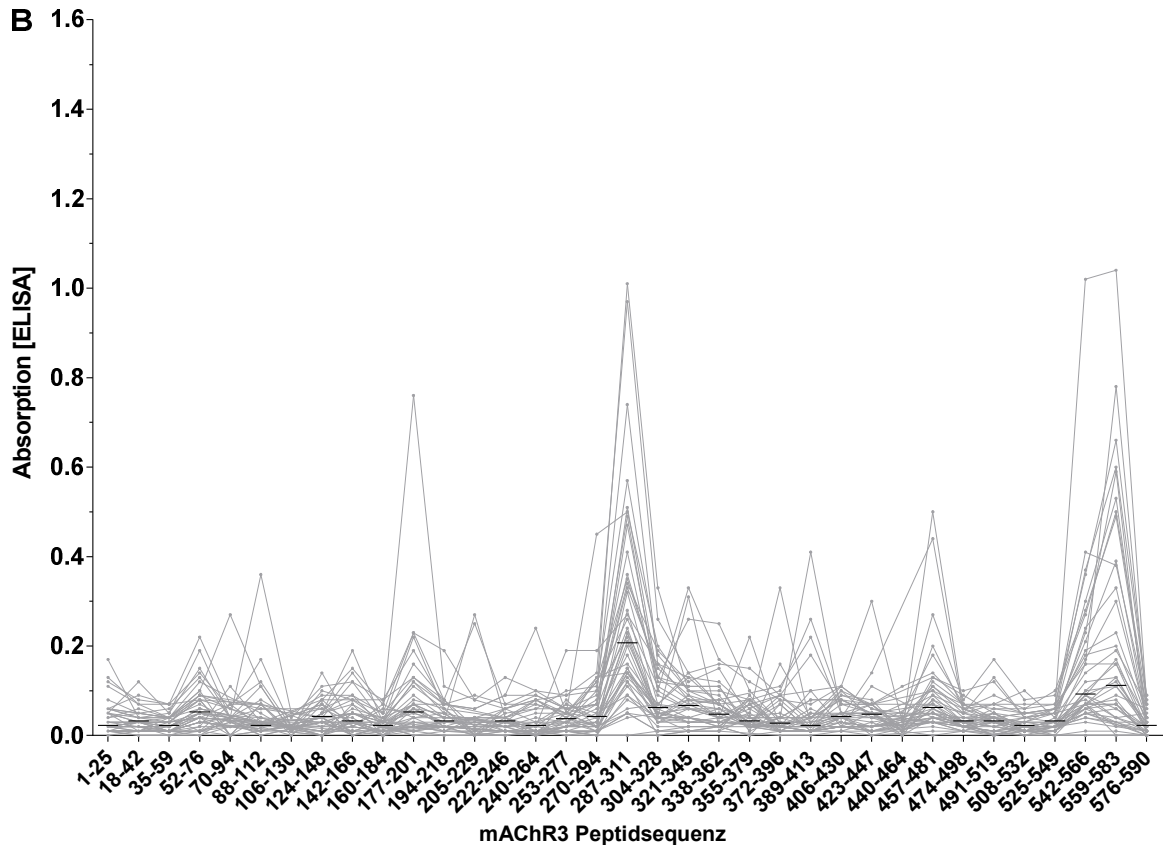


Abbildung 4.8-6: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 44 AIH-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.6 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit Virushepatitis

Eine ähnliche IgG-Reaktivität mit den mAChR3 Peptiden wie die Seren von Patienten mit PBC, PSC und AIH zeigten auch Seren von Patienten mit Virushepatitis, d.h. sie reagierten insbesondere mit den Peptiden 52-76, 355-379, 457-481 und 287-311 (Abbildung 4.8-7, A). Zusätzlich ist eine diffuse Bindung mit verschiedenen Peptiden am C-Terminus zu erkennen. IgM-Antikörper waren bei Patienten mit Virushepatitis insbesondere gegen die zwei Peptide 287-311 und 559-583 gerichtet (Abbildung 4.8-7, B).

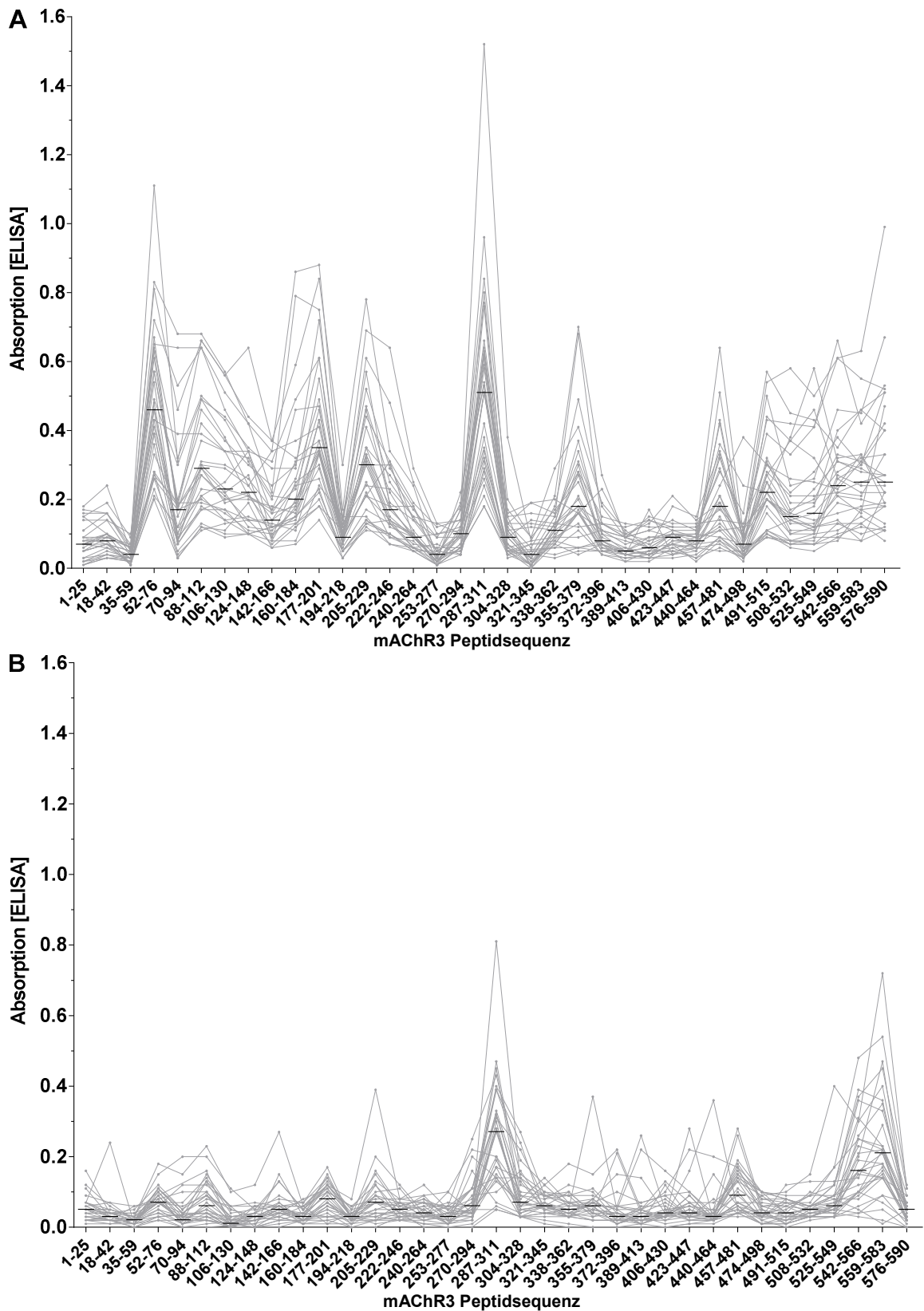
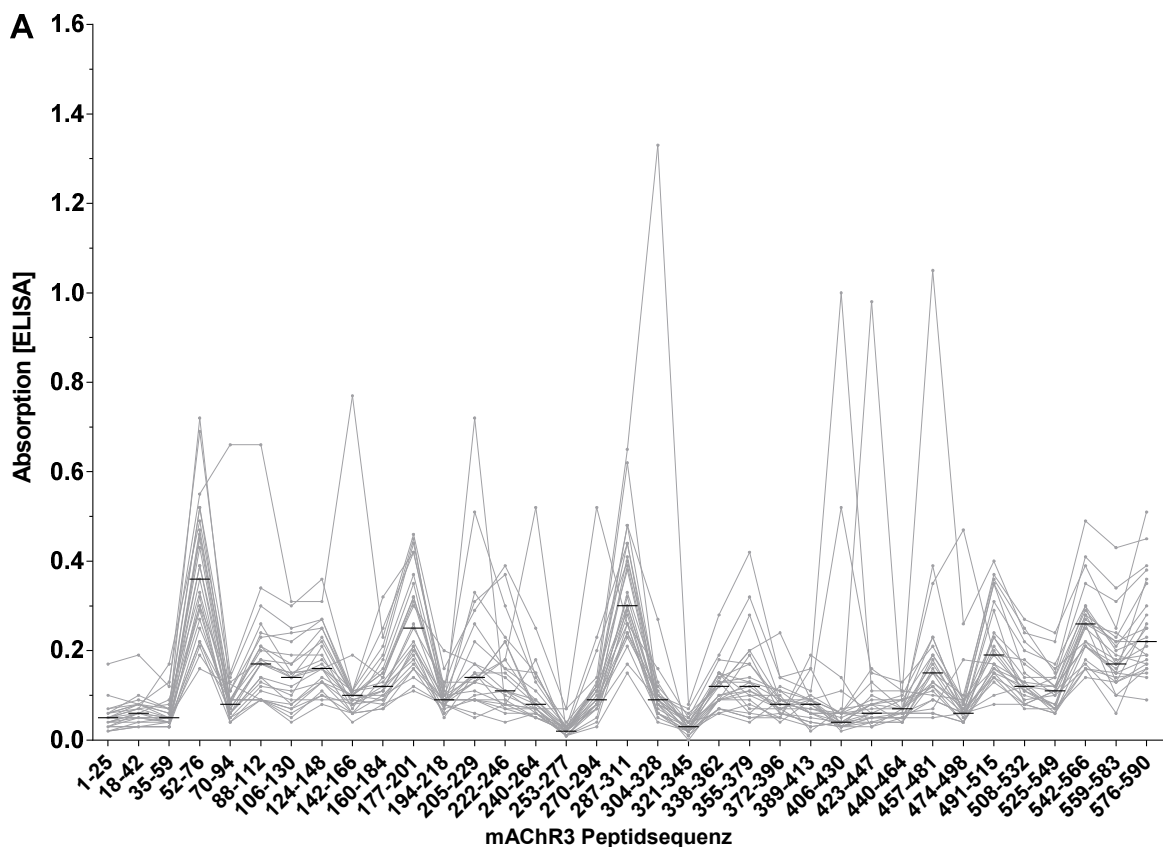


Abbildung 4.8-7: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 31 Patienten mit Virushepatitis gegen 35 mACHR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.7 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung

Die Seren von Patienten mit alkoholinduzierten Lebererkrankungen wiesen eine stärkere Übereinstimmung der IgG- und IgM-Antikörperbindung an die 35 verschiedenen Peptidsequenzen auf, als dies bei den Patienten mit anderen Lebererkrankungen zu beobachten war. Die stärksten Reaktionen waren mit den Peptiden 52-76, 172-201, 287-311 und 542-566 zu beobachten, wobei die IgM-Antikörper (Abbildung 4.8-8, B) eine weitaus diffusere Reaktivität zu den Peptiden aufwiesen als die IgG-Antikörper (Abbildung 4.8-8, A).



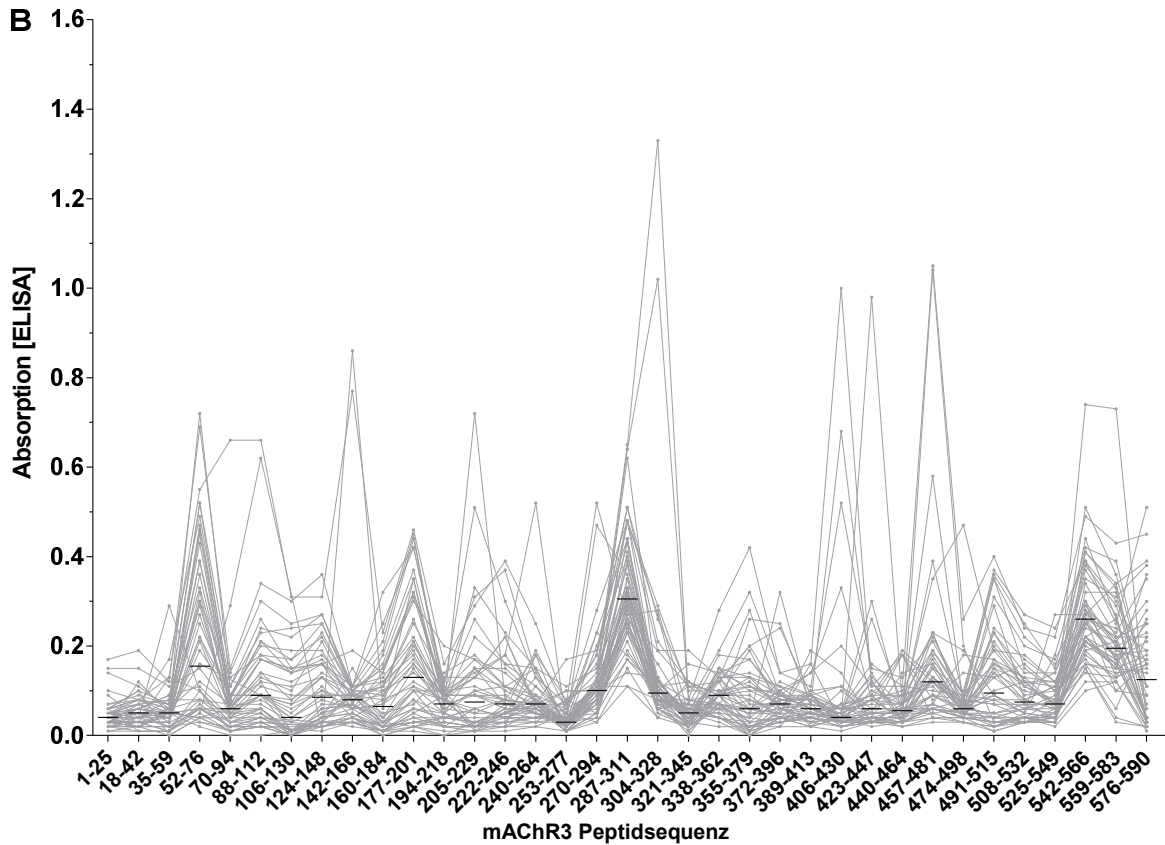


Abbildung 4.8-8: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 25 Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.8 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von Patienten mit primärem Sjögren Syndrom

Die deutlichste IgG- und IgM-Antikörperbindung der SS-Patientenserum ist an die Peptide 287-311 und 559-583 zu beobachten (Abbildung 4.8-9, A und B). Darüber hinaus ist eine starke Reaktion der IgG-Antikörper mit den Peptiden 52-76 bis 172-201 zu erkennen.

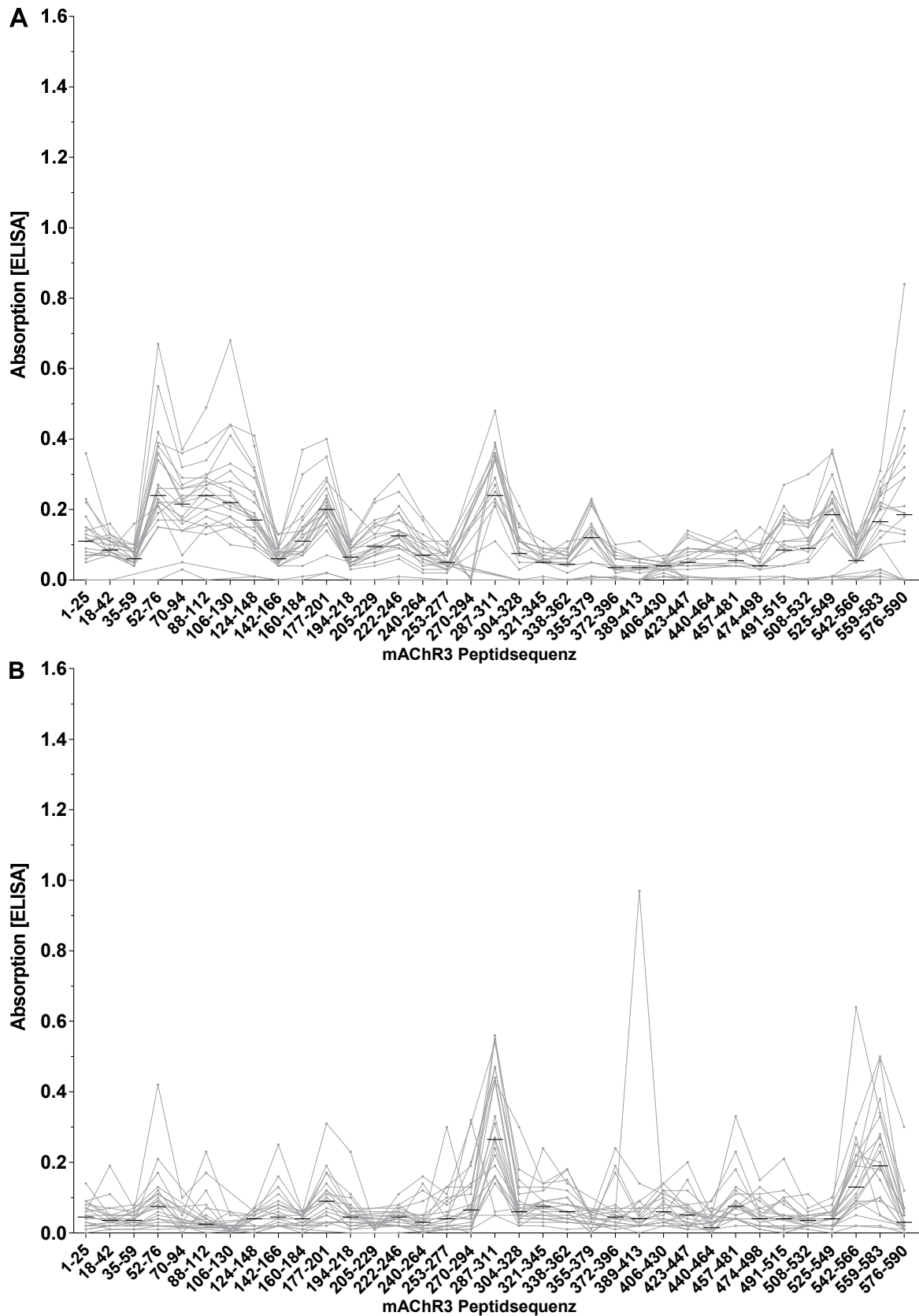
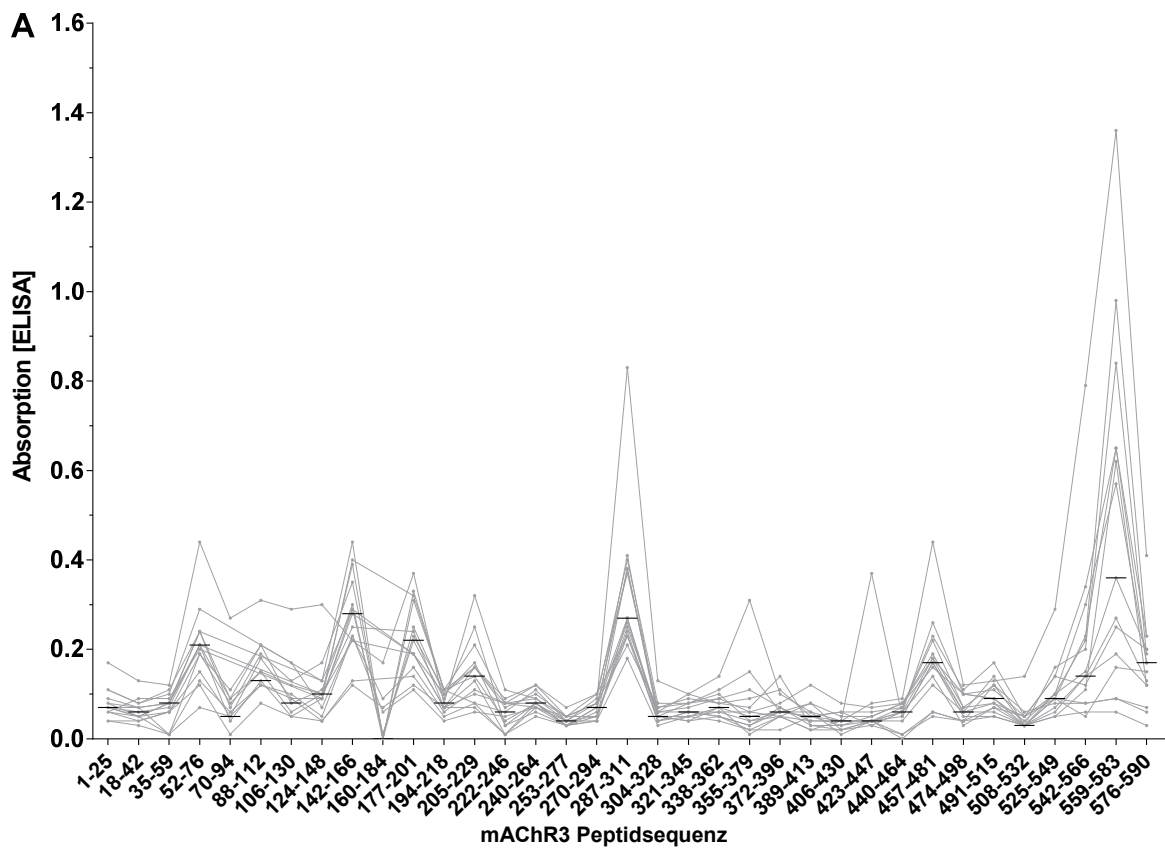


Abbildung 4.8-9: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 22 Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom gegen 35 mACHR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.9 Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3 Peptide in Seren von gesunden Probanden

Auch Seren von gesunden Probanden haben IgG-Antikörper gegen verschiedene Peptide, insbesondere gegen die Peptide 52-76, 142-155, 177-201, 287-311, 457-481 und 559-583 (Abbildung 4.8-10, A). Hingegen konnte so gut wie keine IgM-Antikörperbindung an die mAChR3 Peptide ermittelt werden (Abbildung 4.8-10, B).



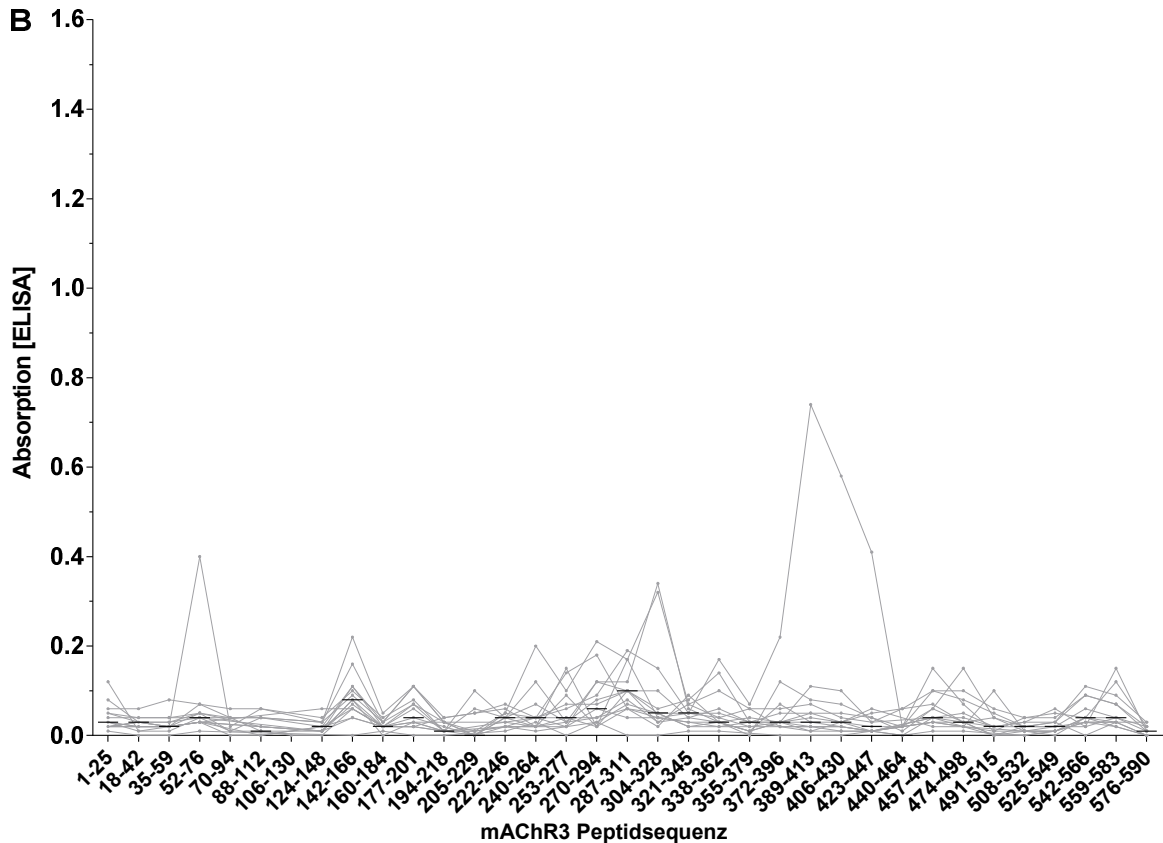


Abbildung 4.8-10: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 15 gesunden Probanden gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

4.8.10 Häufigkeit von Antikörpern gegen die einzelnen mAChR3 Peptide bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden

Wie die vorausgegangen Ergebnisse zeigen, weisen Patientenserum und Seren von gesunden Probanden eine verstärkte Reaktivität der IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen ähnliche mAChR3 Peptide auf. Um daher eine besonders hohe Antikörperbindung an ein Epitop zu identifizieren, wurde mit Hilfe der Seren der gesunden Probanden aus dem Mittelwert der Absorption plus doppelter Standardabweichung ein Normwert bestimmt. In den Tabelle 4.8-4 und Tabelle 4.8-5 sowie den Heatmaps in Abbildung 4.8-11 und Abbildung 4.8-12 sind die Häufigkeiten der IgG- und IgM-Antikörper gegen die einzelnen Peptide in Seren von PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-, SS-Patienten und gesunde Probanden dargestellt.

Tabelle 4.8-4: Häufigkeit von IgG-Antikörpern gegen die 35 Peptide des mAChR3 bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, Sjögren Syndrom und bei gesunden Probanden.

Peptide	HC	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
	Anzahl (%) positiv						
1-25	1 (7)	20 (26)	5 (17)	14 (6)	5 (16)	1 (4)	6 (27)
18-42	1 (7)	39 (51)	12 (41)	20 (9)	7 (23)	1 (4)	5 (23)
35-59	0 (0)	11 (14)	2 (7)	2 (1)	0 (0)	1 (4)	1 (5)
52-76	1 (7)	39 (51)	7 (24)	20 (9)	21 (68)	12 (48)	5 (23)
70-94	1 (7)	36 (47)	12 (41)	36 (16)	8 (26)	1 (4)	9 (41)
88-112	0 (0)	20 (26)	13 (45)	11 (5)	12 (39)	1 (4)	2 (9)
106-130	1 (7)	19 (25)	8 (28)	30 (13)	14 (45)	2 (8)	7 (32)
124-148	1 (7)	26 (34)	4 (14)	18 (8)	14 (45)	6 (24)	7 (32)
142-166	0 (0)	4 (5)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)
160-184	1 (7)	32 (42)	24 (83)	36 (16)	27 (87)	12 (48)	10 (45)
177-201	0 (0)	23 (30)	5 (17)	7 (3)	13 (42)	5 (20)	1 (5)
194-218	0 (0)	3 (4)	1 (3)	5 (2)	6 (19)	2 (8)	1 (5)
205-229	1 (7)	21 (28)	7 (24)	2 (1)	17 (55)	4 (16)	0 (0)
222-246	0 (0)	22 (29)	20 (69)	52 (23)	24 (77)	12 (48)	13 (59)
240-264	0 (0)	14 (18)	7 (24)	23 (10)	11 (35)	7 (28)	3 (14)
253-277	1 (7)	15 (20)	12 (41)	11 (5)	7 (23)	2 (8)	7 (32)
270-294	0 (0)	12 (16)	4 (14)	0 (0)	11 (35)	11 (44)	0 (0)
287-311	1 (7)	10 (13)	5 (17)	16 (7)	7 (23)	1 (4)	0 (0)
304-328	1 (7)	10 (13)	9 (31)	57 (25)	13 (42)	7 (28)	9 (41)
321-345	0 (0)	16 (21)	7 (24)	23 (10)	6 (19)	0 (0)	1 (5)
338-362	1 (7)	18 (24)	5 (17)	9 (4)	10 (32)	8 (32)	0 (0)
355-379	1 (7)	27 (36)	3 (10)	39 (17)	12 (39)	3 (12)	2 (9)
372-396	1 (7)	8 (11)	7 (24)	0 (0)	9 (29)	3 (12)	0 (0)
389-413	1 (7)	4 (5)	5 (17)	7 (3)	5 (16)	5 (20)	1 (5)
406-430	1 (7)	7 (9)	10 (34)	50 (22)	11 (35)	4 (16)	0 (0)
423-447	1 (7)	0 (0)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)
440-464	0 (0)	12 (16)	2 (7)	0 (0)	5 (16)	1 (4)	0 (0)

Peptide	HC	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
	Anzahl (%) positiv						
457-481	1 (7)	11 (14)	1 (3)	2 (1)	4 (13)	2 (8)	0 (0)
474-498	0 (0)	7 (9)	1 (3)	2 (1)	3 (10)	3 (12)	1 (5)
491-515	1 (7)	25 (33)	12 (41)	18 (8)	23 (74)	16 (64)	6 (27)
508-532	1 (7)	19 (25)	12 (41)	45 (20)	22 (71)	19 (76)	9 (41)
525-549	1 (7)	19 (25)	5 (17)	39 (17)	10 (32)	1 (4)	5 (23)
542-566	1 (7)	6 (8)	0 (0)	2 (1)	3 (10)	0 (0)	0 (0)
559-583	1 (7)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
576-590	1 (7)	19 (25)	2 (7)	23 (10)	10 (32)	6 (24)	5 (23)

In der Tabelle 4.8-4 und dem dazugehörigen Heatmap (Abbildung 4.8-11) wird deutlich, dass die IgG-Antikörper am häufigsten gegen die Peptide 160-184 (Zytoplasmatischer loop Nr.2), 222-246 (Transmembranregion), 304-328 (Zyto loop Nr.3), 491-515 (Transmembranregion) und 508-532 (Extrazellulärer loop Nr.3) gerichtet sind. Insgesamt weisen PBC- und VH-Seren die meisten und SS- und AIH-Seren die geringsten IgG-Antikörperbindungen an die mAChR3 Peptide auf. Interessant ist auch, dass in den vorausgegangen Ergebnissen 4.8.3ff die IgG-Reaktivität der Patientenseren gegen das Peptid 559-583 (C-Terminus) am höchsten war, da aber auch Seren von gesunden Probanden relativ stark reagierten, waren durch den hohen Normwert diese Reaktionen nicht mehr als positiv zu werten bzw. vollständig aufgehoben.

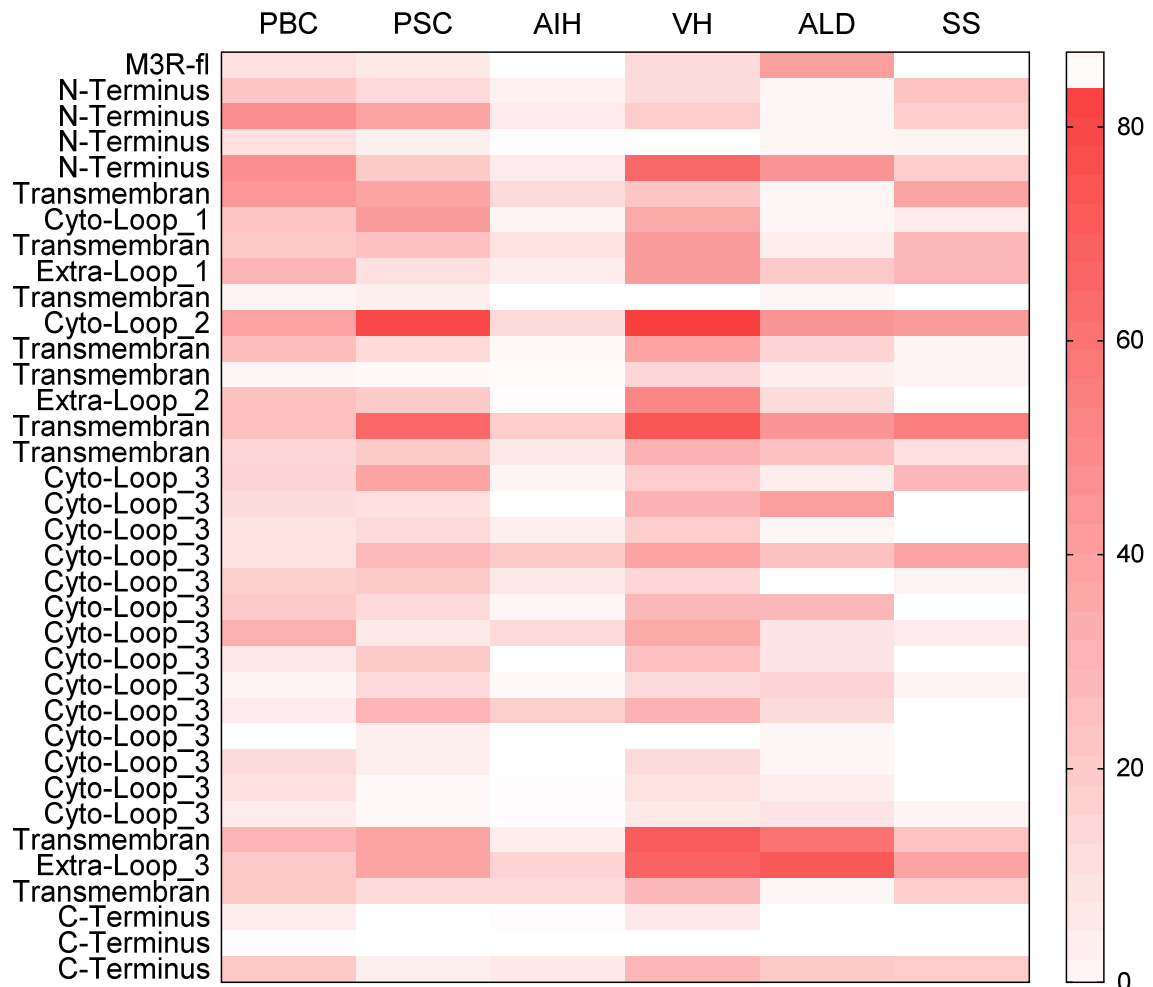


Abbildung 4.8-11: Darstellung der Häufigkeit von IgG-Antikörpern in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen gegen unterschiedliche Bereiche des mAChR3 in Form einer ‚Heatmap‘ basierend auf den in Tabelle 4.8-4 ermittelten Häufigkeiten.

In der Tabelle 4.8-5 ist zu erkennen, dass PBC-Patienten insgesamt häufiger IgM- als IgG-Antikörper gegen verschiedene Peptide haben. Ferner haben Seren von Patienten mit PSC, AIH, VH, ALD und SS häufiger IgM-Antikörper gegen die Peptide 106-130 (Transmembran), 287-311, 457-481, 508-532 (extrazellulärer loop Nr. 3) sowie die Peptide des gesamten C-Terminus als gesunde Probanden.

Tabelle 4.8-5: Häufigkeit von IgM-Antikörpern gegen die 35 Peptide des mAChR3 bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, Sjögren Syndrom und bei gesunden Probanden.

Peptide	HC	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
	Anzahl (%) positiv						
1-25	1 (7)	9 (12)	1 (3)	9 (4)	3 (10)	2 (8)	5 (1)
18-42	1 (7)	23 (30)	1 (3)	16 (7)	4 (13)	6 (24)	23 (5)
35-59	1 (7)	15 (20)	1 (3)	7 (3)	0 (0)	5 (20)	18 (4)
52-76	1 (7)	5 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (1)
70-94	0 (0)	24 (32)	0 (0)	11 (5)	4 (13)	3 (12)	5 (1)
88-112	0 (0)	43 (57)	9 (31)	14 (6)	14 (45)	4 (16)	18 (4)
106-130	0 (0)	50 (66)	17 (59)	25 (11)	25 (81)	15 (60)	45 (10)
124-148	1 (7)	36 (47)	0 (0)	27 (12)	5 (16)	2 (8)	27 (6)
142-166	1 (7)	12 (16)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	1 (4)	5 (1)
160-184	0 (0)	32 (42)	3 (10)	18 (8)	8 (26)	2 (8)	36 (8)
177-201	0 (0)	37 (49)	1 (3)	18 (8)	5 (16)	2 (8)	23 (5)
194-218	0 (0)	8 (11)	1 (3)	34 (15)	5 (16)	8 (32)	50 (11)
205-229	1 (7)	37 (49)	5 (17)	7 (3)	11 (35)	2 (8)	0 (0)
222-246	0 (0)	35 (46)	4 (14)	9 (4)	7 (23)	3 (12)	18 (4)
240-264	1 (7)	2 (3)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	3 (12)	5 (1)
253-277	1 (7)	2 (3)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	1 (4)	5 (1)
270-294	1 (7)	8 (11)	2 (7)	2 (1)	3 (10)	4 (16)	14 (3)
287-311	0 (0)	43 (57)	7 (24)	50 (22)	17 (55)	19 (76)	64 (14)
304-328	2 (13)	7 (9)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	1 (4)	5 (1)
321-345	0 (0)	5 (7)	4 (14)	30 (13)	5 (16)	9 (36)	23 (5)
338-362	1 (7)	0 (0)	0 (0)	9 (4)	1 (3)	0 (0)	14 (3)
355-379	0 (0)	10 (13)	3 (10)	23 (10)	10 (32)	3 (12)	0 (0)
372-396	1 (7)	1 (1)	0 (0)	2 (1)	2 (6)	2 (8)	14 (3)
389-413	1 (7)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (1)
406-430	1 (7)	3 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)
423-447	1 (7)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	1 (3)	2 (8)	0 (0)
440-464	1 (7)	8 (11)	3 (10)	2 (1)	5 (16)	7 (28)	14 (3)

Peptide	HC	PBC	PSC	AIH	VH	ALD	SS
	Anzahl (%) positiv						
457-481	1 (7)	33 (43)	7 (24)	16 (7)	12 (39)	6 (24)	14 (3)
474-498	1 (7)	6 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (12)	9 (2)
491-515	1 (7)	16 (21)	1 (3)	9 (4)	6 (19)	5 (20)	23 (5)
508-532	0 (0)	31 (41)	8 (28)	20 (9)	18 (58)	11 (44)	27 (6)
525-549	1 (7)	42 (55)	9 (31)	20 (9)	18 (58)	8 (32)	23 (5)
542-566	1 (7)	46 (61)	6 (21)	39 (17)	20 (65)	24 (96)	59 (13)
559-583	1 (7)	18 (24)	10 (34)	41 (18)	25 (81)	20 (80)	64 (14)
576-590	0 (0)	7 (22)	9 (31)	36 (16)	21 (68)	14 (56)	45 (10)

Im nachfolgenden Heatmap (Abbildung 4.8-12) wird deutlich, dass IgM-Antikörper in PBC-Seren insbesondere gegen Peptide der zytoplasmatischen Schleifen Nr. 1 und Nr. 2 und aller drei extrazellulären Loops, aber auch gegen transmembranöse Regionen gerichtet sind. Seren von Patienten mit PSC-, AIH- und SS haben im Vergleich zu den anderen Patientengruppen seltener IgM- als IgG-Antikörper. IgM-Antikörper in Seren von Patienten mit Virushepatitis reagieren überwiegend mit Peptiden des zytoplasmatischen Loop Nr. 2, des dritten extrazellulären Loop und dem C-terminalen Ende. Ebenfalls IgM-Antikörper aus dem Serum von Patienten mit ALD reagieren deutlich gegen Epitope am C-Terminus. Zusätzlich fällt auf, dass IgM-Antikörper von PBC-, PSC-, VH- und ALD-Patienten die Transmembranregion (Peptid 106 - 130) zwischen dem zytoplasmatischen Loop Nr. 1 und dem extrazellulären Loop Nr. 1 sowie das Peptid 287 - 311, welches am dritten zytoplasmatischen Loop lokalisiert ist, bevorzugt binden.

