

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Nachweis von funktionellen Antikörpern gegen den
muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 3 und
Analyse ihres Einflusses auf die Rezeptoraktivität und
Zellproliferation bei Patienten mit primär-biliärer
Cholangitis in Abhängigkeit von Art und Dauer der
Therapie**

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

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

**Vorgelegt von
Mayer, Christian Tim**

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Sturm, Ph.D.

Tag der Disputation: 29.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung	1
1.1 Primär biliäre Cholangitis	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Pathologie und Histologie.....	3
1.1.3 Symptome und assoziierte Erkrankungen.....	4
1.1.4 Immunologische Auffälligkeiten und Autoantikörper	6
1.1.5 Therapie und Prognose.....	7
1.2 Acetylcholinrezeptoren und Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper ...	9
1.2.1 Typen und Vorkommen von Acetylcholinrezeptoren.....	9
1.2.2 Signalweg des G-Protein gekoppelten mAChR3	10
1.2.3 Wirkung des mAChR3 auf Zellproliferation und Apoptose	12
1.2.4 Expression und Funktion des mAChR3 auf Cholangiozyten und Hepatozyten	13
1.2.5 Vorkommen und Nachweis von Anti-mAChR3-Antikörpern.....	15
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	16
2. Material	17
2.1 Chemikalien, Lösungen, Arzneimittel	17
2.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Plasmide, Plasmid-Kits und Bakterienstämme	19
2.4 Eukaryontische Zelllinien.....	20
2.5 Nährmedien	20
2.6 Patientenseren	22
2.7 Geräte und Instrumente	23
2.8 Software	24
3. Methoden.....	26
3.1 Zellkulturen.....	26
3.1.1 Kulturbedingungen	26
3.1.2 Passagieren von Zellen.....	26
3.1.3 Zellzahlbestimmung	27
3.2 Ammoniumsulfatfällung von Immunglobulinen aus Patientenseren	27
3.3 Gewinnung von Plasmid-DNA	28
3.4 mAChR3-Lumineszenz-Assay	29

3.4.1 Testprinzip.....	29
3.4.2 Transfektion von CHO-Zellen mit dem mAChR3 Plasmid	30
3.4.3 Transfektion von TFK-1-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid.....	31
3.4.4 Optimierung der Transfektion von HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid.....	31
3.4.5 Transfektion von HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid.....	33
3.4.6 Inkubation der Zellen mit Immunglobulinen aus Patientenseren.....	33
3.4.7 Inkubation der Zellen mit Atropin.....	34
3.4.8 Coelenterazine-Behandlung und luminometrische Messung	34
3.5 ³H-Thymidin-Proliferations-Assay.....	35
3.5.1 Testprinzip.....	35
3.5.2 Transfektion und Aussäen der Zellen.....	36
3.5.3 Inkubation der Zellen mit Immunglobulinen aus Patientenseren.....	36
3.5.4 Inkubation der Zellen mit Atropin und Carbachol	36
3.5.5 ³ H Thymidin-Markierung und Messung.....	36
3.6. Statistik	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Untersuchungen zur Optimierung und Validierung des mAChR3-Lumineszenz-Assays.....	38
4.1.1 Optimierung der Transfektion von HEP-G2-Zellen.....	38
4.1.2 Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität bei Verwendung verschiedener Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay.....	40
4.2 Einfluss von Immunglobulinen aus Seren von PBC-Patienten auf die Aktivität des mAChR3 auf verschiedenen Zelllinien, gemessen im mAChR3-Lumineszenz-Assay.....	42
4.2.1 Häufigkeit inhibierender und stimulierender Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie.....	42
4.2.2 Verlauf der inhibierenden und stimulierenden Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie.....	43
4.2.3 Zusammenfassung der Verläufe funktioneller Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie sowie unter UDCS- bzw. immunsuppressiver Therapie unter Verwendung verschiedener Zelllinien im Lumineszenzassay	61
4.3. Untersuchungen zur Validierung des ³H-Thymidin-Proliferations-Assays	67
4.3.1 Einfluss von Atropin und Carbachol auf die Proliferation verschiedener Zelllinien im ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay.....	67
4.4 Einfluss von Immunglobulinen aus Seren von PBC-Patienten auf die Proliferation verschiedener Zelllinien, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay	68

4.4.1 Häufigkeit von die Proliferation inhibierenden und stimulierenden Anti-mAChR3-Antikörpern bei PBC-Patienten ohne Therapie.....	68
4.4.2 Einfluss von die Proliferation stimulierenden und inhibierenden Antikörpern bei PBC-Patienten im Verlauf ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie.....	69
4.4.3 Zusammenfassung der Verläufe der die Proliferation beeinflussenden Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie sowie unter UDCS- bzw. immunsuppressiver Therapie unter Verwendung verschiedener Zelllinien	87
4.5 Korrelation von mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate	92
5. Diskussion	93
5.1 Diskussion von Material und Methoden	94
5.1.1 Patientenkollektiv	94
5.1.2 mAChR3-Lumineszenz-Assay	95
5.1.3 ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay	97
5.2 Diskussion der Ergebnisse der Messungen mit Seren von PBC-Patienten	99
5.2.1 Diskussion der Ergebnisse im mAChR3-Lumineszenz-Assay.....	99
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse im ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay ...	102
5.2.3 Diskussion der Korrelation von mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate	105
5.3 Ausblick	106
6. Zusammenfassung.....	108
7. Erklärung zum Eigenanteil	120
8. Danksagung	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemessene Lumineszenzwerte im mAChR3-Lumineszenz-Assay nach Transfektion von HEP-G2 Zellen direkt in den Wells der 96-Well-Platte in relativen Lumineszenz-Einheiten (RLU) unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien, Transfektionsreagenz : DNA - Verhältnisse und Ausgangszellzahlen.	39
Abbildung 2: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität, gemessen an mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	40
Abbildung 3: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität gemessen an den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	41
Abbildung 4: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität, gemessen an nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	42
Abbildung 5: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).	45
Abbildung 6: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).	47

- Abbildung 7:** Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). 49
- Abbildung 8:** Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). 51
- Abbildung 9:** Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). 53
- Abbildung 10:** Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). 55
- Abbildung 11:** Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). 57

Abbildung 12: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16).	59
Abbildung 13: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16).	61
Abbildung 14: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von nicht spezifisch behandelten Patienten (n = 4) bei Diagnosestellung und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	63
Abbildung 15: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von mit UDACS behandelten Patienten (n = 18) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	64
Abbildung 16: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von immunsuppressiv behandelten Patienten (n = 16) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay.	65
Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von Patienten in verschiedenen Therapiegruppen, gemessen mit unterschiedlichen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay	66

jeweils vor Therapiebeginn bzw. bei Erstdiagnose und im Verlauf.

Abbildung 18: Einfluss von Atropin auf die Proliferationsrate
verschiedener Zelllinien, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-
Assay. 67

Abbildung 19: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden
CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten
zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -
Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). 71

Abbildung 20: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv
exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline
von PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im
Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht
therapierte Patienten; n = 4). 73

Abbildung 21: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig
exprimierenden HEP-G2-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline
von PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im
Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht
therapierte Patienten; n = 4). 75

Abbildung 22: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden
CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten
vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im
 ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDCS therapierte
Patienten; n = 18). 77

Abbildung 23: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv
exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline 79

von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDACS therapierte Patienten; n = 18).

Abbildung 24: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig exprimierenden HEP-G2- Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDACS therapierte Patienten; n = 18). 81

Abbildung 25: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). 83

Abbildung 26: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). 85

Abbildung 27: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig exprimierenden HEP-G2-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). 87

Abbildung 28: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen nicht therapierter PBC-Patienten (n = 4) bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin- 89

Proliferations-Assay.

Abbildung 29: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen mit UDCA therapiertes PBC-Patienten (n = 18) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay. 90

Abbildung 30: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen immunsuppressiv behandelte PBC-Patienten (n = 16) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay. 91

Abbildung 31: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten aus verschiedenen Therapiegruppen jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay. 92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Arzneimittel und deren Hersteller.	17
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.	19
Tabelle 3: Nährmedien für prokaryontische Zellen.	21
Tabelle 4: Nährmedien für eukaryontische Zellen.	21
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Instrumente.	23
Tabelle 6: Verwendete Software.	24
Tabelle 7: Einfluss von Immunglobulinen von 38 untherapierten PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen im mAChR3-Lumineszenz-Assay mit verschiedenen Zelllinien.	43
Tabelle 8: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte Patienten; n = 4).	44
Tabelle 9: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte	46

Patienten; n = 4).

Tabelle 10: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte Patienten; n = 4). 48

Tabelle 11: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 50

Tabelle 12: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 52

Tabelle 13: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 54

Tabelle 14: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16). 56

Tabelle 15: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).	58
Tabelle 16: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).	60
Tabelle 17: Einfluss von Immunglobulinen von 38 untherapierten PBC-Patienten auf die Proliferation verschiedener Zelllinien, gemessen im ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay.	69
Tabelle 18: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).	70
Tabelle 19: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ³ H-Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).	72
Tabelle 20: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-	74

Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Tabelle 21: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 76

Tabelle 22: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 78

Tabelle 23: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18). 80

Tabelle 24: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16). 82

Tabelle 25: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ^3H - 84

Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Tabelle 26: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im 3H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

86

Abkürzungsverzeichnis

AIH	Autoimmunhepatitis
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ATX-LPA-Achse	Autotaxin-Lysophosphatidsäure-Achse
CPM	<i>Counts per Minute</i> ; Zählungen pro Minute
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EB	<i>Elution Buffer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum
G-418	Geneticin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent Protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HBSS	<i>Hank's balanced Salt Solution</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP ₃	Inositoltrisphosphat
LPA	Lysophosphatidsäure
M2-AMA	Antimitochondriale Antikörper der Klasse M2
mAChR	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mAChR1	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 1

mAChR2	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 2
mAChR3	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 3
mAChR4	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 4
mAChR5	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 5
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC-β	Phospholipase C-β
RLU	<i>Relative Luminescence Unit</i> ; relative Lumineszenz-Einheit
SS	Sjögren-Syndrom
UDCS	Ursodesoxycholsäure

1. Einleitung

1.1 Primär biliäre Cholangitis

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die primär biliäre Cholangitis (PBC) ist eine chronische cholestatische Lebererkrankung, deren Ursachen nicht genau geklärt sind. Sie führt zu einer progressiven Zerstörung der kleinen intrahepatischen Gallenwege, geht mit portalen lymphozytären Entzündungsreaktionen und Granulombildung einher und kann im weiteren Verlauf zu intrahepatischer Fibrose bis hin zum Vollbild einer Leberzirrhose führen (Kaplan 1996).

Ahrens et al. prägten für die Erkrankung 1950 die Bezeichnung „primär biliäre Zirrhose“, die bis heute gebräuchlich ist, jedoch zunehmend durch die Bezeichnung „primär biliäre Cholangitis“ abgelöst wird. Diese Änderung der Nomenklatur trägt im Wesentlichen der Tatsache Rechnung, dass die Erkrankung aufgrund verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten heute deutlich seltener zur Entwicklung einer Leberzirrhose führt als noch zur Zeit ihrer Erstbeschreibung (Beuers et al. 2015).

Auch wenn die genaue Pathogenese der PBC weiterhin nicht vollständig bekannt ist, geht man heute davon aus, dass es sich um eine typische Autoimmunerkrankung handelt. Autoimmun bedingte Verletzungen der kleinen intrahepatischen Gallengänge führen zu sekundärer Cholestase und in fortgeschrittenen Stadien zu einer Schädigung des gesamten Leberparenchyms (Webb et al. 2015).

Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz in der Bevölkerung variieren stark und werden in einer Metaanalyse in unterschiedlichen Populationen mit 0,33 bis 5,8 pro 100.000 Einwohner/Jahr bzw. 1,91 bis 40,2 pro 100.000 Einwohner angegeben (Boonstra et al. 2012). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei etwa 50 Jahren (Griffiths et al. 2014).

Der überwiegende Teil der PBC-Patienten ist weiblich, wobei das Verhältnis von Frauen zu Männern in der Literatur mit bis zu 10:1 angegeben wird. In einigen Populationen scheint der Unterschied der Erkrankungshäufigkeit zwischen Männern und Frauen allerdings geringer auszufallen. So fand eine Studie unter den in den Jahren 2000 bis 2009 neu diagnostizierten PBC-Fällen in Lombardia (Italien) und in Dänemark lediglich ein Verhältnis von Frauen zu Männern von 2,3:1 bzw. 4,2:1 (Lleo et al. 2016).

Zum Ausbruch der Erkrankung kommt es nach derzeitigem Verständnis durch das Aufeinandertreffen einer genetischen Prädisposition mit auslösenden externen Faktoren. So fand sich in einer Studie unter 8 monozygoten Zwillingspaaren, von denen jeweils ein Zwilling an PBC erkrankt war, in 5 Fällen beim anderen Zwilling ebenfalls eine PBC-Erkrankung, entsprechend einer paarweisen Konkordanzrate von 63% (Selmi et al. 2004). Eine familiäre Häufung zeigte sich auch unter Geschwistern und bei Müttern und Töchtern (Smyk et al. 2011).