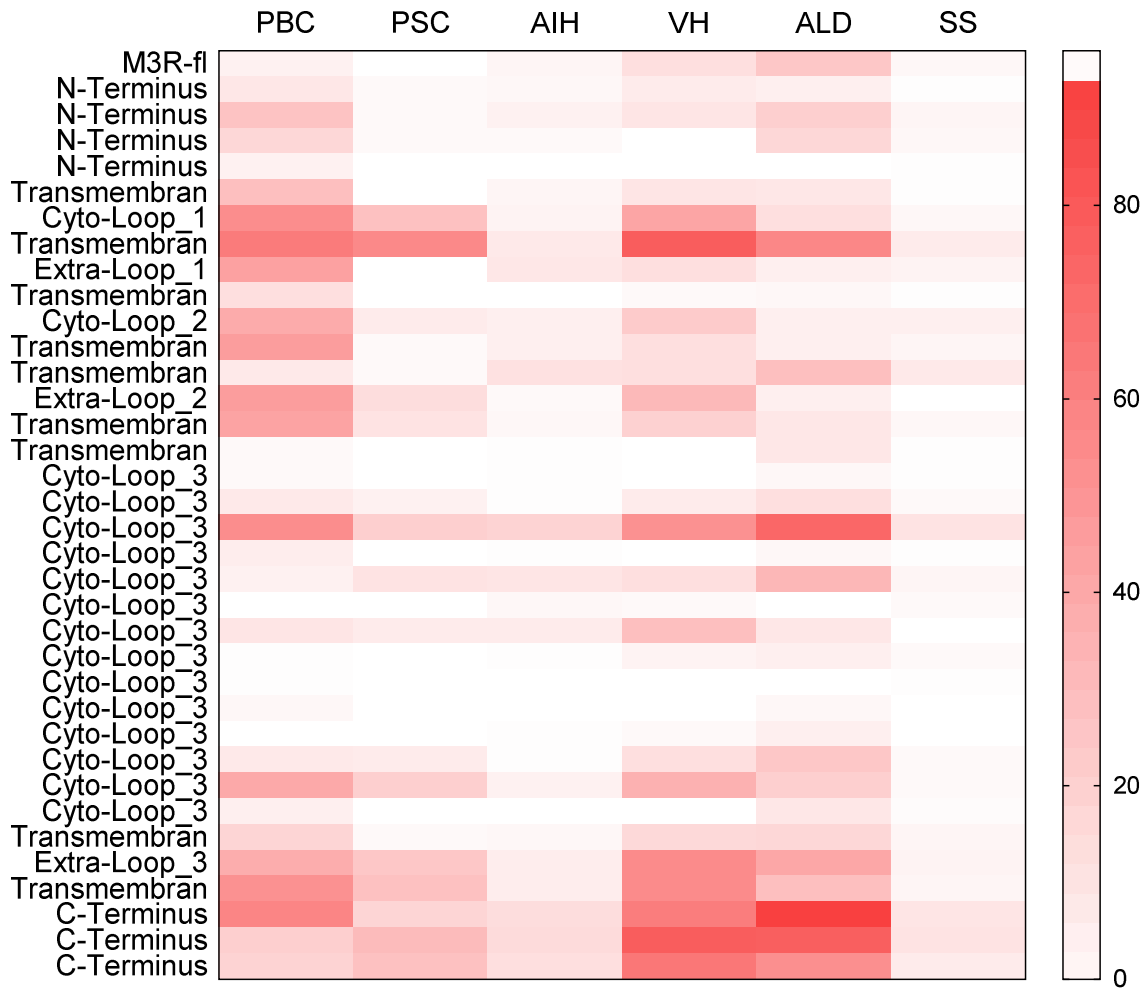


Abbildung 4.8-12: Darstellung der Häufigkeit von IgM-Antikörpern in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen gegen unterschiedliche Bereiche des mAChR3 in Form einer ‚Heatmap‘ basierend auf den in Tabelle 4.8-5 ermittelten Häufigkeiten.

In Kapitel 4.3 wurde der Effekt von anti-mAChR3 Antikörpern auf die Funktion des Rezeptors auf TFK-1-Zellen untersucht, in Kapitel 4.8.10 die Reaktion der IgG- und IgM-Antikörper mit dem full length Antigen und den 35 Peptiden analysiert. In einem weiteren Schritt soll daher geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen Antikörpern besteht, die den nativen Rezeptor binden und seine Funktion beeinflussen und solchen, die eher lineare Strukturen im ELISA erkennen. Es wird deutlich, dass viele Seren die die mAChR3-Funktion im Lumineszenz Assay nicht beeinflussen dennoch mit einzelnen Peptiden des Rezeptors reagieren und vice versa, d. h. es besteht keine Korrelation zwischen dem Effekt der Ig’s auf die Rezeptorfunktionalität und dem Nachweis von AK gegen das full length mAChR3 Protein oder seine Peptide im ELISA (Daten nicht dargestellt, siehe Anhang 7.8).

4.9 Einfluss des mAChR3 auf die Proliferation von Patienten-PBMC

In weiteren Analysen sollte geklärt werden, ob die Inkubation von PBMC mit dem full length mAChR3 Antigen die Proliferation von PBMC beeinflusst. Im Vorfeld erfolgten Etablierungsarbeiten bezüglich des Einfrier- und Auftauprozesses der PMBC-Zellen, der Optimierung der Zellzahl und der Antikörper- und Antigenkonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass eine mAChR3-Konzentration $> 1 \mu\text{g/ml}$ einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte, weshalb die Lymphozytenstimulierung mit dem mAChR3 Antigen in den Verdünnungen $0,0001 \mu\text{g/ml}$, $0,001 \mu\text{g/ml}$, $0,01 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $1 \mu\text{g/ml}$ erfolgte. Die PBMC wurden wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben in Kultur genommen und mit dem Antigen behandelt. Die Dauer der Inkubation mit dem Antigen wurde aus vorherigen Studien der Arbeitsgruppe übernommen [175]. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Pokeweed ($10 \mu\text{g/ml}$) aktiviert, und als Nullkontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt.

PBMC von 21 PBC-, 20 PSC- und 21 AIH-Patienten sowie von 12 gesunden Probanden wurden - wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben - mit dem mAChR3 Antigen für 7 Tage inkubiert; anschließend wurde die Zellproliferation mittels ^3H -Thymidin uptake ermittelt. Die aufgeführten Ergebnisse sind als counts per minute (CPM) aufgezeigt.

4.9.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von gesunden Probanden

Inkubation der PBMC von gesunden Probanden mit dem full length mAChR3 Antigen hatte keinen Einfluss auf deren Proliferation, in niedrigen Konzentrationen wurde die Proliferation sogar eher inhibiert. Der Unterschied zu den unbehandelten PBMC war aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant (Abbildung 4.9-1).

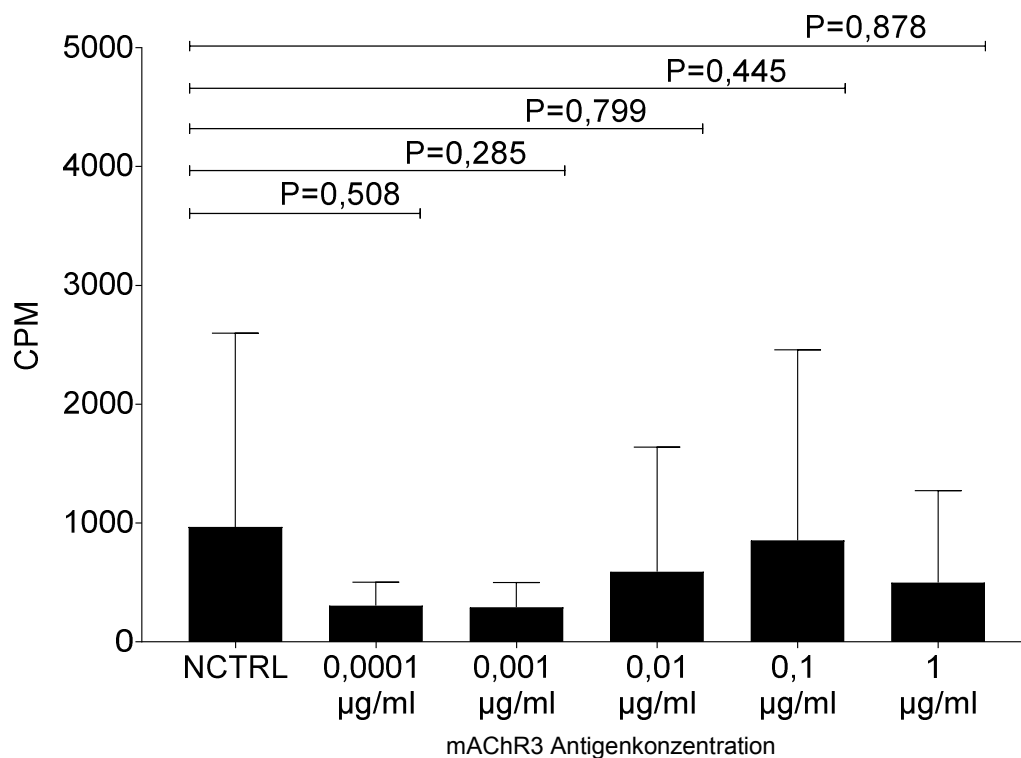


Abbildung 4.9-1: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 12 gesunden Probanden. Dargestellt ist der ³H-Thymidin uptake in counts per minute (CPM). NCTRL = unbehandelte Zellen. p = Signifikanzlevel; als signifikant gilt p < 0,05.

4.9.2 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von PBC-Patienten

Die Abbildung 4.9-2 zeigt die Ergebnisse der Zellproliferation von PBMC von PBC-Patienten nach 7-tägiger Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen in verschiedenen Konzentrationen. Es ist zu erkennen, dass keine signifikante Veränderung der Zellproliferation von PBMC durch das mAChR3 Antigen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ausgelöst wird, jedoch ist bereits die spontane Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten und behandelten Zellen von gesunden Probanden deutlich erhöht.

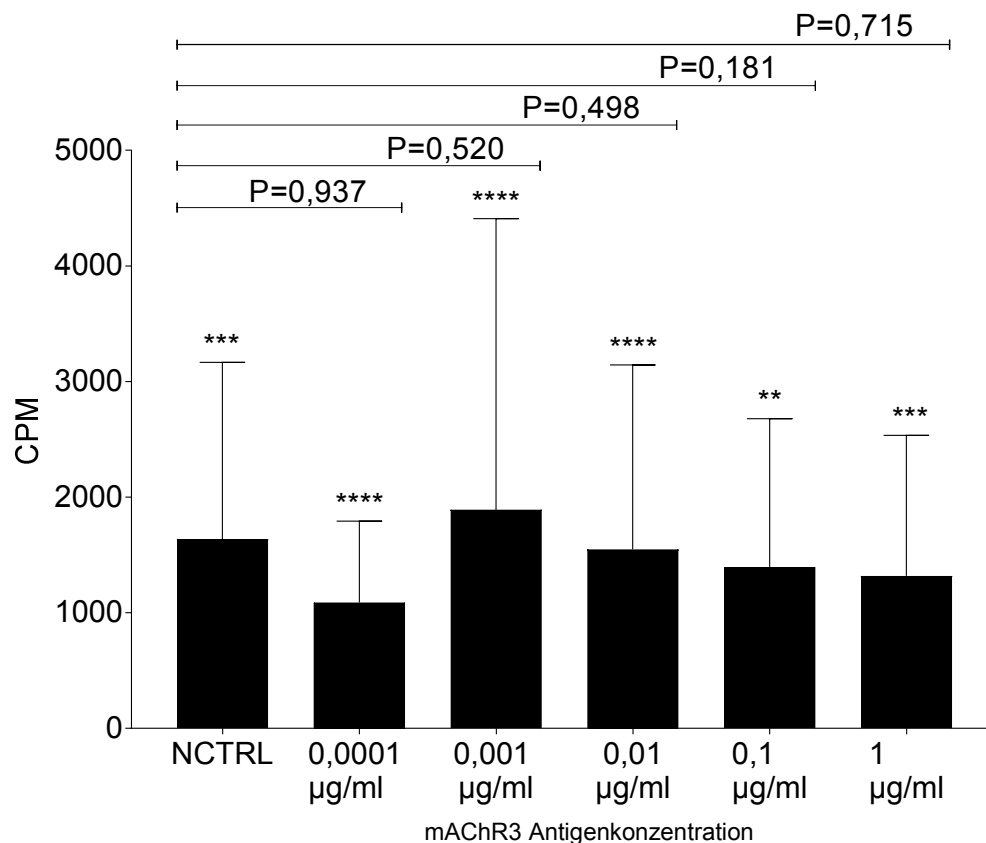


Abbildung 4.9-2: Einfluss des full-length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 21 PBC-Patienten. Dargestellt ist der ³H-Thymidin uptake in counts per minute (CPM). NCTRL = unbehandelte Zellen. Unterschiede zwischen PBC-Patienten und gesunden Probanden: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 und ****p ≤ 0,0001.

4.9.3 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von PSC-Patienten

Auch die PBMC von PSC-Patienten wiesen, wie bereits oben (Abbildung 4.9-2) für die PBMC von PBC-Patienten gezeigt, eine erhöhte Proliferationsrate auf im Vergleich zu PBMC von gesunden Probanden. Inkubation der PBMC mit mAChR3 hatte keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 4.9-3). Zwischen PBMC von PSC- und PBC-Patienten besteht kein signifikanter Unterschied.

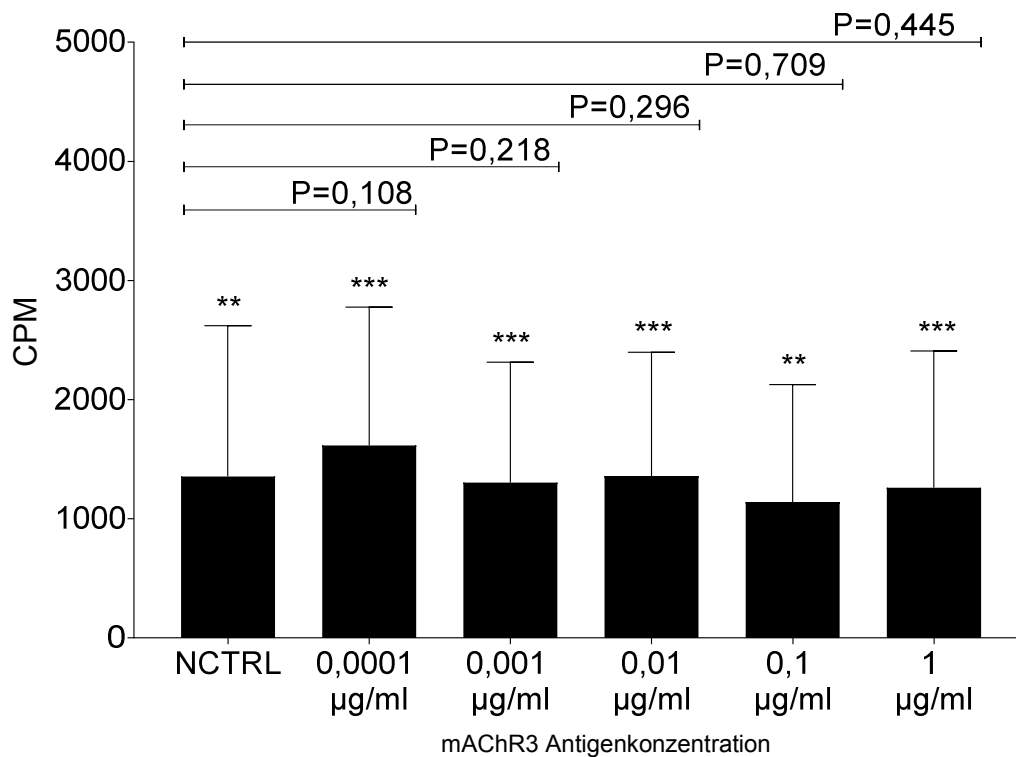


Abbildung 4.9-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 20 PSC-Patienten. Dargestellt ist der ³H-Thymidin uptake in counts per minute (CPM). NCTRL = unbehandelte Zellen. Unterschiede zwischen PSC-Patienten und gesunden Probanden: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 und ****p ≤ 0,0001.

4.9.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Proliferation von PBMC von AIH-Patienten

Bei der Analyse der Proliferation von PBMC von AIH-Patienten ist zu erkennen, dass die Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen in den Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml zu einem signifikanten Anstieg der Proliferationsrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen führt (Abbildung 4.9-4). Darüber hinaus lässt sich wiederum eine stärkere Proliferation der PBMCs von AIH-Patienten im Vergleich zu den von gesunden Probanden beobachten. Zudem proliferieren die PBMCs von AIH-Patienten nach der Antigeninkubation in den Konzentrationen 0,1 und 0,01 µg/ml signifikant stärker als die PBMC von PBC- und PSC-Patienten.

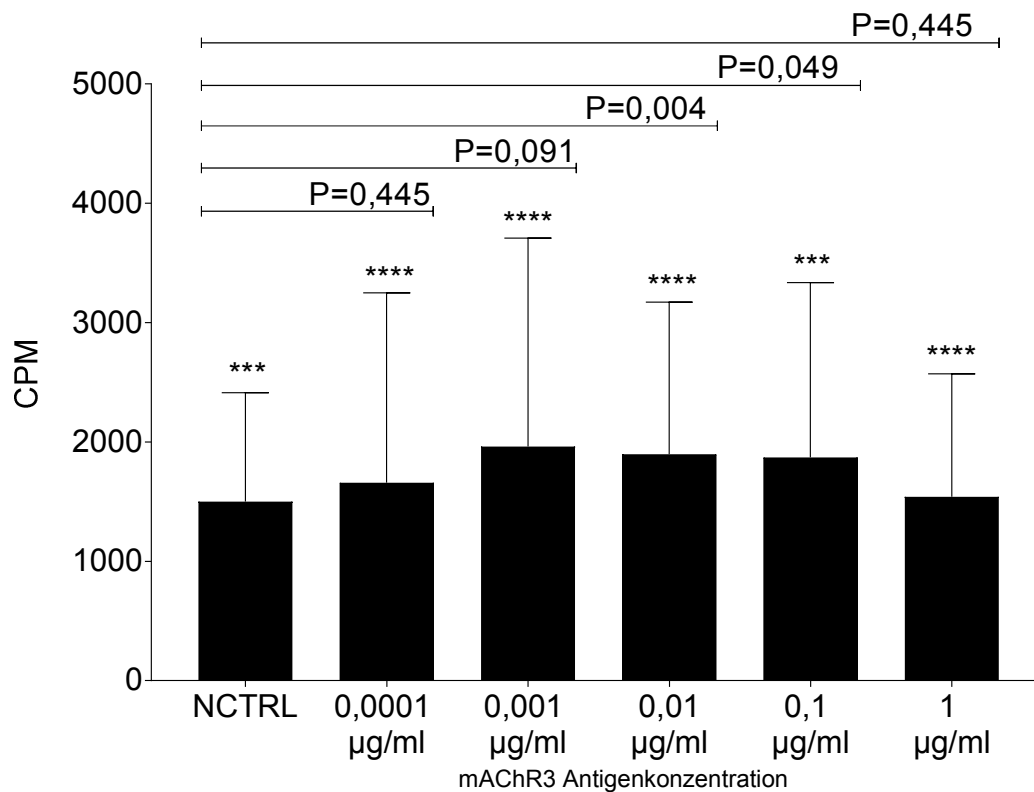


Abbildung 4.9-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 21 AIH-Patienten. Dargestellt ist der ³H-Thymidin uptake in counts per minute (CPM). NCTRL = unbehandelte Zellen. Unterschiede zwischen AIH-Patienten und gesunden Probanden: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 und ****p ≤ 0,0001.

4.10 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Aktivierung immunkompetenter Zellen

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mAChR3-spezifische Aktivierung auf die zelluläre Immunantwort zu analysieren. Hierfür wurden die PBMCs - wie zuvor in Kapitel 3.6.3 beschrieben - kultiviert und behandelt. B-, T-, und NK-Zellen von PBC-, PSC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden wurden nach der Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen mittels Durchflusszytometrie auf den Aktivierungsmarker CD69 untersucht.

4.10.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen von gesunden Probanden

Inkubation der PBMC von gesunden Probanden mit dem full length mAChR3 Antigen in verschiedenen Konzentrationen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die CD69-Expression von CD19⁺-, CD56⁺- und CD4⁺-Zellen. Allerdings führte die Inkubation der PBMC mit dem full length mAChR3 Antigen in einer Konzentration von 0,01 µg/ml zu einer signifikanten Aktivierung von CD8⁺-Zellen (Abbildung 4.10-1).

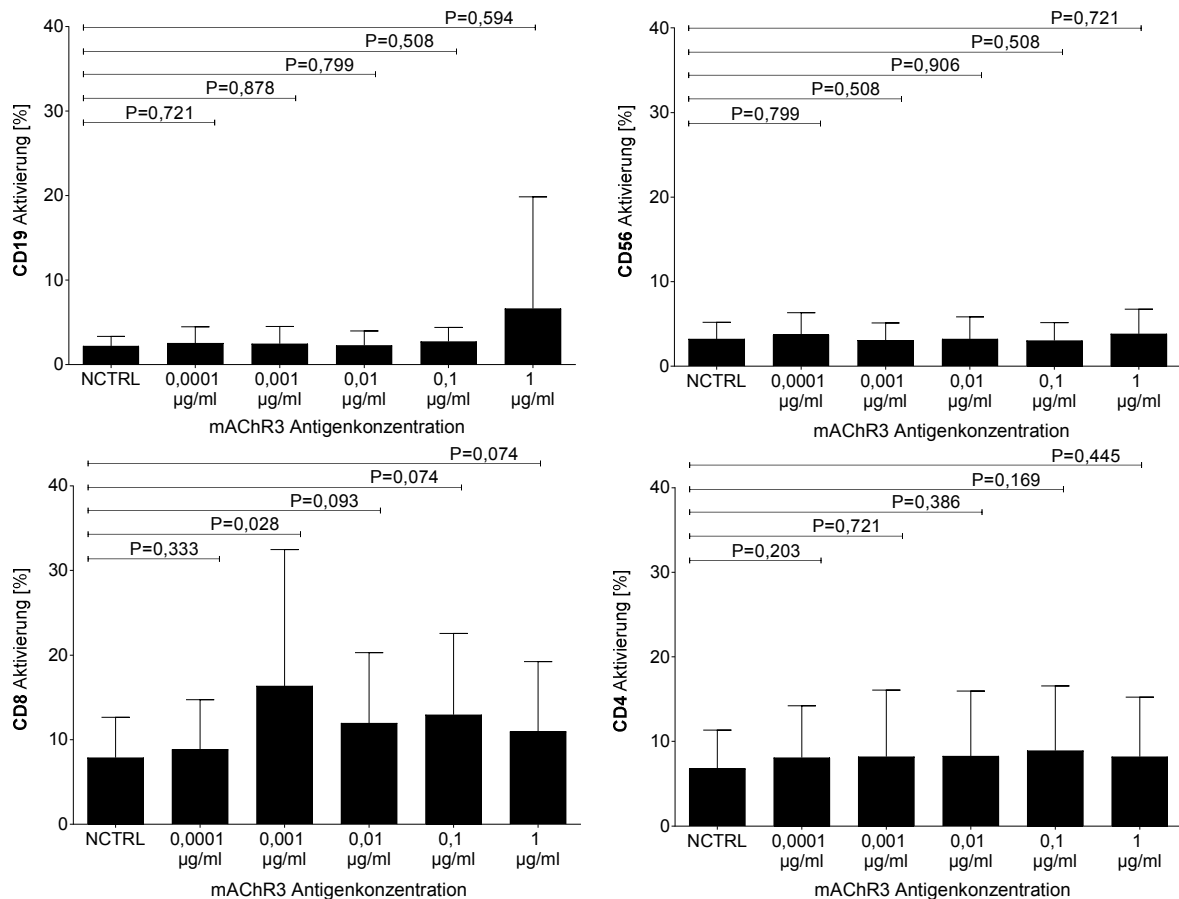


Abbildung 4.10-1: Einfluss des full length mACHR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 10 gesunden Probanden. Dargestellt ist der Prozentwert von CD69 positiven CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt, als signifikant gilt p < 0,05. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert in der Grafik aufgezeigt.

4.10.2 Einfluss des full length mACHR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen von PBC-Patienten

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Aktivierung von CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen von PBC-Patienten nach der Inkubation mit dem mACHR3 Antigen, sind in Abbildung 4.10-2 zusammengefasst. Das full length mACHR3 Antigen führt zu einer signifikanten Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen, während CD19⁺-, CD56⁺- und CD8⁺-Zellen nicht beeinflusst werden. Es ist eine allgemein verminderte CD69-Expression von behandelten und unbehandelten

CD56⁺-Zellen bei den PBC-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden zu beobachten. Die CD69-Expression von CD19⁺-Zellen vor Antigen-Exposition und nach Inkubation mit 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml des full length mAChR3 Antigen war bei den PBC-Patienten höher als bei den gesunden Probanden.

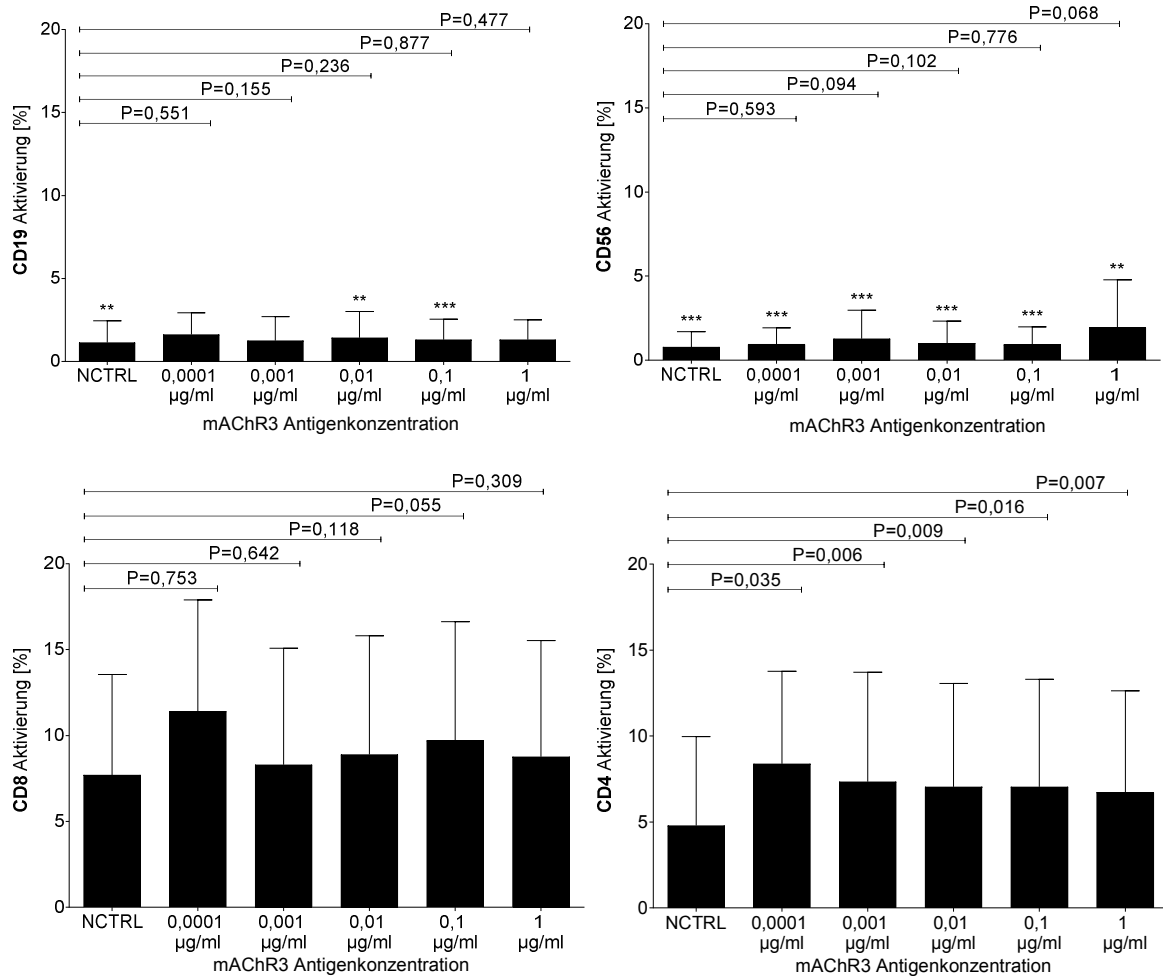


Abbildung 4.10-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 20 PBC-Patienten. Dargestellt ist der Prozentwert von CD69 positiven CD19⁺, CD56⁺, CD8⁺ und CD4⁺-Zellen. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert in der Grafik aufgezeigt. Unterschiede zwischen PBC-Patienten und gesunden Probanden sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.10.3 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen von PSC-Patienten

Des Weiteren wurde der Einfluss des mAChR3 Antigens auf die Aktivierung der PBMC von PSC-Patienten untersucht (Abbildung 4.10-3). Wiederum zeigen die CD56⁺-NK-Zellen der PSC-Patienten bereits spontan sowie nach Inkubation mit 0,001 µg/ml Antigen eine signifikant stärkere CD69-Expression als die gesunden Probanden. Die Aktivierung der CD19⁺-Zellen nach der Inkubation mit 0,1 µg/ml mAChR3 Antigen ist signifikant höher und die der CD56⁺-Zellen signifikant niedriger als bei PBC-Patienten.

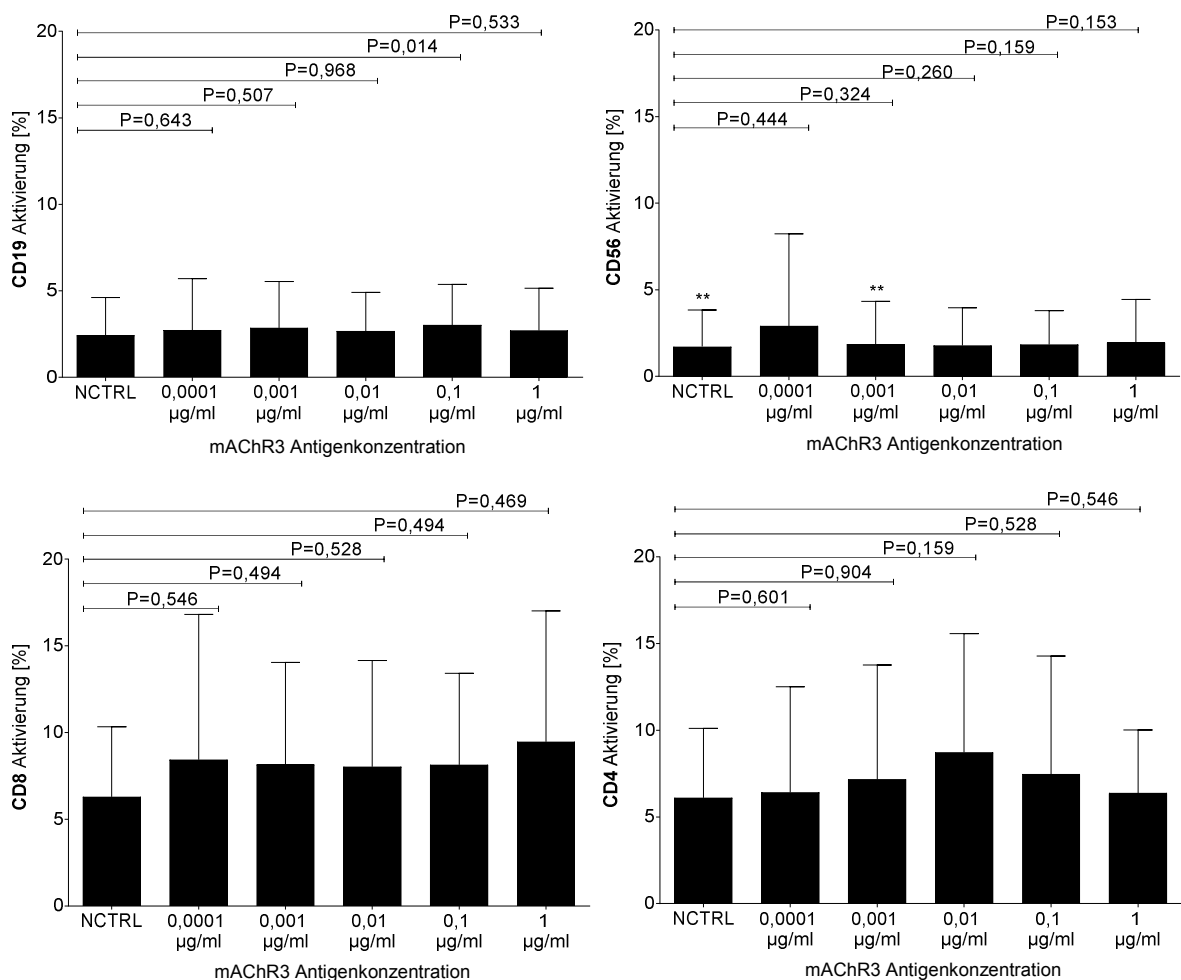


Abbildung 4.10-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 20 PSC-Patienten. Dargestellt ist der Prozentwert von CD69 positiven CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt, als signifikant gilt $p < 0,05$.

Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert in der Grafik aufgezeigt. Unterschiede zwischen PSC-Patienten und gesunden Probanden sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.10.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Expression von CD69 auf CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen von AIH-Patienten

Ähnlich wie bei der Analyse der PBMC von PBC-Patienten findet sich auch bei den PBMC von AIH-Patienten eine konzentrationsabhängige Aktivierung von CD4⁺- aber auch von CD8⁺-T-Zellen durch das full length mAChR3 Antigen. Die Expression von CD69 durch CD19⁺- oder CD56⁺-Zellen wird nicht beeinflusst. Wie die PBMC von PBC- und PSC-Patienten weisen auch die CD56⁺-Zellen der AIH-Patienten eine signifikant niedrigere Aktivierung als die von gesunden Probanden auf. Jedoch kann kein signifikanter Unterschied der CD69-Expression durch CD56⁺-NK-Zellen zwischen AIH- und PBC- oder PSC-Patienten festgestellt werden (Abbildung 4.10-4).