Inzwischen ließen sich zahlreiche genetische Varianten von HLA- (Humanes Leukozytenantigen-) und Nicht-HLA-Genen identifizieren, die mit einem erhöhten Risiko an PBC zu erkranken in Zusammenhang stehen. Bei den HLA-Genen handelt es sich im Speziellen um die HLA-DR Allele B1*08 und B1*02. Die Allele B1*11 und B1*13 zeigen hingegen einen protektiven Effekt. Unter den mit erhöhtem PBC-Risiko assoziierten Nicht-HLA-Genen befinden sich insbesondere Varianten von Genen, die mit der T-Zell-Aktivierung in Verbindung stehen und zum Teil auch Assoziationen mit anderen Autoimmunerkrankungen zeigen. Jedoch kann die Gesamtheit der identifizierten Risikoallele bislang nur einen kleinen Anteil der beobachteten genetischen Risikokomponente erklären (Webb et al. 2015).

An externen Faktoren, die die Entstehung einer PBC-Erkrankung begünstigen, wurden das Rauchen von Zigaretten sowie rezidivierende Harnwegsinfekte identifiziert. Zahlreiche weitere Einflussfaktoren wie die Exposition mit flüchtigen organischen Verbindungen wie Benzol werden diskutiert (Juran und Lazaridis 2014). Für *Escherichia coli*, den häufigsten Erreger von Harnwegsinfekten, wurde zudem in einem Mausmodell nachgewiesen, dass eine Exposition zur

Ausbildung von für die PBC charakteristischen antimitochondrialen Antikörpern (AMA) führen kann (Wang et al. 2014). Als Mechanismus, über den diese Faktoren bei gegebener genetischer Suszeptibilität zur Krankheitsentstehung führen können, wird wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen vorrangig die molekulare Mimikry-Hypothese diskutiert (Juran und Lazaridis 2014).

1.1.2 Pathologie und Histologie

Charakteristisch für die Histologie der PBC ist eine chronische, nicht purulente Entzündung der intrahepatischen Gallenwege. Hauptsächlich betroffen sind hierbei die kleinen interlobulären und septalen Gallengänge (Lindor et al. 2009). Eine Leberbiopsie ist zwar zur Diagnostik von typischen PBC-Fällen nicht mehr zwingend erforderlich, kann jedoch wichtige Informationen über den Schweregrad der Erkrankung, das Ansprechen auf eine Therapie und die Prognose liefern (Wendum et al. 2015).

Nach Ludwig und nach Scheuer lässt sich der Krankheitsverlauf in vier histologische Stadien einteilen (Ludwig et al. 1978; Scheuer 1967).

In Stadium I beschränken sich die entzündlichen Läsionen im Wesentlichen auf die Zellen des Gallengangsepithels. Es finden sich lymphozytenreiche Infiltrate, die den Gallengang umgeben und infiltrieren. In diesem ersten Stadium finden sich häufig Granulome, in weiter fortgeschrittenen Stadien sind diese seltener anzutreffen. Im Zentrum der Granulome, die aus Lymphozyten, Histiocyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und gelegentlich Riesenzellen bestehen, befindet sich oft ein nekrotischer Gallengang. Man spricht dann von einer floriden Läsion. Im zweiten Stadium zeigen sich zunehmend atypisch geformte, gewundene und vernarbte Gallengänge. Die Entzündung breitet sich auf das periportal gelegene Parenchym aus, es kommt zu so genannten Mottenfraßnekrosen. In Stadium III setzt sich die Vernarbung weiter fort. Es bilden sich fibröse Septen aus, die sich über mehrere Leberläppchen erstrecken. In Stadium IV liegt schließlich das Vollbild einer Leberzirrhose vor. Jedoch erlaubt eine einzelne Leberbiopsie nicht immer eine sichere Stadienzuordnung, da Läsionen in verschiedenen Stadien gleichzeitig an

unterschiedlichen Lokalisationen vorhanden sein können und in einer Biopsie in der Regel nicht alle Läsionen erfasst werden können (Kaplan 1996).

Aktuellere, derzeit noch in Evaluation befindliche histologische Scoring-Systeme konzentrieren sich auf den Fibrosegrad, das Ausmaß entzündlicher Veränderungen sowie das Ausmaß von Cholestase und Duktopenie (Nakanuma et al. 2010; Wendum et al. 2015).

Im Erkrankungsverlauf kommt es zunächst zu einer gesteigerten Proliferation der Cholangiozyten, gleichzeitig jedoch auch zu einer erhöhten Apoptoserate. Diese Prozesse tragen indirekt durch die Ausschüttung fibrosebegünstigender Faktoren sowie vermutlich auch direkt durch so genannte epithelial-mesenchymale Transition zum zirrhotischen Umbau der Leber bei (Priester et al. 2010).

1.1.3 Symptome und assoziierte Erkrankungen

Insbesondere zu Beginn des Krankheitsverlaufs zeigen nicht alle PBC-Patienten Symptome der Erkrankung. Bis zu 61% der Patienten sind zum Diagnosezeitpunkt asymptomatisch. Nach einem hinreichend langen Beobachtungszeitraum jedoch entwickeln die meisten Patienten Symptome (Prince et al. 2004).

Die häufigsten Symptome der PBC sind Fatigue, Pruritus und Ikterus (Purohit und Cappell 2015). Eine Fatigue wird in einzelnen Populationen von PBC-Patienten mit einer Häufigkeit von bis zu 80,6% angegeben (Witt-Sullivan et al. 1990).

Die pathophysiologischen Ursachen der Fatigue sind weiterhin nicht vollständig geklärt. Es handelt sich vermutlich um ein multifaktorielles Geschehen, das von der Schwere der Leberbeteiligung weitgehend unabhängig zu sein scheint und vermutlich zentrale wie auch periphere Anteile hat. Die Fatigue ist assoziiert mit Depressionen, Schlafstörungen, kognitiven Beeinträchtigungen und autonomer Dysfunktion (Jopson und Jones 2015).

Die zur Fatigue beitragende raschere Ermüdbarkeit (Goldblatt et al. 2001) und verlängerte Erholungszeit der Skelettmuskulatur könnten möglicherweise Resultat einer beeinträchtigten Funktion der Mitochondrien in der Muskulatur

sein, was auf eine direkte Beteiligung der AMA an der Entstehung der Fatigue hindeuten könnte (Hollingsworth et al. 2008).

Als mögliche zentrale Komponente der Fatigue sind in der Literatur neuroradiologisch nachweisbare Läsionen der weißen Hirnsubstanz beschrieben, die möglicherweise auf eine gestörte Autoregulation der hirnersorgenden Blutgefäße zurückzuführen sind (Hollingsworth et al. 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass solche neuroradiologischen Auffälligkeiten im Gehirn bei PBC-Patienten schon vor Eintreten einer signifikanten Leberschädigung vorhanden sein könnten (Grover et al. 2016). Die Fatigue und die durch sie oft verursachte soziale Isolation haben von den Symptomen der PBC den größten negativen Einfluss auf die krankheitsbezogene Lebensqualität (Dyson et al. 2016).

Auch das Symptom des Pruritus ist unter PBC-Patienten oft sehr ausgeprägt und beeinträchtigend (Purohit und Cappell 2015). Mehr als zwei Drittel der PBC-Patienten verspüren im Krankheitsverlauf einen pathologischen Juckreiz (Kremer et al. 2015). Bei vielen Patienten nimmt dieser nachts und unter Wärmeeinwirkung zu und bessert sich bei Kühlung (Rishe et al. 2008). Obwohl Pruritus auch bei anderen cholestatischen und nicht cholestatischen Lebererkrankungen häufig auftritt, sind auch dessen Ursachen nicht vollständig aufgeklärt. Als mögliche Ursachen wurden erhöhte Konzentrationen von Gallensalzen, Histamin, Serotonin, Progesteronmetaboliten und endogenen Opioiden diskutiert (Kremer et al. 2015). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine Störung der Autotaxin-Lysophosphatidsäure-Achse (ATX-LPA-Achse) und damit verbunden eine intradermale Akkumulation von Lysophosphatidsäure (LPA) ein Auslöser für den Juckreiz bei cholestatischen Lebererkrankungen sein könnte (Sun et al. 2016).

Ein Ikterus tritt meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf auf, kann jedoch auch bereits zum Zeitpunkt der Diagnose bestehen.

Bei bis zu 70% der Patienten besteht eine Hepatomegalie, bei etwa 35% eine Splenomegalie (Kaplan 1996). Auch Oberbauchschmerzen, Haut- und Nagelpilzinfektionen, Ekzeme, Hyperpigmentierungen der Haut, Xanthelasma, Hypercholesterinämie und Osteoporose können Symptome einer PBC

darstellen (Laurin et al. 1994; Koulentaki et al. 2006; Soros et al. 1998; Solerio et al. 2003).

Im Stadium der Leberzirrhose können alle zirrrosotypischen Komplikationen wie Ösophagusvarizen, Aszites und hepatische Enzephalopathie auftreten (Kaplan 1996).

Die PBC ist häufig mit anderen autoimmunen Erkrankungen assoziiert. Bis zu 84% der PBC-Patienten weisen mindestens eine weitere Autoimmunerkrankung auf (Culp et al. 1982). Bei etwa 10% der PBC-Patienten bestehen zusätzlich Eigenschaften einer Autoimmunhepatitis (AIH). Man spricht dann von einem PBC/AIH-Overlap-Syndrom (Chazouilleres 2015). Assoziationen mit extrahepatischen Erkrankungen sind unter anderem beschrieben mit dem Sjögren-Syndrom, dem Raynaud-Syndrom, Autoimmunthyreoiditiden, systemischem Lupus erythematodes, Sklerodermie und rheumatoider Arthritis (Floreani et al. 2015).

1.1.4 Immunologische Auffälligkeiten und Autoantikörper

Wichtigstes immunologisches Charakteristikum der PBC ist der Toleranzverlust gegenüber einigen ubiquitären mitochondrialen Antigenen. Die resultierende Immunantwort scheint eine maßgebliche Ursache für die entzündlichen Prozesse an den intrahepatischen Gallengängen zu sein. Am Entzündungsprozess sind regulatorische T-Zellen, autoreaktive CD8+ T-Zellen wie auch B-Zellen beteiligt (Hirschfield und Gershwin 2013). Des Weiteren besteht eine gesteigerte IgM-Produktion (Kikuchi et al. 2005). Bei über 90% der Patienten sind AMA nachweisbar, die sich gegen verschiedene mitochondriale Antigene richten. Typischerweise handelt es sich um Antikörper, die gegen die E2-Untereinheiten von 2-Oxosäure-Dehydrogenasen gerichtet sind, einer Familie von Enzymen der inneren Mitochondrienmembran. Zu diesen gehören die Pyruvat-Dehydrogenase, die 3-Methyl-2-Oxobutanoat-Dehydrogenase, sowie die Oxoglutarat-Dehydrogenase. Das häufigste Antigen stellt dabei die Pyruvat-Dehydrogenase dar. Diese Antikörper zählen zur AMA-Subklasse M2 (M2-AMA) (Kaplan 1996). Diese M2-AMA sind bei einem Großteil der PBC-Patienten sowohl als IgG, als auch als IgM nachweisbar (Mutimer et al. 1989).

Zusätzlich wurden bei einigen PBC-Patienten auch AMA der Subklassen M4, M8 und M9 festgestellt, deren Vorhandensein möglicherweise prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf hat (Berg und Klein 1992).

Während interindividuell große Unterschiede beim gemessenen AMA-Titer verschiedener PBC-Patienten bestehen, bleiben die AMA-Titer der einzelnen Patienten im Verlauf der Erkrankung weitestgehend konstant (Van Norstrand et al. 1997; Benson et al. 2004; Tana et al. 2015). Auch abhängig von der Art der Therapie kommt es zu keiner signifikanten Veränderung des AMA-Titers (Benson et al. 2004).

Bei etwa 50% der PBC-Patienten lassen sich antinukleäre Antikörper nachweisen. Eine spezifische Bedeutung der ANA in der Pathophysiologie der Erkrankung ist bislang nicht bekannt. Jedoch haben diese prognostische und besonders bei AMA-negativen Patienten auch diagnostische Bedeutung. (Hirschfield und Gershwin 2013).

Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen wie auch der hier vorliegenden Arbeit ist das Vorkommen und die mögliche pathophysiologische Bedeutung von Antikörpern gegen den muskarinischen Acetylcholinrezeptor vom Subtyp 3 (mAChR3) bei PBC-Patienten. Der Nachweis solcher Anti-mAChR3-Antikörper gelang Berg et al. 2010 mittels Western Blot und ELISA. Kapitel 1.2 beschäftigt sich genauer mit dem mAChR3, Kapitel 1.2.5 geht genauer auf das Vorkommen und den Nachweis von Anti-mAChR3-Antikörpern ein.

1.1.5 Therapie und Prognose

Derzeitige Standardtherapie der PBC ist laut aktueller Leitlinie eine Dauertherapie mit Ursodesoxycholsäure (UDCS) in einer Dosierung von 13-15 mg/kg Körpergewicht/Tag (Strassburg et al. 2017). Bei UDCS handelt es sich um eine Gallensäure, die natürlicherweise in der menschlichen Gallenflüssigkeit vorkommt, dort jedoch lediglich etwa 3% der Gesamtmenge an Gallensäuren ausmacht. UDCS wird passiv durch Diffusion resorbiert, in der Leber konjugiert und aktiv in die Gallenflüssigkeit sezerniert. Über den enterohepatischen Kreislauf wird sie teilweise erneut aufgenommen. Über die Nieren wird lediglich ein kleiner Anteil ausgeschieden. UDCS wirkt über mehrere unterschiedliche

Mechanismen: Unter anderem macht sie die Gallenflüssigkeit hydrophiler und vermindert so deren zytotoxische Effekte auf Cholangiozyten, sie stimuliert die Gallensekretion und sie vermindert den pro-apoptotischen Effekt der Gallensäuren auf die Hepatozyten (Copaci et al. 2005). Außerdem scheint UDCS eine aberrante HLA Klasse 1 Expression auf Hepatozyten zu verhindern und reduziert so möglicherweise die Schädigung dieser durch zytotoxische T-Zellen (Calmus et al. 1990).