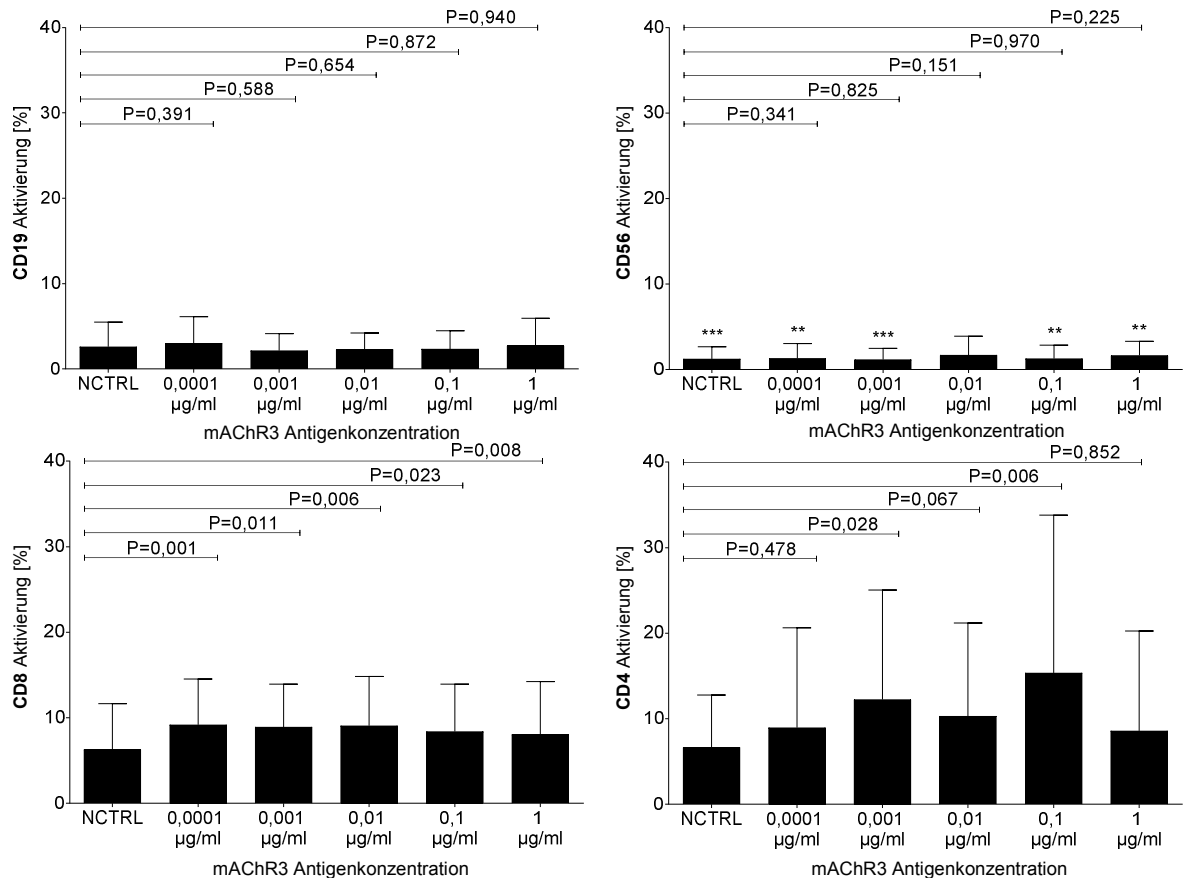


Abbildung 4.10-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 21 AIH-Patienten. Dargestellt ist der Prozentwert von CD69 positiven CD19⁺-, CD56⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-Zellen. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert in der Grafik aufgezeigt. Unterschiede zwischen AIH-Patienten und gesunden Probanden sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

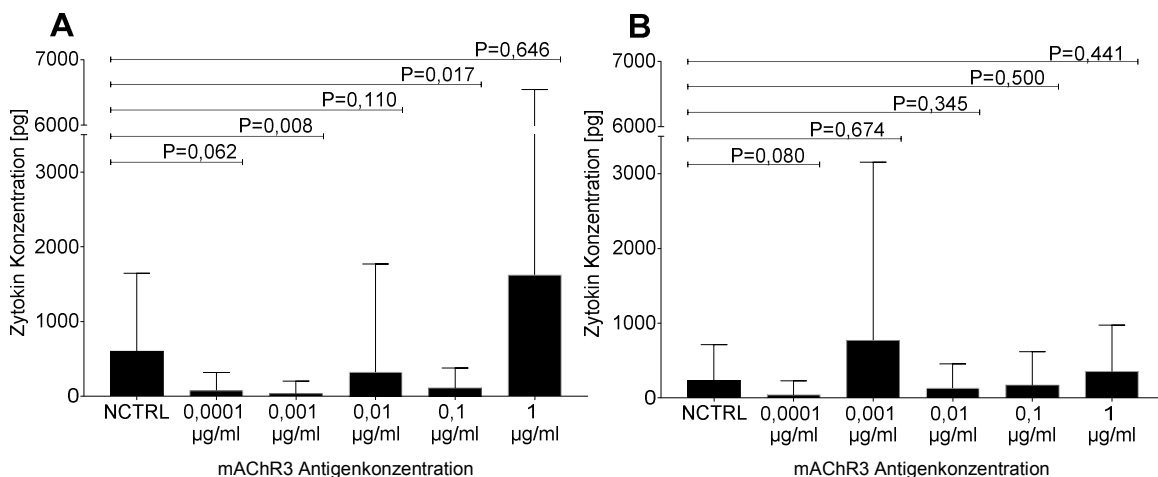
4.11 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die Zytokinproduktion von PBMC

Neben dem Einfluss des mAChR3 Antigens auf die Aktivierung und Zellproliferation der PBMC sollte darüber hinaus der Effekt auf deren Zytokinsekretion analysiert werden. Gemessen wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6, und TNF- α , die Th₁-Zytokine TNF- β und IFN- γ , die Th₂-Zytokine IL-5 und IL-13, sowie der GM-CSF. Als Indikator für regulatorische

T-Zellen wurde IL-10 bestimmt. Wie bei der Analyse der Proliferation und der Aktivierung der PBMC wurden die Zellen mit dem mAChR3 Antigen in den verschiedenen Konzentrationen 0,0001 µg/ml bis 1 µg/ml inkubiert. Der Zellüberstand wurde wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben auf die Zytokinproduktion mit der ELISA Methode analysiert. Die nachfolgenden Ergebnisse sind in der Konzentration [pg/ml] angegeben, welche durch den mitgeführten Standard ermittelt wurden. Die Zytokinfreisetzung wurde im Verhältnis zu unbehandelten Zellen und zu gesunden Probanden analysiert.

4.11.1 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-1α Produktion durch PBMC

Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen in den Konzentrationen 0,001 µg/ml und 0,1 µg/ml führte bei PBMCs von PBC-Patienten (Abbildung 4.11-1, A) zu einer signifikanten Abnahme der IL-1α Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auf Grund der hohen Standardabweichung bestand aber kein Unterschied zu den gesunden Kontrollen (Abbildung 4.11-1, D). Die IL-1α Sekretion der PBMC anderer Probandengruppen wurde nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4.11-1, B für PSC- und Abbildung 4.11-1, C für AIH-Patienten).



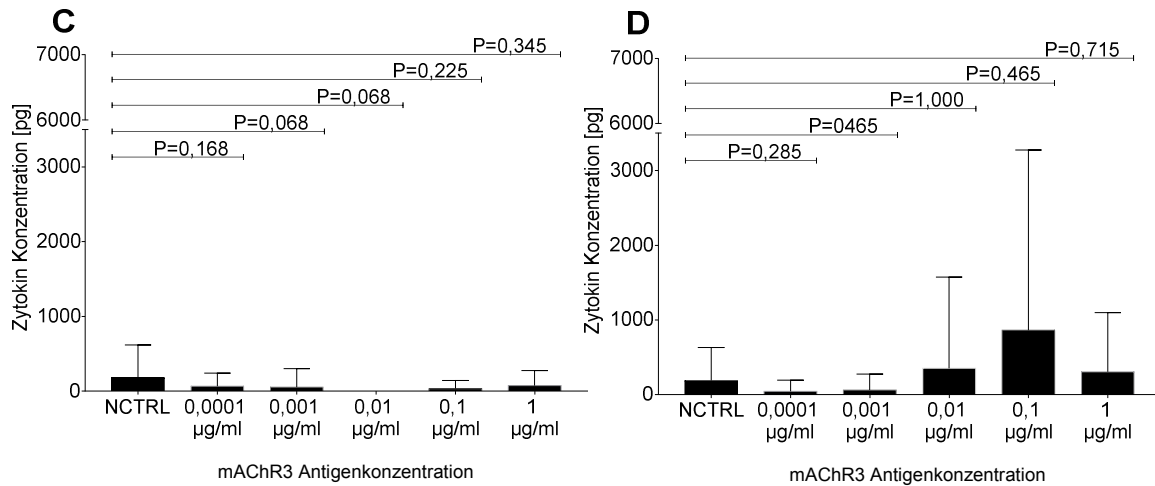


Abbildung 4.11-1, A bis D: Einfluss des full length mACHR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-1α Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mACHR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.2 Einfluss des full length mACHR3 Antigens auf die IL-6 Produktion durch PBMC

Die Produktion von IL-6 durch PBMC wurde durch Inkubation mit dem full length mACHR3 Antigen bei Patienten mit PBC (Abbildung 4.11-2, A) und AIH (Abbildung 4.11-2, C) sowie gesunden Probanden (Abbildung 4.11-2, D) nicht signifikant beeinflusst. Für PBMC von PSC-Patienten (Abbildung 4.11-2, B) war eine verstärkte Sekretion nach Inkubation mit mACHR3 in einer Konzentration von 0,01 µg/ml zu beobachten. Die spontane und die Antigen-induzierte Produktion von IL-6 durch PBMC von AIH-Patienten war signifikant niedriger als die der PBMC von gesunden Probanden.

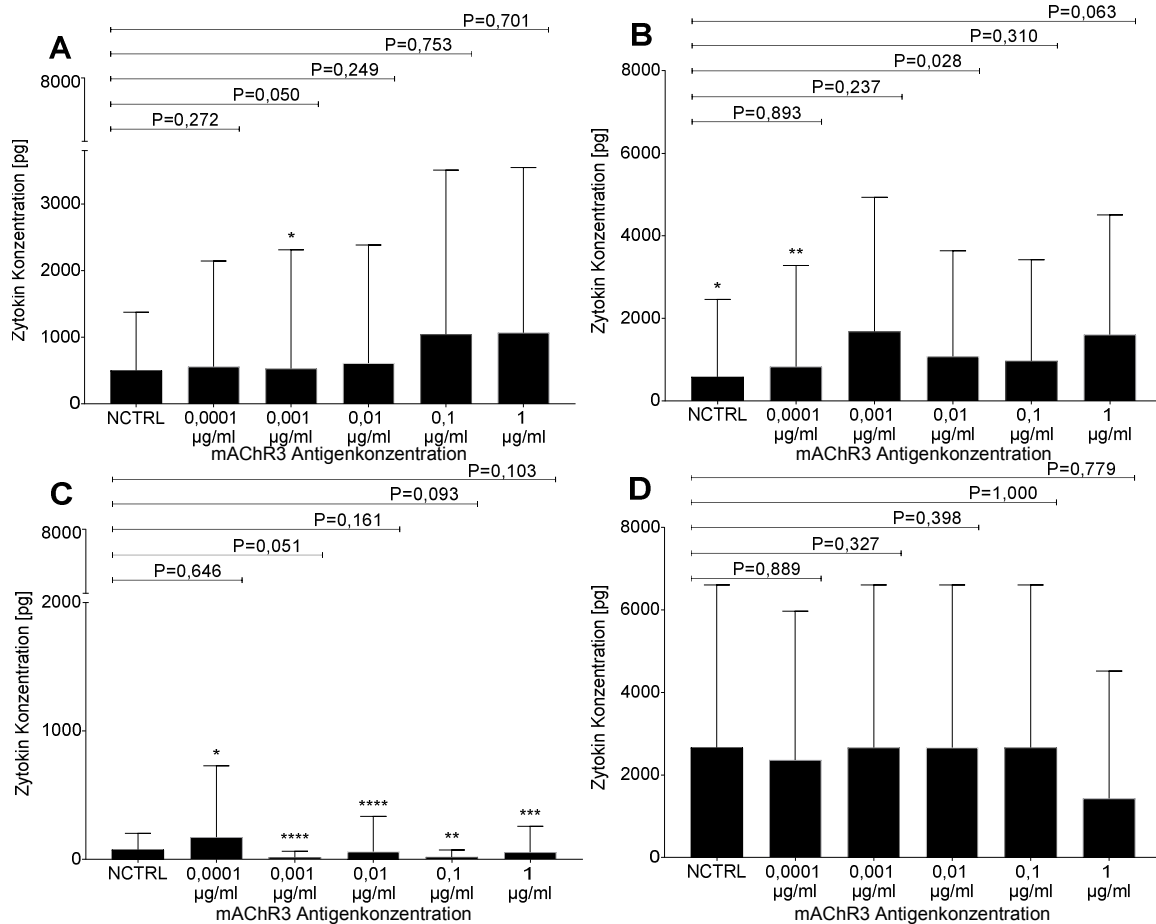


Abbildung 4.11-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-6 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.3 Einfluss von full length mAChR3 Antigen auf die TNF- α Produktion von PBMC

Inkubation der PBMC von gesunden Probanden (Abbildung 4.11-3, D) mit dem full length mAChR3 Antigen führt zu einer signifikanten Abnahme der TNF- α Produktion. Die TNF- α Sekretion durch PBMC von Patienten mit PBC (Abbildung 4.11-3, A), PSC (Abbildung 4.11-3, B) oder AIH (Abbildung 4.11-3, C) wurde nicht signifikant beeinflusst. PBMC von Patienten mit AIH und PSC produzierten signifikant weniger TNF-a als PBMC von gesunden Probanden.

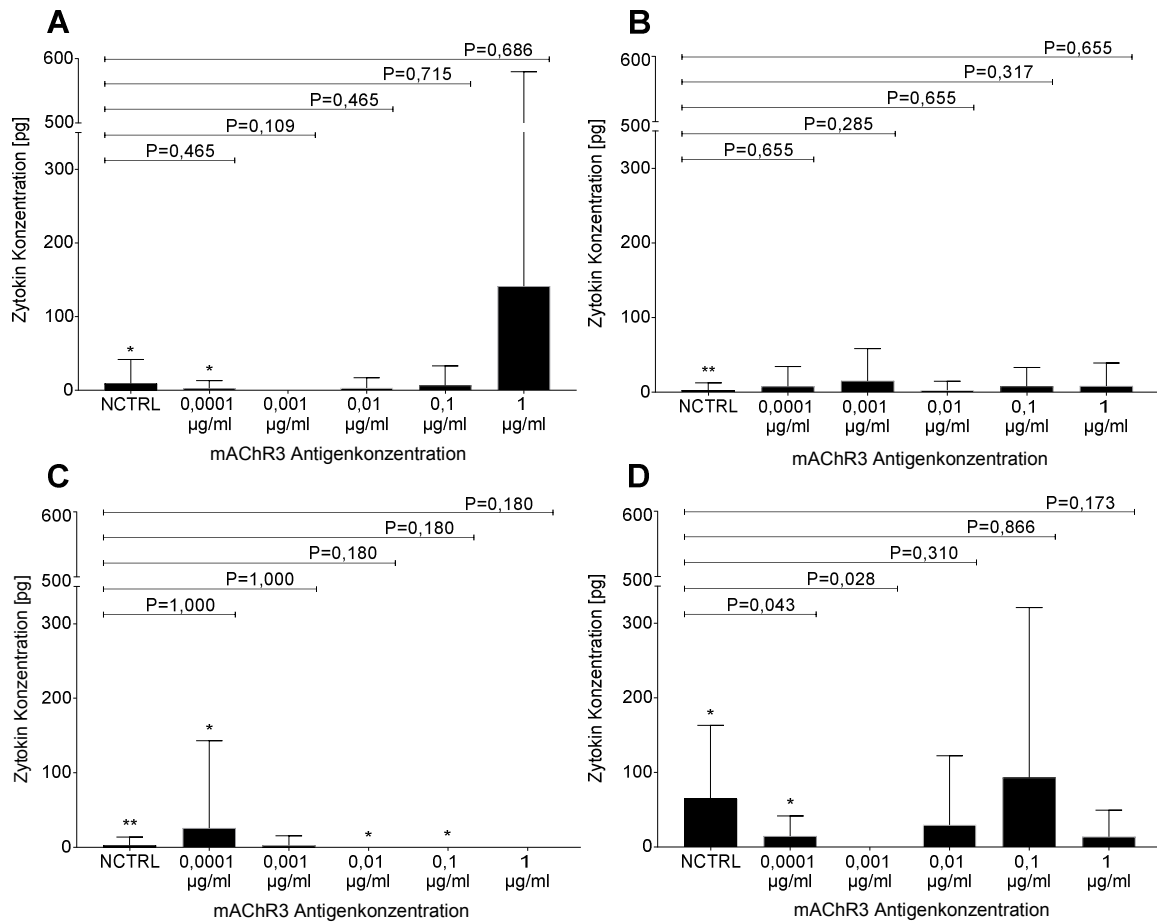


Abbildung 4.11-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die TNF-α Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.4 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die TNF-β Produktion durch PBMC

Die TNF-β-Produktion durch PBMC von Patienten mit PBC (Abbildung 4.11-4, A), PSC (Abbildung 4.11-4, B) und AIH (Abbildung 4.11-4, C) sowie von gesunden Probanden (Abbildung 4.11-4, D) wurde durch Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4.11-4). Insgesamt ist die

spontane TFN- β Produktion durch PBMC von AIH- und PSC-Patienten signifikant niedriger als die durch PBMC von gesunden Probanden.

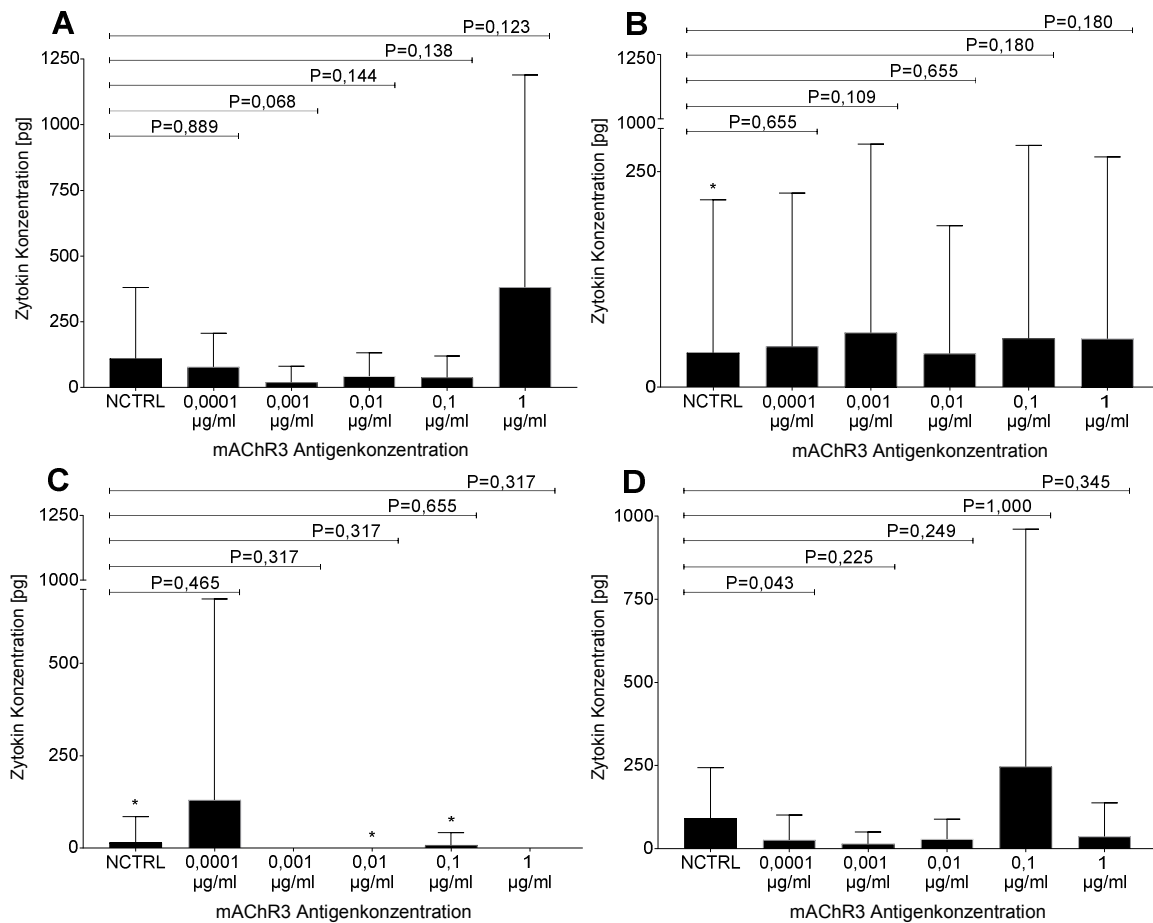


Abbildung 4.11-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 μ g/ml) auf die TNF- β Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.5 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IFN- γ Produktion durch PBMC

Inkubation der PBMC mit dem full length mAChR3 Antigen führte zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Reduktion der IFN- γ Produktion durch

PBMC von Patienten mit PBC (Abbildung 4.11-5, A) und AIH (Abbildung 4.11-5, C) sowie von gesunden Probanden (Abbildung 4.11-5, D), während die IFN- γ Sekretion durch PBMC von PSC-Patienten nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4.11-5, B). Die IFN- γ Produktion der PBMC von gesunden Probanden war zwar geringer als die der PBMC von Patienten, die Unterschiede waren aber nicht statistisch signifikant, wahrscheinlich aufgrund der hohen Standardabweichungen.

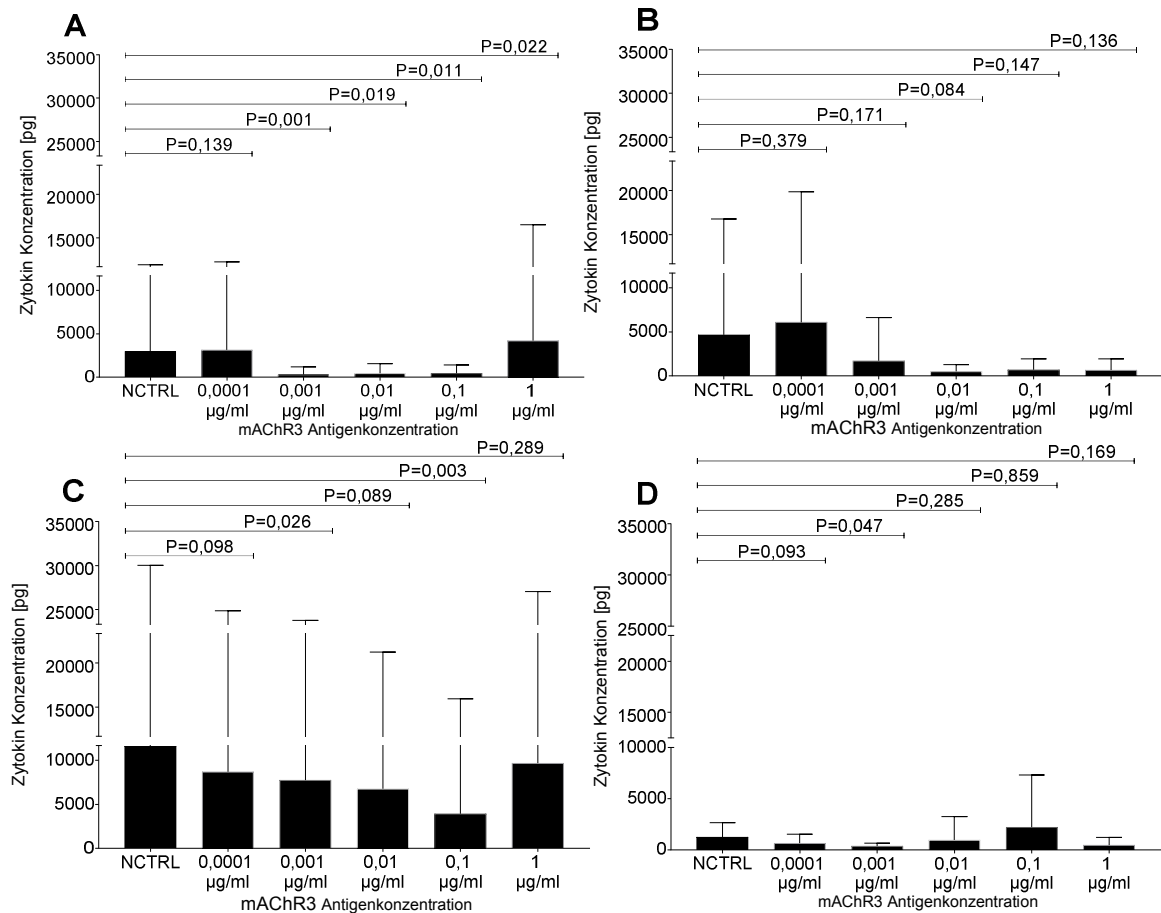


Abbildung 4.11-5: Einfluss des full length mACHR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 μ g/ml) auf die IFN- γ Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mACHR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.6 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-5 Produktion durch PBMC

Die spontane IL-5 Produktion durch PBMC von PBC- (Abbildung 4.11-6, A) und PSC-Patienten (Abbildung 4.11-6, B) war signifikant höher als die durch PBMC von AIH-Patienten (Abbildung 4.11-6, C) oder gesunden Probanden (Abbildung 4.11-6, D). Inkubation mit dem full length mAChR3 Antigen in den Konzentrationen 0,001 mg/ml und 0,01 mg/ml führte zu einer signifikanten Reduktion dieser IL-5-Sekretion bei PBC-Patienten.

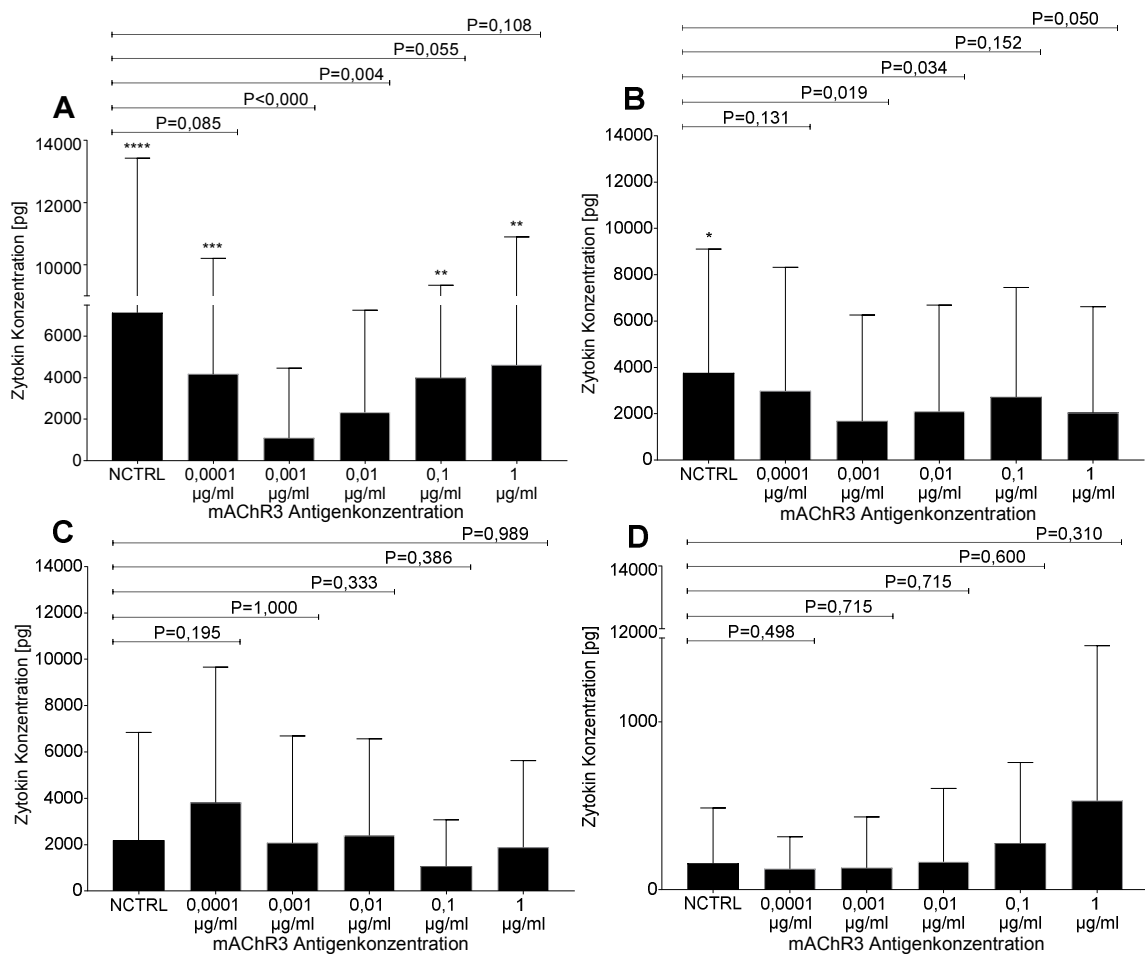


Abbildung 4.11-6: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-5 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.7 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-13 Produktion durch PBMC

Inkubation der PBMCs von PBC-Patienten (Abbildung 4.11-7, A) mit dem full length mAChR3 Antigen führte konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Abnahme der IL-13 Produktion, während die IL-13 Sekretion durch PBMC von Patienten mit anderen Erkrankungen sowie von gesunden Blutspendern (Abbildung 4.11-7, D) nicht beeinflusst wurde. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der IL-13 Sezernierung der PBMC innerhalb der jeweiligen Patientengruppen oder zu den gesunden Probanden erkennen.

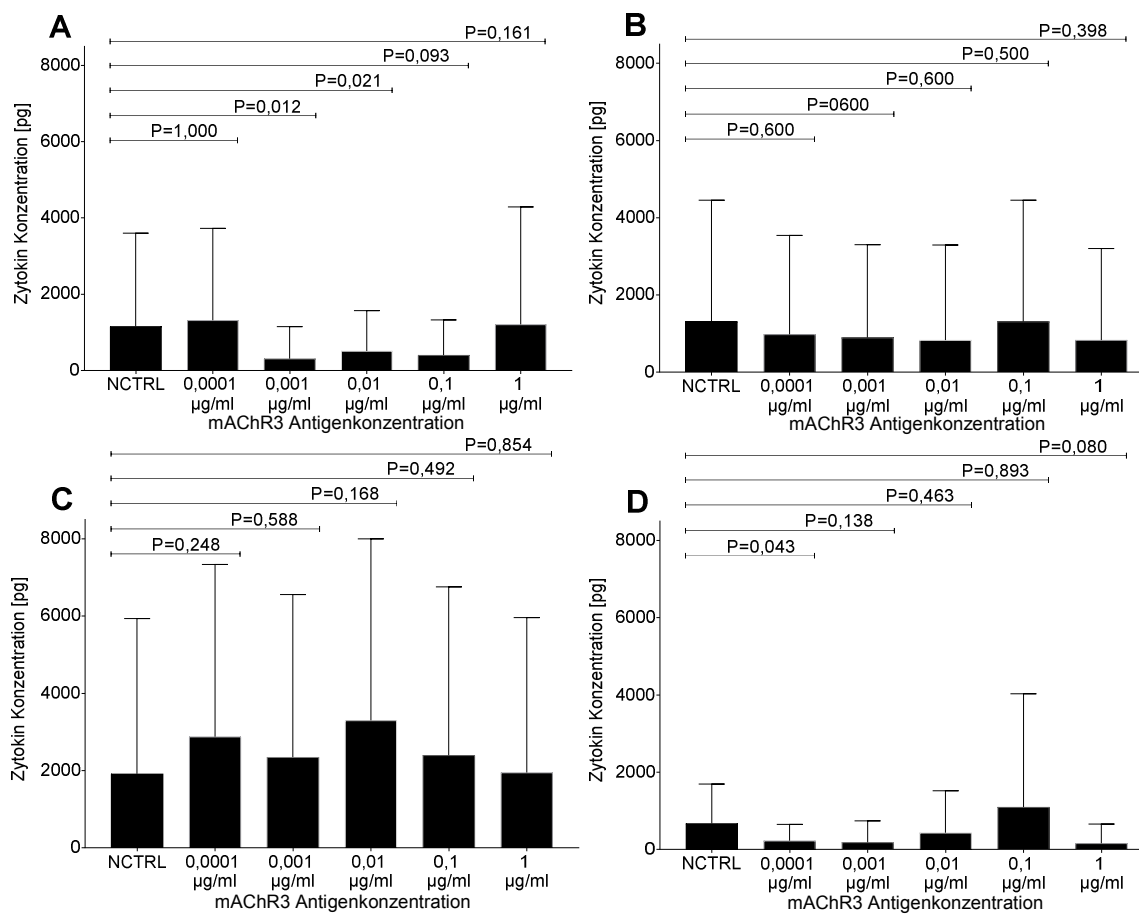


Abbildung 4.11-7: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 µg/ml bis 1 µg/ml) auf die IL-13 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.8 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die IL-10 Produktion durch PBMC

Inkubation der PBMC mit full length mAChR3 Antigen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10 Produktion (Abbildung 4.11-8). Lediglich bei PBMC von AIH-Patienten (Abbildung 4.11-8, C) führte es in den beiden höchsten Konzentrationen 0,1 und 1 µg/ml zu einer signifikanten Reduktion der IL-10 Sekretion. Insgesamt besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der IL-10 Sezernierung durch PBMC von Patienten oder gesunden Probanden.

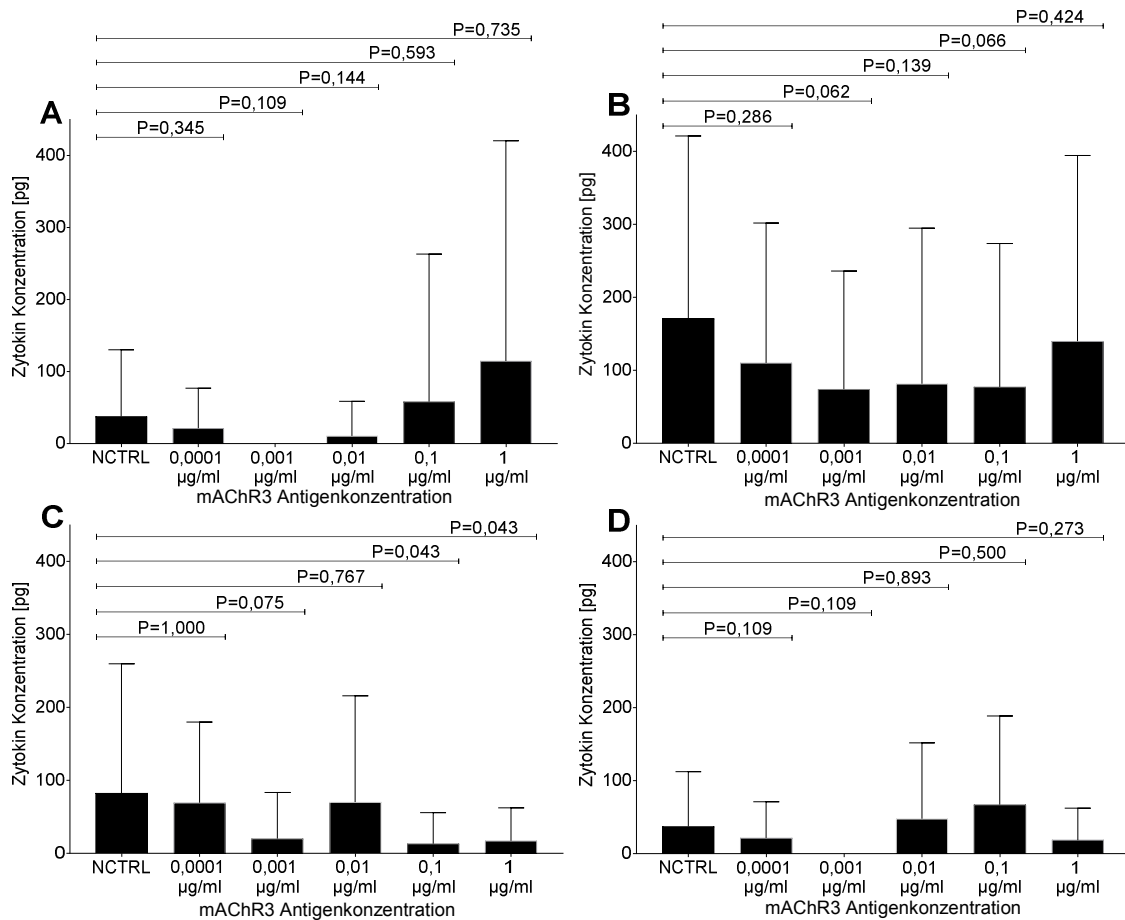
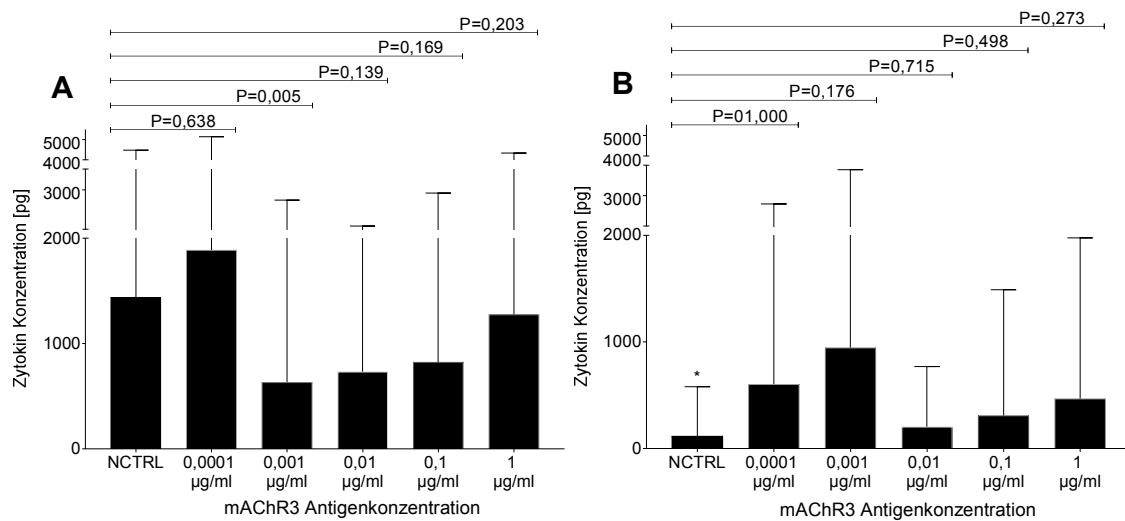


Abbildung 4.11-8: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-10 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

4.11.9 Einfluss des full length mAChR3 Antigens auf die GM-CSF Produktion durch PBMC

Inkubation der PBMC von PBC- (Abbildung 4.11-9, A), PSC- (Abbildung 4.11-9, B) oder AIH-Patienten (Abbildung 4.11-9, C), sowie von gesunden Probanden (Abbildung 4.11-9, D) mit dem full length mAChR3 Antigen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von GM-CSF (Abbildung 4.11-9). Einzig die Inkubation von PBMC von PBC-Patienten mit 0,001 µg/ml Antigen führte zu einer signifikanten Reduktion der GM-CSF Sekretion. Die spontane GM-CSF Produktion durch PBMC von Patienten mit AIH und PSC war signifikant geringer als die durch PBMC von gesunden Probanden. Ferner war die Antigen-induzierte GM-CSF Produktion durch PBMC von AIH-Patienten für die Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml des full length mAChR3 Antigens signifikant geringer als die von gesunden Probanden.



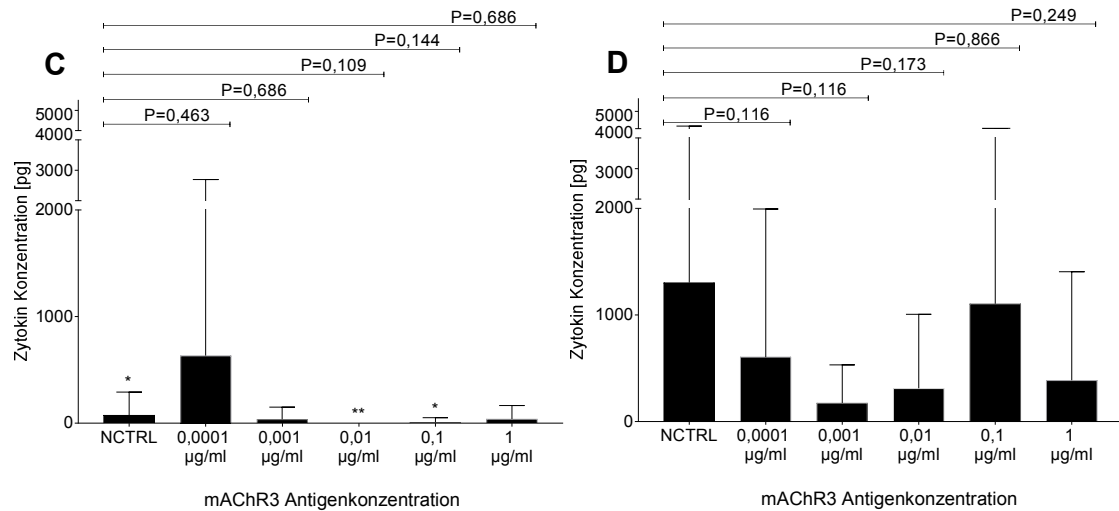


Abbildung 4.11-9: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die GM-CSF Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zytokinsekretion. Signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion zwischen den mAChR3 Antigen-behandelten und unbehandelten Zellen sind als P-Wert dargestellt, als signifikant gilt $p < 0,05$. Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden sind mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

5 Diskussion

Autoimmunerkrankungen sind durch den Verlust der Selbsttoleranz gekennzeichnet, d. h. das Immunsystem stuft körpereigenes gesundes Gewebe als gefährlich ein und beginnt, dieses systematisch abzubauen [7]. Dauerhafte Entzündungsprozesse, welche schließlich zum Verlust des Gewebes führen, sind die Folge. Die Ursache für die Autoreaktivität der B- und T-Zellen ist bisher ungeklärt. Verschiedene Faktoren wie der Einfluss von Umweltfaktoren und/oder genetischen Prädispositionen werden postuliert. Auch AAK scheinen an der Entstehung bzw. Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein. Klassische Beispiele sind die Antikörper gegen den TSH-Rezeptor (Tyreoidea stimulierendes Hormon) bei Patienten mit autoimmuner Schilddrüsenerkrankung, den Acetylcholinrezeptor bei der Myasthenia gravis oder AAK gegen GPCRs bei Patienten mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie etwa AAK gegen den AT₁-Rezeptor bei Patienten mit Bluthochdruck, die eine agonistische Aktivität ausüben und die intrazelluläre Signalkaskade beeinflussen [16]. In den letzten beiden Dekaden haben verschiedene Studien AAK gegen den mAChR3 bei Patienten mit SS aufgezeigt. Darüber hinaus konnte für die anti-mAChR3 Antikörper eine antagonistische Wirkung an Speichel- und Tränendrüsenzellen nachgewiesen werden, die unter anderem an der Ausprägung der typischen Sicca Symptomatik beteiligt sind (reviewed in [19]). Ebenfalls wurden AAK gegen den mAChR3 bei Patienten mit PBC, welche häufig mit dem SS assoziiert ist, postuliert [81, 82]. Inwiefern diese AAK jedoch die Funktionalität des Rezeptors beeinflussen und/oder hierbei eine Organspezifität der AAK vorliegt, ist bisher nicht geklärt. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Fragestellung, ob noch weitere Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen, wie z. B. PSC oder AIH, AAK gegen den mAChR3 im Serum aufweisen. Da vor allem die Degeneration von Cholangiozyten vorherrschend in der Pathogenese der PBC und PSC ist, sollte zudem geprüft werden, ob mAChR3 AAK eine Auswirkung auf die Rezeptoraktivität auf der Gallengangskarzinom-Zelllinie TFK-1 ausüben können.

Im ersten Schritt wurden Seren von Patienten mit autoimmunen, virus-induzierten und toxischen Lebererkrankungen sowie von gesunden Blutspendern auf anti-mAChR3 Antikörper analysiert und deren Effekt auf die Rezeptorfunktion *in vitro* getestet. Im nächsten Schritt wurde die agonistische Wirkung der mAChR3 AAK auf die intrinsische apoptotische Signalkaskade, die Zellproliferation und die Zytokinsekretion von Cholangiozyten untersucht. Ein weiterer Punkt, der neben der funktionellen Aktivität der anti-mAChR3 Antikörper geklärt werden sollte, war ihre Spezifität für den mAChR3 explizit auf Cholangiozyten.

Da in der Literatur keine Einigkeit hinsichtlich der exakten Epitopbindungsstelle der AAK am mAChR3 besteht (siehe Tabelle 1.2-1 und Tabelle 1.2-2), sollte diese mithilfe eines rekombinant hergestellten full length Proteins und 35 synthetisierten mAChR3 Peptidsequenzen (siehe zweiter Teil der Arbeit) analysiert werden. Ferner wurden PBMC von PBC-, PSC- und AIH-Patienten mit dem rekombinanten full length mAChR3 Antigen inkubiert, um weiteren Aufschluss über den Effekt des Antigens auf immunkompetente Zellen zu erlangen. Untersucht wurde sein Einfluss auf die Proliferation, die Aktivierung von NK-, B-, T-Zellen und Makrophagen und die Zytokinproduktion durch diese Zellen. Die exakte Definition der Bindungsstelle der mAChR3 AAK sowie der zellulären Reaktionen gegenüber dem mAChR3 könnten neue Ansätze für die Diagnostik und/oder für die Therapie dieser seltenen autoimmunen Lebererkrankungen ergeben.

5.1 Nachweis von anti-mAChR3 Antikörper in Patientenseren mittels verschiedener Methoden

5.1.1 Mittels Durchflusszytometrie zum Nachweis von Antikörpern gegen den nativen mAChR3

Dies ist die erste Studie, die IgG- und IgM-Antikörper in Patientenseren mit Lebererkrankungen gegen mAChR3-exprimierende Cholangiozyten mittels Durchflusszytometrie nachweisen konnte. Zahlreiche Arbeiten belegen, dass Patienten mit primärem und sekundärem SS Autoantikörper gegen den mAChR3 besitzen (zusammengefasst in Tabelle 1.2-1). Es wird vermutet, dass diese AAK den Rezeptor in seiner Aktivität inhibieren bzw. herabsetzen, was sich wiederum

in der typischen Sicca Symptomatik der Patienten widerspiegelt [20]. Die Assoziation zwischen dem SS und der PBC beträgt bis zu ~ 12 %. Auch hier liegen bereits verschiedenen Studien vor, die die Präsenz von AAK gegen den mAChR3 im Serum von PBC-Patienten belegen [81, 82]. Aufgrund der engen Assoziation der PBC mit der AIH und derer Überlappung mit der PSC wurden auch Patientenseren mit diesen Erkrankungen auf die Präsenz von IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten mit der durchflusszytometrischen Messung analysiert. Als Kontrolle wurden Seren von Patienten mit einer Virushepatitis sowie von gesunden Probanden mitgeführt. Wie in Kapitel 1.3.1/1.3.2 ersichtlich, ist für die PBC eine Erhöhung der Serum-IgM- und für die AIH eine Erhöhung der Serum-IgG-Globuline charakteristisch [115, 99]. Darüber hinaus zeigt die Studie von Klein Moreira et al., dass 25 % der von ihnen getesteten PSC-Fälle überwiegend IgM-Antikörper aufweisen [176]. Deshalb wurde neben der IgG- auch die IgM-Spezifität an mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten getestet.

Seren von SS-Patienten hatten in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten keine Antikörper vom IgG-Typ (Tabelle 4.2-1). Die hier erzielten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Tabelle 1.2-1), die eine hohe mAChR3 AAK Spezifität postulieren und darüber hinaus die AAK als diagnostischen Parameter für das SS empfehlen. Nichtsdestotrotz ist die Präsenz der anti-mAChR3 Antikörper kritisch zu betrachten, da laut Literatur die Streubreite bzgl. der Prävalenz der anti-mAChR3 Antikörper in SS-Patienten zwischen 4,2 % und 90 % liegt. Darüber hinaus ist anzumerken, dass sich die Ergebnisse auf verschiedene Epitope des Rezeptors beziehen, mit unterschiedlichsten Analysemethoden erfasst wurden und andere Zellen als Cholangiozyten verwendet wurden [80].

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal die Präsenz von Antikörpern im Serum von PSC-, AIH- und Virushepatitis Patienten gegen mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen untersucht. Ein Drittel der PBC-Patientenseren hatte Antikörper vom IgM-Typ und ein Patient verfügte auch über IgG-Antikörper gegen mAChR3-exprimierende Cholangiozyten. Interessanterweise hatten 74 % bis zu

88 % der Patienten mit PSC oder Virushepatitis Antikörper gegen mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen, während Patienten mit AIH negativ waren. Darüber hinaus hatten auch 20 % der gesunden Probanden IgM-Antikörper. Hingegen wurden IgG-Antikörper nicht detektiert.

Der häufige Nachweis der Antikörper vom IgM-Typ bei den PBC-Patienten passt zu der generellen Erhöhung der Serum-IgM-Globuline bei dieser Erkrankung. Die Daten passen auch zu denen von Berg et al., welche ebenfalls einen höheren Anteil an mAChR3 AAK des IgM-Typs als vom IgG-Typ in PBC-Patientenserum nachgewiesen haben [81]. Kontrovers dazu sind die Ergebnisse von Tsuboi et al., in deren Arbeit bis zu 90 % anti-mAChR3 Antikörper des IgG-Typs im Serum der PBC-Patienten identifiziert wurden. Darüber hinaus demonstrierten Tsuboi et al. mAChR3 AAK des Typus IgG bei 70 % der von ihnen getesteten PSC-, 77,5 % der Hepatitis C Patienten und 9,5 % bei gesunden Probanden, was sich deutlich von den hier aufgezeigten Ergebnissen unterscheidet.

Ein wesentlicher Aspekt für den Unterschied zwischen den hier dargestellten Ergebnissen und denen in der Literatur stellt sicherlich die Methode für den Nachweis der AAK gegen mAChR3-exprimierende Cholangiozyten dar. In vorausgegangenen Untersuchungen wurden herkömmliche diagnostische Methoden, wie der ELISA oder der Western Blot verwendet, die sich jedoch für den Nachweis der AAK als unzureichend herausstellten [177, 70]. So konnten bereits Révélen et al. zeigen, dass erhebliche Unterschiede beim Nachweis von Anti-endothelialen Antikörpern in Abhängigkeit von der verwendeten Methode (ELISA, WB und Durchflusszytometrie) bestehen. Im Gegensatz zur ELISA-Methode konnten mittels Durchflusszytometrie keine Anti-Endothelzell-Antikörper nachgewiesen werden [178]. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass die unterschiedlichen Antigen-Präparationen Ursache für die mangelnde Übereinstimmung der Ergebnisse in den verschiedenen Nachweismethoden haben könnten. Bezogen auf den mAChR3 ist anzumerken, dass die meisten vorausgegangenen Studien synthetisierte mAChR3 Sequenzen für den Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern benutzten. Die hier vorliegende Arbeit nutzt hingegen das vollständig exprimierte mAChR3 Protein in seiner natürlichen Konformation auf TFK-1-Zellen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse bzgl. der anti-mAChR3 Antikörperhäufigkeit beruhen daher auf einem weitaus sensitiveren Assay, als die in der Literatur vorgelegten Studien. Es ist jedoch anzumerken, dass die Cholangiozyten Zelllinie TFK-1 neben dem mAChR3 eine Vielzahl von Proteinen auf deren Zelloberfläche exprimieren und positive IgG- und IgM-Antikörperbefunde durch die Bindung an andere Rezeptoren/Proteine zurück zuführen sein könnten.

Bei allen Menschen kommen natürlich vorkommende Autoantikörper vor, die in der Lage sind, mit einer Vielzahl von Serumproteinen, Zelloberflächenstrukturen und intrazellulären Strukturen zu reagieren [179]. Diese natürlichen AAK (nAAK) sind meist vom IgM-Typ, in der Regel multireaktiv, und sie entstehen spontan perinatal ohne Antigenkontakt. Es konnte gezeigt werden, dass nAAK bevorzugt oxidierte Phospholipide auf apoptotischen Zellen binden [180]. Sie haben eine wichtige Funktion in der frühen Verteidigung gegen eindringende Pathogene sowie bei der Beseitigung von Zelltrümmern und der Neutralisierung von pro-inflammatorischen Prozessen [181]. Weitere Studien postulieren einen kurativen Einfluss der nAAKs bei der RA und dem SLE. Dabei konnten vor allem nAAKs, die sich gegen Apoptose-assoziiertes Phosphorylcholin (PC) oder Malondialdehyd (MDA) richten, bei Patienten mit geringer Krankheitsaktivität und/oder weniger starken Organschäden nachgewiesen werden [12, 181]. Auf Grund der hohen Präsenz von nAAKs in anderen Autoimmunerkrankungen kann daher vermutet werden, dass es sich bei den IgM-Antikörpern gegen die mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten ebenfalls um nAAKs handelt. Um diese Theorie zu belegen sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, ob der Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgM-Typ mit den inflammatorischen Prozessen der jeweiligen Erkrankungen korreliert.

5.1.2 Nachweis funktioneller Antikörper mittels luminometrischer Messung

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die anti-mAChR3 Antikörper die Funktionalität des Rezeptors auf Cholangiozyten beeinflussen. Die hier angewandte Methode zur Analyse der Funktionalität des mAChR3 wurde im

Immunpathologischen Labor etabliert [76] und für die Untersuchungen mit Cholangiozyten modifiziert [173]. Der Lumineszenztest basiert auf dem Konkurrieren der AAK um den mAChR3 und dessen Agonisten Carbachol. Binden AAK an den mAChR3, kann wiederum Carbachol nicht binden, was in einer geringeren Absorption bei der Lumineszenz resultiert. Für diese Untersuchungen mussten aus den Patientenseren die Immunglobuline isoliert werden, um unspezifische Effekte auf den mAChR3 durch andere Serumproteine auszuschließen.

Nur 3 % der SS-Patienten hatten Antikörper, die mit der mAChR3-Funktion auf Cholangiozyten in Form einer Stimulation interferierten, was wiederum zu den weitgehend negativen Befunden in der Durchflusszytometrie (Tabelle 4.2-1) passt. Zudem stimulierten 31 % der Ig's von PBC- und 14 % der Ig's von PSC-Patienten die Rezeptoraktivität. Interessanterweise hatten auch 44 % der Ig's von AIH-Patienten einen stimulatorischen Effekt auf den mAChR3 (Tabelle 4.3-1). Dagegen beeinflussten Immunglobuline aus Seren von Patienten mit Virushepatitis die mAChR3-Funktion nicht, trotz des häufigen Nachweises von IgM-Antikörpern in der Durchflusszytometrie. Inhibitorische Antikörper wurden hingegen kaum beobachtet. Dies steht im Widerspruch zur Literatur, die überwiegend den Nachweis inhibitorischer Antikörper beschreibt (siehe Tabelle 1.2-1). Ein entscheidender Unterschied von vorausgegangenen Studien, die vor allem eine Inhibition des Rezeptors nachwiesen, zum angewandten Lumineszenztest der vorliegenden Arbeit besteht sicherlich darin, dass der Effekt von mAChR3 AAK auf anderen mAChR3-exprimierenden Geweben (z. B. humane Speicheldrüsenzellen [80]) getestet wurde, wohingegen der Einfluss von Immunglobulinen auf den mAChR3 auf Cholangiozyten bisher nicht untersucht wurde. Darüber hinaus wurde die Inkubationsdauer der Immunglobuline, unter Berücksichtigung der Rezeptorinternalisierung, auf die Dauer von einer Stunde angepasst [74]. Auch hier lässt sich ein starkes Ungleichgewicht bezüglich der Inkubationsdauer in den funktionellen Assays von bis zu einer Stunde [61, 66, 76], 12 Stunden [69, 20] und 24 Stunden [20, 68] in der Literatur beobachten. Dies bedeutet, dass die Beobachtung der bisherigen Studien, wo überwiegend

inhibitorische Antikörper nachgewiesen wurden, auf eine unzureichende Rezeptorexpression zurückzuführen sein könnte.

Um zu verifizieren, ob die hier vorgestellten Ergebnisse auf einer spezifischen Antikörperbindung an den mAChR3 beruhen, wurde ein Adsorptionstest etabliert. Hierbei wurden Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden für eine Stunde auf CHO-Zellen inkubiert, welche den mAChR3 überexprimierten und somit mögliche AAK an den Rezeptor binden können. Im zweiten Schritt wurde der Überstand, in dem sich eine reduzierte Menge AAK befinden sollte, auf Cholangiozyten transferiert, ebenfalls für eine Stunde inkubiert und im Anschluss auf seinen Effekt bezüglich einer Beeinflussung der mAChR3-Funktionalität getestet. Für den Adsorptionstest wurden ausschließlich Ig's untersucht, die im Vorfeld einen stimulatorischen bzw. inhibitorischen Effekt aufzeigten. Ig's von PBC- und PSC-Patienten, die vor der Adsorption den Rezeptor stimulierten, wiesen nach einer vorausgehenden Inkubation mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen eine deutlich geringere stimulatorische Wirkung auf den mAChR3 auf (Abbildung 4.4-1). Auch bei Ig's, die primär den Rezeptor inhibierten, wurde dieser Effekt nach Adsorption neutralisiert. Die Adsorption der Ig's von AIH- und SS-Patienten resultierte hingegen in einer Stimulierung des mAChR3. Ig's der gesunden Probanden zeigten nach der Adsorption sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibition der Rezeptorfunktion. Diese Ergebnisse lassen postulieren, dass vor allem Ig's von PBC- und PSC-Patienten spezifisch an den mAChR3 an CHO-Zellen binden und somit bei dem Transfer des Überstands keine bzw. weniger AAK enthalten sind, welche die Rezeptoraktivität auf Cholangiozyten beeinflussen können. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Inkubation mit Ig's auf CHO-Zellen in diversen Studien zu einer Inhibition des mAChR3s führte (siehe Tabelle 1.2-1), in der vorliegenden Arbeit jedoch eine Stimulation des Rezeptors nach der Inkubation mit Ig's auf Cholangiozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 4.3-1). Im Zuge des Adsorptionstests ist vor allem eine erhöhte Rezeptoraktivität der zuvor inhibitorischen Ig's nach Adsorption auf CHO-Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 4.4-1). Es könnte demnach postuliert werden, dass CHO-Zellen bevorzugt inhibitorischen AAKs binden und somit überwiegend stimulatorische

AAKs im Überstand verbleiben, was wiederum zu einer erhöhten Aktivierung des mAChR3 auf Cholangiozyten nach der Adsorption beiträgt. Weiter kann angenommen werden, dass somit eine völlig unterschiedliche Subpopulation von AAKs auf die Cholangiozyten reagierte, als dies im vorausgegangenen funktionellen mAChR3 Antikörper Lumineszenztest (siehe Kapitel 4.3) der Fall gewesen ist. Nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass die Adsorption mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen alle mAChR3 AAK, insbesondere die vom IgM-Typ, abgefangen hat und verbleibende AAK im Überstand möglicherweise einen anderen GPCR unspezifisch binden, welcher ebenfalls den $G\alpha_{q/11}$ Signalweg stimuliert.

Verschiedene Studien belegen, dass die Stimulation des mAChR3 zu einer verstärkten Zellproliferation führt. Dies geht mit einer verstärkten Produktion von IP_3 einher, das für die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Mitochondrium verantwortlich ist und letztendlich die Gentranskription verstärkt [182, 183]. Aus diesem Grund sollte mittels 3H -Thymidin uptake geprüft werden, ob die Stimulation des mAChR3 durch Ig's in einer erhöhten Proliferation der Cholangiozyten resultiert. Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Veränderung der Proliferationsrate von Cholangiozyten nach der Inkubation mit den Ig's von Patienten oder gesunden Probanden festgestellt werden. Neben dem Effekt der mAChR3 AAK auf die Zellproliferation sollte auch der Einfluss der Ig's auf die apoptotische Signalkaskade in Cholangiozyten untersucht werden. Vorreiter hierzu ist die Studie von Budd et al., deren Arbeit aufzeigt, dass die mAChR3 Stimulierung mit einer erhöhten anti-apoptischen Bcl-2 Protein Expression korreliert [56]. Zudem assoziierten Reina S. et al. die Einleitung der Apoptose in A253-Zellen mit der vorherigen Behandlung mit IgG anti-mAChR3 Antikörper aus pSS Patientenserum [57]. Deshalb war es von Interesse, diesen Effekt auch in Cholangiozyten zu analysieren. Nach Inkubation der Cholangiozyten mit dem Zytostatikum 5-FU war ein signifikanter Rückgang des Bcl-2 Proteins zu beobachten. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Inkubation mit dem mAChR3 stimulierenden Carbachol aufgehoben. Dies bestätigt die von Budd et al. aufgezeigten Erkenntnisse. Jedoch muss hier auch darauf hingewiesen werden, dass diverse Studien zu der Bcl-2 Expression in Cholangiozyten zu unterschiedlichen Erkenntnissen kommen. Es

wurde einerseits eine verstärkte Bcl-2 Expression in Cholangiokarzinomzellen [184], andererseits aber auch gar keine Expression des anti-apoptotischen Proteins aufgezeigt [185]. Man könnte daher vermuten, dass die TFK-1 Zelllinie von Haus aus das anti-apoptotische Bcl-2 Protein überexprimieren und die Inkubation mit Carbachol keinen direkten Einfluss auf die Expression dieses Proteins haben. Korrespondierend zu der Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 wurden daher auch die Expression der proapoptotischen Proteine Bax und Caspase-9 untersucht. Dabei wurde eine geringere Bax- sowie Caspase-9 Expression nach der Behandlung mit 5-FU festgestellt, jedoch hätte eine Zunahme der pro-apoptotischen Proteine, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, auf Grund der Initiierung der Apoptose mit dem Zytostatikum, der Fall sein müssen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Behandlung mit 5-FU zu einer porösen Zellmembran führt und die Proteine Bax und Caspase-9 durch diese hindurch in den Zellüberstand gelangten. Der Zellüberstand wurde jedoch während den mehrmaligen Waschschritten verworfen. Die In-Cell Western Methode detektiert jedoch Proteine innerhalb der Zelle. Sollte die Mehrzahl der apoptotischen Proteine, wie eben beschrieben, in den Zellüberstand gelangt sein und bei den Waschschritten verworfen worden sein, könnte dies die wider Erwarten niedrige Bax- sowie Caspase-9 Expression erklären. Daher wird empfohlen, auch den Überstand auf anti- bzw. proapoptotische Proteine zu analysieren. Die Zugabe von Carbachol hatte gar keinen Effekt auf die Caspase-9 Expression und bewirkte nur einen geringen Anstieg der Bax-Proteinexpression, der jedoch immer noch weniger als in unbehandelten Zellen war.

Weiter wurde nicht nur der Effekt von Carbachol auf die Expression von pro- und anti-apoptotischen Molekülen in Cholangiozyten sondern auch der von Ig's mit stimulierenden oder inhibierenden anti-mAChR3 Antikörper getestet. In Cholangiozyten, die für 24 h mit den Ig's inkubiert worden waren, wurde eine leicht reduzierte Bcl-2, Bax und Caspase-9 Expression beobachtet, die Inkubation der Cholangiozyten mit den PSC-Ig's führte zu einer generell höheren Caspase-9 Expression. Im Vergleich dazu konnte für die Bcl-2 oder Bax Expression kein Unterschied der Ig Inkubation hinsichtlich der einzelnen Erkrankungen festgestellt werden. Die Bax Expression in Cholangiozyten nach Inkubation mit Ig's von

gesunden Probanden war nach einstündiger Inkubation etwas höher als mit Ig's von Patienten Ig's. Im Vergleich zu den gesunden Probanden war nach 24- stündiger Inkubation mit Patienten Ig's ein signifikanter Unterschied der Bcl-2, Bax oder Caspase-9 Expression zu erkennen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ig's nicht in der Lage sind, die apoptotische Signalkaskade von Cholangiozyten zu beeinflussen. Um diese Aussage zu bestätigen wären weiterführende Untersuchungen sinnvoll, die den Einfluss von Ig's auf weitere Apoptoseproteine untersuchen, welche am extrinsischen Signalweg beteiligt sind. Auch muss berücksichtigt werden, dass pro Probandengruppe nur fünf Individuen getestet wurden, was aufgrund der geringen Anzahl keine signifikante Aussage ermöglicht. Die Ergebnisse müssten daher an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden. Auch ist anzumerken, dass die hier dargestellten Untersuchungen mit der Cholangiozyten-Tumorzelllinie TFK-1, also einem artifiziellen System durchgeführt wurden. So wurde zum Beispiel in geschädigten interlobulären Gallengangsepithelzellen in Biopsiematerial von PBC-Patienten keine bzw. eine reduzierte Bcl-2- und Bax-Expression nachgewiesen, während sie in Biopsien von Hepatitis C-Patienten im Vergleich zu den PBC-Patienten erhöht war [186, 187]. Die Übertragung des in dieser Arbeit beschriebenen Systems auf isolierte Gallengangsepithelzellen aus Biopsiematerial von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen könnte daher in künftigen Studien Hinweise auf den natürlichen Einfluss der AAK auf die apoptotische Signalkaskade geben.

Neben dem Einfluss der AAK auf die mAChR3 Rezeptoraktivität, die Proliferationsrate und Apoptosemechanismen sollte zudem geklärt werden, ob Cholangiozyten durch die Inkubation mit Ig's zur Zytokinsekretion angeregt werden. Hierfür wurden die Ig's der PBC-, PSC-, AIH- und SS-Patienten sowie der gesunden Probanden mit TFK-1-Zellen inkubiert und die Zytokinsekretion mittels ELISA in den Zellüberständen analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt des mAChR3 Agonisten Carbachol und des Antagonisten Atropin auf die Zytokinfreisetzung getestet. Von Interesse waren in erster Linie Zytokine, die auch von Endothelzellen gebildet werden, wie z. B. IL-1 α , IL-6, oder TNF- α , weitere Zytokine wurden ebenso analysiert (IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ , GM-CSF und TNF- β). Es waren jedoch in den Überständen keinerlei Zytokine nachweisbar,

weder nach 1- noch nach 24-stündiger Inkubation der TFK-1-Zellen mit den Ig's, dem mAChR3 Agonisten oder dem Antagonisten. Die mangelnde Zytokinsekretion könnte auf eine spontane Mutation der Tumorzelllinie TFK-1 während der Kultivierung zurückzuführen sein. Auch hier wären ähnliche Analysen entweder mit anderen Cholangiozyten-Zelllinien oder isolierten Gallengangsendothelien aus Biopsiematerial sinnvoll. Auch mittels PCR-Untersuchungen könnte überprüft werden, ob die entsprechenden Zytokin-Gene exprimiert werden.

5.2 Analyse der Epitopbindungsstellen von AAK an den mAChR3

Wie bereits aufgezeigt gibt es mehrere z. T. widersprüchliche Berichte in der Literatur bezüglich der Epitopbindungsstellen der AAK an den mAChR3. Berg et al. wiesen bei Verwendung des zweiten extrazellulären Loops im ELISA bei 64 % der PBC-Patienten IgG- und bei 91 % IgM-Antikörper nach [81]. Tsuboi et al. dagegen weisen für das N-terminale Ende des Rezeptors die stärkste anti-mAChR3 Antikörperbindung nach [82]. In der vorliegenden Arbeit sollte die Epitopspezifität nochmals anhand größerer Patientenkollektive untersucht werden. Des Weiteren wurde das full length Protein rekombinant hergestellt, um auch dieses hinsichtlich seiner Reaktivität mit Antikörpern in Patientenseren zu analysieren.

Die IgG-Reaktivität von Seren von Patienten mit AIH und SS mit dem full length mAChR3 Protein war signifikant geringer als die der gesunden Probanden. Die stärkste Reaktivität, und zwar nicht nur der IgG - sondern auch der IgM-Antikörper, wiesen Seren von Patienten mit ALD auf. Diese Befunde weisen darauf hin, dass das rekombinant hergestellte mAChR3 Protein die eigentliche Bindungsstelle der funktionellen anti-mAChR3 Antikörper nicht exprimiert bzw. diese eher Konformationsepitope erkennen. Passend hierzu ist, dass sie die Funktion des Rezeptors beeinflussen können, da die meisten funktionellen Autoantikörper gegen Konformationsepitope der korrespondierenden Rezeptoren gerichtet sind. Beachtenswert sind die Befunde bzgl. anti-mAChR3-Reaktivität der Seren von Patienten mit ALD, die in weiteren Studien vertieft und erweitert werden sollten, insbesondere die Analyse von anti-mAChR3 Antikörper vom IgA-Typ wäre hier

interessant, da bei ALD-Patienten häufig die IgA-Immunglobuline im Serum erhöht sind und zahlreiche IgA-Antikörper beschrieben wurden [142].

Parallel erfolgte die Testung derselben Patientenseren gegen 35 mAChR3 Peptidsequenzen, die eine exakte AAK Bindung an den Rezeptor aufzeigen sollten. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Reaktionen von IgG- und IgM-AAK mit Transmembranregionen und den intrazellulär gelegenen Loop-Sequenzen Nr. 1, 2 und 3 des mAChR3 analysiert. Insgesamt war die IgG- und IgM-Reaktivität von AIH- und SS-Seren geringer als die der Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen, wie bereits für das full length mAChR3 Protein gezeigt. In der Literatur wird vor allem der zweite extrazelluläre Loop als Targetantigen diskutiert, mit dem 4,2 % bis 90 % der SS-Seren reagierten (siehe Tabelle 1.2-1). Die hier aufgeführten Ergebnisse weisen hingegen eine starke IgG-Bindung an den zytoplasmatischen Loop Nr. 2 und den dritten extrazellulären Loop, sowie die angrenzenden Transmembranregionen des mAChR3 auf.

So reagierten Seren von PBC-Patienten insbesondere mit dem N-terminalen Ende und dem zweiten zytoplasmatischen Loop. Tsuboi et al. haben in ihrer Studie die IgG-AAK-Bindung von PBC- und PSC-Patienten an den N-Terminus und alle drei extrazellulären Domänen untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Antikörper gegen den ersten extrazellulären Loop als diagnostischer Marker vor allem für die anti-M2-AMA negative PBC geeignet sind und eine klare Differenzierung zur PSC zulassen. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Patientenseren die im funktionellen Lumineszenztest die mAChR3-Rezeptoraktivität stimulierten reagierten bevorzugt mit dem ersten Drittel des mAChR3, angefangen am N-terminalen Ende bis zum intrazellulären Loop Nr. 2. PSC-Seren reagierten sowohl mit dem intrazellulären Loop Nr. 2 als auch mit mehreren Transmembranregionen. Auffällig ist jedoch, dass keine Reaktion mit dem C-Terminus erfolgte. Seren von Patienten mit einer Virushepatitis reagierten ebenso diffus mit verschiedenen Peptiden, jedoch am stärksten mit den Peptiden, die dem intrazellulären Loop Nr. 2, der dritten extrazellulären Schleife und der angrenzenden Transmembranregion entsprechen. Seren von Patienten mit alkoholinduzierten Lebererkrankungen reagierten dagegen insbesondere mit dem

Peptid des extrazellulären Loop Nr. 3 und der nachfolgenden Transmembranregion. Insgesamt zeigten Seren von VH-Patienten die häufigste und stärkste IgG-Reaktivität gegenüber den 35 verschiedenen mAChR3 Peptiden.

Hingegen zeigten PBC-, VH- und ALD-Patienten eine gleich häufige und intensive IgM-Bindung an die einzelnen Peptide auf. Hierbei waren IgM-Antikörper ebenfalls überwiegend gegen den extrazellulären Loop Nr. 3, den zytoplasmatischen Loop Nr. 1 und 2, ein Peptid innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife und das C-terminale Ende des mAChR3 gerichtet. Patientenseren, die im funktionellen Lumineszenztest die mAChR3-Rezeptoraktivität stimulierten, reagierten bevorzugt mit drei Peptiden innerhalb des intrazellulären Loop Nr. 3 und dem C-terminalen Ende. PSC-Seren enthielten vor allem IgM-Antikörper gegen den zytoplasmatischen Loop Nr. 1, die angrenzende Transmembranregion und den C-Terminus. Antikörper in PSC-Seren, die die den Rezeptor aktivierten, reagierten mit keinem der Peptide. Seren von Patienten mit einer Virushepatitis zeigten eine starke IgM-AAK-Reaktivität an die Transmembranregion nach dem intrazellulären Loop Nr. 1 und an ein Peptid des zytoplasmatischen Loop Nr. 3, sowie über eine verstärkte Bindung an den C-Terminus des Rezeptors. Die ALD-Patientenseren reagierten mit denselben Peptiden wie die VH-Patientenseren. Analog zur Analyse der IgG-AAK zeigten auch IgM-AAK aus dem Serum von SS-Patienten kaum eine Reaktivität gegenüber den Peptiden, was der Literatur aber widerspricht [80]. Zusammengefasst zeigen die hier aufgeführten Ergebnisse eine starke IgM-Bindung an die angrenzenden Transmembranregionen des zytoplasmatischen Loop Nr. 1, an das Peptid 287 - 311 in der dritten zytoplasmatischen Schleife, den extrazellulären Loop Nr. 3 und den nachfolgenden C-Terminus des mAChR3.

Die ausgeprägte IgG- und IgM-Reaktivität gegenüber den jeweiligen Transmembranregionen kann auf die Überlappung der Aminosäuresequenzen zurückgeführt werden. Wie in Kapitel 2.11 aufgeführt, überlappen sich die Peptidsequenzen beidseitig um mindestens 7 Aminosäuren. Folglich könnte die Synthese der Peptide eine Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse zur Literatur sein. Eine weitere Ursache für die hier erbrachten kontroversen Ergebnisse, im Vergleich zur Literatur, könnte die Ähnlichkeit von

Peptidsequenzen von Pathogenen, (Viren, Bakterien, Parasiten) und körpereigene Strukturen darstellen. Die Homologie zwischen der Peptidsequenz von Pathogenen und menschlichen Antigenen könnte zu einer Aktivierung autoreaktiver B- und T-Zellen führen [188, 189] und folglich in einem Verlust der immunologischen Selbsttoleranz resultieren. Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, werden diverse Pathogene für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht. Die hier aufgezeigte überschießende IgG- und IgM-Reaktivität gegenüber den jeweiligen Peptiden könnte demnach auch auf eine Immunantwort gegenüber einer Peptidsequenz eines Pathogens zurückzuführen sein. Daher wurden die einzelnen mAChR3 Peptide (siehe Tabelle 2.11-1) mit der Proteinsequenzdatenbank Protein BLAST des NCBI (National Center for Biotechnology Information) abgeglichen. Eine Homologie der hier verwendeten mAChR3 Peptidsequenzen zu anderen Organismen ließ sich aber nicht ermitteln.

Neben dem molekularen Mimikry werden häufig Mutationen der HLA-Genotypen als Ursache von Autoimmunerkrankungen angenommen [190, 191]. Die HLA-Region ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Dabei sind die HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Gene, die mit der Produktion von HLA-Klasse-I- und die HLA-D-Gene mit der Produktion von HLA-Klasse-II.-Proteinen assoziiert. Klasse-I-Proteine präsentieren in erster Linie kurze Fragmente von intrazellulären Antigenen an CD8⁺-T-Zellen, während HLA-Klasse-II-Proteine extrazelluläre Antigene an CD4⁺-T-Zellen präsentieren. Im Vergleich von Patienten zur normalen Population hat sich gezeigt, dass verschiedene Allele des HLA-Komplexes verändert sind. Insbesondere korrelieren häufig Veränderungen der Aminosäuresequenz eines HLA-Klasse-II-Proteins mit der Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen, allerdings gibt es auch vermehrt Studien, die eine Mutation in HLA-Klasse-I-Allelen aufzeigen. Neben der Prädisposition für Autoimmunerkrankungen wird darüber hinaus postuliert, dass spezifische HLA-Varianten in einer veränderten Immunantwort auf spezifische Antigene resultieren [192, 193, 194]. Für die Autoimmunerkrankungen, welche in dieser Arbeit fokussiert werden liegen ganz unterschiedliche Studien bezüglich des Polymorphismus der HLA-Klasse-I- und -II-Komplexe vor, welcher wiederum mit der Herkunft der Bevölkerung, dem Phänotyp, dem Krankheitsverlauf, der

Expression von Autoantikörpern oder einer Überlappung mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist.

Demnach könnten PBC-, PSC-, AIH-, VH- und ALD-Patienten verschiedene HLA-Allel-Varianten aufweisen, die nach Aufnahme des mAChR3 Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) in einer fehlerhaften oder unvollständigen mAChR3-Epitop Präsentation auf den APCs resultieren. Diese führt zu einer Aktivierung von T- bzw. B-Zellen mit der Folge der Induktion der Produktion von AAK gegen den mAChR3. Es könnte demnach angenommen werden, dass in den Seren der jeweiligen Patientenkohorten unterschiedliche mAChR3 Antikörper vorhanden sind, die jeweils mit einem anderen Epitop des Rezeptors reagieren. Um eine spezifische Epitop-Sequenz mit der Pathogenese einer der hier untersuchten Erkrankungen zu korrelieren, sollte daher eine Analyse der HLA-Allel-Varianten der Patientengruppen erfolgen und eine Statistik in Bezug auf die mAChR3 Peptide erhoben werden. Darüber hinaus könnte sich das spezifische Epitop aus mehreren Peptidsequenzen des mAChR3 zusammensetzen. Um diese Theorie zu verifizieren sollten weitere Untersuchungen mit diversen Variationen an Peptiden folgen. Hierbei können die bereits aufgezeigten IgG- und IgM-Reaktivitäten berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass Peptide, die in dieser Arbeit besonders häufig bzw. stark gebunden wurden, in weiterführenden Studien miteinander kombiniert werden sollten.

5.3 Zusammenfassung der CD69 Aktivierung, Zytokinsekretion und Zellproliferationsrate von PBMC

Für die meisten Autoimmunerkrankungen sind bisher die Faktoren, welche die immunologische Reaktion gegen autologe Antigene initiieren, nicht bekannt. Generell können Autoantigene durch CD4⁺-T-Zellen erkannt werden, was zu einer Aktivierung der naiven T-Zellen und Einleitung der Immunkaskade führt. Naive T-Zellen können abhängig von der immunologischen Mikroumgebung und der Natur des Antigenepitops in Th₁-, Th₂- oder Th₁₇-Zellen differenzieren. Hierbei sind Zytokine die Schlüssel-moleküle für die Entstehung der Immunreaktionen. Das führt und die Expression von HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Molekülen verstärkt.