PBC-Patienten, die mit UDCS behandelt werden, zeigen geringere Cholestasemarker im Blut (Floreani und Mangini 2017) und weisen histologisch eine geringere Progressionsrate als unbehandelte Patienten auf (Angulo et al. 1999). Poupon et al. zeigten 1999, dass eine Therapie mit UDCS das lebertransplantatfreie Überleben von PBC-Patienten in allen Krankheitsstadien verlängert.

Patienten, die innerhalb eines Jahres gut auf die UDCS-Therapie ansprechen, unterscheiden sich hinsichtlich des Langzeitüberlebens nicht signifikant von der Allgemeinbevölkerung. Patienten mit schlechtem biochemischem Ansprechen auf die UDCS-Therapie hingegen zeigen ein signifikant kürzeres Langzeitüberleben (Pares et al. 2006).

Insbesondere für diese etwa 40% der PBC-Patienten, die kein gutes biochemisches Ansprechen auf UDCS zeigen, gibt es verschiedene weitere Therapieansätze (Floreani und Mangini 2017). Der Farnesoid X Rezeptor Agonist Obeticholsäure scheint bei diesen Patienten in Kombination mit UDCS einen zusätzlichen Nutzen zu haben (Nevens et al. 2016). Eine Kombinationstherapie mit UDCS und Fibraten befindet sich derzeit noch in klinischer Evaluation. Eine Kombinationstherapie mit UDCS und dem Glukokortikoid Budesonid verbessert zwar das biochemische und histologische Therapieansprechen, ist jedoch mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Osteopenie und Gewichtszunahme verbunden und bei Patienten mit Leberzirrhose aufgrund der Gefahr einer Portalvenenthrombose kontraindiziert (Patel und Seetharam 2016).

Therapieversuche mit weiteren immunsuppressiv wirkenden Medikamenten wie Rituximab, Azathioprin, Cyclosporin, Methotrexat und Mycophenolat-Mofetil

zeigten in Studien entweder keine ausreichende Wirkung oder werden aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils derzeit nicht empfohlen (Molinaro und Marschall 2017). Aufgrund eines Overlap-Syndroms, anderer assoziierter Autoimmunerkrankungen oder einer stattgehabten Lebertransplantation erhält dennoch ein relativ großer Anteil der PBC-Patienten zusätzlich zur UDCS-Therapie eine immunsuppressive Therapie.

Eine Lebertransplantation kommt bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und unzureichendem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie in Betracht. Vermutlich dank des frühzeitigen therapeutischen Einsatzes von UDCS hat die Anzahl an Lebertransplantationen bei PBC-Patienten in den letzten beiden Jahrzehnten abgenommen (Patel und Seetharam 2016).

Obwohl die Prognose nach der Lebertransplantation für PBC-Patienten mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 71% sehr gut ist, kommt es häufig zur erneuten histologischen PBC-Manifestation in der Transplantatleber. In einer Analyse von 90 Patienten zeigten Patienten, die nach Transplantation präventiv mit UDCS behandelt wurden, deutlich geringere Rezidivraten als Patienten, die nach Transplantation keine UDCS erhielten. Eine signifikante Auswirkung der präventiven UDCS-Therapie nach Transplantation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit konnte jedoch nicht festgestellt werden (Bosch et al. 2015).

1.2 Acetylcholinrezeptoren und Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper

1.2.1 Typen und Vorkommen von Acetylcholinrezeptoren

Bereits in den 1920er Jahren wurde Acetylcholin, damals vom Entdecker Otto Loewi als „Vagusstoff“ bezeichnet, experimentell als erster Neurotransmitter identifiziert (Loewi 1921). Die Rezeptoren, an denen Acetylcholin als Transmitter wirkt, wurden später in zwei Gruppen unterteilt, die nach Agonisten der jeweiligen Rezeptorengruppe als nikotinsche und muskarinsche Acetylcholinrezeptoren bezeichnet werden. Bei nikotinschen

Acetylcholinrezeptoren (nAChR) handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle. Sie kommen als hauptsächlich exzitatorisch wirkende Rezeptoren im peripheren vegetativen Nervensystem und an muskulären Endplatten, aber auch im zentralen Nervensystem vor (Lindstrom 1997). Auch außerhalb des Nervensystems kommen auf verschiedenen Zelltypen wie etwa Keratinozyten nikotinische Acetylcholinrezeptoren vor (Grando et al. 1995).

Bei den fünf muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR1-mAChR5) handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. mAChR1, mAChR3 und mAChR5 sind dabei vorzugsweise mit G-Proteinen der $G_{q/11}$ -Familie gekoppelt, mAChR2 und mAChR4 mit $G_{i/o}$ -Proteinen (Kostenis et al. 1999). Der Signalweg der $G_{q/11}$ gekoppelten Rezeptoren wird in Kapitel 1.2.2 näher beschrieben.

Die Funktionen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren sind vielfältig. Unter anderem spielen sie eine Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen, der Sekretionsaktivität verschiedener exokriner Drüsen und der Modulation der Herzrhythmus. Im ZNS sind sie unter anderem beteiligt an Motorik, Temperaturregulation und Gedächtnisfunktionen (Caulfield und Birdsall 1998).

Der mAChR3, der in dieser Arbeit im Speziellen eine wichtige Rolle spielt, ist neben seiner Wirkung auf die glatte Muskulatur der wichtigste parasympathische Rezeptor zur Regulation des Speichelflusses. Die Aktivierung des mAChR3 in den Azinuszellen der Speicheldrüsen sorgt dabei für einen gesteigerten Speichelfluss (Proctor und Carpenter 2007; Nakamura et al. 2004). Der mAChR3 beeinflusst zudem die Funktion von Cholangiozyten und möglicherweise auch von Hepatozyten und er ist an der Regulation von Proliferation und Apoptose verschiedener Zellen beteiligt. Hierauf gehen die Kapitel 1.2.3 und 1.2.4 genauer ein.

1.2.2 Signalweg des G-Protein gekoppelten mAChR3

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, handelt es sich beim mAChR1, mAChR3 und mAChR5 um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die überwiegend mit G-Proteinen der $G_{q/11}$ -Familie gekoppelt sind (Kostenis et al. 1999). Wie bei allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren handelt es sich um Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen

miteinander verbunden sind. Intrazellulär binden die Rezeptoren an ein heterotrimeres G-Protein, in diesem Falle eines der Klasse $G_{q/11}$, mit einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand des Rezeptors bilden α , β und γ eine gemeinsame Einheit, wobei die α -Untereinheit ein GDP-Molekül bindet. Wird der Rezeptor durch Bindung eines Liganden aktiviert, so ändert er seine Struktur, was zu einem Austausch des GDP-Moleküls gegen ein GTP-Molekül führt. Durch diesen Austausch wird der G-Protein-Komplex instabil und dissoziiert in eine $G\alpha$ - und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit. $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ aktivieren dann „downstream“ Effektormoleküle bis die intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha$ GTP zu GDP hydrolysiert und das inaktivierte $G\alpha$ -GDP mit $G\beta\gamma$ reassoziert (Mizuno und Itoh 2009).

$G_{q/11}$ -Proteine aktivieren sowohl über die $G\alpha$ -GTP-Untereinheit, als auch über die $G\beta\gamma$ -Untereinheit die Phospholipase C- β (PLC- β). Diese hydrolysiert das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 wiederum sorgt intrazellulär über spezifische IP_3 -Rezeptoren in der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums für eine Freisetzung von Calcium-Ionen aus selbigem. DAG bleibt membranständig und aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Rhee 2001), wobei bei einigen Isoformen der PKC auch Calciumionen sowie das Membranphosphoglycerid Phosphatidylserin für die Aktivierung benötigt werden (do Carmo et al. 2013). Die PKC wiederum beeinflusst unter anderem Zellproliferation und Apoptose (Gutcher et al. 2003) und hat wichtige Auswirkungen sowohl auf die B-Zellen (Saijo et al. 2003), als auch auf die T-Zellen (Saibil et al. 2007) des Immunsystems. Speziell die Proteinkinase C δ scheint wichtig für die Toleranzentwicklung von B-Zellen gegen körpereigene Antigene zu sein (Mecklenbrauker et al. 2002). Der beschriebene Signalweg wird von zahlreichen weiteren Faktoren wie etwa vom intrazellulären Milieu und von spezifischen Regulator-Proteinen beeinflusst. Er stellt einen wichtigen, aber nicht den einzigen Signalweg dar, über den der mAChR3 wirkt (Mizuno und Itoh 2009).

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Methoden spielen insbesondere die durch die mAChR3-Aktivierung wie oben beschrieben ausgelöste intrazelluläre

Freisetzung von Calcium-Ionen sowie die Beeinflussung der Zellproliferation und Apoptose eine wichtige Rolle.

1.2.3 Wirkung des mAChR3 auf Zellproliferation und Apoptose

Verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben Einfluss auf die Proliferation und die Apoptosemechanismen der jeweiligen rezeptorexprimierenden Zellen. Dabei spielen insbesondere muskarinische Acetylcholinrezeptoren eine wichtige Rolle (Yanamadala et al. 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit ist dabei unter anderem der Einfluss des mAChR3 auf Apoptose und Zellproliferation von Bedeutung. Dieser Einfluss ist sowohl von der untersuchten Zelllinie, als auch vom variablen intrazellulären Milieu abhängig.

Bereits 1995 beschrieben Yan et al. eine potentielle anti-apoptotische Wirkung der mAChR3-Aktivierung auf Rattenkleinhirnneuronen. De Sarno et al. zeigten 2003 in einer Studie an Zellen der menschlichen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, die muskarinische Acetylcholinrezeptoren hauptsächlich vom mAChR3-Subtyp exprimiert, einen protektiven Effekt der muskarinischen Rezeptoraktivierung gegen durch DNA-Schäden, oxidativen Stress und Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien ausgelöste apoptotische Signale. Ebenfalls im Jahr 2003 zeigten Tobin und Budd in einer Studie mit mAChR1-, mAChR3- und mAChR5-exprimierenden CHO-Zellen, dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch Carbachol dem Etoposid-induzierten apoptotischen Zelltod entgegenwirkt. Jedoch schien dieser anti-apoptotische Effekt nicht allein auf die Aktivierung des $G_{q/11}$ /PLC Signalwegs zurückzuführen zu sein. Unabhängig von diesem Signalweg schien der mAChR3 in der Lage zu sein, die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins zu verstärken. Besondere Bedeutung hierfür wird in dieser Studie dem C-terminalen Ende des mAChR3 beigemessen.

Shafer und Williams hingegen zeigten 2004, dass eine mAChR3-Aktivierung unter bestimmten intrazellulären Bedingungen, in diesem Falle bei Überexpression des Rac1-Proteins in CHO-Zellen, sogar zur Induktion der Apoptose führen kann. Eine mAChR3-Aktivierung bei CHO-Zellen ohne Rac1-

Überexpression führte in dieser Studie zu einer Inhibierung der Zellproliferation, nicht jedoch zur Apoptoseinduktion.

Eine proliferationsanregende Wirkung des mAChR3 scheint für die Entwicklung der somatotropen Zellen der Adenohypophyse und damit für das Längenwachstum des Körpers eine entscheidende Rolle zu spielen (Gautam et al. 2009).

Bereits 1999 hatten auch Nicke et al. gezeigt, dass die Wirkung der mAChR3-Aktivierung vom intrazellulären Milieu abhängt. In einer Studie mit einer Fibroblasten-Zelllinie zeigte sich bei ruhenden Zellen eine die Proliferation aktivierende Wirkung der mAChR3-Aktivierung durch Carbachol. Bei Zellen, die durch Inkubation mit Kälberserum oder durch Transfektion mit dem Onkogen v-src zum Wachstum angeregt wurden, hatte die mAChR3-Aktivierung hingegen eine deutliche die Proliferation hemmende Wirkung.

In einer Studie mit CHO-Zellen zeigten Burdon et al. 2002 ebenfalls eine proliferationshemmende Wirkung der Carbachol-induzierten mAChR3-Aktivierung. In dieser Studie zeigte sich sowohl bei Inkubation der Zellen mit Kälberserum, als auch bei serumfreier Inkubation eine Hemmung der Proliferation.

Aus den Ergebnissen der erwähnten Studien wird deutlich, dass die Wirkung des mAChR3 auf Apoptose und Zellproliferation für jede Zelllinie und die jeweiligen spezifischen intra- und extrazellulären Umstände individuell betrachtet werden muss.

Auf die Auswirkungen des mAChR3 auf die Proliferation und Apoptose speziell von Cholangiozyten und Hepatozyten geht Kapitel 1.2.4 weiter ein.

1.2.4 Expression und Funktion des mAChR3 auf Cholangiozyten und Hepatozyten

Um einen möglichen Einfluss der in Kapitel 1.1.2 erwähnten Anti-mAChR3-Antikörper auf die Pathophysiologie der PBC zu untersuchen, ist zum einen wichtig, ob und wie die Antikörper die Rezeptoraktivität beeinflussen, zum anderen, ob der Rezeptor auf den jeweiligen Zellen überhaupt exprimiert wird und welche physiologische Funktion er dort hat.