Aktiviert Makrophagen sezernieren TNF- α . Th₂-Zellen sezernieren IL-4 und IL-5, die wichtige Zytokine für die Reifung von B-Zellen in Plasmazellen sind und dadurch die Produktion von Autoantikörpern initiieren. Für die Differenzierung in Th₁₇-Zellen wird die Stimulation von TGF- β und IL-6 notwendig. Die Th₁₇-Zellen sekretieren IL-17 und sind in der Lage, die Aktivierung von T_{regs} zu unterdrücken. T_{regs} sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems und unterdrücken übermäßige Immunreaktionen bei Autoimmunerkrankungen. Unter normalen physiologischen Bedingungen können sich die Th₁- und Th₂-Zellen sowie deren assoziierte Zytokine gegenseitig hemmen. Somit wird eine Veränderung der Balance zwischen der Th₁- und Th₂-Immunantwort oder auch eine Hyperaktivität der Th₁₇-Zellen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht [195]. Der Verlust der Selbsttoleranz bzw. die Induktion autoreaktiver Lymphozyten ist verantwortlich für die Destruktion von Cholangiozyten und Hepatozyten bei autoimmunen Lebererkrankungen. Die Arbeit von Naito Y. et al. demonstriert die Präsenz von über 50 % mAChR3 reaktiven T-Zellen in PBMC von SS-Patienten. Zudem zeigen 40 % der autoreaktiven T-Zellen eine gesteigerte IFN- γ Produktion mit einer hohen Affinität an den zweiten extrazellulären Loop des mAChR3 [196]. Darüber hinaus konnten Sumida T. et al. die Beteiligung von mAChR3 reaktiven Th₁- und Th₁₇-Zellen bei der Speicheldrüsenentzündung (Sialadenitis), die typisch in SS-Patienten ist, aufzeigen [197]. Des Weiteren lassen deren Daten vermuten, dass reaktive T-Zellen bevorzugt an die erste Domäne des mAChR3 binden. Informationen über den Einfluss von mAChR3 AAK auf die Lymphozyten von PBC-, PSC- und AIH-Patienten stehen bisher nicht zur Verfügung. Ein Ziel war es daher den Einfluss des mAChR3 Antigens auf die Aktivierung, die Zytokinsekretion und Zellproliferation der PBMC von PBC-, PSC- und AIH-Patienten, sowie von gesunden Probanden zu analysieren.

In Tabelle 5.3-1 sind die in dieser Arbeit angefertigten Ergebnisse zusammengefasst. Interessant war, dass das full length mAChR3 Antigen am stärksten die Reaktivität von PBMC von PBC-Patienten beeinflusste. Zum Einem konnte eine Aktivierung der CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden, zum Anderen hatte die mAChR3 Antigeninkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine

Reduzierung der IL-1 α -, IL-5-, IL-13-, IFN- γ - und GM-CSF-Sekretion, aber eine erhöhte IL-6-Produktion zur Folge. Es konnte jedoch keine Veränderung der Proliferationsrate festgestellt werden. Auch die Proliferation der PBMC von PSC-Patienten wurde durch Inkubation mit dem mAChR3 nicht beeinflusst, sie resultierte aber in einer Aktivierung von CD19⁺-Zellen. Darüber hinaus war eine verminderte IL-5 und eine verstärkte IL-6 Sekretion zu beobachten. Die Inkubation von PBMC von AIH-Patienten förderte dagegen die Zellproliferation sowie die Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Des Weiteren konnte eine verringerte IL-10 und IFN- γ Sekretion festgestellt werden. Bei gesunden Probanden zeigte sich nach der mAChR3 Antigen-Behandlung ebenfalls eine reduzierte IFN- γ Produktion und eine verringerte TNF- α Konzentration sowie eine verstärkte Aktivierung der CD8⁺-Zellen.

Tabelle 5.3-1: Einfluss der mAChR3 Antigen Inkubation auf die Zellproliferation, Zellaktivierung und Zytokinsekretion der PBMC von PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden.

Zusammenfassung		PBC-Patienten	PSC-Patienten	AIH-Patienten	gesunde Probanden	
CD69-Aktivierung	CD19	ns	↑	ns	ns	
	CD56	ns	ns	ns	ns	
	CD4	↑	ns	↑	ns	
	CD8	ns	ns	↑	↑	
Zytokinproduktion	Makrophagen	IL-1 α	↓	ns	ns	ns
		TH ₁	TNF- α	ns	ns	ns
	TNF- β		ns	ns	ns	ns
	IFN- γ		↓	ns	↓	↓
	TH ₂	IL-5	↓	↓	ns	ns
		IL-6	↑	↑	ns	ns
		IL-10 (T _{reg})	ns	ns	↓	ns

Zusammenfassung			PBC-Patienten	PSC-Patienten	AIH-Patienten	gesunde Probanden
Zytokinproduktion	TH ₂	IL-13	↓	ns	ns	ns
	Vorläuferzellen: Monozyten	GM-CSF	↓	ns	ns	ns
Proliferation			ns	ns	↑	ns

ns = nicht signifikant

Bei Patienten mit PBC wurde zu Beginn der Erkrankung eine verstärkte Typ 1-Immunantwort beschrieben, die sich im Verlauf der Erkrankung in Richtung Th₂ verschiebt [95, 198]. Die erhöhten Th₁-zellbedingten Zytokine, wie das IFN- γ und IL-2, können durch Behandlung mit UDCA verringert werden [199, 200]. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich der IFN- γ -Serumspiegel nach sechsmonatiger Therapie mit UDCA wieder erholt [199]. Neben der Th₁-Immunantwort haben weitere Studien aufgezeigt, dass sich IL-17 positive Zellen um die beschädigten Gallengänge anreichern [97, 201]. Zudem postuliert die Arbeit von Rong et al. ein erhöhtes Verhältnis von Th₁₇-Zellen zu T_{regs} in PBMC von PBC-Patienten. Weiter wird vermutet, dass dieses Ungleichgewicht der Th₁₇/T_{regs} für den Verlust der Selbsttoleranz bei der PBC verantwortlich ist [98]. Zusammengefasst belegen etliche Studien, dass CD4⁺-T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PBC spielen [202]. Dennoch ist bis heute unklar, welche Subpopulation der Th₁-, Th₁₇-Zellen oder T_{regs} in der Erkrankung vorherrschend ist. Weitere Studien haben aufgezeigt, dass Patienten mit PBC eine Reduktion der CD4⁺CD25⁺-T-Zellen aber eine verstärkte Foxp3⁺ Expression der CD4⁺-T-Zellen aufweisen [203]. Allerdings kumulieren die CD4⁺Foxp3⁺-T-Zellen hauptsächlich in der Leber, dies wird wiederum mit der Kolo-kalisierung aktiver CD8⁺-Zellen in Verbindung gebracht [204]. Außerdem zeigen Bernuzzi et al., dass die CD8⁺-T_{regs} bei PBC-Patienten reduziert sind und darüber hinaus phänotypische Veränderungen aufweisen [205]. Im Vergleich zu CD4⁺-Zellen sind die CD8⁺-Zellen die Initiatoren bei der Zerstörung der Gallengänge. Markant ist zudem, dass das Verhältnis der CD8⁺-Zellen zu Foxp3⁺-Zellen im späten Stadium der PBC deutlich höher liegt

[206]. Diese und weitere Befunde deuten darauf hin, dass CD8⁺-Zellen aufgrund des Funktionsverlustes der T_{regs} an der Destruktion der Gallengänge beteiligt sind [207].

Neben dem erworbenen Immunsystem ist die Beteiligung der angeborenen Immunantwort bei der PBC in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus geraten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten von PBC-Patienten hypersensibel auf die Signale von bestimmten TLRs reagieren, wodurch verstärkt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, und TNF- α sekretiert werden [208]. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Expression des TLR3 [209] und des TLR4 [210, 211] auf BECs festgestellt werden. Eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystems stellen die NK-Zellen dar. Von den gesamten Lymphozyten in der Leber sind 30 % NK-Zellen. Chuang et al. berichteten über eine höhere Anzahl von NK-Zellen sowohl im Blut als auch in der Leber von PBC-Patienten, die zudem eine höhere zytotoxische Aktivität aufwiesen [212]. Die Studie von Shimoda et al. untermauert die Beteiligung der NK-Zellen in der PBC. Sie konnten zeigen, dass NK-Zellen, die durch den TLR4 stimuliert wurden, BECs bei gleichzeitiger IFN- α Anwesenheit zerstören, welches wiederum von TLR3 stimulierten Monozyten synthetisiert wurde. Zudem wurde eine erhöhte Anzahl von CD56⁺-Zellen um die kleinen zerstörten Gallenwege identifiziert [213]. Diese und weitere Studien lassen vermuten, dass durch TLR-Signalling ausgelöst Entzündungsreaktionen ein weiterer wesentlicher Aspekt bei dem Verlust der Selbsttoleranz sein könnten.

Bei Autoimmunerkrankungen gerät vermehrt auch die Rolle des GM-CSF in den Fokus. Ursprünglich wurde der GM-CSF als hämatopoetischer Wachstumsfaktor identifiziert [214]. Darüber hinaus ist der GM-CSF als Stimulator für die Proliferation, Differenzierung, Reifung und Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen beteiligt [215]. Neuere Studien deuten darauf hin, dass der GM-CSF auch entzündliche Funktionen besitzt und bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, die vor allem eine Th₁₇ Signatur aufweisen, eine wichtige Rolle spielt [216, 217], wie z. B. bei der Autoimmun-Arthritis, welche durch GM-CSF durch die Mobilisierung von entzündlichen Makrophagen aktiviert

wird [218]. Andererseits haben mehrere Studien *in vivo* gezeigt, dass GM-CSF Autoimmunerkrankungen auch unterdrücken kann. Dies konnte für die experimentelle Autoimmunthyreoiditis (EAT), die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG), den Typ-1-Diabetes (T1D) und die Colitis gezeigt werden [219]. Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Wirkung von GM-CSF dosisabhängig ist, wobei eine niedrige Dosis an GM-CSF eine suppressive Wirkung hat, eine höhere Dosis dagegen zu einer erhöhten Immunantwort führt [220].

Auf Grund der gesteigerten Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen von PBC-PBMC nach Inkubation mit dem mAChR3 Antigen wird angenommen, dass das Antigen bzw. seine Peptide hauptsächlich an den MHC-II-Komplex binden. Die verstärkte Aktivierung der CD4⁺-Zellen gilt als typisch für die PBC [93, 94], und insofern passen die vorliegenden Befunde zu den publizierten Daten. Die verringerte IL-1 α Sekretion lässt sich so interpretieren, dass die Th₁-Immunantwort gehemmt ist, so dass eine Interaktion der CD4⁺-Zellen mit den Makrophagen nicht möglich ist. Auch die verringerte IFN- γ Konzentration weist auf eine reduzierte Th₁-Immunantwort hin, die allerdings auch durch die UDAC-Therapie bedingt sein könnte. Wie bereits erwähnt ist vor allem zu Beginn der PBC eine Verschiebung hin zur Th₁-Antwort zu beobachten. Die hier aufgezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die getesteten Patienten verstärkt mit einer Th₂-Antwort reagieren, was eine Interaktion zwischen den CD4⁺-Zellen und B-Zellen bedeutet. Die erhöhte IL-6-Produktion spiegelt diese gesteigerte humorale Th₂- sowie die verminderte Typ-1-Reaktion wieder. Kontrovers dazu ist allerdings die mangelnde B-Zellaktivierung und die signifikant reduzierte IL-5- und IL-13- Sekretion. Jedoch könnte die verstärkte IL-6 Sekretion auch bedeuten, dass die Differenzierung von Th₁₇-Zellen angeregt wird, was die Hypothese des Verlusts der Selbsttoleranz, ausgelöst durch ein Ungleichgewicht hin zu Th₁₇-Zellen, bestätigt. Rong et al. beschreiben eine Imbalance zwischen einer erhöhten Th₁₇-Population bei gleichzeitiger reduzierter T_{reg}-Population. Daher wäre ebenfalls eine Auswirkung der mAChR3 Behandlung auf die IL-10 Sekretion zu erwarten, welches jedoch nicht der Fall war [98]. Ein wichtiges Kennzeichen der PBC ist die Infiltration von eosinophilen Granulozyten in das intraportale Gewebe [95]. Ausschlaggebend für

die Aktivierung der eosinophilen Zellen ist das IL-5. Die Inkubation der PBMC mit dem mAChR3 Antigen resultierte jedoch in einer reduzierten IL-5 Sekretion, was daraufhin deuten könnte, dass mAChR3 Antigene die Infiltration von eosinophilen Granulozyten verhindern, allerdings ist die IL-5 Sekretion trotzdem signifikant höher als die bei den gesunden Probanden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auf, dass die mAChR3 Antigen-Stimulation keinen Einfluss auf die Beteiligung der angeborenen Immunantwort durch NK-Zellen hat. Ferner wird deutlich, dass sie keinen Effekt auf die Zellproliferation der PBMC hat, welches die fehlende CD56-Zellaktivierung bestätigt. Der GM-CSF ist, wie zuvor beschrieben, sowohl an immun-modulatorischen als auch an immunsuppressiven Prozessen beteiligt. Die PBMC der PBC-Patienten sekretierten nach der mAChR3 Antigen Inkubation eine deutlich niedrigere Konzentration des GM-CSF als unbehandelte Lymphozyten. Dies korreliert sowohl mit der verringerten IL-1 α - und IL-5-Produktion als auch mit der Proliferationsrate. Kontrovers dazu ist jedoch die erhöhte CD4⁺-T-Zellaktivität und die verstärkte IL-6 Sekretion, die auf eine unterstützende Pathogenität hinweisen könnten. Aus diesen Gründen wird angenommen, dass das mAChR3 Antigen keinen direkten Einfluss auf die pro- bzw. antiinflammatorischen Eigenschaften des GM-CSF ausübt. Die Tatsache, dass keine reduzierte Zellproliferation nachgewiesen werden konnte, lässt außerdem vermuten, dass das mAChR3 Antigen keine Auswirkung auf die CD8⁺-Zellaktivität ausübt, was sich darin widerspiegelt, dass keine signifikante Aktivierung der CD8⁺-Zellen im Vergleich zu unbehandelten PBMC vorlag.

Es wird postuliert, dass die PSC durch Bakterien bzw. durch die Aktivierung von PAMPs, die durch einen entzündeten, durchlässigen Darm in den Portalkreislauf eindringen, ausgelöst wird, wodurch vor allem das angeborene Immunsystem aktiviert wird [221]. Die Inkubation der PBMC von PSC-Patienten mit dem mAChR3 Antigen hatte keinen Effekt auf die Aktivierung der NK-Zellen oder etwa auf die Zytokinsekretion von TNF- α . Demnach zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass mAChR3 Antigene nicht an TLRs/PAMPs auf den PMBCs der PSC-Patienten binden und eine immuntypische Signalkaskade in Gang setzen

können. Bo et al. haben hingegen aufgezeigt, dass CD4⁺-T-Zellen mit Th₁-inflammatorischen Mediatoren vorherrschend bei der PSC sind. So konnten sie im Vergleich zu PBC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden höhere Werte von TNF- α , IL-1 β und niedrigere Konzentrationen von IL-2, IL-10 und IFN- γ in den Überständen von leberinfiltrierenden Lymphozyten von PSC-Patienten nachweisen [222]. Wiederum andere Studien beschreiben die Dominanz von CD8⁺-T-Zellen [223, 224] oder gar keinen Unterschied im CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis im Vergleich zu anderen Lebererkrankungen [225].

In der vorliegenden Arbeit resultierte die mAChR3 Antigen-Behandlung der PBMC von PSC-Patienten in einer Aktivierung der CD19⁺-Zellen und einer, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, erhöhten IL-6 Sekretion. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das mAChR3 Antigen die humorale Immunantwort in PSC-Patienten bzw. die Antikörperproduktion fördert und die Th₁-Antwort hemmt. Die verminderte IL-5-Sekretion der PBMC nach der Stimulation mit dem mAChR3 Antigen könnte dafür sprechen, dass die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und deren Inflammation in den Gallengängen unterdrückt wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Inkubation mit mAChR3 keinen Effekt auf die Immunprozesse von PBMC hat. Hierfür spricht, dass die Inkubation der PBMC mit dem mAChR3 Antigen keinen Einfluss auf die Zellproliferation der PBMC bzw. die Aktivierung von CD56⁺-, CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen hatte.

Obwohl die für die Pathogenese der AIH relevanten Faktoren bisher nicht bekannt sind, haben verschiedene Studien gezeigt, dass die AIH durch eine immunologische Reaktion gegen autologe Leberantigene initiiert wird [226, 227]. Es gibt nur wenige Studien bezüglich der Th₁/Th₂-Balance bei der AIH, jedoch deuten diese daraufhin, dass sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort an der Pathogenese der AIH beteiligt ist [228, 229]. Ferner wird ein Defekt der T_{regs} [230] für die Pathogenese von AIH verantwortlich gemacht, der die Entstehung und die Persistenz der Erkrankung beeinflussen könnte [231]. Die Untersuchungen der mAChR3 Antigen-Behandlung auf die Zellaktivierung von PBMC der AIH-Patienten zeigt eine verstärkte Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Demnach könnten mAChR3 Peptide an HLA-Klasse-I- und HLA-

Klassen-II-Molekülen binden, d. h. die Typ-1 und Typ-2 Immunantwort beeinflussen. Im Gegensatz zu der Aktivierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen steht die mangelnde Th₁- und Th₂-Zytokinantwort. Hier konnte lediglich eine reduzierte IFN- γ und IL-10 Sekretion festgestellt werden, was auf eine gegenseitige Hemmung der zellulären und der humoralen Immunantwort hinweisen könnte. Interessant ist, dass die mAChR3 Antigen Inkubation nur die Proliferation der PBMC von AIH-Patienten stimulierte. Insgesamt lassen die hier aufgezeigten Ergebnisse jedoch keine eindeutige Aussage zu, ob das mAChR3-Antigen/Antikörper-System an der Pathogenese der AIH beteiligt ist.

Bei gesunden Probanden liegt eine verstärkte Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen nach mAChR3 Antigen-Behandlung vor. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die Präsentation von mAChR3-Peptiden zytotoxische T-Zellen stimuliert werden, so dass die Apoptose induziert wird und somit weitere pathogene Reize des Antigens auf die Signalkaskade verhindert werden. Daher würde man erwarten, dass ein Rückgang der Proliferationsrate die Folge wäre, jedoch konnte keine Veränderung der Proliferation von PBMC nach mAChR3 Antigen Inkubation festgestellt werden. Hier ist anzumerken, dass gesunde Probanden generell eine signifikant höhere Proliferationsrate, mit oder ohne Antigen-Behandlung, im Vergleich zu Patienten aufweisen. Zudem war ebenfalls eine signifikant stärkere Aktivierung der CD56⁺-NK-Zellen bei gesunden Probanden als bei den Patienten zu beobachten, was darauf hinweist, dass PBMC der Patienten nicht mehr dieselbe Aktivität der angeborenen Immunantwort wie die von gesunden Probanden haben. Allerdings lag kein Unterschied der CD56⁺-Zellaktivierung im Vergleich zu behandelten und unbehandelten PBMC der gesunden Probanden vor. Demnach wird vermutet, dass das mAChR3 Antigen keinen direkten Einfluss auf die Aktivierung CD56⁺-NK-Zellen haben. Darüber hinaus führte die mAChR3 Antigen Inkubation zu einer verminderten TNF- α - und IFN- γ Sekretion. Da eine verstärkte CD8⁺-T-Zellaktivierung vorliegt, wäre eine erhöhte Produktion des IFN- γ zu erwarten, welche unter anderem auf die CD8⁺-Zellen stimulierend wirkt. Hier ist anzumerken, dass die Zytokinsekretion nach 7-tägiger mAChR3 Antigen-Behandlung erfasst wurde und die Aktivierung der PBMC nach 24-stündiger Behandlung. Es besteht hier die Möglichkeit, dass die TNF- α - und die IFN- γ -Sekretion zu Beginn der Stimulation

deutlich höher war als nach 7 Tagen und die Zytokine zum gemessenen Zeitpunkt bereits verbraucht waren, was wiederum als eine verringerte Th₁-Antwort interpretiert werden kann. Des Weiteren hatte die mAChR3 Antigen Inkubation keinerlei Auswirkung auf die Th₂-Antwort. Hier konnte allerdings allgemein eine signifikant höhere IL-6 Sekretion der PBMCs der gesunden Probanden im Vergleich zu PBMC von PBC-Patienten nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Fähigkeit hinweisen, Th₁₇-Zellen zu stimulieren, welche wiederum in der Lage sind T_{regs} zu unterdrücken.

Demnach kann vermutet werden, dass das gebundene mAChR3 Antigen von zytotoxischen T-Zellen zur Herunterregulation der Entzündungsprozesse führt. Weiter würde dies bedeuten, dass die Lymphozyten der Patienten bereits wichtige Zellfunktionen verloren haben, um adäquat auf die Inkubation mit dem mAChR3 Antigen zu reagieren. Dies wird ebenfalls dadurch bestätigt, dass die Lymphozyten der Patienten, mit oder ohne Antigen-Behandlung, eine generell signifikant höhere Proliferationsrate im Vergleich zu den gesunden Probanden aufwiesen. Außerdem war bei gesunden Probanden die Aktivierung CD56⁺-NK-Zellen und die IL-6 Sekretion signifikant höher als bei den Patienten. Dies bestätigt die Annahme, dass Lymphozyten von gesunden Probanden noch ein intaktes angeborenes Immunsystem haben, aber auch die adaptive Immunantwort problemlos in Gang gesetzt werden kann, dies aber wiederum bei den Patienten nicht mehr der Fall ist.

Es wäre interessant zu untersuchen welche Folgen eine Re-Stimulierung der zuvor getesteten Lymphozyten von gesunden Probanden mit dem mAChR3 Antigenen hätte. Die Fragestellung hierzu ist, inwiefern die Re-Inkubation mit dem mAChR3 Antigen dauerhafte bzw. irreversible Veränderungen in den Lymphozyten von gesunden Probanden initiieren können und ob dabei ein vergleichbares Aktivierungs- und Zytokinprofil wie bei den Patienten zu beobachten ist.

6 Fazit & Perspektive

6.1 Erkenntnisse über den Einfluss von mAChR3 AAK auf Cholangiozyten

Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss von AAK aus Patientenseren auf den mAChR3 hinsichtlich Rezeptorfunktion sowie Proliferation, intrinsische Apoptosemechanismen und Zytokinsekretion der Cholangiozyten Zelllinie TFK-1 zusammengefasst werden.

Mittels Durchflusszytometrie konnten IgG- und IgM-Antikörpern gegen mAChR3-exprimierenden Cholangiozyten in Seren von, PBC-, PSC- und Hepatitis C Patienten nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich ausschließlich um Antikörper des IgM Typus, während entsprechend der Literatur IgG-Antikörper zu erwarten gewesen wären. Die hier aufgezeigten Erkenntnisse reihen sich ebenfalls darin ein und decken sich mit der Aussage, dass mAChR3 AAK nicht als spezifischen Marker für die Diagnose des SS eignen. Auf Grund der Annahme, dass mAChR3 AAK die Sicca Symptomatik in SS-Patienten begünstigen und der Tatsache, dass diese Symptomatik häufig mit dem SS assoziierten PBC zu beobachten ist, war es von Interesse, die Wirkung der mAChR3 AAK speziell auf Cholangiozyten zu erweitern. Im Gegensatz zu der beschriebenen inhibierenden Wirkung der mAChR3 AAK auf die Rezeptorfunktionalität in HSG- oder CHO-Zellen zeigen die hier vorgelegten Befunde einen stimulierenden Effekt der AAK auf den mAChR3 auf Cholangiozyten. Vor allem die Inkubation mit Ig's von PBC-, AIH- und in geringerem Ausmaß von PSC-Patienten hatte einen stimulierenden Einfluss auf die mAChR3-Aktivität. Hingegen die Ig's von Patienten mit SS und Virushepatitis keinen Effekt auf die mAChR3 Rezeptorfunktionalität auf die Cholangiozyten Zelllinie TFK-1 hatten. Da destruktive Prozesse in Cholangiozyten charakteristisch für Patienten mit autoimmunen cholestatischen Lebererkrankungen sind, harmonieren die hier vorgestellten Erkenntnisse soweit, dass vorrangig Ig's von PBC- und PSC-Patienten den mAChR3 beeinflussten. Diese Theorie wird zudem durch die Ergebnisse des Adsorptionstests gestützt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass der stimulierende sowie der inhibierende Effekt von PBC- und PSC-Patienten Ig's auf den mAChR3 schon nach einmaliger

Adsorption aufgehoben wurde, wo hingegen nach der Adsorption der AIH- und SS-Patienten Ig's eine verstärkte Rezeptorfunktionalität beobachtet wurde. Man könnte daher postulieren, dass bei Patienten mit PBC und PSC anti-mAChR3 Antikörper spezifisch an Cholangiozyten binden und eine Stimulation des Rezeptors initiieren. Diverse Studien belegen, dass die Stimulation des mAChR3 in einer Aktivierung der anti-apoptischen Signalkaskade resultiert, was zu einer Hochregulierung der Gentranskription sowie der des Bcl-2-Proteins führt [55, 56]. Die hier durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Auswirkung der mAChR3-Aktivierung durch die AAK auf die Proliferationsrate und Apoptosemechanismen in Cholangiozyten lassen jedoch keinen klaren Trend erkennen, da nur ein geringer Effekt auf die Zellproliferation sowie die Expression von anti-apoptischen Bcl-2 oder den pro-apoptischen Proteinen Bax und Caspase-9 durch Ig-behandelte und unbehandelte TFK-1-Zellen festgestellt werden konnte. Weiterführende Untersuchungen der agonistischen Wirkung der AAK Behandlung auf die Zytokinsekretion der Cholangiozyten konnten ebenso wenig ausgewertet werden, da keinerlei Zytokinproduktion durch die TFK-1-Zellen ermittelt wurde. Es wird daher vermutet, dass die mangelnde Proliferation und Zytokinsekretion, sowie die Tatsache, dass die mitgeführten Kontrollen in den Apoptose-Assays nicht die erwartete Bcl-2, Bax und Caspase-9 Expression widerspiegeln, auf einen artifiziellen Effekt der verwendeten Tumorzelllinie zurückzuführen ist.

Generell liefern die dargestellten Ergebnisse nur einen ersten Hinweis auf einen komplexen Mechanismus. Weiterführend wäre von Interesse, den Einfluss von anti-mAChR3 Antikörper auf die Zellproliferation, die Apoptosemechanismen und die Zytokinsekretion von BECs aus Lebern von Patienten zu analysieren. Darüber hinaus könnten Tests durchgeführt werden, die den Effekt der mAChR3 AAK auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen untersuchen. Damit könnte die Frage beantwortet werden, ob mAChR3 AAK fähig sind, gleichzeitig noch weitere GPCRs mit unterschiedlicher Signaltransduktion zu aktivieren und ihre Auswirkung auf die Expression von Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

6.2 Erkenntnisse über die exakte Epitopbindungsstelle von AAK an den mAChR3 (B-Zell Epitop)

Auf Grund häufiger Überlappung zu weiteren Autoimmunerkrankungen wäre es von großem Vorteil, die Affinität der mAChR3 AAK spezifisch einer der Erkrankungen zuordnen zu können. Hierfür ist es notwendig die exakte Epitopbindungsstelle der AAK an den Rezeptor zu identifizieren, welche als diagnostisches oder therapeutisches Instrument verwendet werden könnte.

Vorangegangene Studien, die sich mit der Analyse der Epitopbindungsstelle der mAChR3 AAK von SS- aber auch von PBC-Patienten beschäftigt haben, weisen eine große Diskrepanz diesbezüglich auf. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Bindung von mAChR3 AAK vom IgG- und IgM-Typ in Seren von Patienten mit PBC, PSC, AIH, Virushepatitis, ALD und SS an 35 verschiedene mAChR3 Peptidsequenzen, welche den kompletten Rezeptor reflektieren, getestet.

Zusammengefasst zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass Patienten mit autoimmunen, viralen oder alkoholinduzierten Lebererkrankungen, wie auch gesunde Probanden mit unterschiedlicher Intensität an die einzelnen Epitope des mAChR3 binden. Jedoch weisen IgG-AAK eine häufige Bindung an Peptide des zweiten zytoplasmatischen, den dritten extrazellulären Loop und die angrenzenden Transmembranregionen des mAChR3 auf. Hingegen reagieren IgM-AAK bevorzugt mit der an den zytoplasmatischen Loop Nr. 1 angrenzenden Transmembranregion, mit einer Peptidsequenz innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife sowie der dritten extrazellulären Schleife und dem nachfolgenden C-Terminus des mAChR3. Insgesamt konnte keine spezifische Antikörper-Reaktivität an eines der mAChR3 Epitope innerhalb für die hier untersuchten Patientengruppen identifiziert werden, welches zukünftig bei der Differenzierung der Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden könnte. Dabei konnte die Möglichkeit von Molekularen Mimikry ausgeschlossen werden. Es sollten weitere Untersuchungen folgen, die eine Analyse der HLA-Allel Varianten innerhalb der Patientengruppen berücksichtigen und somit weiteren Aufschluss

bezüglich der Korrelation zwischen der Epitop Sequenz und der Pathogenese liefern.

6.3 Erkenntnisse über den Einfluss von mAChR3 AAK auf Lymphozyten (autoreaktive T-Zellen)

Ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es, den Effekt des mAChR3 Antigens auf die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsekretion von Patienten PBMC zu analysieren.

Lymphozyten der PBC-Patienten reagieren auf das mAChR3 Antigen mit einer gesteigerten CD4⁺-Zellaktivierung. Die verringerte IL-1 α Sekretion und IFN- γ Konzentration weist auf eine Inhibition der Th₁-Immunantwort hin. Die verstärkte IL-6 Produktion spiegelt eine verstärkte humorale Th₂-Immunantwort wider, könnte aber auch auf eine Differenzierung von Th₁₇-Zellen hinweisen. Die Inkubation von PBMC mit dem mAChR3 Antigen resultierte zudem in einer reduzierten Konzentration des GM-CSF, was mit der verringerten IL-1 α , IL-5 Produktion und dem mangelnden Einfluss auf die Proliferationsrate korreliert. Im Gegensatz dazu hatte die mAChR3 Antigen-Behandlung der PBMC von PSC-Patienten, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, eine Aktivierung der CD19⁺-Zellen und eine korrelierende erhöhte IL-6 Sekretion zur Folge. Des Weiteren konnte eine verminderte IL-5 Sekretion nach der Stimulation mit dem mAChR3 Antigen beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass vor allem die humorale Immunantwort durch mAChR3 AAK angesprochen wird. AIH-Patienten weisen eine verstärkte CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellaktivierung, jedoch eine reduzierte IFN- γ und IL-10 Sekretion nach der mAChR3 Antigen Inkubation auf. Allerdings waren die PBMC von AIH-Patienten die Einzigen, die mit einer erhöhten Proliferation auf die mAChR3 Stimulation reagierten. Im Vergleich dazu führte die mAChR3 Antigen Inkubation zu einer Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen der Lymphozyten von gesunden Probanden. Nach 7-tägiger mAChR3 Antigen-Stimulation wurde eine verminderte TNF- α - und IFN- γ Sekretion beobachtet, die aber keinen Einfluss auf die Zellteilung hatte.

Für künftige Studien wäre es interessant, neben den hier geprüften CD19⁺-, CD56⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auch den Einfluss des mAChR3 auf weitere Subpopulationen wie TH₁₇⁺- Zellen und/oder T_{regs} zu analysieren. Ferner könnte die Lymphozytenreaktivität auf die verschiedenen mAChR3-Epitope getestet werden. Ein weiterer Ansatz, die Auswirkung des mAChR3 Antigens auf immunkompetente Zellen zu präzisieren, wäre die Analyse auf DNA bzw. mRNA Ebene.

7 Anhang

In dem folgenden Kapitel werden die Plasmidkarten der verwendeten Plasmide als auch alle Ergebnisse aufgeführt, die nicht im Ergebnissteil 4 dargestellt wurden.

7.1 Plasmidkarte pG5A

Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pG5A für die Transfektion der GFP-/Aequorin-Sequenz in CHO und TFK-1-Zellen im Lumineszenz und Adsorptions-Assay.

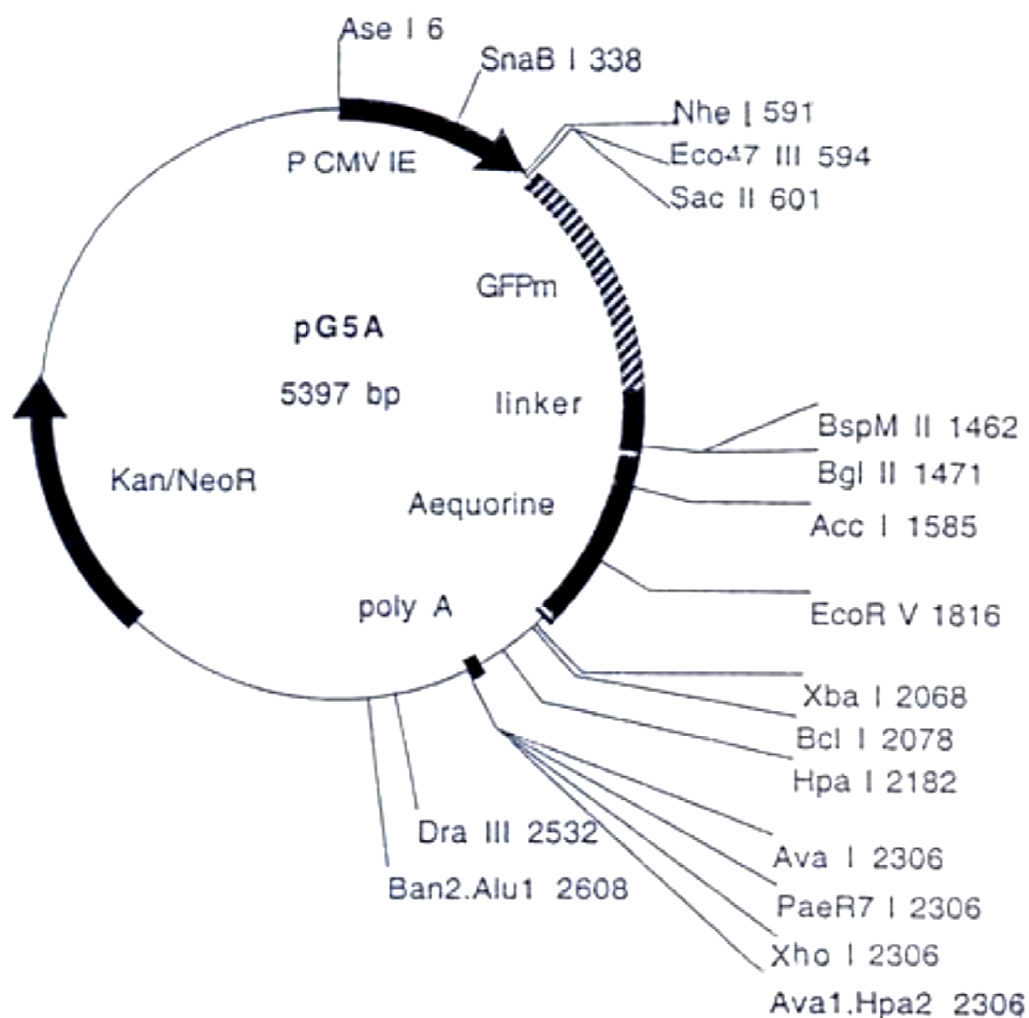


Abbildung 7.1-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pG5A für die Transfektion der GFP-/Aequorin-Sequenz in CHO und TFK-1-Zellen im Lumineszenz Assay.

7.2 Plasmidkarte pcDNA3.1 (+/-)

Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pcDNA3.1 (+/-) für die Transfektion der mAChR3-Sequenz in CHO und TFK-1-Zellen im Adsorptionstest und für den Nachweis von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie.

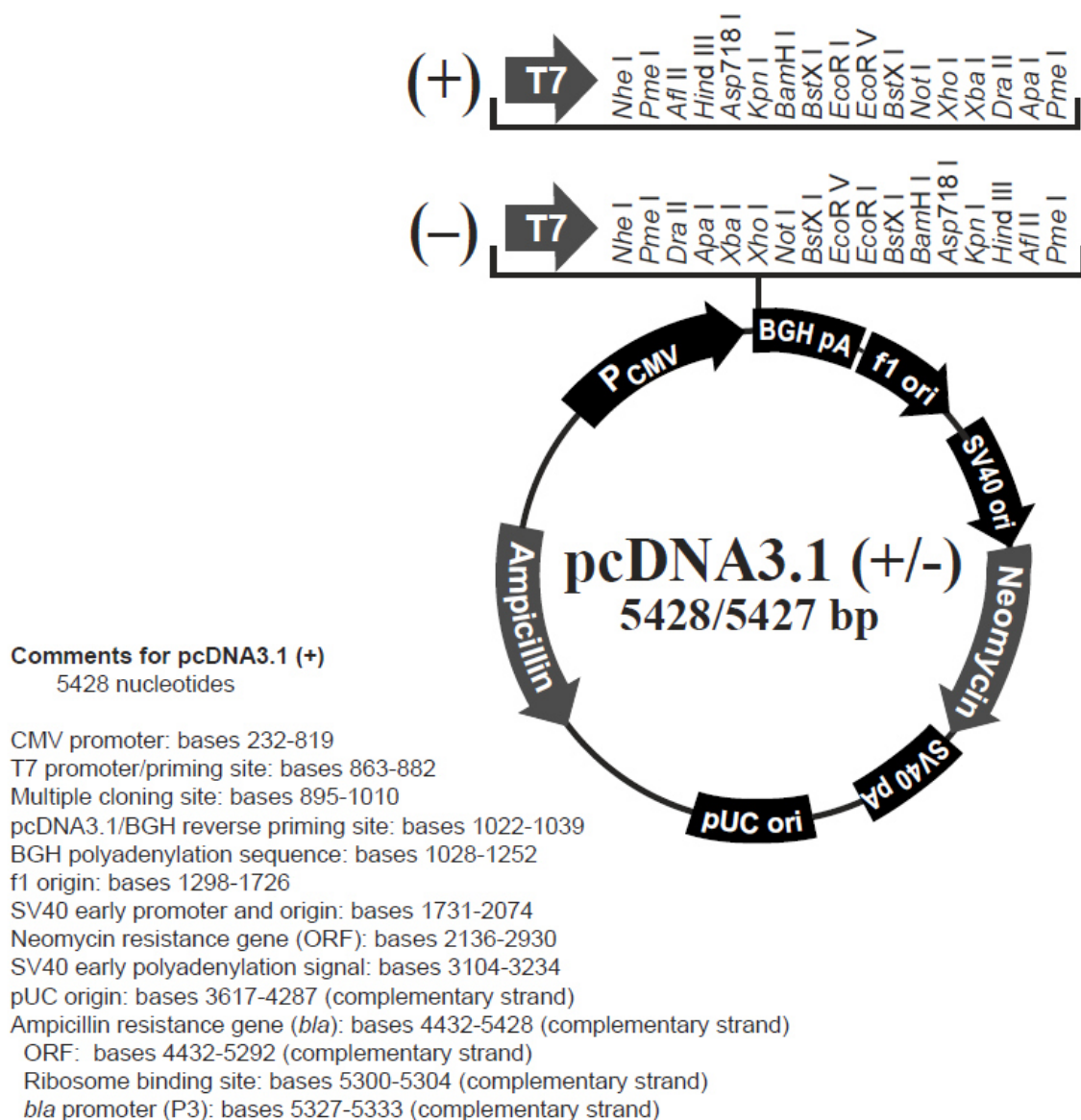


Abbildung 7.2-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pcDNA3.1 (+/-) für die Transfektion der mAChR3 Sequenz in CHO Zellen im Adsorptionstest von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie.

7.3 Plasmidkarte pTrcHis-Topo

Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pTrcHis-Topo für die Expression des His-getaggten mAChR3 Fusionsproteins.

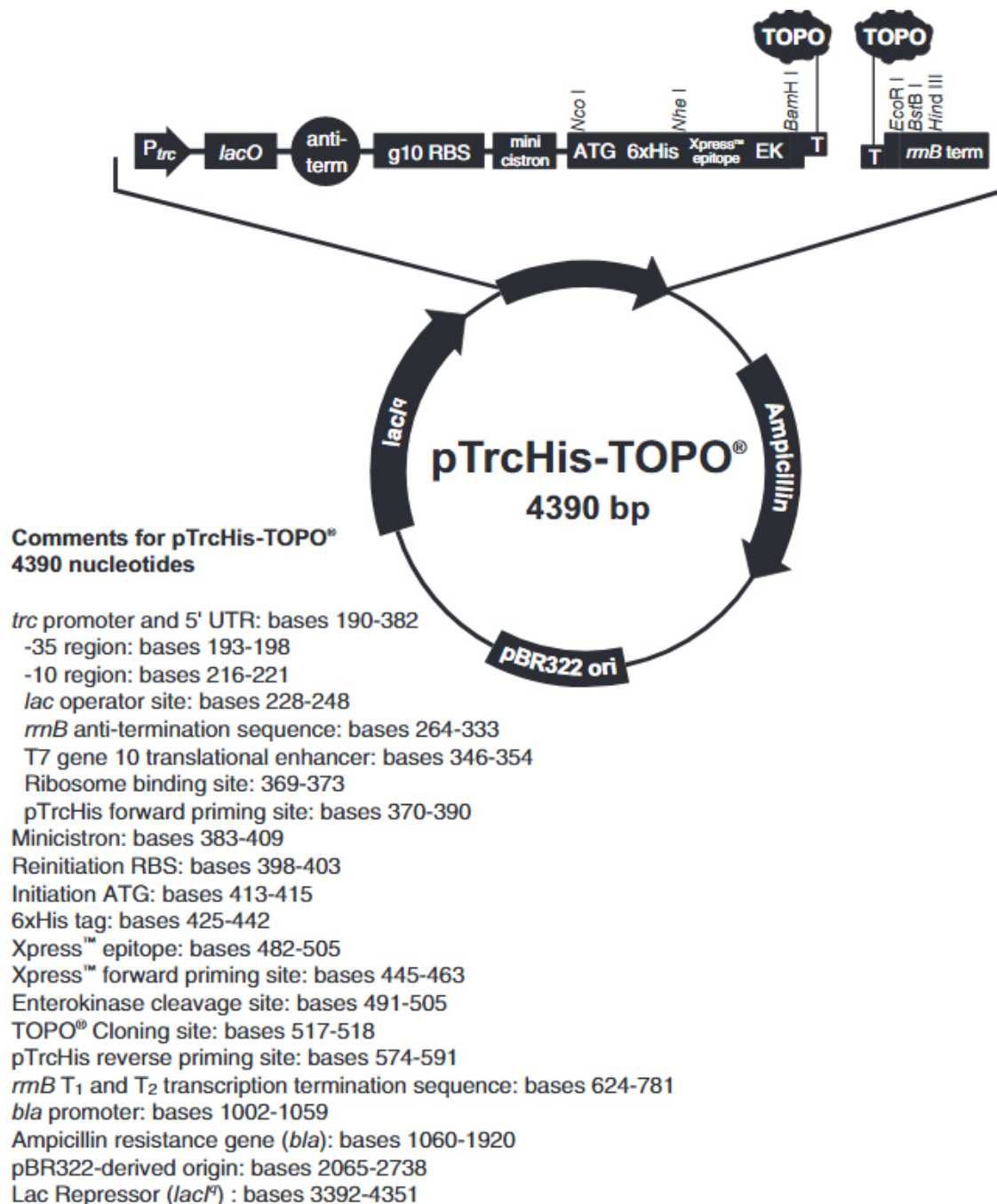
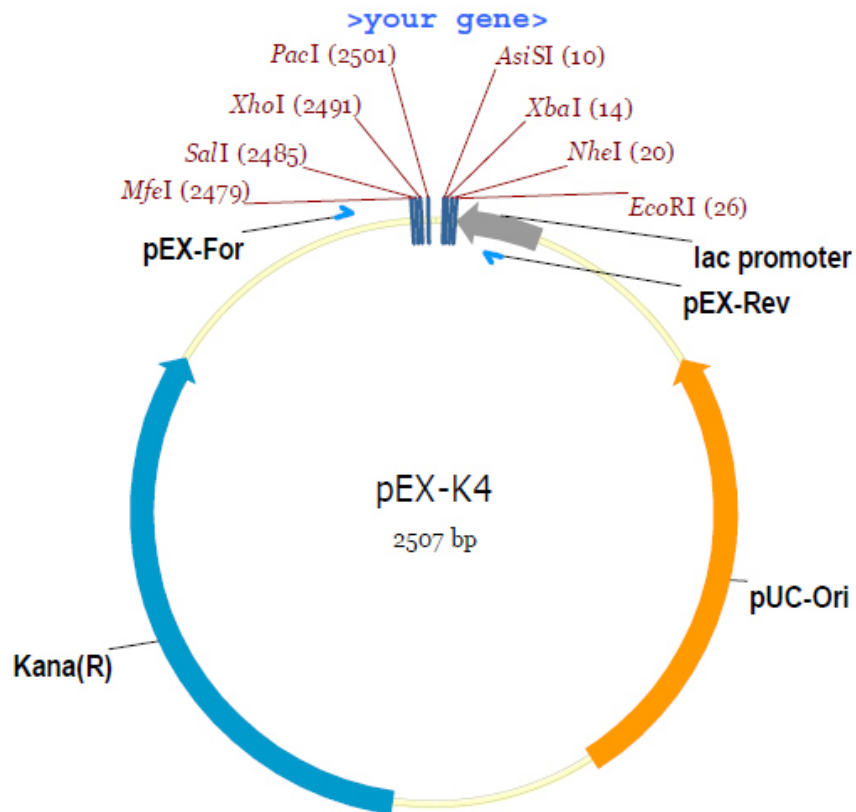


Abbildung 7.3-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pTrcHis-Topo für die Expression des His-getaggten mAChR3 Fusionsproteins.

7.4 Plasmidkarte pEX-K4

Schematische Darstellung des verwendeten pEX-K4 Plasmids für die Klonierungsarbeiten.



MCS of pEX-K4

Abbildung 7.4-1: Schematische Darstellung des verwendeten pEX-K4 Plasmids für die Klonierungsarbeiten.

7.5 Signifikanzschranken für Ausreißertest nach Dixon

Die erzielten Ergebnisse aus dem Lumineszenz Assay und dem Proliferations-Assay wurden auf verdächtige Ausreißer der Grundgesamtheit nach Dixon untersucht. Der Ausreißertest nach Dixon wird von der DIN 53804 empfohlen, wenn die Stichprobenanzahl N weniger als 30 beträgt. Dazu werden die Einzelwerte der Stichprobe der Größe nach geordnet und die zwei Prüfwerte PW („nach oben“ und „nach unten“) berechnet. Der Prüfwert PW „nach unten“ überprüft den kleinsten Wert, der Prüfwert PW „nach oben“ überprüft den größten Wert in der geordneten Zahlenreihe (siehe Formeln). Die Prüfwerte sind mit einer von Dixon vorgegebenen, tabellarischen statistischen Sicherheit (siehe Tabelle 7.5-1 je nach Anzahl der Stichproben zu vergleichen. Überschreitet der Prüfwert die Signifikanzschranke, handelt es sich nach Dixon um einen signifikanten Ausreißer und dieser muss aus der Datenreihe eliminiert werden [232].

Tabelle 7.5-1: Signifikanzschranken für die Ermittlung von Ausreißern nach Dixon

N	P (95%)	Signifikanzschranken für 3 bis 7 Stichproben
3	0,941	$PW_{unten} = \frac{x_2 - x_1}{x_N - x_1}$ $PW_{oben} = \frac{x_N - x_{N-1}}{x_N - x_1}$
4	0,765	
5	0,642	
6	0,560	
7	0,507	

N	P (95%)	Signifikanzschranken für 8 bis 10 Stichproben
8	0,554	$PW_{unten} = \frac{x_2 - x_1}{x_{N-1} - x_1}$ $PW_{oben} = \frac{x_N - x_{N-1}}{x_N - x_2}$
9	0,512	
10	0,477	

N	P (95%)	Signifikanzschranken für 11 bis 13 Stichproben
11	0,576	$PW_{unten} = \frac{x_3 - x_1}{x_{N-1} - x_1}$ $PW_{oben} = \frac{x_N - x_{N-2}}{x_N - x_2}$
12	0,546	
13	0,521	

N	P (95%)	Signifikanzschranken für 14 bis 29 Stichproben
14	0,546	$PW_{unten} = \frac{x_3 - x_1}{x_{N-2} - x_1}$ $PW_{oben} = \frac{x_N - x_{N-2}}{x_N - x_3}$
15	0,525	
16	0,507	
17	0,490	
18	0,475	
19	0,462	
20	0,450	
21	0,440	
22	0,430	
23	0,421	
24	0,413	
25	0,406	
26	0,399	
27	0,393	
28	0,387	
29	0,381	

X_1 = niedrigster Messwert

X_2 = zweitniedrigster Messwert

X_3 = drittniedrigster Messwert

X_N = höchster Messwert

X_{N-1} = zweithöchster Messwert

X_{N-2} = dritthöchster Messwert

7.6 Proliferationsrate der TFK-1-Zellen nach der Inkubation mit Immunglobulinen

In Tabelle 7.6-1 ist die Auswirkung der Ig's von PBC-, PSC-, AIH-, VH-Patienten und gesunden Probanden auf die Proliferationsrate von Cholangiozyten zusammengefasst.

Tabelle 7.6-1: Zusammenfassung der Zellproliferation von Cholangiozyten nach Inkubation von Immunglobulinen von PBC-, PSC-, AIH- VH-Patienten und gesunden Probanden.

Erkrankung	Anzahl	Proliferationsrate [%]		
		kein Effekt	Inhibition	Stimulation
PBC	148	100	0	0
PSC	50	100	0	0
AIH	50	100	0	0
VH	49	100	0	0
gesunde Probanden	129	100	0	0

7.7 Bax und Caspase-9 Expression bei gleichzeitiger CCh oder 5-FU-Inkubation in TFK-1-Zellen

Die nachfolgenden Grafiken zeigen in Abbildung 7.7-2 die Ergebnisse der In-Cell Western Analyse bezüglich der Bax oder Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen nach der einstündiger und 24 stündiger Inkubation mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten, sowie von gesunden Probanden und gleichzeitiger Carbachol oder 5-FU Inkubation.

Nach einer gleichzeitigen Inkubation mit 5-FU und mit Ig's von SS-, PBC-, PSC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden konnte kein Unterschied der Bax Expression nach 1h als auch nach 24 h in TFK-1-Zellen ermittelt werden (Abbildung 7.7-1). Die Bax Expression nach Inkubation mit Ig's von gesunden Probanden war signifikant geringer als nach der Inkubation mit Ig's von PSC- und SS-Patienten.

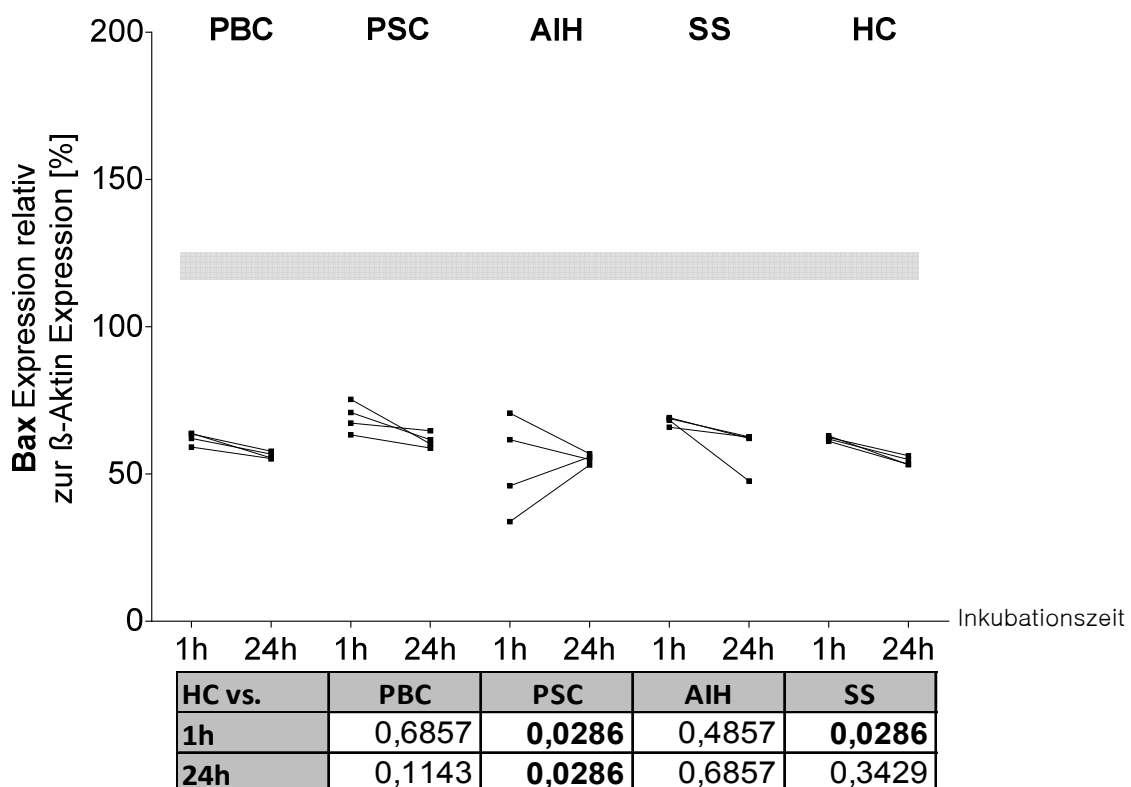


Abbildung 7.7-1: Bax Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit 5-FU vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden. Die Bax Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Bax

Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

In Abbildung 7.7-2 ist die Bax Expression in TFK-1-Zellen dargestellt, die zuvor 24 h mit CCh und gleichzeitig mit Ig's von SS-, PBC-, PSC-, AIH-Patienten und gesunden Probanden inkubiert wurde. Dazu ist die einstündige Ig Inkubation aufgezeigt. Wie zuvor kann kein Unterschied in der Bax Expression nach 1-stündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation mit den Ig's festgestellt werden. Im Vergleich der Bax-Expression nach der Inkubation mit Ig's von gesunden Probanden und Patienten ist diese signifikant geringer als die von PBC- und SS-Patienten.

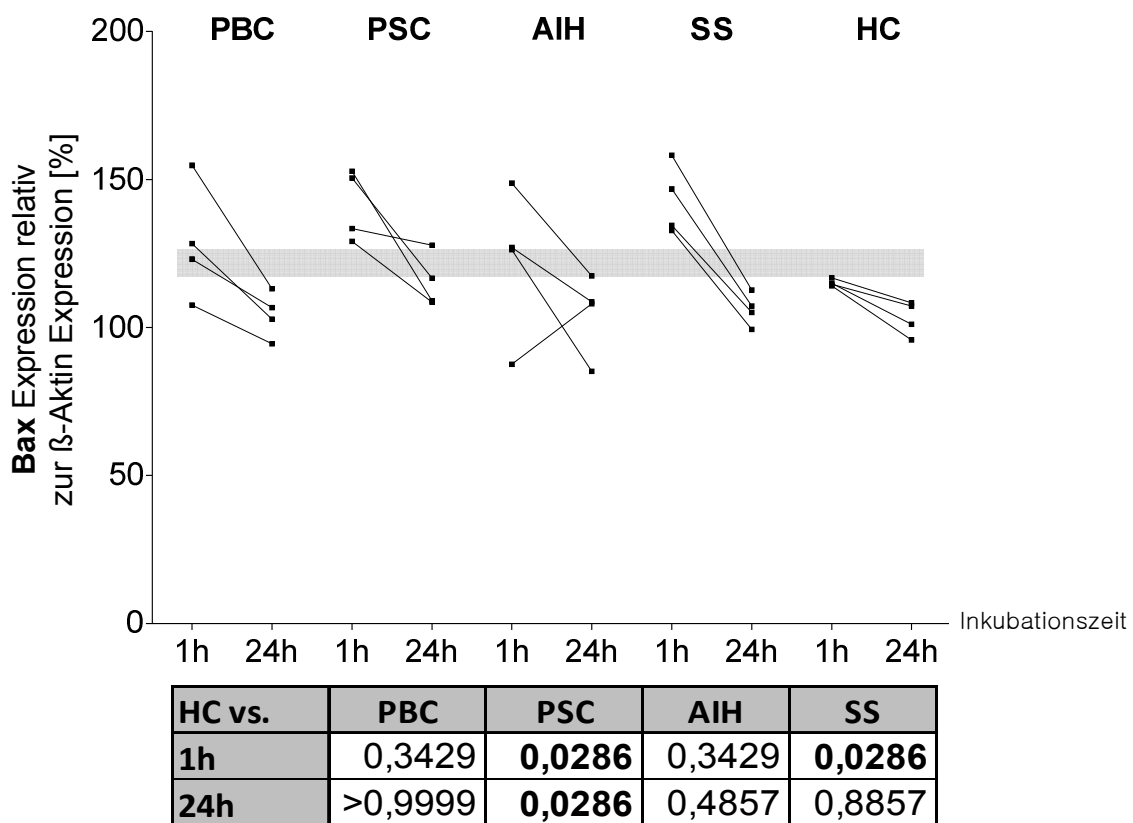


Abbildung 7.7-2: Bax Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit Carbachol vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden. Die Bax Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Bax Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

In Abbildung 7.7-3 ist ein signifikanter Unterschied der Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen nach der einstündigen und 24-stündigen Inkubation mit 5-FU und Immunglobulinen von PBC-Patienten zu erkennen. Die Analyse der Caspase-9 Expression nach Behandlung mit Ig's von gesunden Probanden im Vergleich zu Patienten Ig's zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied.

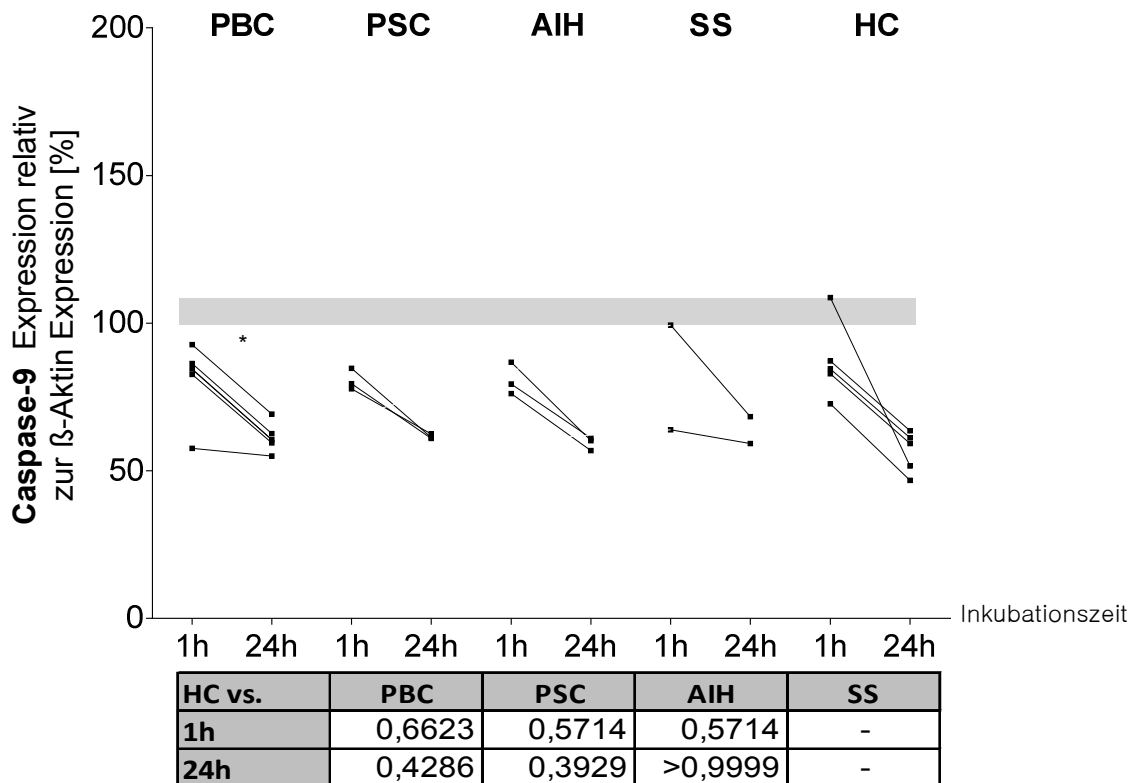


Abbildung 7.7-3: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit 5-FU vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden. Die Caspase-9 Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Caspase-9 Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

Auch die Caspase-9 Expression (Abbildung 7.7-4) nach 24 h Inkubation mit CCh und Ig's von PBC-Patienten ist signifikant geringer als nach einstündiger Inkubation. Ebenso ist die Caspase-9 -Expression in TFK-1-Zellen signifikant niedriger nach der Behandlung mit Ig's von AIH-Patienten als derer mit Ig's von gesunden Probanden.

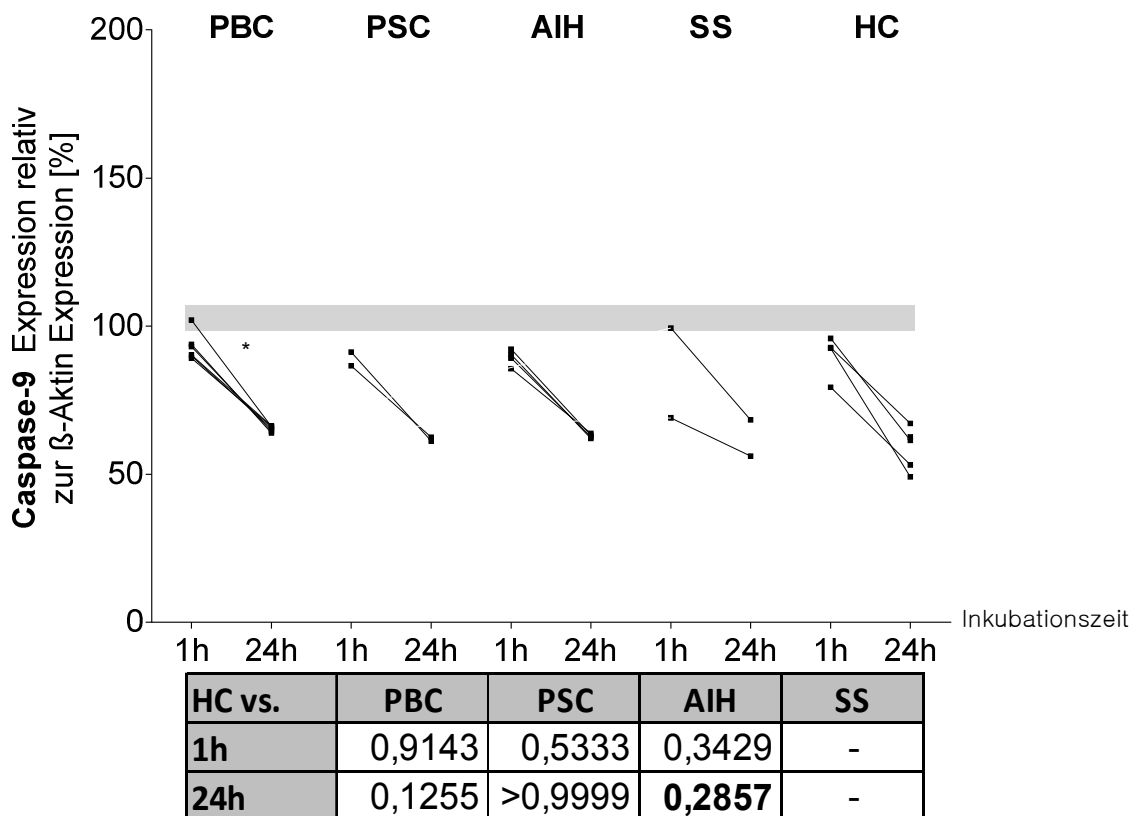
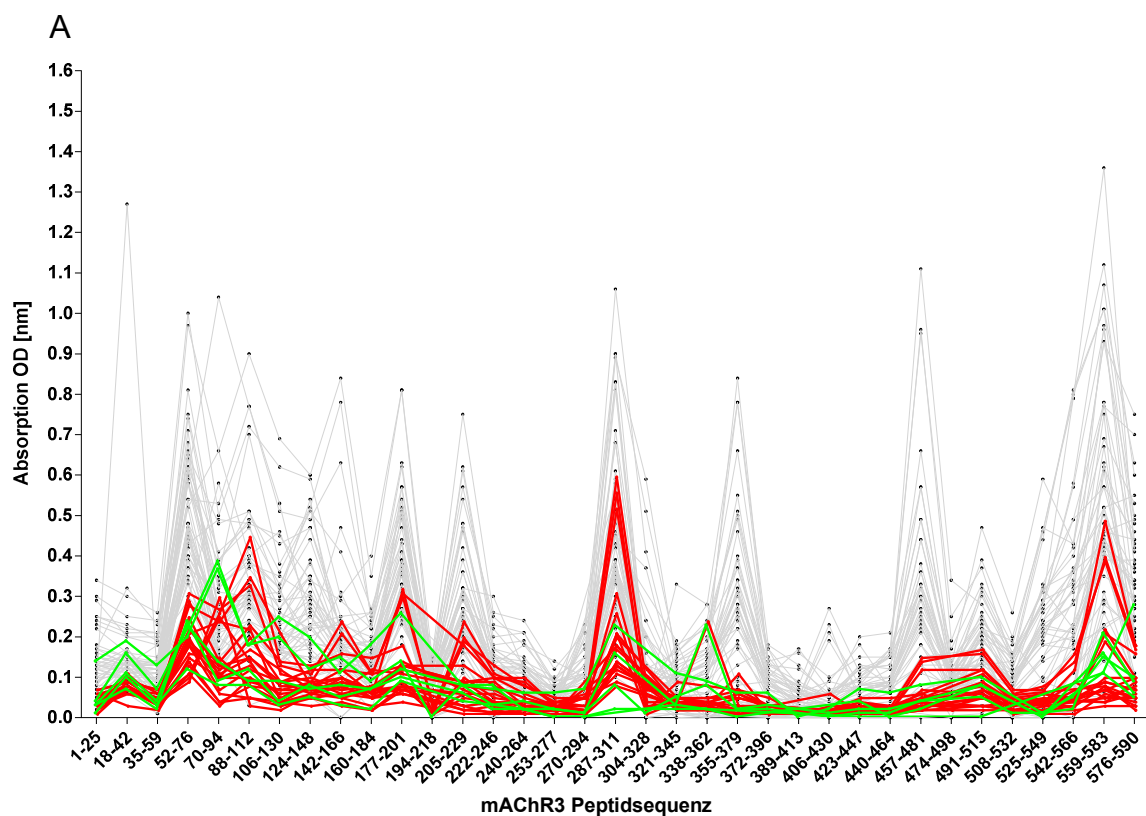


Abbildung 7.7-4: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit Carbachol vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden. Die Caspase-9 Expression in unbehandelten Zellen ist in der Grafik mit einem grauen Balken hinterlegt. Dargestellt ist die prozentuale Caspase-9 Expression relativ zur mitgeführten β -Aktin Kontrolle, welche mittels Licor Odyssey Reader detektiert und quantifiziert wurde.

7.8 Korrelation zwischen der Antikörper Affinität und funktionellen Antikörpern an das full length mAChR3 Protein

Insgesamt wurden 76 PBC-Patientenseren hinsichtlich ihrer IgG- und IgM-Antikörper Affinität mittels ELISA als auch auf deren Effekt auf den mAChR3 funktionell zu beeinflussen, getestet. Hiervon hatten 19 eine stimulatorische (rot), 5 eine inhibierende (grün) Auswirkung und 52 keinen Effekt auf die mAChR3-Funktionalität. Wie in Abbildung 7.8-1, B zu erkennen ist, weisen zwei stimulatorische Seren an den Peptiden 372-396 zu 389-413 und von 406-430 zu 457-481 und ein inhibitorisches Serum an den Peptiden 406-430 zu 440-464 ein stärkeres Muster der IgM-Antikörperbindung im Vergleich zu der IgG-Antikörperbindung auf (Abbildung 7.8-1, A).



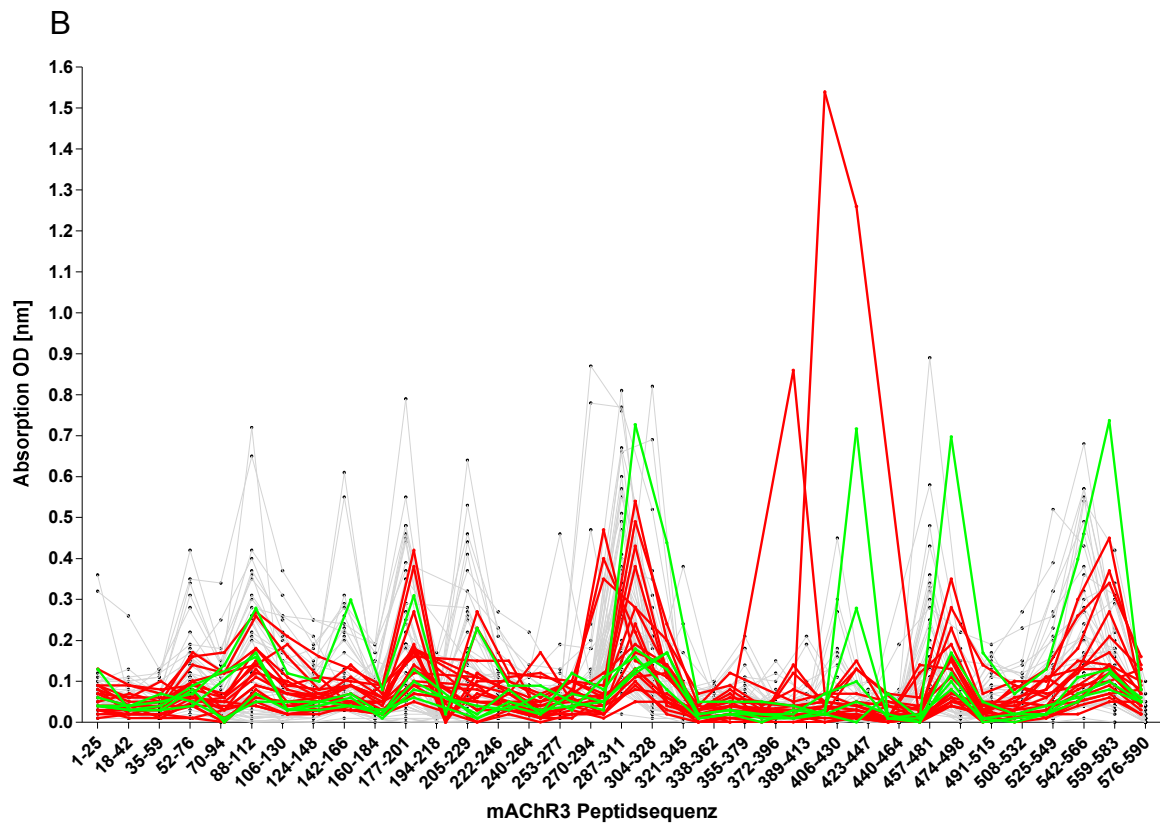


Abbildung 7.8-1: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

Drei der 29 Seren von PSC-Patienten stimulierten den mAChR3-Rezeptor, ein Serum hatte einen inhibitorischen Effekt. Auch hier war keine Korrelation zwischen diesen funktionellen Antikörpern und Antikörpern gegen die linearen Epitope zu beobachten (Abbildung 7.8-2, A und Abbildung 7.8-2, B)

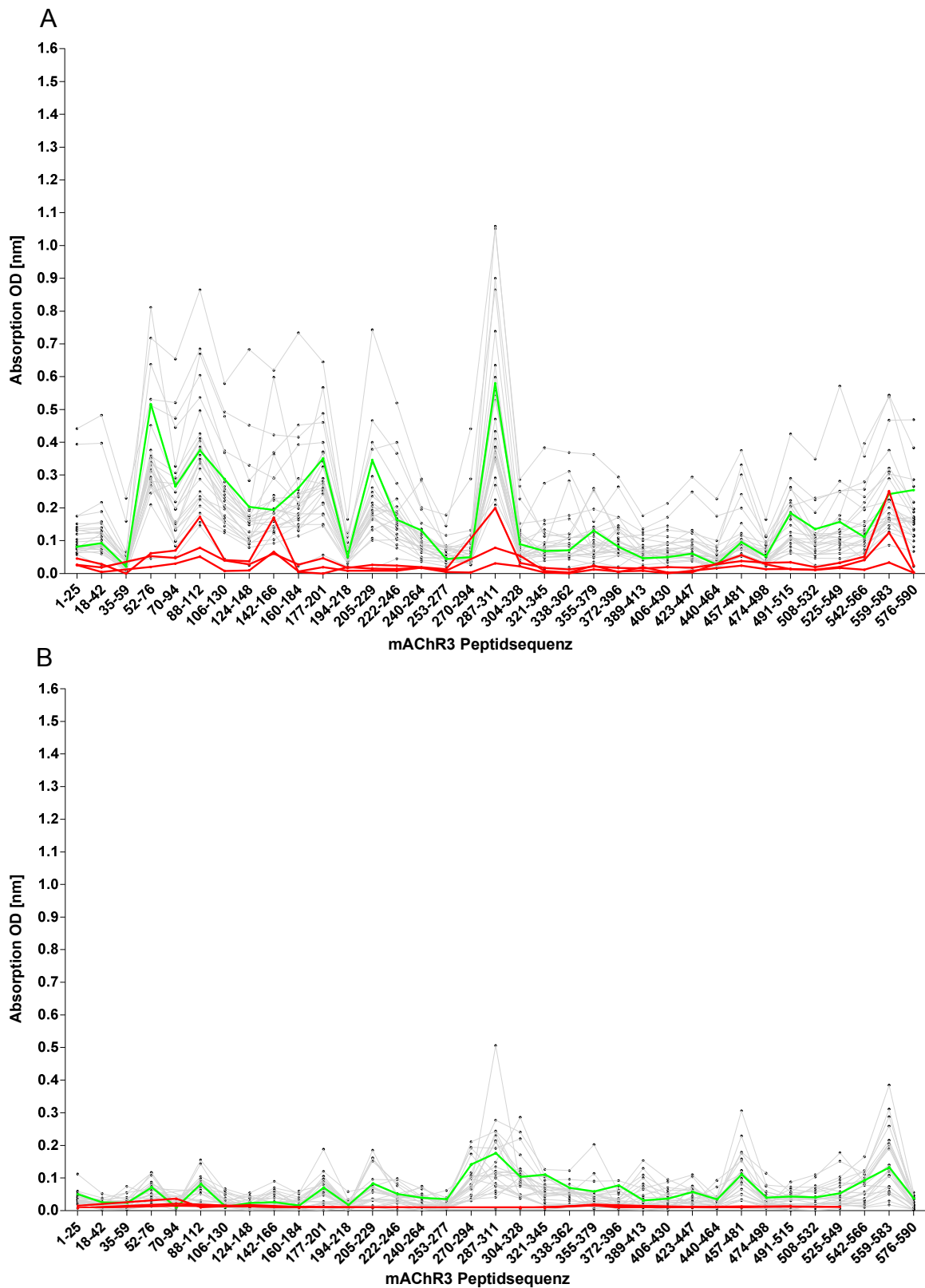


Abbildung 7.8-2: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 29 PSC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

Ähnliche Befunde wurden für Seren von Patienten mit AIH (Abbildung 7.8-3, A und B) sowie Patienten mit anderen Erkrankungen (nicht dargestellt) erhoben.