Maßgeblich an der Gallensekretion beteiligt sind Hepatozyten und Cholangiozyten (Boyer 1996). 1997 fanden Alvaro et al. Hinweise darauf, dass Cholangiozyten, die den primären Angriffspunkt für pathologische intrahepatische Prozesse bei der PBC darstellen, den mAChR3 exprimieren, Hepatozyten jedoch nicht.

Weitere Studien bestätigen die Expression des mAChR3 auf Cholangiozyten und zeigen, dass dieser dort eine Rolle bei der Regulation der Bicarbonatsekretion spielt (Nathanson et al. 1996; Minagawa et al. 2007).

Auch LeSage et al. untersuchten 1999 den Einfluss des cholinergen Systems und im speziellen des mAChR3 auf Cholangiozyten. Hierbei zeigte sich zusätzlich zur oben beschriebenen funktionellen Bedeutung des mAChR3 auf Cholangiozyten auch eine wichtige Rolle des mAChR3 in der Proliferations- und Apoptoseregulation dieser Zellen. Nach Vagotomie zeigten die Cholangiozyten in Ratten, die einer Gallengangsligatur unterzogen worden waren, eine erhöhte mAChR3-Expression sowie eine geringere Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate.

Cassiman et al. zeigten 2002, dass die vagale Innervation über den mAChR3 in erkrankten und transplantierten Lebern eine Stimulation hepatischer Progenitorzellen zur Proliferation und Differenzierung zu sowohl Cholangiozyten, als auch Hepatozyten bewirkt. Eine mAChR3-Expression konnte in dieser Studie auf hepatischen Progenitorzellen und Cholangiozyten, nicht jedoch auf ausdifferenzierten Hepatozyten nachgewiesen werden.

Li et al. hingegen zeigten 2009, dass auch ausdifferenzierte Hepatozyten von Mäusen den mAChR3 exprimieren. Die Effekte einer Aktivierung oder Inhibition dieser Rezeptoren auf den Hepatozyten blieb in dieser Studie jedoch unklar.

Eine weitere aktuellere Studie untersuchte den Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten, von denen 87,5% funktionell aktive Anti-mAChR3-Antikörper enthielten, auf die Proliferation von Cholangiozyten und Hepatozyten. Die Immunglobuline zeigten bei Cholangiozyten in 66,7% der Fälle und bei Hepatozyten in 94,0% der Fälle eine die Proliferation stimulierende Wirkung, eine die Proliferation hemmende Wirkung wurde in 2,2% bzw. 2,0% der Fälle beobachtet. Unklar blieb in dieser Arbeit, ob die

proliferationsmodulierende Wirkung über den mAChR3 vermittelt wurde. Eine intrazelluläre Expression der Rezeptor-mRNA konnte in dieser Arbeit sowohl bei Cholangiozyten (TFK-1-Zellen), als auch bei Hepatozyten (HEP-G2-Zellen) nachgewiesen werden, eine Expression des Rezeptors auf Proteinebene jedoch nur bei den Cholangiozyten, was auf eine auf Proteinebene nur geringe bzw. nicht-konstitutive Expression des mAChR3 auf HEP-G2-Zellen hinweisen könnte (Frischke 2013).

1.2.5 Vorkommen und Nachweis von Anti-mAChR3-Antikörpern

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt wiesen Berg et al. 2010 erstmals Anti-mAChR3-Antikörper mittels Western Blot und ELISA nach, wobei dort beim Nachweis mittels ELISA ein aus 25 Aminosäuren bestehendes Teilpeptid des mAChR3 verwendet wurde. Zuvor wurden Anti-mAChR3-Antikörper bereits bei Patienten mit Sjögren-Syndrom (SS) nachgewiesen (Bacman et al. 1998), einer Erkrankung, die häufig mit PBC assoziiert ist. Die Antigene der Anti-mAChR3-Antikörper bei SS-Patienten scheinen in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife des Rezeptors lokalisiert zu sein (Marczinovits et al. 2005; Koo et al. 2008). Verschiedene Studien zeigen, dass diese Antikörper in der Lage sind, am mAChR3 als Agonisten (Bacman et al. 1998) oder Antagonisten (Waterman et al. 2000; Preuss et al. 2014a) zu wirken und so unter anderem die Kontraktionsfähigkeit glatter Muskeln inhibieren können (Park et al. 2013; Waterman et al. 2000). Während Waterman et al. 2000 und Park et al. 2013 diese funktionelle Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper anhand der Auswirkung der Antikörper auf die Kontraktionsfähigkeit von Präparaten glatter Muskulatur untersuchten, beschrieben Preuss et al. 2014 eine Lumineszenz-basierte Methode, die den Nachweis funktioneller Anti-mAChR3-Antikörper und eine Quantifizierung deren funktioneller Aktivität mit Hilfe von CHO-Zellen ermöglicht (Preuss et al. 2014b).

Mit Hilfe der von Preuss et al. 2014 beschriebenen Methode konnte Frischke 2013 auch bei PBC-Patienten eine funktionelle Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper nachweisen, die in dieser Studie überwiegend antagonistisch war.

Dort zeigten Immunglobuline aus 86,7% der Patientenseren eine die mAChR3-Aktivität inhibierende Wirkung (Frischke 2013).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Wie bereits in Kapitel 1.2.5 erwähnt, wurden in vorangegangenen Studien funktionell aktive Anti-mAChR3-Antikörper in den Seren von PBC-Patienten nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit soll mithilfe des im Immunpathologischen Labor etablierten mAChR3-Lumineszenz-Assays die erhöhte Prävalenz dieser Antikörper bei PBC-Patienten bestätigen und deren funktionelle Wirkung auf den mAChR3 analysieren. Zudem soll gezeigt werden, ob sich die Prävalenz dieser Antikörper und deren funktionelle Rezeptorwirkung im Verlauf der Erkrankung – abhängig vom Therapieregime – verändert.

In einer vorherigen Studie wurde zudem gezeigt, dass aus den Seren von PBC-Patienten isolierte Antikörper die Zellproliferation beeinflussen. Auch dieses Phänomen soll in dieser Arbeit mittels des ebenfalls im Immunpathologischen Labor etablierten ³H-Thymidin-Proliferations-Assays re-evaluiert und quantifiziert werden und auch hier soll untersucht werden, ob es im Krankheitsverlauf – abhängig vom Therapieregime – zu einer Änderung in Prävalenz oder Aktivität dieser die Proliferation beeinflussenden Antikörper kommt.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte organ- bzw. zelllinienspezifisch sind, sollen die Experimente mit drei unterschiedlichen Zelllinien, einer Cholangiozyten-Zelllinie, einer Hepatozyten-Zelllinie sowie einer CHO (Chinese hamster ovary)-Zelllinie durchgeführt werden.

2. Material

2.1 Chemikalien, Lösungen, Arzneimittel

Tabelle 1 enthält die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Arzneimittel.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Arzneimittel und deren Hersteller.

Name der Substanz	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ammoniumsulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ampuwa Reinstwasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Atropinsulfat 10 mg/ml	B. Braun Melsungen, Melsungen, D
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Carbachol 50 mg	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Coelenterazine h	Biotum Inc., Hayward, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum Gold (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Berlin, D
FuGENE 6 Transfection Reagent	Promega GmbH, Mannheim, D
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega GmbH, Mannheim, D
G 418-BC, kristallin	Biochrom, Berlin, D
Ham's F12 Nutrient Mixture	Gibco, Gaithersburg, USA

Hank's balanced salt solution (HBSS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
³ H Thymidin-Lösung (14,8 kBq)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
MicroScintPS Szintillationsflüssigkeit	PerkinElmer Inc., MA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin 100x (10000 U/mL)	Gibco, Gaithersburg, MD, USA
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Refobacin 80mg	Merck KGaA, Darmstadt, D
RPMI 1640 Flüssigmedium	Biochrom AG, Berlin, D
SuperFect Transfection Reagent	Quiagen GmbH, Hilden, 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 BioChemica	AppliChem, Darmstadt, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 enthält die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Name des Produktes	Hersteller
Falcon-Röhrchen, konisch, 50 ml, 15 ml, steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Costar Stabpipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Cryo.s Einfrierröhrchen, 2 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
Cellstar® Zellkulturflasche, 250 ML, 75 CM ² , steril	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
Nunc MicroWell 96-Well-Platten mit transparentem Boden aus Polymer mit Deckel	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
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
Ultratip 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.3 Plasmide, Plasmid-Kits und Bakterienstämme

Das zur Transfektion von HEP-G2- und TFK-1-Zellen verwendete *pG5A GFP/Aequorin Plasmid* wurde freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim, Abteilung II: Pharmakologie, Prof.

Dr. Offermanns zur Verfügung gestellt. Es kodiert neben dem GFP/Aequorin Fusionsprotein für eine Kanamycin-/Neomycin-Resistenz.

Das zur Transfektion von CHO-Zellen verwendete *mAChR3 - Plasmid* wurde vom Guthrie cDNA Resource Center (Rolla, MI, USA) bezogen. Es kodiert für den mAChR3 sowie eine Ampicillin-Resistenz, geklont in *pcDNA3.1+* (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA).

Die Vermehrung der Plasmide erfolgte in *One Shot TOP10F' Chemically Competent E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden, D).

2.4 Eukaryontische Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei eukaryontische Zelllinien verwendet, die nachfolgend jeweils kurz beschrieben werden.

CHO-K1-Zellen (DSMZ, Braunschweig, D; DSMZ no.: ACC 110):

Bei der CHO-K1-Zelllinie handelt es sich um einen Subklon einer immortalisierten Zelllinie aus Epithelzellen des Ovars des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*). Die verwendete Zelllinie lag in einem stabil mit dem in Kapitel 2.3 beschriebenen pG5A GFP/Aequorin Plasmid transfizierten Zustand vor.

HEP-G2-Zellen (DSMZ, Braunschweig, D; DSMZ no.: ACC 180):

Hierbei handelt es sich um menschliche Leberzellen, die aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert wurden.

TFK-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig, D; DSMZ no.: ACC 344):

Die Cholangiozytenzelllinie TFK-1 besteht aus Zellen eines menschlichen Gallengangskarzinoms.

2.5 Nährmedien

Die für prokaryontische Zellen verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 3, die für eukaryontische Zellen verwendeten Nährmedien in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Nährmedien für prokaryontische Zellen.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
LB-Agar	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar-Agar in Reinstwasser, pH 7,0 25 µg/mL Kanamycin
Flüssiges LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10 g/l NaCl in Reinstwasser, pH 7,0 50 µg/mL Kanamycin

Tabelle 4: Nährmedien für eukaryontische Zellen.

Zelllinie	Art des Mediums	Zusammensetzung
CHO	Kulturmedium	90% Ham's F12 Nutrient Mixture 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 300 µg/ml G418
	Einfriermedium	70% Ham's F12 Nutrient Mixture 20% FCS 10% DMSO 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 300 µg/ml G418

HEP-G2 und TFK-1	Kulturmedium	90% RPMI 1640 Flüssigmedium 10% FCS 160 µg/ml Refobacin
	Einfriermedium	70% RPMI 1640 Flüssigmedium 20% FCS 10% DMSO 160 µg/ml Refobacin

2.6 Patientenseren

Untersucht wurden Seren von insgesamt 38 an PBC erkrankten Patienten. Alle Patienten wurden in der Abteilung I (Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten) der Medizinischen Klinik Tübingen (Prof. Dr. Ch. Berg) betreut. Von den Patienten waren 35 weiblich und 3 männlich, bei Abnahme des ersten Serums hatten sie ein Alter von 27 bis 66 Jahren (Median: 48,5 Jahre).

Pro Patient wurde ein Serum vor Therapiebeginn, bzw. bei Patienten, die im Verlauf keine Therapie erhielten, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, sowie ein Serum im Krankheitsverlauf analysiert.

Vier Patienten (40 bis 55 Jahre; Median 50,5 Jahre; 4 weiblich; 0 männlich) erhielten im Verlauf keine spezifische Therapie der PBC.

18 Patienten (36 bis 61 Jahre; Median 50 Jahre; 16 weiblich; 2 männlich) erhielten UDCS ohne zusätzliche immunsuppressive Therapie.

16 Patienten (27 bis 66 Jahre; Median 45,5 Jahre; 15 weiblich; 1 männlich) erhielten eine immunsuppressive Therapie, 15 davon in Kombination mit UDCS. Fünf dieser Patienten hatten eine Lebertransplantation erhalten. Die 16 immunsuppressiv behandelten Patienten erhielten aufgrund der Lebertransplantation, der PBC und/oder einer anderen Erkrankung eines oder mehrere der folgenden Immunsuppressiva: Glukokortikoide (15 Patienten), Azathioprin (5 Patienten), Cyclosporin A (4 Patienten), Methotrexat (3

Patienten), Tacrolimus (2 Patienten), Mycophenolat-Mofetil (2 Patienten), Rituximab (1 Patient).

2.7 Geräte und Instrumente

Die bei der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Geräte und Instrumente sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Instrumente.