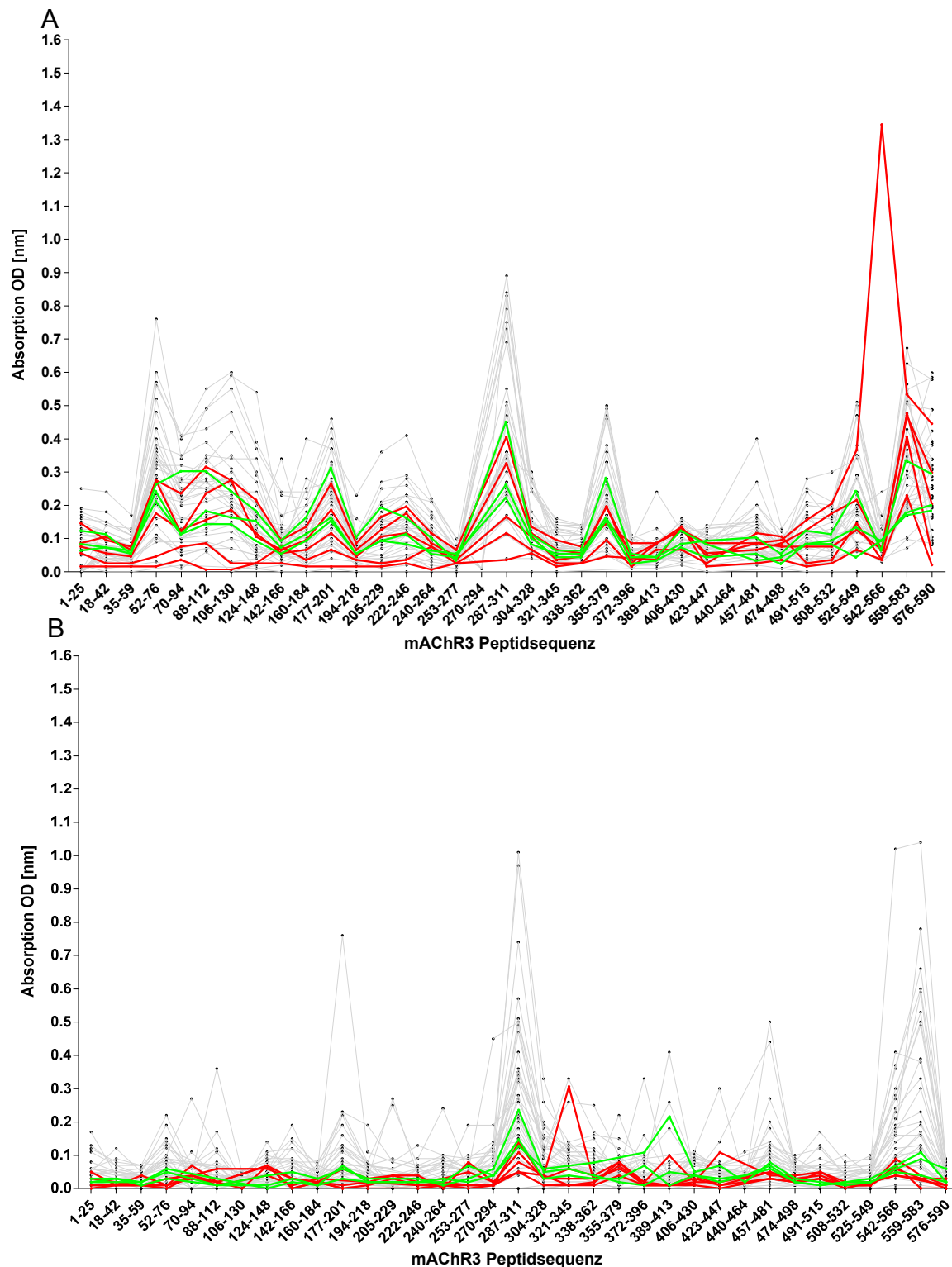


Abbildung 7.8-3: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 44 AIH-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide. Dargestellt sind die individuellen Reaktivitäten sowie der Median (—).

7.9 Korrelation der IgG und IgM Affinität an das full length mAChR3 Antigen zu der PBMC Aktivierung nach Antigeninkubation

Nachfolgend sind in Tabelle 7.9-1 nochmals die Ergebnisse der IgG- und IgM-Antikörperbindung an das mAChR3 Antigen und in Tabelle 7.9-2 die Aktivierung der PBMC von gesunden Probanden, PBC-, PSC und AIH-Patienten durch die Inkubation mit 1 µg/ml mAChR3 Antigen zusammengefasst.

Tabelle 7.9-1: Häufigkeit der IgG- und IgM-Antikörperbindungen an das full length mAChR3 Protein der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden [n,%].

Subtyp	HC n=15	PBC n=76	PSC n=29	AIH n=44
	Anzahl (%) positiv			
IgG	1 (7)	11 (14)	3 (10)	0 (0)
IgM	1 (7)	5 (7)	0 (0)	11 (5)

Tabelle 7.9-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigen in der Konzentrationen 1 µg/ml auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 10 gesunden Probanden, 20 PBC-, 20 PSC- und 21 AIH-Patienten.

PBMC Aktivierung mit 1 µg/ml Antigen	HC n=10	PBC n=20	PSC n=20	AIH n=21
	Anzahl (%) positiv (über cut off)			
CD19	3 (30)	3 (15)	1 (5)	0 (0)
CD56	1 (10)	5 (25)	1 (5)	1 (5)
CD4	2 (20)	3 (15)	0 (0)	2 (10)
CD8	2 (20)	2 (10)	3 (15)	2 (10)

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.4-1: Effekt einer einmaligen Adsorption von Ig's aus Seren von Patienten mit PBC, PSC, AIH und Sjögren-Syndrom sowie gesunden Probanden mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen.....	78
Abbildung 4.6-1: In-Cell Western von TFK-1-Zellen zur Etablierung der pro- bzw. anti-apoptischen Protein Kontrollen relativ zur β -Aktin Expression in Prozent [%]..	82
Abbildung 4.6-2: Bcl-2 Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC).....	83
Abbildung 4.6-3: Bax Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC).....	84
Abbildung 4.6-4: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen nach der Inkubation für 1 h und 24 h mit Ig's von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC).....	85
Abbildung 4.8-1: IgG-Reaktivität von Seren von Patienten mit PBC-, PSC-, AIH-, SS-, Virushepatitis (VH) und alkoholinduzierter Lebererkrankung (ALD) sowie von gesunden Probanden (HC).	87
Abbildung 4.8-2: IgM-Reaktivität von Seren von Patienten mit PBC-, PSC-, AIH-, SS-, Virushepatitis (VH) und alkoholinduzierter Lebererkrankung (ALD) sowie von gesunden Probanden (HC).	89
Abbildung 4.8-3: IgG-Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten mit 35 mAChR3 Peptiden.....	91
Abbildung 4.8-4: IgM-Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	92
Abbildung 4.8-5: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 29 PSC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	93
Abbildung 4.8-6: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 44 AIH-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	95
Abbildung 4.8-7: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 31 Patienten mit Virushepatitis gegen 35 mAChR3 Peptide.....	96
Abbildung 4.8-8: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 25 Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung gegen 35 mAChR3 Peptide.	98

Abbildung 4.8-9: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 22 Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom gegen 35 mAChR3 Peptide... ..99	99
Abbildung 4.8-10: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 15 gesunden Probanden gegen 35 mAChR3 Peptide.. 101	101
Abbildung 4.8-11: Darstellung der Häufigkeit von IgG-Antikörpern in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen gegen unterschiedliche Bereiche des mAChR3 in Form einer ‚Heatmap‘ 104	104
Abbildung 4.8-12: Darstellung der Häufigkeit von IgM-Antikörpern in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen gegen unterschiedliche Bereiche des mAChR3 in Form einer ‚Heatmap‘ 107	107
Abbildung 4.9-1: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 12 gesunden Probanden..... 109	109
Abbildung 4.9-2: Einfluss des full-length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 21 PBC-Patienten..... 110	110
Abbildung 4.9-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 20 PSC-Patienten..... 111	111
Abbildung 4.9-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Proliferation von PBMC von 21 AIH-Patienten 112	112
Abbildung 4.10-1: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 10 gesunden Probandent. 114	114
Abbildung 4.10-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 20 PBC-Patienten 115	115
Abbildung 4.10-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 20 PSC-Patienten. 116	116
Abbildung 4.10-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 bis 1 µg/ml) auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 21 AIH-Patienten..... 118	118

Abbildung 4.11-1, A bis D: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-1α Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	120
Abbildung 4.11-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-6 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	121
Abbildung 4.11-3: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die TNF-α Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	122
Abbildung 4.11-4: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die TNF-β Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	123
Abbildung 4.11-5: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IFN-γ Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	124
Abbildung 4.11-6: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-5 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	125
Abbildung 4.11-7: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 µg/ml bis 1 µg/ml) auf die IL-13 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	126
Abbildung 4.11-8: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die IL-10 Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).	127

Abbildung 4.11-9: Einfluss des full length mAChR3 Antigens in verschiedenen Konzentrationen (0,001 bis 1 µg/ml) auf die GM-CSF Sekretion durch PBMC von PBC- (A; n = 20), PSC- (B; n = 20), und AIH-Patienten (C; n = 21) sowie von gesunden Probanden (D; n = 12).....	129
Abbildung 7.1-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pG5A für die Transfektion der GFP-/Aequorin-Sequenz in CHO und TFK-1-Zellen im Lumineszenz Assay.....	159
Abbildung 7.2-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pcDNA3.1 (+/-) für die Transfektion der mAChR3 Sequenz in CHO Zellen im Adsorptionstest von anti-mAChR3 Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ in Patientenseren mittels Durchflusszytometrie.....	160
Abbildung 7.3-1: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pTrcHis-Topo für die Expression des His-getaggen mAChR3 Fusionsproteins.....	161
Abbildung 7.4-1: Schematische Darstellung des verwendeten pEX-K4 Plasmids für die Klonierungsarbeiten.....	162
Abbildung 7.7-1: Bax Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit 5-FU vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig´s von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden.....	166
Abbildung 7.7-2: Bax Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit Carbachol vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig´s von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden.....	167
Abbildung 7.7-3: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit 5-FU vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig´s von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden.....	168
Abbildung 7.7-4: Caspase-9 Expression in TFK-1-Zellen die für 24 h mit Carbachol vorbehandelt wurden und gleichzeitig für 24 h oder im Anschluss für 1 h mit Ig´s von SS-, PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden (HC) inkubiert wurden.....	169
Abbildung 7.8-1: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 76 PBC-Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	171

Abbildung 7.8-2: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 29 PSC- Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	172
Abbildung 7.8-3: IgG- (A) und IgM- (B) Reaktivität von Seren von 44 AIH- Patienten gegen 35 mAChR3 Peptide.....	173

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.2-1: Übersicht über die Identifikation von AAK gegen den mAChR3 im Serum von Patienten mit pSS oder sSS.....	9
Tabelle 1.2-2: Übersicht über den Nachweis von AAK gegen den mAChR3 im Serum von PBC-Patienten.	12
Tabelle 2.1-1: Aufführung der verwendeten Chemikalien.....	23
Tabelle 2.2-1: Aufführung der verwendeten Laborgeräte.	28
Tabelle 2.3-1: Aufführung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 2.4-1: Aufführung der verwendeten Kits.	33
Tabelle 2.5-1: Aufführung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.	33
Tabelle 2.6-1: Chemisch kompetente prokaryotische Zellen, welche bei den Klonierungsarbeiten, der Proteinexpression und zur Gewinnung der pG5A Plasmid DNA verwendet wurden.	34
Tabelle 2.7-1: Restriktionsenzyme und Ligase für die Klonierungsarbeiten.	35
Tabelle 2.8-1: Plasmide die in dieser Arbeit verwendet wurden mit ihren jeweiligen Eigenschaften und Angabe ihrer Referenz.....	36
Tabelle 2.8-2: Plasmidkonstruktionen die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden. Aufgeführt sind die klonierten Inserts und die Vektoreigenschaften.	37
Tabelle 2.9-1: Nährmedium der prokaryotischen Zellen.....	37
Tabelle 2.9-2: Nährmedium der eukaryotischen Zellen.	38
Tabelle 2.9-3: Nährmedium der eukaryotischen Zellen.	38
Tabelle 2.10-1: Liste der verwendeten Primärantikörper.....	39
Tabelle 2.10-2: Liste der Capture Antikörper mit denen die 96-well Platten für den Zytokin ELISA beschichtet wurden.....	40
Tabelle 2.10-3: Liste der Standards, die im Zytokin ELISA benutzt wurden.....	41
Tabelle 2.10-4: Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 2.10-5: Liste der Detektionsantikörper, die beim Zytokin ELISA gebraucht wurden.	43
Tabelle 2.11-1: Lokalisation, Länge, Überlappung und Aminosäuresequenz der mAChR3 Peptide.	44
Tabelle 2.12-1: Puffer, Lösungen und Gelbestandteile, die zur Anfertigung der Arbeit benötigt wurden.	46

Tabelle 2.13-1:Klinische Parameter von Patienten, aus deren Seren Immunglobuline isoliert wurden.....	52
Tabelle 2.13-2:Klinische Parameter von Patienten, deren Seren gegen rekombinantes mAChR3 und seine einzelnen Peptide mittels ELISA getestet wurden.	52
Tabelle 2.13-3:Klinische Daten der Patienten, deren PBMC auf ihre Reaktivität gegenüber dem rekombinanten mAChR3 Antigen analysiert wurden.....	53
Tabelle 2.14-1: Eingesetzte Software.....	53
Tabelle 4.1-1: Zusammenfassung der Expressionsanalysen der muskarinischen Rezeptoren mAChR1 bis mAChR5 auf Hepatozyten (HEP-G2, HUH-7) und Cholangiozyten (MMNK-1, TFK-1) Zelllinien.....	75
Tabelle 4.2-1: Nachweis von Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ gegen mAChR3-exprimierende Cholangiozyten in Seren von Patienten mit SS und verschiedenen Lebererkrankungen sowie gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie.....	76
Tabelle 4.3-1: Effekt der Immunglobuline aus Seren von Patienten mit SS und verschiedenen Lebererkrankungen auf die mAChR3-Funktion auf TFK-1-Zellen.	77
Tabelle 4.8-1: Unterschied der IgG-Antikörperbindung an das full length mAChR3 Protein innerhalb der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden. Hervorgehoben sind P-Werte < 0,05.	88
Tabelle 4.8-2: Unterschied der IgM-Antikörperbindung an das full length mAChR3 Protein innerhalb der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden. Hervorgehoben sind P-Werte < 0,05.	90
Tabelle 4.8-3: Häufigkeit von IgG- und IgM-Antikörpern gegen das full length mAChR3 Protein bei Patienten mit PBC, PSC, AIH, VH und ALD sowie bei gesunden Probanden.....	90
Tabelle 4.8-4: Häufigkeit von IgG-Antikörpern gegen die 35 Peptide des mAChR3 bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, Sjögren Syndrom und bei gesunden Probanden.....	102
Tabelle 4.8-5: Häufigkeit von IgM-Antikörpern gegen die 35 Peptide des mAChR3 bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, Sjögren Syndrom und bei gesunden Probanden.....	105
Tabelle 5.3-1: Einfluss der mAChR3 Antigen Inkubation auf die Zellproliferation, Zellaktivierung und Zytokinsekretion der PBMC	

von PBC-, PSC- und AIH-Patienten sowie von gesunden Probanden.....	146
Tabelle 7.5-1: Signifikanzschränken für die Ermittlung von Ausreißern nach Dixon	163
Tabelle 7.6-1: Zusammenfassung der Zellproliferation von Cholangiozyten nach Inkubation von Immunglobulinen von PBC-, PSC-, AIH-VH-Patienten und gesunden Probanden.....	165
Tabelle 7.9-1: Häufigkeit der IgG- und IgM-Antikörperbindungen an das full length mAChR3 Protein der PBC-, PSC-, AIH-, VH-, ALD-Patienten und gesunden Probanden [n,%].....	174
Tabelle 7.9-2: Einfluss des full length mAChR3 Antigen in der Konzentrationen 1 µg/ml auf die Aktivierung (CD69-Expression) von PBMC von 10 gesunden Probanden, 20 PBC-, 20 PSC- und 21 AIH-Patienten.....	174

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

³ H-Thymidin	Tritiumoxid Desoxythymidin
4-DAMP	1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodid
α	alpha
β	beta
γ	gamma
°C	Grad-Celsius
%	Prozent
AAK	Autoantikörper
Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholin Rezeptor
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALD	Alkoholinduzierte Lebererkrankung
AMA	anti-mitochondriale Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kalifornien
Ca ²⁺	Calcium Ionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	Cholangiokarzinom
CD	Cluster of Differentiation
CDT	kohlenhydratdefizientes Transferrin
CHO-K1	<i>Chinese Hamster Ovary</i> Zellen
cm	Zentimeter
CPM	<i>counts per minute</i>

D	Deutschland
DAG	Diacylglycerin
d.h.	das heißt
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DK	Dänemark
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAMG	Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis
EAT	Experimentelle Autoimmunthyreoiditis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> (lat.) und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GOT	Aspartat-Aminotransferase
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBcAg	Hepatitis B Core-Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface antigen

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEP-G2	Leberzellkarzinom-Zelllinie
HLA	humane Leukozyten-Antigene
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUH-7	Leberzellkarzinom-Zelllinie
I	Italien
ICW	<i>In-Cell Western</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin-A
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRDye	infrared dyes
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IRL	Irland
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar
mAChR3	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor 3
mg	Milligramm
MCH	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
min	Minuten
ml	Milliliter
MMNK-1	Cholangiozyten-Zelllinie

MMP-3	Matrix-Metalloprotease-3
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	<i>totale Anzahl</i>
NANBH	Non-A, Non-B Hepatitis
NCBI	National Center for Biotechnology
nd	<i>second</i>
NE	Nebraska
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OCW	<i>On-Cell Western</i>
p.A.	pro analysi bzw. analysenrein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
p-ANCA	perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBC	Primäre biliäre Cholangitis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDGF	Platelet-derived growth factor receptors
PE	Phycoerythrin
PerCP	peridinin-chlorophyll-protein complex
PFA	Paraformaldehyd
pg	picogramm
pH	pH-Wert
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
pSS	primäres Sjögren Syndrom
RA	rheumatoide Arthritis
rd	<i>third</i>

RF	rheumatoide Faktoren
RNA	Ribonukleinsäure
Ro/La	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	systemischen Lupus erythematoses
ss	einzelsträngig
SS	Sjögren Syndrom
sSS	sekundäres Sjögren Syndrom
SSC	<i>sideward scatter</i>
st	<i>first</i>
T1D	Typ-1-Diabetes
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TFK-1	Gallengangstumorzelllinie
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UDCA	Ursodesoxycholsäure
USA	<i>United states of America</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleich
VH	Virushepatitis
WB	Western Blot
WI	Wisconsin
v/v	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel

ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

11 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Murphy und C. Weaver, *Janeway's Immunobiology*, 9 Hrsg., New York: Garland Science, Taylor & Francis, 2016.
- [2] A. K. Abbas und C. A. Janeway Jr., „Immunology,“ *Cell*, Bd. 100, Nr. (1), pp. 129-138, 7 January 2007.
- [3] E. Witebsky, „Immunology: views of the past and visions for the future,“ *Canadian Medical Association Journal*, Bd. 97, Nr. (23), p. 1371–1377, 2 December 1967.
- [4] M. Wong, „What has happened in the last 50 years in immunology,“ *Journal of Paediatrics and Child Health*, Bd. 51, Nr. (2), pp. 135-139, February 2015.
- [5] M. A. Kennedy, „A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response,“ *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Bd. (3), pp. 369-377, May 2010.
- [6] J. Suurmond und B. Diamond, „Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity,“ *Journal of Clinical Investigation*, Bd. 125, Nr. 6, p. 2194–2202, 1 June 2015.
- [7] Y. Shoenfeld, P. L. Meroni und M. E. Gershwin, „What Is an Autoantibody?,“ in s *Autoantibodies*, 3rd edition Hrsg., Oxford,, Elsevier Science & Technology, 2014, pp. 13-20.
- [8] I. R. Mackay, „Travels and travails of autoimmunity: a historical journey from discovery to rediscovery,“ *Autoimmunity Reviews*, Bd. 9, Nr. 5, pp. A251-A258, 9 MArch 2010.
- [9] Y. Shoenfeld, P. L. Meroni und M. E. Gershwin, „Pathogenic Mechanisms and Clinical Relevance of Autoantibodies,“ in s *Autoantibodies*, Oxford, Elsevier Science & Technology, 2014, pp. 51-57.
- [10] M. Samarkos, K. A. Davies, C. Gordon und S. Loizou, „Clinical significance of IgA anticardiolipin and anti-beta2-GP1 antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome,“ *Clinical Rheumatology*, Bd. 25, Nr. 2, pp. 199-204, March 2006.

- [11] B. Dema, N. Charles, C. Pellefigues, T. K. Ricks, R. Suzuki, C. Jiang, J. Scheffel, S. Hasni, M. Jablonski, K. Sacré, D. Gobert, T. Papo, E. Daugas, S. Crampton, S. Bolland und J. Rivera, „Immunoglobulin E plays an immunoregulatory role in lupus.“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 211, Nr. 11, pp. 2159-2168, 20 October 2014.
- [12] C. Grönwall, E. Akhter, C. Oh, R. W. Burlingame, M. Petri und G. J. Silverman, „IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE.“ *Clinical Immunology*, Bd. 142, Nr. 3, pp. 390-398, March 2012.
- [13] K. N. Potter und T. J. Wilkin, „The molecular specificity of insulin autoantibodies.“ *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, pp. 338-353, 16 5 2000.
- [14] J. S. Smolen und G. Steiner, „Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.“ *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 473-488, 2 2003.
- [15] B. T. Kurien und R. H. Scofield, „Autoantibody Determination in the Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus.“ *Immunology*, Bd. 64, pp. 227-235, 3 2006.
- [16] Y. Xia und R. E. Kellems, „Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond.“ *Circulation Research*, Bd. 113, Nr. 11, pp. 78-87, 21 June 2013.
- [17] H.-P. Holthoff, S. Zeibig, V. Jahns-Boivin, J. Bauer, M. J. Lohse, S. Kääb, S. Clauss, R. Jahns, A. Schlipp, G. Münch und M. Ungerer, „Detection of Anti- β 1-Ar Autoantibodies in Heart Failure by a Cell-Based Competition ELISA .“ *Circulation Research*, Bd. 111, Nr. 6, pp. 75-684, 31 August 2012.
- [18] S. S. Baroni, M. Santillo, F. Bevilacqua, M. Luchetti, T. Spadoni, M. Mancini, P. Fraticelli, P. Sambo, A. Funaro, A. Kazlauskas, E. V. Avvedimento und A. Gabrielli, „Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis.“ *New England Journal of Medicine*, Bd. 354, Nr. 25, pp. 2667-2676, 22 June 2006.
- [19] T. Sumida, H. Tsuboi, M. Iizuka, H. Asashima und I. Matsumoto, „Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome.“ *Modern Rheumatology*, Bd. 23, Nr. 5, pp. 841-845, September 2013.

- [20] J. Li, Y. M. Ha, N. Y. Kü, S. Y. Choi, S. J. Lee, S. B. Oh, J. S. Kim, J. H. Lee, E. B. Lee, Y. W. Song und K. Park, „Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjögren's syndrome.“ *Laboratory Investigation*, Bd. 84, Nr. 11, pp. 1430-1438, November 2004.
- [21] M. M. Hosey, „Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors.“ *The FASEB Journal*, Nr. 6, pp. 845-852, 1992.
- [22] M. P. Caulfield und N. J. Birdsall, „International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors.“ *Pharmacological Reviews*, Nr. 50(2), pp. 279-290, June 1998.
- [23] T. Haga, „Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors.“ *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, Nr. 89(6), pp. 226-256, 2013.
- [24] A. Ashkenazi, „An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover.“ *Science*, Nr. 238(4827), pp. 672-675, 1987.
- [25] E. G. Peralta, A. Ashkenazi, J. W. Winslow, J. Ramachandran und D. J. Capon, „Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes.“ *Nature*, Nr. 334(6181), pp. 434-437, 4 August 1988.
- [26] A. Ashkenazi, E. G. Peralta, J. W. Winslow, J. Ramachandran und D. J. Capon, „Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell.“ *Cell*, Nr. 56(3), pp. 487-493, 10 February 1989.
- [27] J. H. Exton, „Regulation of Phosphoinositide Phospholipases by Hormones, Neurotransmitters, and Other Agonists Linked to G Proteins.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Nr. 36, pp. 481-509, 1996.
- [28] J. Wess, „Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function.“ *Trends in Pharmacological Sciences*, Bd. 14(8), pp. 308-313, August 1993.
- [29] R. Cortés, A. Probst, H. J. Tobler und J. M. Palacios, „Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the human brain. II. Quantitative autoradiographic studies.“ *Brain Research*, Bd. 362, Nr. 2, pp. 239-253, 8 January 1986.

- [30] C. F. Hohmann, E. D. Potter und A. I. Levey, „Development of muscarinic receptor subtypes in the forebrain of the mouse.,“ *The Journal of Comparative Neurology*, Bd. 358, Nr. 1, pp. 88-101, 17 July 1995.
- [31] H. G. Preiksaitis und L. G. Laurier, „Pharmacological and molecular characterization of muscarinic receptors in cat esophageal smooth muscle.,“ *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Bd. 2, pp. 853-861, May 1998.
- [32] S. Tyagi, P. Tyagi, S. Van-le, N. Yoshimura, M. B. Chancellor und F. de Miguel, „Qualitative and quantitative expression profile of muscarinic receptors in human urothelium and detrusor.,“ *The Journal of Urology*, Bd. 176, Nr. (4 Pt 1), pp. 1673-1678, October 2006.
- [33] O. E. Brodde und M. C. Michel, „Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart.,“ *Pharmacological Reviews*, Bd. 51, Nr. 4, pp. 651-690, 1999.
- [34] R. M. Eglen, S. S. Hegde und N. Watson, „Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function.,“ *Pharmacological Reviews*, Bd. 48, Nr. 4, pp. 531-565, 1996.
- [35] S. Lin, M. Kajimura, K. Takeuchi, M. Kodaira, H. Hanai und E. Kaneko, „Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric smooth muscle: effect of M3 selective antagonist on gastric motility and emptying.,“ *Digestive Diseases and Sciences*, Bd. 42, Nr. 5, pp. 907-914, May 1997.
- [36] M. T. Vilaró, J. M. Palacios und G. Mengod, „Multiplicity of muscarinic autoreceptor subtypes? Comparison of the distribution of cholinergic cells and cells containing mRNA for five subtypes of muscarinic receptors in the rat brain.,“ *Brain Research. Molecular Brain Research*, Bd. 21, Nr. (1-2), pp. 30-46, January 1994.
- [37] M. J. Post, J. D. Te Biesebeek, H. N. Doods, J. Wemer, H. H. Van Rooji und A. J. Porsius, „Functional characterization of the muscarinic receptor in rat lungs.,“ *European Journal of Pharmacology*, Bd. 202, Nr. (1), pp. 67-72, September 1991.
- [38] T. R. Renuka, R. Robinson und C. S. Paulose, „Increased insulin secretion by muscarinic M1 and M3 receptor function from rat pancreatic islets in vitro.,“ *Neurochemical Research*, Bd. 31, Nr. 3, pp. 313-320, March 2006.

- [39] A. C. Kruse, J. Hu, A. C. Pan, D. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, J. Wess und B. K. Kobilka, „Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor.“ *Nature*, Bd. 482, Nr. (7386), pp. 552-556, February 2012.
- [40] M. P. Caulfield, „Muscarinic receptors--characterization, coupling and function.“ *Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 58, Nr. 3, pp. 319-379, June 1993.
- [41] D. Gautam, S. J. Han, F. F. Hamdan, J. Jeon, B. Li, J. H. Li, Y. Cui, D. Mears, H. Lu, C. Deng und T. Heard, „A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo.“ *Cell Metabolism*, Bd. 3, Nr. 6, pp. 449-461, June 2006.
- [42] K. Weston-Green, X. F. Huang, J. Lian und C. Deng, „Effects of olanzapine on muscarinic M3 receptor binding density in the brain relates to weight gain, plasma insulin and metabolic hormone levels.“ *European Neuropsychopharmacology*, Bd. 22, Nr. 5, pp. 364-373, May 2012.
- [43] D. Gautam, T. S. Heard, Y. Cui, G. Miller, L. Bloodworth und J. Wess, „Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice.“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 66, Nr. 2, pp. 260-267, August 2004.
- [44] M. Matsui, D. Motomura, H. Karasawa, T. Fujikawa, J. Jiang, Y. Komiya, S. Takahashi und M. M. Taketo, „Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype.“ *National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 97, Nr. 17, pp. 9579-9584, 15 August 2000.
- [45] R. P. Yasuda, W. Ciesla, L. R. Flores, S. J. Wall, M. Li M, S. A. Satkus, J. S. Weisstein, B. V. Spagnola und B. B. Wolfe, „Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain.“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 43, Nr. 2, pp. 149-157, 1993.
- [46] H. Wang, H. Hang, L. Zhang, H. Shi, G. Schram, S. Nattel und Z. Wang, „Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart.“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 59, Nr. 5, pp. 1029-1036, May 2001.

- [47] K. Kawashima und T. Fujii, „Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes.“ *Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 86, Nr. 1, pp. 29-48, April 2000.
- [48] K. Kawashima, K. Kajiyama, K. Fujimoto, H. Oohata und T. Suzuki, „Presence of acetylcholine in blood and its localization in circulating mononuclear leukocytes of humans.“ *Biogenic Amines*, Bd. 9, Nr. 4, pp. 251-258, 1993.
- [49] E. Hellström-Lindahl und A. Nordberg, „Muscarinic receptor subtypes in subpopulations of human blood mononuclear cells as analyzed by RT-PCR technique. J Neuroimmunol.“ *Journal of Neuroimmunology*, Bd. 68, p. 139–144, 1996.
- [50] H. Fujino, Y. Kitamura, T. Yada, T. Uehara und Y. Nomura, „Stimulatory roles of muscarinic acetylcholine receptors on T cell antigen receptor/CD3 complex-mediated interleukin-2 production in human peripheral blood lymphocytes.“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 51, p. 1007–1014, 1997.
- [51] T. Fujii und K. Kawashima, „Ca²⁺ oscillation and c-fos gene expression induced via muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-cell lines.“ *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Bd. 362, pp. 14-21, 2000.
- [52] T. Fujii und K. Kawashima, „Calcium signaling and c-fos gene expression via M3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells.“ *Japanese Journal of Pharmacology*, Bd. 84, p. 124–132, 2000.
- [53] S. Feske, „Calcium signalling in lymphocyte activation and disease.“ *Nature Reviews Immunology*, Bd. 7, Nr. 9, pp. 690-702, September 2007.
- [54] R. Uzhachenko, A. Shanker, W. G. Yarbrough und A. V. Ivanova, „Mitochondria, calcium, and tumor suppressor Fus1: At the crossroad of cancer, inflammation, and autoimmunity.“ *Oncotarget*, Bd. 6, Nr. 25, p. 20754–20772, 28 August 2015.
- [55] A. B. Tobin und D. C. Budd, „The anti-apoptotic response of the Gq/11-coupled muscarinic receptor family.“ *Biochemical Society Transactions*, Bd. 31, Nr. 6, pp. 1182-1185, December 2003.
- [56] D. C. Budd, E. J. Spragg, K. Ridd und A. B. Tobin, „Signalling of the M3-muscarinic receptor to the anti-apoptotic pathway.“ *Biochemical Journal*, Bd. 381, Nr. 1, pp. 43-49, 1 July 2004.

- [57] S. Reina, L. Sterin-Borda und E. Borda, „Anti-M(3) peptide IgG from Sjögren's syndrome triggers apoptosis in A253 cells.“ *Cellular Immunology*, Bd. 275, Nr. 1-2, pp. 33-41, January-February 2012.
- [58] X. Bi, X. He, M. Xu, M. Zhao, X. Yu, X. Lu und W. Zang, „Acetylcholine ameliorates endoplasmic reticulum stress in endothelial cells after hypoxia/reoxygenation via M3 AChR-AMPK signaling.“ *Cell Cycle*, Bd. 14, Nr. 15, pp. 2461-2472, 3 August 2015.
- [59] I. Marczinovits, L. Kovács, A. György, G. K. Tóth, L. Dorgai, J. Molnár und G. Pokorny, „A peptide of human muscarinic acetylcholine receptor 3 is antigenic in primary Sjogren's syndrome.“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 24, Nr. 1, pp. 47-54, February 2005.
- [60] S. R. Bacman, A. Berra, L. Sterin-Borda und E. S. Borda, „Human primary Sjögren's syndrome autoantibodies as mediators of nitric oxide release coupled to lacrimal gland muscarinic acetylcholine receptors.“ *Current Eye Research*, Bd. 17, Nr. 12, pp. 1135-1142, Deember 1998.
- [61] S. A. Waterman, T. P. Gordon und M. Rischmueller, „Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome.“ *Arthritis & Rheumatology*, Bd. 43, Nr. 7, pp. 1647-1654, July 2000.
- [62] J. Gao, S. Cha, R. Jonsson, J. Opalko und A. B. Peck, „Detection of Anti-Type 3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Autoantibodies in the Sera of Sjögren's Syndrome by Use of a Transfected Cell Line Assay.“ *Arthritis & Rheumatology*, Bd. 50, Nr. 80, pp. 2615-2621, August 2004.
- [63] D. Cavill, S. A. Waterman und T. P. Gordon, „Antibodies Raised Against the Second Extracellular Loop of the Human Muscarinic M3 Receptor Mimic Functional Autoantibodies in Sjögren's Syndrome.“ *Scandinavian Journal of Immunology*, Bd. 59, Nr. 3, pp. 261-266, March 2004.
- [64] Y. Naito, I. Matsumoto, E. Wakamatsu, D. Goto, T. Sugiyama, R. Matsumura, S. Ito, A. Tsutsumi und T. Sumida, „Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome.“ *Annals of the Rheumatic Diseases*, Bd. 64, pp. 510-511, 2005.
- [65] L. Kovács, I. Marczinovits, A. György, G. K. Tóth, L. Dorgai, J. Pál, J. Molnár und G. Pokorny, „Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3213–228 in primary Sjögren's syndrome.“ *Rheumatology*, Bd. 44, Nr. 8, pp. 1021-1025, May 2005.

- [66] L. Dawson, J. Stanbury, N. Venn, B. Hasdimir, S. N. Rogers und P. M. Smith, „Antimuscarinic antibodies in primary Sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells.,“ *Arthritis & Rheumatology*, Bd. 54, Nr. 4, pp. 1165-1173, April 2006.
- [67] Y. Nakamura, E. Wakamatsu, I. Matsumoto, M. Tomiita, Y. Kohno, M. Mori, S. Yokota, D. Goto, S. Ito, A. Tsutsumi und T. Sumida, „High prevalence of autoantibodies to muscarinic-3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjogren syndrome,“ *Annals of the rheumatic diseases*, Bd. 67, Nr. 1, pp. 136-137, February 2008.
- [68] N. Y. Koo, J. Li, S. M. Hwang, S. Y. Choi, S. J. Lee, S. B. Oh, J. S. Kim, E. B. Lee, Y. W. Song und K. Park, „Functional epitope of muscarinic type 3 receptor which interacts with autoantibodies from Sjogren's syndrome patients.,“ *Rheumatology (Oxford)*, Bd. 47, Nr. 6, pp. 828-833, June 2008.
- [69] H. Tsuboi, I. Matsumoto, W. E., Y. Nakamura, M. Iizuka, T. Hayashi, D. Goto, S. Ito und T. Sumida, „New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome.,“ *Clinical & Experimental Immunology*, Bd. 162, Nr. 1, p. 53–61, October 2010.
- [70] N. Roescher, A. Kingman, Y. Shiota, J. A. Chiorini und G. G. Illei, „Peptide-based ELISAs are not sensitive and specific enough to detect muscarinic receptor type 3 autoantibodies in serum from patients with Sjogren's syndrome.,“ *Annals of the Rheumatic Diseases*, Bd. 70, Nr. 1, pp. 235-236, January 2011.
- [71] Y. N. Li, J. P. Guo, J. He, X. Liu, F. R. Yin, Y. Ding, H. H. Yao, A. J. Kang und Z. G. Li, „Serum IgA against type 3 muscarinic acetylcholine receptor is a novel marker in diagnosis of Sjögren's syndrome.,“ *Chinese Medical Journal*, Bd. 124, Nr. 16, pp. 2490-2495, August 2011.
- [72] J. He, L. Qiang, Y. Ding, P. Wei, Y. N. Li, H. Hua und Z. G. Li, „The role of muscarinic acetylcholine receptor type 3 polypeptide (M3RP205-220) antibody in the saliva of patients with primary Sjögren's syndrome.,“ *Clinical and Experimental Rheumatology*, Bd. 30, Nr. 3, pp. 322-326, May 2012.

- [73] H. Tsuboi, Y. Nakamura, M. Iizuka, N. Matsuo, I. Matsumoto und T. Sumida, „Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor.“ *Modern Rheumatology*, Bd. 22, Nr. 2, pp. 264-271, April 2012.
- [74] M. Jin, S. M. Hwang, A. J. Davies, Y. Shin, J. S. Bae, J. H. Lee, E. B. Lee, Y. W. Song und K. Park, „Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome patients induce internalization of muscarinic type 3 receptors.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 1822, Nr. 2, pp. 161-167, February 2012.
- [75] M. Deák, A. Szvetnik, A. Balog, N. Sohár, R. Varga, G. Pokorny, G. Tóth, M. Kiss und L. Kovács, „Neuroimmune interactions in Sjögren's syndrome: relationship of exocrine gland dysfunction with autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptor-3 and mental health status parameters.“ *Neuroimmunomodulation*, Bd. 20, Nr. 2, pp. 79-86, 2016.
- [76] B. Preuss, S. Tunaru, J. Henes, S. Offermanns und R. Klein, „A novel luminescence-based method for the detection of functionally active antibodies to muscarinic acetylcholine receptors of the M3 type (mAChR3) in patients' sera.“ *Clinical & Experimental Immunology*, Bd. 177, Nr. 1, pp. 179-189, July 2014.
- [77] N. Kim, Y. Shin, S. Choi, E. Namkoong, M. Kim, J. Lee, Y. Song und K. Park, „Effect of Antimuscarinic Autoantibodies in Primary Sjögren's Syndrome.“ *Journal of Dental Research*, Bd. 94, Nr. 5, pp. 722-728, May 2015.
- [78] K. Jayakanthan, J. Ramya, S. K. Mandal, P. Sandhya, M. Gowri und D. Danda, „Younger patients with primary Sjögren's syndrome are more likely to have salivary IgG anti-muscarinic acetylcholine receptor type 3 antibodies.“ *Clinical Rheumatology*, Bd. 35, Nr. 3, pp. 657-662, March 2016.
- [79] Z. Zuo, A. E. Williams, Y. J. Park, K. Choi, A. L. Chan, W. H. Reeves, M. R. Bubb, Y. J. Lee, K. Park, C. M. Stewart und S. Cha, „Muscarinic type 3 receptor autoantibodies are associated with anti-SSA/Ro autoantibodies in Sjögren's syndrome.“ *Journal of Immunological Methods*, Bd. 437, pp. 28-36, October 2016.
- [80] C. Deng, C. Hu, S. Chen, J. Li, X. Wen, Z. Wu, Y. Li, F. Zhang und Y. Li, „Meta-analysis of anti-muscarinic receptor type 3 antibodies for the diagnosis of Sjögren syndrome.“ *PLoS One*, Bd. 10, Nr. 1, p. e0116744, January 28 2015.

- [81] C. P. Berg, K. Blume, K. Lauber, M. Gregor, P. A. Berg, S. Wesselborg und G. M. Stein, „Autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptors found in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *BMC Gastroenterology*, Bd. 10, p. 120, October 2010.
- [82] H. Tsuboi, H. Ohira, H. Asashima, S. Tsuzuki, M. Iizuka, N. Matsuo, Y. Kondo, I. Matsumoto und T. Sumida, „Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *Hepatology Research*, Bd. 44, Nr. 14, pp. E471-479, December 2014.
- [83] S. Sherlock und J. Dooley, „Diseases of the liver and biliary cirrhosis.,“ *Oxford: Blackwell Sci Pub*, pp. 236-253, 1993.
- [84] K. D. Lindor, M. E. Gershwin, R. Poupon, M. Kaplan, N. V. Bergasa, E. J. Heathcote und A. A. f. S. o. L. Diseases, „Primary biliary cirrhosis.,“ *Hepatology*, Nr. 50(1), pp. 291-308, July 2009.
- [85] E. J. Carey, A. H. Ali und K. D. Lindor, „Primary biliary cirrhosis.,“ *The Lancet*, Nr. 386(10003), p. 1565–1575, 17 October 2015.
- [86] U. Beuers, K. M. Boberg, R. W. Chapman, O. Chazouillères, P. Invernizzi, D. E. Jones, F. Lammert, A. Parès und M. Trauner, „EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases.,“ *Journal of Hepatology*, Nr. 51(2), pp. 237-267, August 2009.
- [87] H. Y. Pan, Y. N. Dai, J. N. Zheng, K. Q. Shi, S. Van Poucke, H. Zou und M. H. Zheng, „National incidence of autoimmune liver diseases and its relationship with the human development index.,“ *Oncotarget*, Nr. 7(29), pp. 46273-46282, 19 July 2016.
- [88] M. E. Gershwin, I. R. Mackay, A. Sturgess und R. L. Coppel, „Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Immunology*, Nr. 138, p. 3525–3531, 1987.
- [89] J. Van de Water, A. Cooper, C. D. Surh, R. Coppel, D. Danner, A. Ansari, R. Dickson und M. E. Gershwin, „Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *New England Journal of Medicine*, Nr. 320(21), pp. 1377-1380, 25 May 1989.

- [90] T. K. Mao, P. A. Davis, J. A. Odin, R. L. Coppel und M. E. Gershwin, „Sidechain Biology and the Immunogenicity of PDC-E2, the Major Autoantigen of Primary Biliary Cirrhosis,“ *Hepatology*, Nr. 40(6):, p. 1241–1248, December 2004.
- [91] S. Matsumura, J. Van De Water, H. Kita, R. L. Coppel, T. Tsuji, K. Yamamoto, A. A. Ansari und M. E. Gershwin, „Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases.,“ *Hepatology*, Nr. 35(1), pp. 14-22, January 2002.
- [92] K. Tsuneyama, J. Van de Water, Y. Nakanuma, S. Cha, A. Ansari, R. Coppel und M. E. Gershwin, „Human combinatorial autoantibodies and mouse monoclonal antibodies to PDC-E2 produce abnormal apical staining of salivary glands in patients with coexistent primary biliary cirrhosis and Sjögren's syndrome.,“ *Hepatology*, Nr. (4 Pt 1), pp. 893-898, 20 October 1994.
- [93] E. Hashimoto, K. D. Lindor, H. A. Homburger, E. R. Dickson, A. J. Czaja, R. Wiesner und J. Ludwig, „Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis.,“ *Mayo Clinic Proceedings*, Nr. 68(11), pp. 1049-1055, November 1993.
- [94] K. Harada, J. Van de Water, P. S. Leung, R. L. Coppel, A. Ansari, Y. Nakanuma und M. E. Gershwin, „In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset.,“ *Hepatology*, Bd. 25, Nr. 4, pp. 791-796, April 1997.
- [95] K. Harada und Y. Nakanuma, „Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis.,“ *Medical Molecular Morphology*, Bd. 39, Nr. 2, pp. 55-61, June 2006.
- [96] J. A. Solís Herruzo, P. Solís Muñoz und T. Muñoz Yagüe, „The pathogenesis of primary biliary cirrhosis,“ *Revista española de enfermedades digestivas*, Bd. 101, Nr. (6), pp. 413-423, June 2009.
- [97] K. Harada, S. Shimoda, Y. Sato, K. Isse, H. Ikeda und Y. Nakanuma, „Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis.,“ *Clinical & Experimental Immunology*, Bd. 157, Nr. 2, pp. 261-270, August 2009.

- [98] G. Rong, Y. Zhou, Y. Xiong, L. Zhou, H. Geng, T. Jiang, Y. Zhu, H. Lu, S. Zhang, P. Wang, B. Zhang und R. Zhong, „Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population.,“ *Clinical & Experimental Immunology*, Bd. 156, Nr. 2, pp. 217-225, May 2009.
- [99] C. Rust und U. Beuers, „Overlap syndromes among autoimmune liver diseases,“ *World Journal of Gastroenterology*, Nr. 14(21), p. 3368–3373, 7 June 2008.
- [100] Y.-Q. Huang, „Recent advances in the diagnosis and treatment of primary biliary cholangitis,“ *World Journal of Hepatology*, Nr. 8(33), p. 1419–1441, 16 November 2016.
- [101] C. Selmi, M. J. Mayo, N. Bach, H. Ishibashi, P. Invernizzi, R. G. Gish, S. C. Gordon, H. I. Wright, B. Zweiban, M. Podda und M. E. Gershwin, „Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment.,“ *Gastroenterology*, Nr. 127(2), pp. 485-492, August 2004.
- [102] C. Selmi, M. De Santis, F. Cavaciocchi und M. E. Gershwin, „Infectious Agents and Xenobiotics in the Etiology of Primary Biliary Cirrhosis,“ *Disease Markers*, Nr. 29(6), p. 287–299, 2010.
- [103] A. Lleo, S. Oertelt-Prigione, I. Bianchi, L. Calzari, P. Finelli, M. Miozzo, R. Lazzari, A. Floreani, F. Donato, M. Colombo, M. E. Gershwin, M. Podda und P. Invernizzi, „Y chromosome loss in male patients with primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Autoimmunity*, Nr. 41, pp. 87-91, March 2013.
- [104] E. L. Krawitt, „Autoimmune hepatitis.,“ *New England Journal of Medicine*, Nr. 354(1), pp. 54-66, 5 January 2006.
- [105] I. G. McFarlane, „Definition and classification of autoimmune hepatitis.,“ *Seminars Liver Disease*, Nr. 22(4), pp. 317-324, November 2002.
- [106] K. M. Boberg, „Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis.,“ *Clinical Liver Disease*, Nr. 6(3), pp. 635-647, August 2002.
- [107] J. J. Feld und E. J. Heathcote, „Epidemiology of autoimmune liver disease.,“ *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Nr. 18(10), pp. 1118-1128, 18 October 2003.

- [108] M. Werner, H. Prytz, B. Ohlsson, S. Almer, E. Björnsson, A. Bergquist, S. Wallerstedt, H. Sandberg-Gertzén, R. Hultcrantz, P. Sangfelt, O. Weiland und A. Danielsson, „Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study.“ *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Nr. 43(10), pp. 1232-1240, 2008.
- [109] K. J. Hurlburt, B. J. McMahon, H. Deubner, B. Hsu-Trawinski, J. L. Williams und K. V. Kowdley, „Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives.“ *American Journal of Gastroenterology*, Nr. 97(9), pp. 2402-2407, September 2002.
- [110] J. H. Ngu, K. Bechly, B. A. Chapman, M. J. Burt, M. L. Barclay, R. B. Geary und C. A. Stedman, „Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women?“, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Nr. 25(10), pp. 1681-1686, October 2010.
- [111] K. Zachou, P. Muratori, G. K. Koukoulis, A. Granito, N. Gatselis, A. Fabbri, G. N. Dalekos und L. Muratori, „Review article: autoimmune hepatitis – current management and challenges“, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 38, Nr. 8, p. 887–913, October 2013.
- [112] N. K. Gatselis, K. Zachou, G. K. Koukoulis und G. N. Dalekos, „Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics“, *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 21, Nr. 1, pp. 60-83, 7 January 2015.
- [113] F. Alvarez, P. A. Berg, F. B. Bianchi, L. Bianchi, A. K. Burroughs, R. L. Cancado, R. W. Chapman, W. G. Cooksley, A. J. Czaja, V. J. Desmet, P. T. Donaldson, A. L. Eddleston, L. Fainboim, J. Heathcote, J. C. Homborg, J. H. Hoofnagle, S. Kakumu, E. L. Krawitt, I. R. Mackay, R. N. MacSween, W. C. Maddrey, M. P. Manns, I. G. McFarlane, K. H. Meyer zum Büschenfelde, M. Zeniya und e. al., „International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis.“ *Journal of Hepatology*, Bd. 31, Nr. 5, pp. 929-938, November 1999.
- [114] M. P. Manns, A. J. Czaja, J. D. Gorham, E. L. Krawitt, G. Mieli-Vergan, D. Vergani und J. M. Vierling, „Diagnosis and management of autoimmune hepatitis.“ *Hepatology*, Bd. 51, Nr. 6, p. 2193–2213, June 2010.
- [115] A. J. Czaja, „Diagnosis and management of the overlap syndromes of autoimmune hepatitis.“ *Canadian Journal of Gastroenterology*, Bd. 37, Nr. 7, pp. 417-423, July 2013.

- [116] Y. M. Lee und M. M. Kaplan, „Primary sclerosing cholangitis.“ Bd. 14, Nr. 9, pp. 924-933, 6 April 1995.
- [117] N. A. Molodecky, H. Kareemi, R. Parab, H. W. Barkema, H. Quan, R. P. Myers und G. G. Kaplan, „Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis.“ *Hepatology*, Bd. 53, Nr. 5, pp. 1590-1599, May 2011.
- [118] T. H. Karlsen, E. Schrumpf und K. M. Boberg, „Update on primary sclerosing cholangitis.“ *Digestive and Liver Disease*, Bd. 42, Nr. 6, pp. 390-400, June 2010.
- [119] M. J. Pollheimer, E. Halilbasic, P. Peter und M. Trauner, „Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis.“ *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology.*, Bd. 25, Nr. 6, p. 727–739, December 2011.
- [120] R. H. Wiesner und N. F. LaRusso, „Clinicopathologic features of the syndrome of primary sclerosing cholangitis.“ *Gastroenterology*, Bd. 79, Nr. 2, pp. 200-206, August 1980.
- [121] K. M. Elsayes, E. P. Oliveira, V. R. Narra, H. A. Abou El Abbass, M. I. Ahmed, R. Tongdee und J. J. Brown, „MR and MRCP in the evaluation of primary sclerosing cholangitis: current applications and imaging findings.“ *2006*, Bd. 30, Nr. 3, pp. 398-404, June.
- [122] O. Fausa, E. Schrumpf und K. Elgjo, „Relationship of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis.“ *Seminars in Liver Disease*, Bd. 11, Nr. 1, pp. 31-39, February 1991.
- [123] M. Kaya, P. Angulo und K. D. Lindor, „Overlap of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis: an evaluation of a modified scoring system.“ *Journal of Hepatology*, Bd. 33, Nr. 4, pp. 537-542, October 2000.
- [124] U. Beuers und C. Rust, „Overlap syndromes.“ *Seminars in Liver Disease*, Bd. 25, Nr. 3, pp. 311-320, August 2005.
- [125] J. F. Riemann, W. Fischbach, P. R. Galle und J. Mössner, *Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 2: Leber, Galle, Pankreas*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2008.
- [126] C. P. Strassburg, „Autoimmune liver diseases and their overlap syndromes.“ *Praxis (Bern 1994)*, Nr. 95(36), pp. 1363-1381, 6 September 2006.

- [127] N. Razumilava, G. J. Gores und K. D. Lindor, „Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis.“ *Hepatology*, Bd. 54, Nr. 5, pp. 1842-1852, November 2011.
- [128] S. Singh und J. A. Talwalkar, „Primary Sclerosing Cholangitis: Diagnosis, Prognosis, and Management.“ *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 11, Nr. 8, pp. 898 - 907, 27 February 2013.
- [129] N. Seo, S. Y. Kim, S. S. Lee, J. H. Byun, J. H. Kim, H. J. Kim und M.-G. Lee, „Sclerosing Cholangitis: Clinicopathologic Features, Imaging Spectrum, and Systemic Approach to Differential Diagnosis.“ *Korean Journal of Radiology*, Bd. 17, Nr. 1, p. 25–38, January 2016.
- [130] A. B. De Vries, M. Janse, H. Blokzijl und R. K. Weersma, „Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis.“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 21, Nr. 6, p. 1956–1971, 14 February 2015.
- [131] R. J. Lamontagne, S. Bagga und M. J. Bouchard, „Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis.“ *Hepatoma Research*, Bd. 2, p. 163–186, 1 July 2016.
- [132] J. Carter und V. A. Saunders, „Virology: Principles and Applications,“ England, Wiley, 2007, pp. 213-227.
- [133] B. S. Blumberg, B. Larouze, W. T. London, B. Werner, J. E. Hesser, I. Millman, G. Saimot und M. Payet, „The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma.“ *The American journal of pathology*, Bd. 81, Nr. 3, p. 669–682, 1975.
- [134] „Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.“ *The Lancet*, Bd. 385, Nr. 9963, p. 117–171, 10 January 2015.
- [135] G. Papatheodoridis, M. Buti, M. Cornberg, H. L. Janssen, D. Mutimer, S. Pol, G. Raimondo, G. Dusheiko, A. Lok und P. Marcellin, „EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection.“ *Journal of Hepatology*, Bd. 57, p. 167–185, 2012.
- [136] W. Gerlich, D. Glebe, L. G. Gürtler und G. Kaiser, „Therapy of hepatitis B Virus Infections – Potential and Limitations.“ *Intervirology*, Bd. 57, Nr. 3-4, pp. 127-238, 2014.

- [137] Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley und M. Houghton, „Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.“ *Science*, Bd. 244, Nr. 4902, pp. 359-362, 21 April 1989 Apr 21.
- [138] D. Moradpour, F. Penin und C. M. Rice, „Replication of hepatitis C virus.“ *Nature Reviews Microbiology*, Bd. 5, Nr. 6, pp. 453-463, June 2007.
- [139] R. Koch-Institut, „Epidemiologischen Bulletin 17,“ 2004.
- [140] A. Shlomai, Y. P. De Jong und C. M. Rice, „Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma.“ *Seminars in Cancer Biology*, Bd. 26, pp. 78-88, June 2014.
- [141] R. N. MacSween und A. D. Burt, „Histologic spectrum of alcoholic liver disease.“ *Seminars in Liver Disease*, Bd. 6, p. 221–232, 1986.
- [142] C. Torruellas, S. W. French und V. Medici, „Diagnosis of alcoholic liver disease.“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 20, Nr. 33, p. 11684–11699, 7 September 2014.
- [143] C. Turner, „How much alcohol is in a ‘standard drink’? An analysis of 125 studies.“ *British Journal of Addiction*, Bd. 85, p. 1171–1175, 1990.
- [144] K. V. Menon, G. J. Gores und V. H. Shah, „Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease.“ *Mayo Clinic Proceedings*, Bd. 76, Nr. 10, pp. 1021-1029, October 2001.
- [145] S. Mandayam, M. M. Jamal und T. R. Morgan, „Epidemiology of alcoholic liver disease.“ *Seminars in Liver Disease*, Bd. 24, p. 217–232, 2004.
- [146] S. Bellentani, G. Saccoccio, G. Costa, C. Tiribelli, F. Manenti, M. Sodde und e. al., „Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage.“ *The Dionysos Study Group. Gut*, Bd. 41, p. 845–850, 1997.
- [147] U. Becker, M. Gronbaek, D. Johansen und T. I. Sorensen, „Lower risk for alcohol-induced cirrhosis in wine drinkers.“ *Hepatology*, Bd. 35, p. 868–875, 2002.
- [148] X. L. Lu, J. Y. Luo, M. Tao, Y. Gen, P. Zhao, H. L. Zhao und e. al., „Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World J Gastroenterol*.“ Bd. 10, p. 2423–2426, 2004.

- [149] N. Sato, K. O. Lindros, E. Baraona, K. Ikejima, E. Mezey, H. A. Jarvelainen und e. al., „Sex difference in alcohol-related organ injury.“ *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, Bd. 25, p. 40S–45S, 2001.
- [150] C. M. Leevy und S. A. Moroianu, „Nutritional aspects of alcoholic liver disease.“ *Clinical Liver Disease*, Bd. 9, pp. 67-81, 2005.
- [151] C. P. Day und M. F. Bassendine, „Genetic predisposition to alcoholic liver disease.“ *Gut*, Bd. 33, p. 1444–1447, 1992.
- [152] C. J. McClain, Z. Song, S. S. Barve, D. B. Hill und I. Deaciuc, „Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease.“ *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, Bd. 287, p. G497–G502, 2004.
- [153] A. Monzoni, F. Masutti, G. Saccoccio, S. Bellentani, C. Tiribelli und M. Giacca, „Genetic determinants of ethanol-induced liver damage.“ *Molecular Medicine*, Bd. 7, p. 255–262, 2001.
- [154] A. Monto, K. Patel, A. Bostrom, S. Pianko, P. Pockros, J. G. McHutchison und e. al., „Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis.“ *Hepatology*, Bd. 39, p. 826–834, 2004.
- [155] P. Ruchika und S. Anupama, „The epidemiology of Sjögren’s syndrome.“ *Clinical Epidemiology*, Nr. 6, pp. 247-255, July 2014.
- [156] M. N. Lazarus und D. A. Isenberg, „Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with primary Sjögren’s syndrome.“ *Annals of the Rheumatic Diseases*, Nr. 64(7), pp. 1062-1064, Juli 2005.
- [157] S. Lindgren, R. Manthorpe und S. Eriksson, „Autoimmune liver disease in patients with primary Sjögren’s syndrome.“ *Journal of Hepatology*, Nr. 20(3), pp. 354-358, March 1994.
- [158] A. J. Montaña-Loza, J. C. Crispín-Acuña JC und J. Remes-Troche, „Abnormal hepatic biochemistries and clinical liver disease in patients with primary Sjögren’s syndrome.“ *Annals of Hapatology*, Nr. 6(3), pp. 150-155, July-September 2007.

- [159] T. Matsumoto, T. Morizane, Y. Aoki, S. Yamasaki, M. Nakajima, N. Enomoto, S. Kobayashi und H. Hashimoto, „Autoimmune hepatitis in primary Sjogren's syndrome: pathological study of the livers and labial salivary glands in 17 patients with primary Sjogren's syndrome.“ Nr. 55(2), pp. 70-76, February 2005.
- [160] Y. Alamanos, N. Tsifetaki, P. V. Voulgari, A. I. Venetsanopoulou, C. Siozos und A. A. Drosos, „Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in north-west Greece, 1982-2003.“ *Rheumatology (Oxford)*, Nr. 45(2), pp. 187-191, February 2006.
- [161] M. García-Carrasco, M. Ramos-Casals, J. Rosas, L. Pallarés, J. Calvo-Alen, R. Cervera, J. Font und M. Ingelmo, „Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients.“ *Medicine (Baltimore)*, Nr. 81(4), pp. 270-280, July 2002.
- [162] C. P. Mavragani und H. M. Moutsopoulos, „The geoepidemiology of Sjögren's syndrome.“ *Autoimmun Reviews*, Nr. 9(5), pp. 605-310, March 2010.
- [163] C. P. Mavragani und H. M. Moutsopoulos, „Sjögren syndrome.“ *Canadian Medical Association Journal*, Nr. 186(15), p. E579–E586, 21 October 2014.
- [164] M. Voulgarelis und A. G. Tzioufas, „Current Aspects of Pathogenesis in Sjögren's Syndrome.“ *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, Nr. 2(6), pp. 325-334, December 2010.
- [165] R. Yoshimi, A. Ueda, K. Ozato und Y. Ishigatsubo, „Clinical and Pathological Roles of Ro/SSA Autoantibody System.“ *Clinical and Developmental Immunology*, pp. 1-12, December 2012.
- [166] A. Rasmussen, J. A. Ice, H. Li, K. Grundahl, J. A. Kelly, L. Radfar, D. U. Stone, K. S. Hefner, J. M. Anaya, M. Rohrer, R. Gopalakrishnan, G. D. Houston, D. M. Lewis, J. Chodosh, J. B. Harley, P. Hughes, J. S. Maier-Moore, C. G. Montgomery, N. L. Rhodus, A. D. Farris, B. M. Segal, R. Jonsson, C. J. Lessard, R. H. Scofield und K. L. Moser Sivils, „Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterized sicca cohort.“ *Annal Rheumatic Diseases*, Nr. 73, pp. 31-38, 2014.

- [167] V. Schegg, M. Vogel, S. Didichenko, M. B. Stadler, Z. Beleznyay, S. Gadola, C. Sengupta, B. M. Stadler und S. M. Miescher, „Evidence that anti-muscarinic antibodies in Sjögren’s Syndrome recognise both M3R and M1R,“ Nr. 36(4), pp. 213-222, July 2008.
- [168] S. Kivity, M. T. Arango, M. Ehrenfeld, O. Tehori, Y. Shoenfeld, J. Anaya und N. Agmon-Levin, „Infection and autoimmunity in Sjogren's syndrome: a clinical study and comprehensive review.,“ *Journal of Autoimmunity*, Nr. 51, pp. 17-22, June 2014.
- [169] M. T. Brennan, V. Sankar, R. A. Leakan, M. M. Grisius, M. T. Collins, P. C. Fox, B. J. Baum und S. R. Pillemer, „Sex steroid hormones in primary Sjögren's syndrome.,“ *Journal Rheumatology*, Nr. 30(6), pp. 1267-1271, June 2003.
- [170] N. Holdgate und E. W. St.Claira, „Recent advances in primary Sjogren's syndrome,“ *F1000Research*, Nr. 5, 2016.
- [171] H. Rehm und T. Letzel, „Isolierung von Plasmamembranen,“ in *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*, Berlin-Heidelberg, Springer Spektrum, 2013, p. 45 ff..
- [172] QIAGEN, *The QIAexpressionist*, Hilden: Qiagen GmbH, 2003.
- [173] S. Frischke, „Einfluss möglicher Autoantikörper in Patientenserum auf die Expression und Funktionalität des muskarinischen Acetylcholinrezeptro 3 (M3R) auf Cholangiozyten und Hepatozyten sowie ihre Auswirkung auf deren Zellproliferation,“ Eberhardt Karls Universität Tübingen, Tübingen, 2013.
- [174] W. J. Pichler und J. Tilch, „The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity,“ *Allergy*, Bd. 59, Nr. (8), pp. 809-820, August 2004.
- [175] R. Klein, „Evidence for immunological (allergic) mechanisms in a subgroup of patients with phenprocoumon-induced liver disease,“ *European Journal of Clinical Pharmacology*, Bd. 65, Nr. (12), pp. 1195-1201, December 2009.
- [176] R. Klein Moreira, F. Revetta, E. Koehler und M. K. Washington, „Diagnostic utility of IgG and IgM immunohistochemistry in autoimmune liver disease.,“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 16, Nr. 4, p. 453–457, 28 January 2010.

- [177] L. J. Dawson, H. E. Allison, J. Stanbury, D. Fitzgerald und P. M. Smith, „Putative anti-muscarinic antibodies cannot be detected in patients with primary Sjogren's syndrome using conventional immunological approaches.“ *Rheumatology (Oxford)*, Bd. 43, Nr. 12, pp. 1488-1495, December 2004.
- [178] R. Révélen, F. D'Arbonneau, L. Guillevin, A. Bordron, P. Youinou und M. Dueymes, „Comparison of cell-ELISA, flow cytometry and Western blotting for the detection of antiendothelial cell antibodies.“ *Clinical and Experimental Rheumatology*, Bd. 20, Nr. 1, pp. 19-26, Jan-Feb. 2002.
- [179] A. Coutinho, M. D. Kazatchkine und S. Avrameas, „Natural autoantibodies.“ *Current Opinion in Immunology*, Bd. 7, Nr. 6, pp. 812-818, December 1995.
- [180] C. J. Binder, „Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes.“ *Journal of Clinical Immunology*, Bd. Suppl 1, pp. S56-60, 30 May 2010.
- [181] G. J. Silverman, „Regulatory natural autoantibodies to apoptotic cells: Pallbearers and protectors.“ *Arthritis & Rheumatology*, Bd. 63, Nr. 3, p. 597–602, March 2011.
- [182] A. J. Español und M. E. Sales, „Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines.“ *International Journal of Molecular Medicine*, Bd. 13, Nr. 2, pp. 311-317, February 2004.
- [183] R. R. Resende, A. S. Alves, L. R. Britto und H. Ulrich, „Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.“ *Experimental Cell Research*, Bd. 314, Nr. 7, pp. 1429-1443, 15 April 2008.
- [184] D. M. Harnois, F. G. Que, A. Celli, N. F. LaRusso und G. J. Gores, „Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line.“ *Hepatology*, Bd. 26, Nr. 4, pp. 884-890, October 1997.
- [185] A. C. Okaro, A. R. Deery, R. R. Hutchins und B. R. Davidson, „The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium.“ *Journal of Clinical Pathology*, Bd. 54, Nr. 12, pp. 927-932, 2001.

- [186] M. Iwata, K. Harada, N. Kono, S. Kaneko, K. Kobayashi und Y. Nakanuma, „Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis.“ *Human Pathology*, Bd. 31, Nr. 2, pp. 179-184, February 2000.
- [187] M. E. Gershwin und J. Van de Water, „Cholangiocytes and primary biliary cirrhosis: prediction and predication.“ *Journal of Clinical Investigation*, Bd. 108, Nr. 2, p. 187–188, 15 July 2001.
- [188] R. T. Damian, „Molecular mimicry revisited.“ *Parasitology Today*, Bd. 3, Nr. 9, p. 263–266, September 1987.
- [189] M. F. Cusick, J. E. Libbey und R. S. Fujinami, „Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease.“ *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Bd. 42, Nr. (1), pp. 102-111, February 2012.
- [190] Y. Ghodke, K. Joshi, A. Chopra und B. Patwardhan, „HLA and disease.“ *European Journal of Epidemiology*, Bd. 20, Nr. (6), pp. 475-488, June 2005.
- [191] T. H. Karlsen und B. K. Chung, „Genetic Risk and the Development of Autoimmune Liver Disease.“ *Digestive Diseases*, Bd. 33, pp. Suppl 2:13-24, December 2015.
- [192] E. Y. Jones, L. Fugger, J. L. Strominger und C. Siebold, „MHC class II proteins and disease: a structural perspective.“ *Nature Reviews Immunology*, Bd. 6, Nr. (4), pp. 271-82, April 2006.
- [193] P. Deitiker und M. Z. Atassi, „MHC Genes Linked to Autoimmune Disease.“ *Critical Reviews in Immunology*, Bd. 35, Nr. (3), pp. 203-251, 2015.
- [194] Y. M. Mosaad, „Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease.“ *Scandinavian Journal of Immunology*, Bd. 82, Nr. (4), pp. 283-306, October 2015.
- [195] H. Ishida, H. Ota, H. Yanagida und H. Dobashi, „An imbalance between Th1 and Th2-like cytokines in patients with autoimmune diseases-- differential diagnosis between Th1 dominant autoimmune diseases and Th2 dominant autoimmune diseases.“ *Nihon Rinsho*, Bd. 55, Nr. 6, pp. 1438-1443, June 1997.

- [196] Y. Naito, I. Matsumoto, E. Wakamatsu, D. Goto, S. Ito, A. Tsutsumi und T. Sumida, „Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjögren's syndrome.,“ *Annals of the Rheumatic Disease*, Bd. 65, Nr. 2, pp. 269-271, February 2006.
- [197] T. Sumida, H. Tsuboi, M. Iizuka, T. Hirota, H. Asashima und I. Matsumoto, „The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: a critical review.,“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 51, pp. 44-50, June 2014.
- [198] K. Harada, K. Tsuneyama, M. Yasoshima, Y. Kanemori, H. Ohta, S. Masuda, N. Onai, K. Matsushima und Y. Nakanuma, „Type1 and type2 memory T cells imbalance shown by expression of intrahepatic chemokine receptors relates to pathogenesis of primary biliary cirrhosis.,“ *Hepatology Research*, Bd. 24, Nr. 3, p. 290, November 2002.
- [199] M. Tang, X. H. Shi und F. C. Zhang, „The characteristics of peripheral lymphocytic subsets and cytokines in primary biliary and their changes to drug treatment.,“ *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, Bd. 49, Nr. 2, pp. 129-133, February 2010.
- [200] S. Miyaguchi und M. Mori, „Ursodeoxycholic acid (UDCA) suppresses liver interleukin 2 mRNA in the cholangitis model.,“ *Hepato-Gastroenterology*, Bd. 52, Nr. 62, pp. 596-602, March-April 2005.
- [201] R. Y. Lan, T. L. Salunga, K. Tsuneyama, Z. X. Lian, G. X. Yang, W. Hsu, Y. Moritoki, A. A. Ansari, C. Kemper, J. Price, J. P. Atkinson, R. L. Coppel und M. E. Gershwin, „Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 32, Nr. 1, pp. 43-51, February 2009.
- [202] D. E. Jones, „Pathogenesis of primary biliary cirrhosis.,“ *Postgraduate Medical Journal*, Bd. 84, Nr. 987, pp. 23-33, January 2008.
- [203] D. Wang, H. Zhang, J. Liang, Z. Gu, Q. Zhou, X. Fan, Y. Hou und L. Sun, „CD4+ CD25+ but not CD4+ Foxp3+ T cells as a regulatory subset in primary biliary cirrhosis.,“ *Cellular & Molecular Immunology*, Bd. 7, Nr. 6, pp. 485-490, November 2010.
- [204] P. Bochtler, P. Riedl, I. Gomez, R. Schirmbeck und J. Reimann, „Local accumulation and activation of regulatory Foxp3+ CD4 T(R) cells accompanies the appearance of activated CD8 T cells in the liver.,“ *Hepatology*, Bd. 48, Nr. 6, pp. 1954-1963, December 2008.

- [205] F. Bernuzzi, D. Fenoglio, F. Battaglia, M. Fravega, M. E. Gershwin, F. Indiveri, A. A. Ansari, M. Podda, P. Invernizzi und G. Filaci, „Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 35, Nr. 3, pp. 176-180, November 2010.
- [206] R. Y. Lan, C. Cheng, Z. X. Lian, K. Tsuneyama, G. X. Yang, Y. Moritoki, Y. H. Chuang, T. Nakamura, S. Saito, S. Shimoda, A. Tanaka, C. L. Bowlus, Y. Takano, A. A. Ansari, R. L. Coppel und M. E. Gershwin, „Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis.,“ *Hepatology*, Bd. 43, Nr. 3, pp. 729-737, April 2006.
- [207] T. Y. Shi und F. C. Zhang, „Role of autoimmunity in primary biliary cirrhosis.,“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 18, Nr. 48, p. 7141–7148, 28 December 2012.
- [208] T. K. Mao, Z. X. Lian, C. Selmi, Y. Ichiki, P. Ashwood, A. A. Ansari, R. L. Coppel, S. Shimoda, H. Ishibashi und M. E. Gershwin, „Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *Hepatology*, Bd. 42, Nr. 4, pp. 802-808, October 2005.
- [209] M. Nakamura, K. Funami, A. Komori, T. Yokoyama, A. Aiba, A. Araki, Y. Takii, M. Ito, M. Matsuyama, M. Koyabu, K. Migita, K. Taniguchi, H. Fujioka, H. Yatsunami, M. Matsumoto, H. Ishibashi und T. Seya, „Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers.,“ *Hepatology International*, Bd. 2, Nr. 2, pp. 222-230, June 2008.
- [210] J. Zhao, S. Zhao, G. Zhou, L. Liang, X. Guo, P. Mao, X. Zhou, H. Wang, Y. Nan, D. Xu und J. Yu, „Altered biliary epithelial cell and monocyte responses to lipopolysaccharide as a TLR ligand in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Bd. 46, Nr. 4, pp. 485-494, April 2011.
- [211] A. P. Wang, K. Migita, M. Ito, Y. Takii, M. Daikoku, T. Yokoyama, A. Komori, M. Nakamura, H. Yatsunami und H. Ishibashi, „Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 25, Nr. 1, pp. 85-91, August 2005.
- [212] Y. H. Chuang, Z. X. Lian, K. Tsuneyama, B. L. Chiang, A. A. Ansari, R. L. Coppel und M. E. Gershwin, „Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis.,“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 26, Nr. 4, pp. 232-240, June 2006.

- [213] S. Shimoda, K. Harada, H. Niiro, K. Shirabe, A. Taketomi, Y. Maehara, K. Tsuneyama, Y. Nakanuma, P. Leung, A. A. Ansari, M. E. Gershwin und K. Akashi, „Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis.“ *Hepatology*, Bd. 53, Nr. 4, pp. 1270-1281, April 2011.
- [214] A. W. Burgess, J. Camakaris und D. Metcalf, „Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium.“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 252, Nr. 6, pp. 1998-2003, 25 March 1977.
- [215] J. A. Hamilton und A. Achuthan, „Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease.“ *Trends in Immunology*, Bd. 34, Nr. 2, pp. 81-89, February 2013.
- [216] M. El-Behi, B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel und A. Rostami, „The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF.“ *Nature Immunology*, Bd. 12, Nr. 6, pp. 568-575, June 2011.
- [217] L. Codarri, G. Gyölvéshi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter und B. Becher, „ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation.“ *Nature Immunology*, Bd. 12, Nr. 6, pp. 560-567, June 2011.
- [218] A. Shiomi und T. Usui, „Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation.“ *Mediators of Inflammation*, Bd. 568543, pp. 1-13, 8 March 2015.
- [219] P. Bhattacharya, M. Thiruppathi, H. A. Elshabrawy, K. Alharshawi, P. Kumar und B. S. Prabhakar, „GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity.“ *Cytokine*, Bd. 75, Nr. 2, pp. 261-271, October 2015.
- [220] P. Bhattacharya, I. Budnick, M. Singh, M. Thiruppathi, K. Alharshawi, H. Elshabrawy, M. J. Holterman und B. S. Prabhakar, „Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy.“ *Journal of Interferon & Cytokine Research*, Bd. 35, Nr. 8, pp. 585-599, August 2015.
- [221] C. A. O'Mahony und J. M. Vierling, „Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis.“ *Seminars in Liver Disease*, Bd. 26, Nr. 1, pp. 3-21, February 2006.

- [222] X. Bo, U. Broome, M. Remberger und S. Sumitran-Holgersson, „Tumour necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis.“ *Gut*, Bd. 49, Nr. 1, pp. 131-141, July 2001.
- [223] T. L. Whiteside, S. Lasky, L. Si und D. H. Van Thiel, „Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis.“ *Hepatology*, Bd. 5, Nr. 3, pp. 468-474, May-June 1985.
- [224] L. Si, T. L. Whiteside, R. R. Schade, T. E. Starzl und D. H. Van Thiel, „T-lymphocyte subsets in liver tissues of patients with primary biliary cirrhosis (PBC), patients with primary sclerosing cholangitis (PSC), and normal controls.“ *Journal of Clinical Immunology*, Bd. 4, Nr. 4, pp. 262-272, July 1984.
- [225] J. A. Snook, R. W. Chapman, G. K. Sachdev, A. Heryet, P. M. Kelly, K. A. Fleming und D. P. Jewell, „Peripheral blood and portal tract lymphocyte populations in primary sclerosing cholangitis.“ *Journal of Hepatology*, Bd. 9, Nr. 1, pp. 36-41, July 1989.
- [226] J. Buxbaum, P. Qian, P. M. Allen und M. G. Peters, „Hepatitis resulting from liver-specific expression and recognition of self-antigen.“ *Journal of Autoimmunity*, Bd. 31, Nr. 3, pp. 208-215, November 2008.
- [227] Y. Aizawa und A. Hokari, „Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects.“ *Clinical and Experimental Gastroenterology*, p. 9–18, 19 January 2017.
- [228] D. Vergani und G. Mieli-Vergani, „Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis.“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 14, Nr. 21, p. 3306–3312, 7 June 2008.
- [229] F. Behfarjam, M. H. Sanati, S. Nasser Moghaddam, M. Ataei, S. Nikfam und Z. Jadali, „Role of Th1/Th2 cells and related cytokines in autoimmune hepatitis.“ *Turkish journal of gastroenterology*, 25 January 2017 .
- [230] M. Peiseler, M. Sebode, B. Franke, F. Wortmann, D. Schwinge, A. Quaas, U. Baron, S. Olek, C. Wiegard, A. W. Lohse, C. Weiler-Normann, C. Schramm und J. Herkel, „FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency.“ *Journal of Hepatology*, Bd. 57, Nr. 1, pp. 125-132, July 2012.

- [231] C. R. Grant, R. Liberal, B. S. Holder, J. Cardone, Y. Ma, S. C. Robson, G. Mieli-Vergani, D. Vergani und M. S. Longhi, „Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis.“ *Hepatology*, Bd. 59, Nr. 3, pp. 1007-1015, March 2014.
- [232] S. Kromidas, „Die Validierungsparameter einer Analytischen Methode.“ in s *Handbuch Validierung in der Analytik*, Weinheim, Wiley-VCH-Verlag, 2011, p. 734.

12 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2013 bis Februar 2017 im Immunpathologischen Labor in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Tübingen unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Reinhild Klein und Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee angefertigt.

Einen besonderen Dank möchte ich an Prof. Dr. Klein richten, da sie mir die Gelegenheit gegeben hat meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Ihre engagierte Betreuung und Unterstützung habe ich das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken. Bei etlichen intensiven Diskussionen der Ergebnisse lieferte sie neue und kreative Ideen die zu richtungsweisenden Impulsen geführt haben. Das positive Denken und die Motivation von Prof. Dr. Klein halfen mir die Daten in die richtige Form zu bringen und mein Engagement nie zu verlieren.

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee möchte ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität danken. Die wissenschaftlichen Arbeiten von Prof. Dr. Rammensee haben mir immer wieder neue Inspirationen für meine eigene Forschungen geliefert.

In Gedenken danke ich Herrn Prof. Dr. med. Peter A. Berg für die Bereitstellung der erforderlichen finanziellen Ressourcen und bedauere sehr, dass Er die Fertigstellung meiner Arbeit nicht mehr miterleben kann.

Ohne die engagierte und tatkräftige Unterstützung meiner Betreuer und dem gesamten IMPALA- und HLA-Laborteam hätte die Arbeit nicht in dieser Form entstehen können. Deshalb möchte ich mich bei allen recht herzlich für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft bedanken. Frau Dr. Beate Preuß danke ich für die tägliche Zusammenarbeit und die Überlassung notwendiger Materialien und Quellen.

Abschließend geht mein liebster Dank an meinen Ehemann Marc, meine Familie, Franziska T. und Anne K.. Herzlichen Dank für die uneingeschränkte, tolle und vielseitige Unterstützung, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.