Bezeichnung	Hersteller
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, D
Cytoperm 2 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Eppendorf Reference® 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1.000 µL	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Kern ALT 220-5DAM Analysewaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Kühl-/Eisschrank 4°C/ -20°C/ -80°C	Wissenschaftlich-technische Werkstätte, Universitätsklinikum Tübingen, D
Magnetrührer IKA-Combimag RET	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
MicroBeta ² LumiJET	PerkinElmer, Rodgau, D
Mikroskop 3,2 x vis photo	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Multipette® plus	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Nalgene® Cryo 1°C Freezing Containers	Thermo Scientific, München, D

NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific, München, D
Neubauer Zählkammer (0,1 mm Tiefe)	Sigma, Deisenhofen, D
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Research plus, 8-Kanal 10-100µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Waage LC 820	Sartorius, Göttingen, D

2.8 Software

Die zur Durchführung der Versuche, Auswertung der Daten und Erstellung dieser Arbeit eingesetzte Software ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Endnote X7,5	Thomson Reuters, New York City, USA
Excel für Mac 2011	Microsoft Corp., Redmond, USA
Graph Pad Prism 6.0f	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
MicroBeta ² LumiJET	PerkinElmer, Rodgau, D

NanoDrop 2000 / 2000c	Thermo Scientific, München, D
SPSS Statistics Version 24	IBM, Armonk, USA

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Kulturbedingungen

Für die Versuchsreihen wurden die Zelllinien CHO-K1, Hep-G2 und TFK-1 verwendet, die in den in Kapitel 2.5 aufgeführten Kulturmedien kultiviert wurden. Alle Arbeitsschritte mit den Zellkulturen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen.

Die bei -80 °C in Einfriermedium tiefgefrorenen Zellen wurden zunächst zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in zwei Waschschritten vom im Einfriermedium enthaltenen DMSO befreit. Dazu wurden die Zellen nach dem Auftauen mit 10 ml Kulturmedium vermennt und bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde der Waschschrift unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Zellen schließlich erneut in Kulturmedium gelöst, ausgezählt und eine Gesamtzahl von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche gegeben, die anschließend mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt wurde.

Während des Auftauens und für die ersten zwei Zellpassagen wurde bei HEP-G2-Zellen gemäß der Empfehlung des DSMZ Kulturmedium mit 20 % FCS-Gehalt verwendet.

Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C , 5 % CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Vor dem Passagieren der Zellen wurden diese zunächst unter dem Mikroskop betrachtet, um die Konfluenz zu beurteilen und Kontaminationen auszuschließen.

Anschließend wurde zunächst das Kulturmedium abpipettiert. Um verbliebene Reste des Kulturmediums zu entfernen, wurden die Zellen einmalig mit 10 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin mit EDTA (0,05 % für CHO- und TFK-1-Zellen, 0,25 % HEP-G2-Zellen) hinzugegeben, gleichmäßig auf dem Boden der Zellkulturflasche verteilt und die Zellen für drei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur mit dem Trypsin mit EDTA inkubiert. Durch vorsichtiges Abklopfen konnten die Zellen anschließend vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Mithilfe der Pipette wurden die Zellen voneinander separiert und die Trypsin-Reaktion schließlich durch Hinzugeben des jeweiligen Kulturmediums gestoppt. Anschließend wurde entsprechend des von der DSMZ empfohlenen Teilungsverhältnisses ein Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese zu einem Gesamtvolumen von 25 ml mit Kulturmedium aufgefüllt.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Nach dem Passagieren der Zellen wurden hierfür aus der übrigen Zellsuspension jeweils 20 μL entnommen und mit 60 μL Trypanblau gefärbt. Die gefärbte Zellsuspension wurde auf die Zählkammer aufgetragen. In vier großen Quadranten wurden die lebenden Zellen ausgezählt und daraus die durchschnittliche Zellzahl pro Kammer berechnet. Mit Hilfe des Kammerfaktors (10^4) und des Verdünnungsfaktors (4) wurde die Zellkonzentration errechnet.

3.2 Ammoniumsulfatfällung von Immunglobulinen aus Patientenseren

Um sicher zu sein, dass mögliche Effekte auf Antikörper und nicht auf andere Faktoren in den Patientenseren zurückzuführen sind, wurden aus allen Seren die Immunglobuline durch Ammoniumsulfatfällung isoliert. Hierfür wurden zu jeweils 300 μL Serum 300 μL gesättigte Ammoniumsulfatlösung (767 g/L) tropfenweise hinzugegeben und die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Am Folgetag wurden die mit Ammoniumsulfat versehenen Seren für 30 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abpipettiert. Es folgten zwei Waschschriffe, bei denen die entstandenen Pellets jeweils in 500 μ L 60-prozentiger Ammoniumsulfatlösung resuspendiert, 15 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Resuspension in je 300 μ L HBSS. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.3 Gewinnung von Plasmid-DNA

Bei der Durchführung des in Kapitel 3.4 beschriebenen mAChR3-Lumineszenz-Assays sowie des in Kapitel 3.5 beschriebenen ^3H -Thymidin-Proliferations-Assays wurden die CHO-Zellen wie in den jeweiligen Kapiteln beschrieben mit einem für den mAChR3 kodierenden Plasmid (mAChR3-Plasmid) transfiziert. Während die CHO-Zellen bereits in einem stabil mit einem für ein Fusionsprotein aus GFP und Aequorin kodierenden Plasmid (pG5A GFP/Aequorin Plasmid) transfizierten Zustand vorlagen, wurden die TFK-1- und HEP-G2-Zellen bei der Durchführung des mAChR3-Lumineszenz-Assays außerdem wie in Kapitel 3.4 beschrieben transient mit diesem Plasmid transfiziert.

Zur Gewinnung des jeweiligen Plasmids wurden One Shot TOP10F' E. coli Bakterien verwendet. Die für die Anzucht benötigten Nährmedien wurden entsprechend der auf dem jeweiligen Plasmid kodierten Resistenz mit Antibiotika versehen. Kryokonservierte Bakterien wurden auf einem Agarnährboden ausgestrichen und für etwa 16 Stunden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden Bakterien von der jeweiligen Agarplatte gepickt und als Vorkultur in 4 ml flüssigem LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 60 μ L der Vorkultur zur Anzucht der Hauptkultur in 30 ml LB-Medium überführt und diese dann erneut bei 37 °C und 150 rpm für etwa 16 Stunden inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Midi Kit nach Anleitung des Herstellers. Die so gewonnenen DNA-Pellets wurden in dem im

Kit enthaltenen Elution Buffer (EB) suspendiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und des Verunreinigungsgrades der bei der Isolierung gewonnenen plasmidhaltigen Suspension erfolgte photometrisch am NanoDrop 2000 Spectrophotometer.

Das Gerät bestimmt dabei automatisch unter anderem die Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge und errechnet daraus die DNA-Konzentration sowie den Quotienten A_{280}/A_{260} , über den eine Verunreinigung der Proben durch Proteine ausgeschlossen werden konnte.

Die gemessenen Plasmidsuspensionen wurden nun durch Zugabe von weiterem EB auf eine DNA-Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.4 mAChR3-Lumineszenz-Assay

3.4.1 Testprinzip

Der mAChR3-Lumineszenz-Assay dient der Erfassung der mAChR3-Aktivität verschiedener Zellen unter Carbachol-Einfluss sowie dem Nachweis und der Quantifizierung von den mAChR3 aktivierenden oder hemmenden Einflüssen durch mögliche funktionelle Autoantikörper in Patientenseren. Der Assay misst die Aktivität des mAChR3 über ein luminometrisches Messverfahren.

Grundlage dieses Messverfahrens bildet das Protein Aequorin, welches das Luciferin Coelenterazine H bindet und so zu einem Photoprotein wird. Aequorin besitzt zudem drei Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen. Nach Bindung von freien intrazellulären Ca^{2+} -Ionen an diese Bindungsstellen wirkt Aequorin als Luciferase und katalysiert die Oxidation von Coelenterazine H zu einer instabilen Dioxetanform, die unter Abspaltung von CO_2 weiterreagiert zu einem Coelenteramid-Ion im elektronisch angeregten Zustand. Bei dessen Relaxation in den Grundzustand wird blaues Licht ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) frei (Kendall und Badminton 1998).

Da der mAChR3 $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelt ist und eine Aktivierung so eine Hochregulation der Phospholipase C und dadurch letztlich eine Erhöhung der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt (Qin et al. 2011), konnte die luminometrische Messung des emittierten Lichtes zur Quantifizierung der mAChR3-Aktivität verwendet werden.

Der im Immunpathologischen Labor etablierte Assay beginnt mit der Transfektion der Zellen mit dem mAChR3-Plasmid (CHO-Zellen) bzw. dem pG5A GFP/Aequorin Plasmid (TFK-1- und HEP-G2-Zellen) und dem Aussäen der Zellen auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte. Bei den TFK-1- und den HEP-G2-Zellen wurde auf eine Transfektion mit dem mAChR3-Plasmid verzichtet, da hier die Auswirkungen der Antikörper auf die natürlicherweise von den Zellen exprimierten Rezeptoren beobachtet werden sollte. Ca. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Behandlung der Zellen mit Immunglobulinen der zu untersuchenden Probanden. Nach weiteren ca. 24 Stunden wurden die Zellen mit Coelenterazine H geladen und die luminometrische Messung wurde unter automatischer Injektion des mAChR3-Agonisten Carbachol durchgeführt.

3.4.2 Transfektion von CHO-Zellen mit dem mAChR3 Plasmid

Die Transfektion der CHO-Zellen mit dem mAChR3-Plasmid erfolgte mithilfe der Fugene 6 Transfektionsreagenz. Nach dem Passagieren und Auszählen der Zellen (siehe Kapitel 3.1.2. und 3.1.3) wurde ein Teil der übrigen Zellsuspension entnommen und mit Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von 10^5 Zellen/ml verdünnt. Pro 96-Well-Platte wurden zweimal 12 ml dieser verdünnten Zellsuspension hergestellt. Ein 12 ml Zellansatz diente dabei als untransfizierte Kontrolle, die Zellen im zweiten 12 ml Zellansatz wurden nach dem folgenden Schema transfiziert.

Zunächst wurden 560 μL FCS-freies Kulturmedium in ein Reaktionsgefäß gegeben, 36 μL Transfektionsreagenz tropfenweise hinzugegeben (Transfektionsansatz) und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden 20 μL FCS-freies Medium mit 6 μg Plasmid-DNA vermischt und nach Ablauf der fünf Minuten zum Transfektionsansatz hinzupipettiert. Nun folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur, woraufhin der Transfektionsansatz zu dem zu transfizierenden Zellansatz gegeben und dieser bei Raumtemperatur für eine

Stunde unter langsamem Schütteln bei 30 rpm inkubiert wurde. Die gleiche einstündige Inkubation erfolgte parallel mit dem nicht zu transfizierenden Zellansatz.

Anschließend wurden die Zellen auf eine Nunc MicroWell 96-Well-Mikrotiterplatte aufpipettiert. Hierbei wurden pro Platte acht Wells zur Kontrolle mit untransfizierten Zellen befüllt, die restlichen Wells mit transfizierten Zellen. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.4.3 Transfektion von TFK-1-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid

Die Transfektion der TFK-1-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid erfolgte analog der Vorgehensweise in Kapitel 3.4.2.

3.4.4 Optimierung der Transfektion von HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid

Die in Kapitel 3.4.2 beschriebene Transfektionsmethode stellte sich bei der HEP-G2-Zelllinie als wenig effektiv heraus. Die gemessenen Lumineszenzwerte im funktionellen mAchR3-Lumineszenz-Assay lagen im sehr niedrigen Bereich, sodass ein sehr ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis vorlag, welches keine verlässlichen Messungen zuließ

Um die Effektivität der Transfektion bei der HEP-G2-Zelllinie zu verbessern, wurden verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Insbesondere wurde untersucht, ob durch eine Transfektion der Zellen direkt in den Wells der 96-Well-Platte, eine Erhöhung der Ausgangszellzahl und die Verwendung einer anderen Transfektionsreagenz höhere Lumineszenzwerte erreicht werden können.

Hierfür wurden HEP-G2-Zellen nach dem empfohlenen Protokoll des jeweiligen Herstellers mittels der Transfektionsreagenzien SuperFect, Fugene 6 und Fugene HD einen Tag nach Aussäen auf der 96-Well-Platte transfiziert. Zudem wurden die Verhältnisse von Transfektionsreagenz zu DNA variiert (5:1, 4:1 und

3:1 für Superfect, 5,5:1, 4,5:1 und 3,5:1 für Fugene® 6 und Fugene® HD; Verhältnisse jeweils in μL Transfektionsreagenz : μg DNA). Des Weiteren wurden die Transfektionen jeweils mit einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^4$ Zellen/Well und $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well durchgeführt. Der Transfektionserfolg wurde anhand der gemessenen Lumineszenz der transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen im funktionellen mAChR3-Lumineszenz-Assay beurteilt.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Messungen wurde die Transfektion auf der 96-Well-Platte mit Fugene 6 als potentiell effektivere Transfektionsmethode identifiziert. Wie im Herstellerprotokoll vorgesehen fand die Transfektion hierbei erst einen Tag nach dem Aussäen der Zellen auf der 96-Well-Platte statt. Im Vergleich zur bisherigen in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode verblieben die Zellen daher bei der neuen Methode vor der Messung einen Tag länger im Well. Es sollte daher nun ausgeschlossen werden, dass der Unterschied in den gemessenen Lumineszenzwerten allein auf einer höheren Zelldichte in den Wells zum Messzeitpunkt beruht.

Hierfür wurde die neue Transfektionsmethode nochmals im funktionellen mAChR3-Lumineszenz-Assay direkt mit der bisher angewendeten Methode verglichen, wobei die Zellen nun bei der bisherigen Methode ebenfalls einen Tag länger auf der Platte belassen wurden. Bei beiden Methoden wurden in diesem Test die Zahl der ausgesäten Zellen sowie das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA wie oben beschrieben variiert.

Zusätzlich zum reinen Test der Transfektionseffizienz wurde für jede Kombination ein weiterer Test mit Immunglobulinen eines Patienten durchgeführt, die bei vorherigen Untersuchungen als den mAChR3 inhibierend eingestuft worden waren.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche (siehe Kapitel 4.1.1) wurde für die Messungen mit HEP-G2-Zellen die in Kapitel 3.4.5 beschriebene Transfektionsmethode ausgewählt.

3.4.5 Transfektion von HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid

Die Transfektion der HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aeqourin Plasmid erfolgte mithilfe der Fugene 6 Transfektionsreagenz. Nach dem Passagieren und Auszählen der Zellen (siehe Kapitel 3.1.2. und 3.1.3) wurde ein Teil der übrigen Zellsuspension entnommen und mit Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Je 100 μL dieser Zellsuspension wurden in die Wells einer Nunc MicroWell 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und diese dann für etwa 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert.

Am Folgetag wurde die Transfektion durchgeführt. Hierfür wurde für jede zu transfizierende 96-Well-Platte ein Transfektionsansatz mit einem Fugene 6:DNA-Verhältnis von 3,5:1 angesetzt, indem zu 553,8 μL serumfreiem Medium 46,2 μL Fugene 6 tropfenweise hinzupipettiert wurden. Der Transfektionsansatz wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 13,2 μg DNA hinzugemischt und der Ansatz erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In jedes Well wurden anschließend 5 μL dieses Transfektionsansatzes gegeben, lediglich die Wells in der ersten Spalte wurden hierbei ausgespart, um eine Kontrollgruppe mit nicht transfizierten Zellen zu erhalten. Die 96-Well-Platte wurde kurz an zentrifugiert und dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Danach erfolgte die Reinkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.4.6 Inkubation der Zellen mit Immunglobulinen aus Patientenseren

Die mittels Ammoniumsulfatfällung aus Patientenseren gewonnenen Immunglobuline wurden 1:10 mit HBSS verdünnt und ca. 24 Stunden nach Transfektion zu den transfizierten Zellen hinzugegeben. Je zu testendem Serum wurden 10 μL /Well in vier Wells gegeben, von denen sich jeweils alle vier entweder auf der unteren oder der oberen Plattenhälfte befanden. Zusätzlich zu den acht Wells mit untransfizierten Zellen in der ersten Spalte der

96-Well-Platte wurden als weitere Kontrollgruppe und als Bezugspunkt für die spätere Auswertung acht Wells der transfizierten Zellen nicht mit Immunglobulinen, sondern lediglich mit je 10 μL HBSS behandelt. Von diesen Kontrollwells befanden sich vier auf der oberen und vier auf der unteren Plattenhälfte. So konnte die Auswertung der oberen und unteren Plattenhälfte unabhängig voneinander erfolgen und so Ergebnisverfälschungen durch eventuell nicht exakt identisch kalibrierte Sensoren ausgeschlossen werden (siehe auch unter Kapitel 3.4.8).

Die Inkubation der Zellen mit den Immunglobulinen erfolgte erneut für etwa 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.4.7 Inkubation der Zellen mit Atropin

Um bessere Aussagen über die Validität des funktionellen Lumineszenz-Assays mit den verschiedenen Zelllinien treffen zu können, wurden für jede Zellreihe auch Messungen ohne Immunglobuline durchgeführt, bei denen die Zellen stattdessen ab 15 Minuten vor Durchführung der Lumineszenzmessung mit dem mAChR3-Antagonisten Atropin inkubiert wurden. Verwendet wurden pro Well 10 μL einer Atropinlösung in absteigenden Konzentrationen zwischen 10 mg/ml und 19ng/ml.

3.4.8 Coelenterazine-Behandlung und luminometrische Messung

Nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Immunglobulinen wurden diese für die luminometrische Messung vorbereitet. Ab diesem Schritt erfolgten die Arbeiten unter nicht sterilen Bedingungen. Zunächst wurde der flüssige Überstand aus den Platten vorsichtig in ein Einweg-Papiertuch ausgeklopft.

In einem abgedunkelten Raum wurde Coelenterazine H auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ in kalziumfreiem HBSS verdünnt und hiervon 50 μL pro Well auf die 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde lichtgeschützt in den Brutschrank transferiert und dort für eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss wurde die Platte erneut vorsichtig ausgeklopft. Es wurden pro Well 100 μL HBSS mit 2 mM CaCl_2 hinzugegeben und es erfolgte eine erneute einstündige Inkubation.

Für die Lumineszenzmessung wurde Carbachol in HBSS mit 2 mM CaCl_2 auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ verdünnt. Die Messung erfolgte im MicroBeta 2 LumiJet Luminometer. Nach Einlegen der Platte in das Gerät wurde eine Wartezeit von 3 Minuten eingehalten. Während der dann folgenden Messung wurden 30 μL der verdünnten Carbachollösung in das jeweilige Well injiziert, die Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 20 Sekunden gemessen und integriert.

Die Messung erfolgte mit zwei Sensoren, von denen einer die obere und einer die untere Plattenhälfte erfasste. Um Ergebnisverfälschungen durch Messunterschiede der Sensoren untereinander auszuschließen, wurden obere und untere Plattenhälfte unabhängig voneinander ausgewertet. Die Messungen erfolgten jeweils als Vierfachmessung.

3.5 ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay

3.5.1 Testprinzip

Mit dem ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay sollte der Einfluss der Antikörper aus den Seren der PBC-Patienten auf die Zellproliferation der drei verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst transfiziert (nur CHO-Zellen) und auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Inkubation mit den Immunglobulinen, am dritten Tag die Thymidinmarkierung und am vierten Tag die Messung im Beta-Counter.

Das Verfahren beruht darauf, dass das am dritten Tag hinzugegebene radioaktive ^3H Thymidin bei mitotischen Zellteilungen in die neu entstehenden DNA-Stränge eingebaut wird und so über die szintillatorische Messung der Radioaktivität der Zellen des jeweiligen Wells das Ausmaß der stattgefundenen Zellproliferation quantifiziert werden kann.

3.5.2 Transfektion und Aussäen der Zellen

Die CHO-Zellen wurden analog der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methode mit dem mAChR3-Plasmid transfiziert, bei den TFK-1- und HEP-G2-Zellen erfolgte keine Transfektion. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen in 100 μL Medium pro Well ausgesät. Anschließend erfolgte eine Inkubation für etwa 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.5.3 Inkubation der Zellen mit Immunglobulinen aus Patientenseren

Die Inkubation der Zellen mit Immunglobulinen erfolgte analog der in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Methode etwa 24 Stunden nach dem Aufbringen der Zellen auf die 96-Well-Platte. Die gesamte Inkubationszeit mit den Immunglobulinen betrug im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay etwa 40 Stunden.

3.5.4 Inkubation der Zellen mit Atropin und Carbachol

Um bessere Aussagen über die Validität des ^3H -Thymidin-Proliferations-Assays treffen zu können, wurden für jede Zelllinie auch Messungen ohne Immunglobuline durchgeführt, bei denen die Zellen stattdessen für den gleichen Zeitraum mit dem mAChR3-Antagonisten Atropin bzw. mit dem mAChR3-Agonisten Carbachol inkubiert wurden.

Verwendet wurden pro Well 10 μL einer Atropinlösung in absteigenden Konzentrationen zwischen 10 mg/ml und 0,31 mg/ml sowie 10 μL einer Carbachollösung in absteigenden Konzentrationen zwischen 20 mmol/L und 0,63 mmol/L.

3.5.5 ^3H Thymidin-Markierung und Messung

Etwa 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit den Immunglobulinen bzw. mit Atropin oder Carbachol erfolgte die Markierung mit ^3H Thymidin. Unter entsprechenden Schutzmaßnahmen wurden in jedes Well 20 μL einer ^3H Thymidin-Lösung (14,8 kBq) gegeben. Nach 16-stündiger Inkubation mit dem

markierten Thymidin wurden die Platten auf ein Einweg-Papiertuch ausgeklopft und zweimal mit 50 μ L Wasser pro Well gewaschen.

Anschließend trockneten die Platten für ca. 5 Stunden bei Raumtemperatur, bevor 25 μ L Szintillationsflüssigkeit pro Well hinzugegeben wurden und die Messung der CPM (Counts per Minute) im MicroBeta 2 LumiJet durchgeführt wurde.

3.6. Statistik

Sowohl im mAChR3-Lumineszenz-Assay, als auch im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay wurden alle Messungen als Vierfach-Test durchgeführt, d.h. jeweils vier Wells der 96-Well-Platte wurden mit der gleichen Immunglobulinlösung behandelt und das Ergebnis auf eine Kontrollgruppe von vier Wells bezogen, die mit reinem HBSS behandelt wurden.

Mit dem Dean-Dixon Ausreißertest wurden innerhalb der Vierergruppen Ausreißer bei einem Signifikanzniveau von 0,05 identifiziert und von der Auswertung ausgeschlossen. Anschließend wurde aus den Messwerten jeweils der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der Messwerte der Kontrollgruppe bezogen.

Immunglobuline, deren zugehörige Messwerte einen Mittelwert von $< 70\%$ des Kontrollgruppenmittelwertes aufwiesen, wurden im entsprechenden Assay als inhibierend bewertet, Immunglobuline, deren zugehörige Messwerte einen Mittelwert von $> 130\%$ des Kontrollgruppenmittelwertes aufwiesen, als aktivierend.

Veränderungen der funktionellen Rezeptoraktivität und der Proliferationsraten im Verlauf in den jeweiligen Patientengruppen wurden mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Signifikanz geprüft. P-Werte $< .05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Zur Überprüfung, ob die mAChR3-Aktivität bei der jeweiligen Zelllinie mit der Proliferationsrate korreliert, wurde die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman verwendet. Auch hier wurden p-Werte $< .05$ als statistisch signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur Optimierung und Validierung des mAChR3-Lumineszenz-Assays

4.1.1 Optimierung der Transfektion von HEP-G2-Zellen

Die Transfektion von CHO- und TFK-1-Zellen wurde durchgeführt wie in der Literatur beschrieben (Preuss et al. 2014b). Diese Methode erwies sich aber für die Transfektion von HEP-G2-Zellen mit dem pG5A GFP/Aequorin Plasmid als wenig effektiv. Kontrollmessungen mit nicht mit Immunglobulinen behandelten, transfizierten HEP-G2-Zellen erreichten nur geringfügig höhere Lumineszenzwerte als Messungen mit untransfizierten Zellen.

Zur Optimierung wurde daher eine Transfektion der HEP-G2-Zellen erst nach dem Aussähen auf die 96-Well-Platte direkt in den Wells getestet. Hierbei wurden verschiedene Transfektionsreagenzien, Transfektionsreagenz:DNA-Verhältnisse und Anfangszellzahlen evaluiert. Die höchsten RLU-Werte wurden erreicht bei der Transfektion mit Fugene 6, einem Fugene 6:DNA-Verhältnis von 3,5:1 und einer Ausgangszellzahl von $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well (Abbildung 1).

In einem weiteren Testdurchlauf mit Fugene 6 erreichte erneut die oben genannte Kombination an Parametern die höchsten RLU-Werte. Immunglobuline aus einem Patientenserum, die in vorherigen Untersuchungen als den mAChR3 inhibierend beschrieben worden waren, zeigten bei der Messung mit in den Wells mit Fugene 6 transfizierten HEP-G2-Zellen in allen Kombinationen ebenfalls eine hemmende Wirkung mit Ausnahme der Kombination aus einem Fugene 6:DNA-Verhältnis 4.5:1 und $2 \cdot 10^4$ ausgesäten Zellen pro Well.

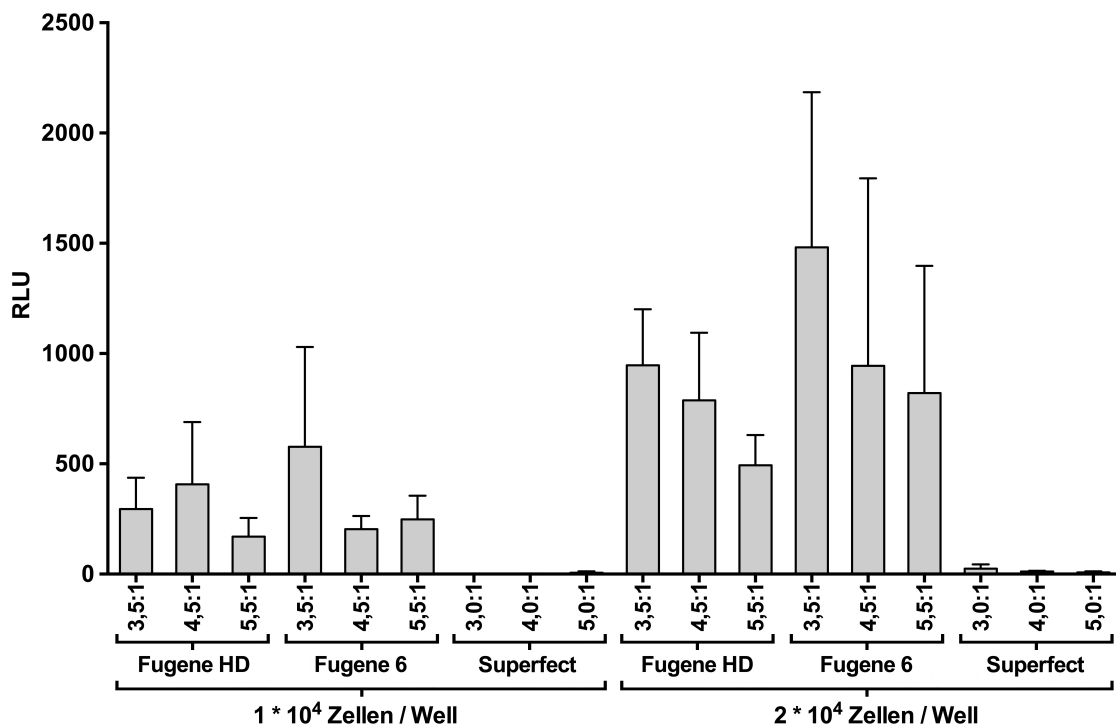


Abbildung 1: Gemessene Lumineszenzwerte im mAChR3-Lumineszenz-Assay nach Transfektion von HEP-G2 Zellen direkt in den Wells der 96-Well-Platte in relativen Lumineszenz-Einheiten (RLU) unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien, Transfektionsreagenz:DNA-Verhältnisse und Ausgangszellzahlen. Die höchsten RLU-Werte zeigen sich bei der Transfektion mit Fugene 6, einem Fugene 6:DNA-Verhältnis von 3,5:1 und einer Ausgangszellzahl von $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well.

Ein Testdurchlauf mit Transfektion der HEP-G2-Zellen mit Fugene 6 vor Aussäen auf die 96-Well-Platte, bei dem das Fugene 6:DNA-Verhältnis und die Zellzahl in gleicher Weise variiert wurden, erbrachte in allen Kombinationen RLU-Werte < 100.

Die direkt in den Wells der 96-Well-Platte transfizierten Zellen lieferten somit konstant eine deutlich höhere Lumineszenzausbeute als die bereits vor dem Aufbringen auf die Platte transfizierten Zellen, sodass von einem wesentlich besseren Transfektionserfolg auszugehen ist. Für weitere Testreihen wurden daher die HEP-G2-Zellen wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben direkt in den Wells der 96-Well-Platte transfiziert.

4.1.2 Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität bei Verwendung verschiedener Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay

Bei Verwendung der den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen zeigte sich - wie bereits vorbeschrieben (Preuss et al. 2014b) – im mAChR3-Lumineszenz-Assay eine deutliche konzentrationsabhängige Signalverminderung durch Inkubation mit Atropin für 15 Minuten (Abbildung 2).

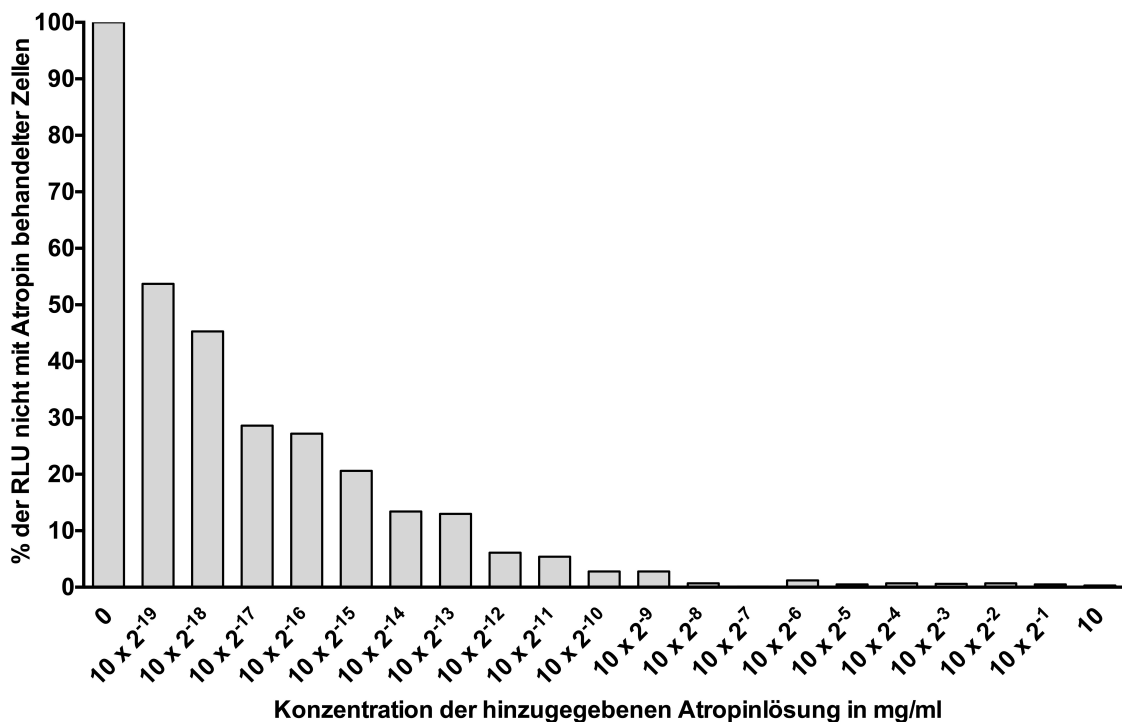


Abbildung 2: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 μ L einer Atropinlösung der jeweils angegebenen Konzentration inkubiert.

Auch bei Verwendung der den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen war durch Zugabe von Atropin eine Hemmung der Rezeptoraktivität zu verzeichnen, die aber stark schwankte, deutlich geringer als bei den CHO-Zellen ausfiel und nicht konzentrationsabhängig war (Abbildung 3).

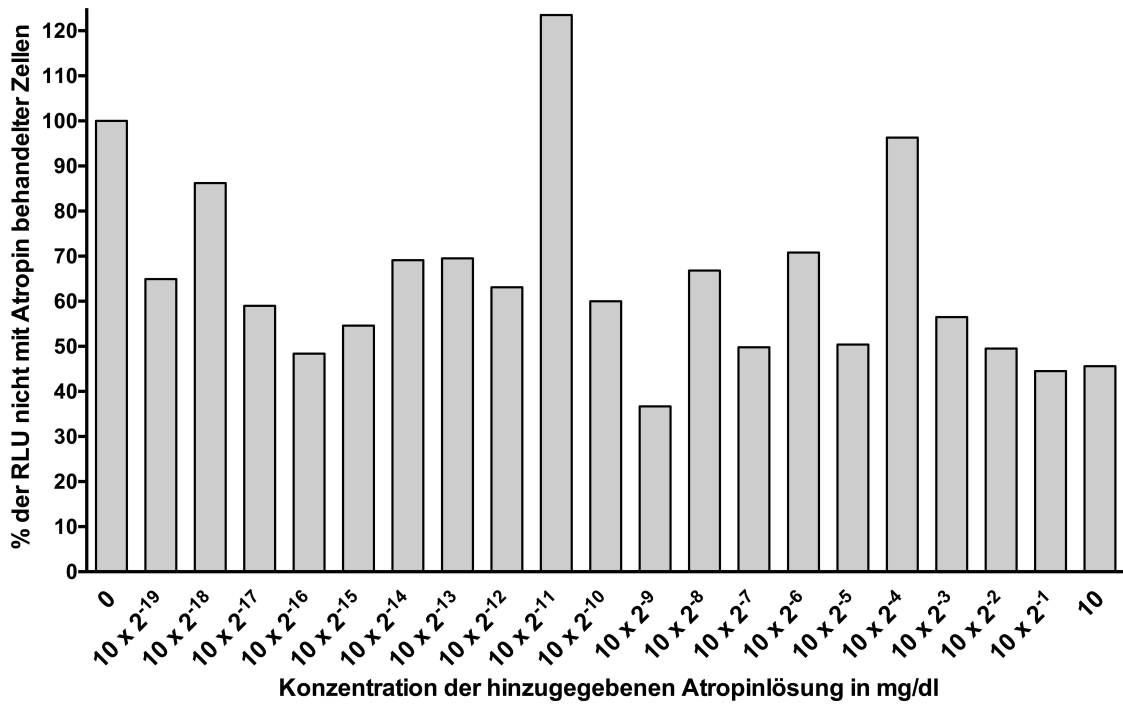


Abbildung 3: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 μ L einer Atropinlösung der jeweils angegebenen Konzentration inkubiert.

Bei Verwendung der den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen war ab einer Konzentration der hinzugegebenen Atropinlösung von 10×2^{-10} mg/ml konstant eine Hemmung der Rezeptoraktivität auf unter 70% des Wertes der nicht mit Atropin behandelten Zellen zu beobachten (Abbildung 4).

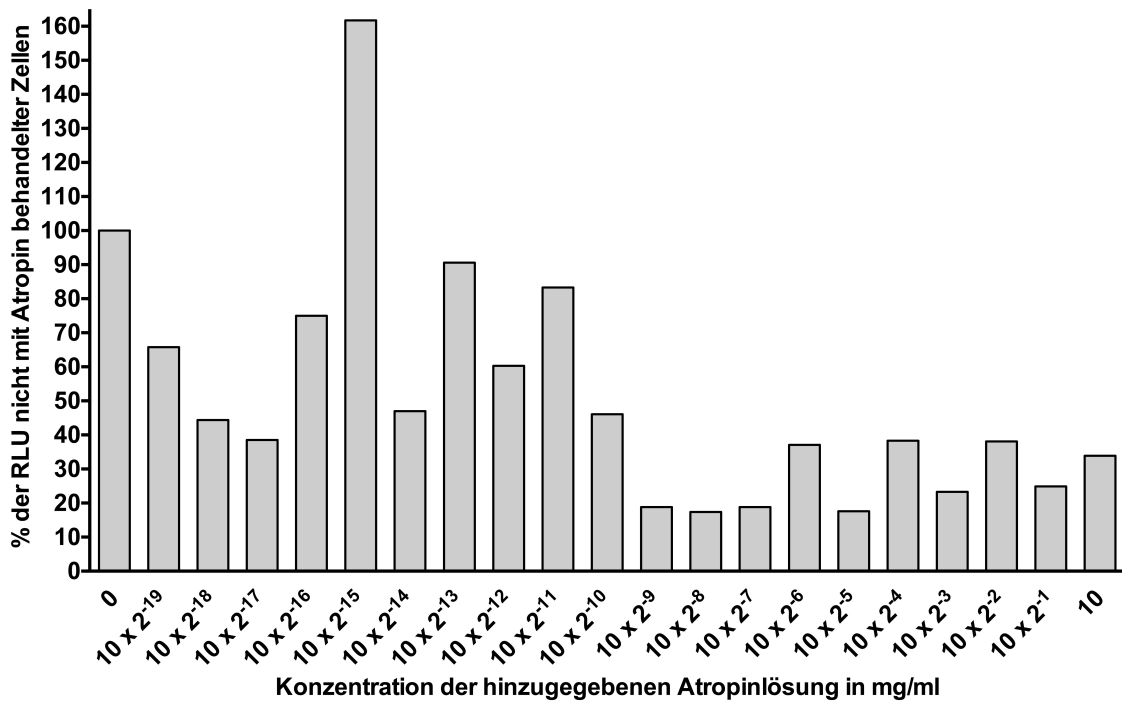


Abbildung 4: Einfluss von Atropin auf die mAChR3-Aktivität, gemessen an nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 µL einer Atropinlösung der jeweils angegebenen Konzentration inkubiert.

4.2 Einfluss von Immunglobulinen aus Seren von PBC-Patienten auf die Aktivität des mAChR3 auf verschiedenen Zelllinien, gemessen im mAChR3-Lumineszenz-Assay

4.2.1 Häufigkeit inhibierender und stimulierender Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie

In den 38 vor Therapiebeginn bzw. zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abgenommenen Serumproben bzw. den daraus isolierten Immunglobulinfraktionen fanden sich unter Verwendung von TFK-1- und HEP-G2-Zellen in erster Linie inhibierende Anti-mAChR3-Antikörper (63-84% der Patienten). Der mAChR3 auf den CHO-Zellen wurde dagegen trotz

Überexpression des Rezeptors nur durch 26% der Immunglobulinfraktionen gehemmt (Tabelle 7):

Tabelle 7: Einfluss von Immunglobulinen von 38 untherapierten PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen im mAChR3-Lumineszenz-Assay mit verschiedenen Zelllinien.

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen	Konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen	Nur gering exprimierende HEP-G2-Zellen
	Anzahl (%)		
Inhibition	10 (26)	32 (84)	24 (63)
Stimulation	4 (11)	2 (5)	1 (3)
Kein Effekt	24 (63)	4 (11)	13 (34)

4.2.2 Verlauf der inhibierenden und stimulierenden Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie

4.2.2.1 Verlauf der funktionellen Anti-mAChR3-Antikörper bei vier Patienten, die im Verlauf keine Therapie erhielten

Messung mit CHO-Zellen

Unter Einfluss der Immunglobuline aus den Seren der Patienten, die im Verlauf keine spezifische Therapie erhielten (n = 4), nahm die mediane mAChR3-Rezeptoraktivität im Lumineszenzassay unter Verwendung der den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen von bei Diagnosestellung 66,0% auf im

Verlauf (9-177 Monate, Median 103 Monate) 30,2% der Rezeptoraktivität transfizierter, aber nicht mit Immunglobulinen behandelter Zellen ab. Bei kleiner Stichprobengröße von lediglich 4 Patienten war diese Veränderung statistisch nicht signifikant.

Drei Patienten wiesen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose inhibierende Anti-mAChR3-Antikörper auf. Unter Einfluss der Immunglobuline des vierten Patienten lag die mAChR3-Aktivität bei Diagnosestellung noch knapp im Normbereich (71,2% Rezeptoraktivität), im weiteren Verlauf entwickelte auch dieser Patient inhibierende Antikörper (Tabelle 8). Abbildung 5 illustriert die Verläufe der mAChR3-Rezeptoraktivität der einzelnen Patienten sowie den Verlauf der medianen mAChR3-Rezeptoraktivität.

Tabelle 8: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	3 (75)	4 (100)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	1 (25)	0

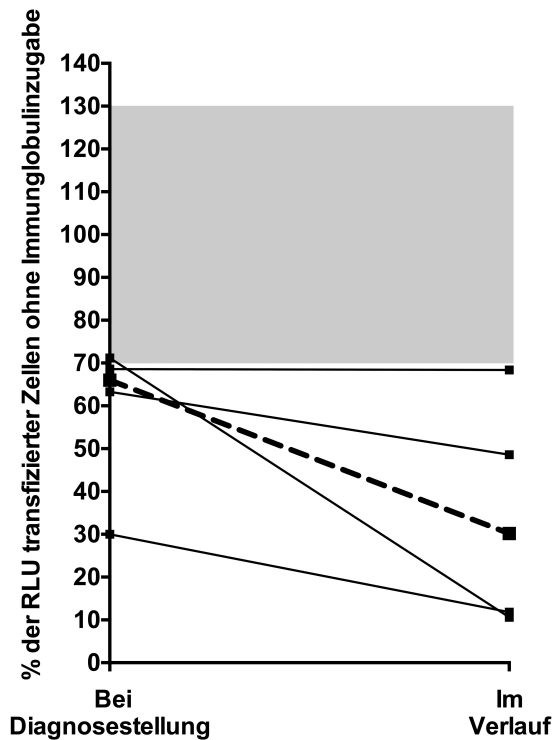


Abbildung 5: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit TFK-1-Zellen

Bei Verwendung der den Rezeptor konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der medianen mAChR3-Rezeptoraktivität von bei Diagnosestellung 33,2% auf im Verlauf (9-177 Monate, Median 103 Monate) 46,1% der Rezeptoraktivität transfizierter, aber nicht mit Immunglobulinen behandelter Zellen.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wiesen bei Messung mit den TFK-1-Zellen drei der vier im Verlauf nicht therapierten Patienten inhibierende Antikörper gegen den mAChR3 auf. Bei einem dieser Patienten wurden diese Antikörper im weiteren Verlauf negativ (Abbildung 6; Tabelle 9). Bei dem Patienten, der in

dieser Messung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Anti-mAChR3-Antikörper aufwies, handelt es sich nicht um den gleichen Patienten, der bei der Messung mit CHO-Zellen bei Diagnosestellung keine solchen Antikörper aufwies.

Tabelle 9: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	3 (75)	2 (50)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	1 (25)	2 (50)

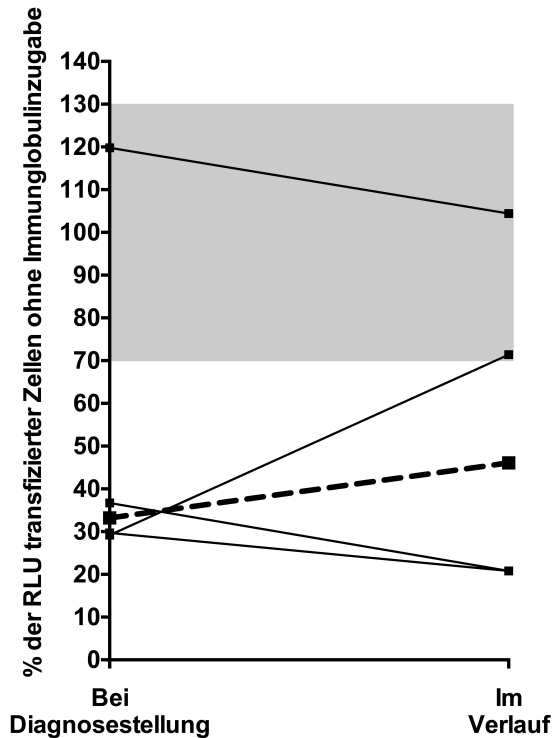


Abbildung 6: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der HEP-G2-Zellen stieg die mediane mAChR3-Rezeptoraktivität von 64,3% bei Diagnosestellung auf in der Verlaufsmessung (9-177 Monate, Median 103 Monate) 75,4% der Rezeptoraktivität transfizierter, nicht mit Immunglobulinen behandelter Zellen leicht an. Die Veränderung war nicht signifikant.

Bei Diagnosestellung inhibierten die Immunglobuline von einem Patienten den mAChR3. Im weiteren Verlauf entwickelte ein weiterer Patient inhibitorische Anti-mAChR3-Antikörper (Abbildung 7; Tabelle 10).

Tabelle 10: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	1 (25)	2 (50)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	3 (75)	2 (50)

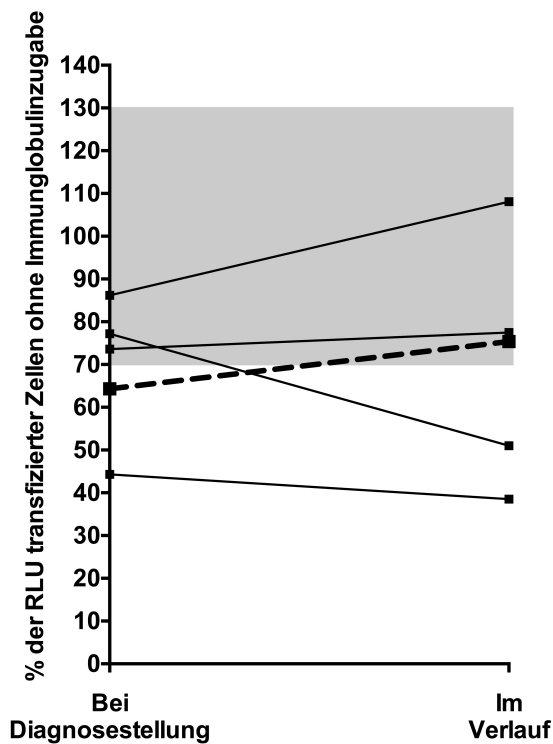


Abbildung 7: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.2.2.2 Verlauf der funktionellen Anti-mAChR3-Antikörper bei 18 Patienten, die mit UDCS behandelt wurden

Messung mit CHO-Zellen

Bei Analyse des Einflusses der Immunglobuline der 18 mit UDCS behandelten Patienten auf die Rezeptoraktivität des mAChR3 auf CHO-Zellen ergab sich unter Therapie (12-206 Monate, Median 121 Monate) keine signifikante Veränderung der medianen Rezeptoraktivität (vor Therapiebeginn 86,1%, während der Therapie 92,8% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen).

Zwei der Patienten wiesen vor Therapiebeginn den mAChR3 inhibierende und zwei der Patienten den mAChR3 aktivierende Antikörper auf. Bei der Verlaufsmessung unter UDCS-Therapie wurden die aktivierenden Antikörper bei beiden Patienten negativ, ein Patient entwickelte neu inhibierende Antikörper und ein Patient entwickelte neu aktivierende Antikörper (Abbildung 8; Tabelle 11).

Tabelle 11: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	2 (11)	3 (17)
Stimulation	2 (11)	1 (6)
Kein Effekt	14 (78)	14 (78)

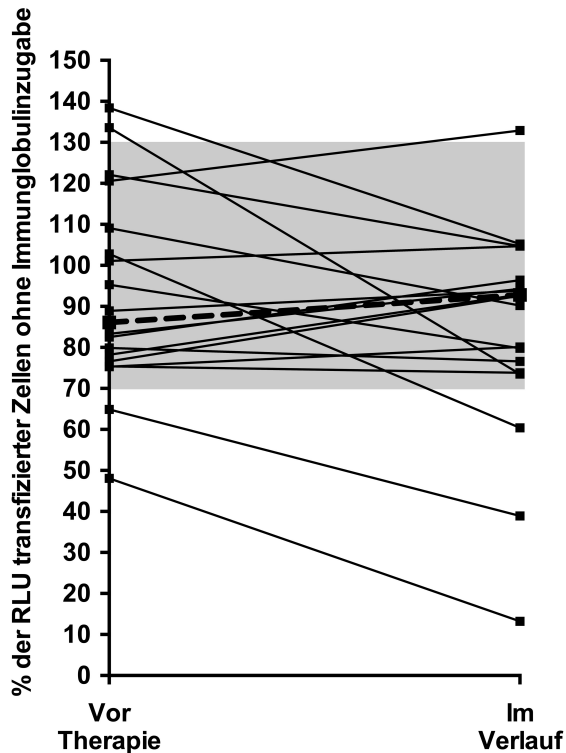


Abbildung 8: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit TFK-1-Zellen

Unter Verwendung der den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen blieb der Effekt der Immunglobuline der 18 mit UDCS behandelten Patienten auf die Rezeptoraktivität bei einem Medianwert von vor Therapiebeginn 37,4% und im Verlauf (12-206 Monate, Median 121 Monate) 36,6% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen nahezu konstant.

Vor Therapiebeginn wiesen alle Patienten den mAChR3 inhibierende Antikörper auf, im Verlauf wurden die Antikörper bei vier Patienten negativ (Abbildung 9; Tabelle 12).

Tabelle 12: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	18 (100)	14 (78)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	0	4 (22)

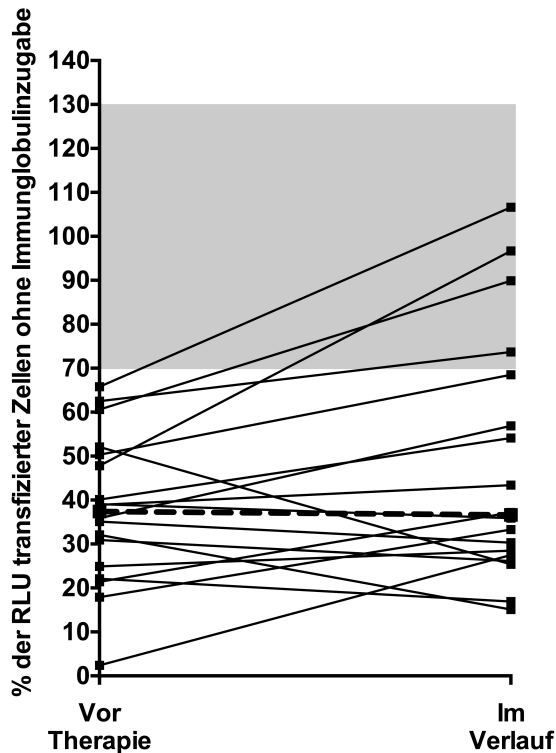


Abbildung 9: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der den Rezeptor nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen blieb der Einfluss der Immunglobuline der 18 mit UDCS behandelten Patienten auf die mediane mAChR3-Rezeptoraktivität im Verlauf nahezu konstant (bei Diagnosestellung 53,6%, in der Verlaufsmessung [12-206 Monate, Median 121 Monate] 53,3% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen).

Vor Therapiebeginn wie auch im Verlauf wiesen jeweils 13 Patienten den mAChR3 inhibierende Antikörper auf, wobei die inhibierenden Antikörper im Verlauf bei zwei Patienten negativ und bei zwei Patienten neu positiv wurden.

Den mAChR3 aktivierende Antikörper wurden nicht beobachtet (Abbildung 10; Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	13 (72)	13 (72)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	5 (28)	5 (28)

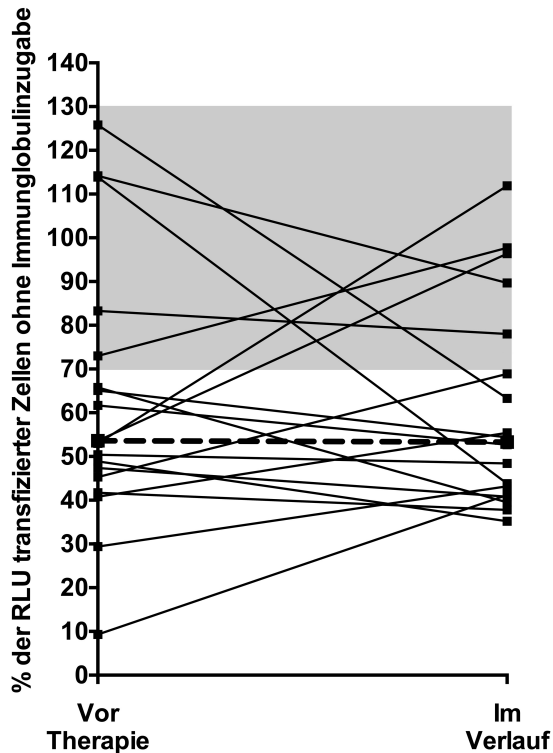


Abbildung 10: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.2.2.3 Verlauf der funktionellen Anti-mAChR3-Antikörper bei 16 Patienten, die immunsuppressiv behandelt wurden

Messung mit CHO-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline der 16 immunsuppressiv behandelten PBC-Patienten nahm im Lumineszenz-Assay mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen die mediane Rezeptoraktivität im Verlauf signifikant ab ($p < .05$). Vor Therapiebeginn wurde eine mediane Rezeptoraktivität von 93,8%, während der Therapie [11-213 Monate, Median

107,5 Monate] eine mediane Rezeptoraktivität von 73,5% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen gemessen.

Die Anzahl an Patienten mit den mAChR3 inhibierenden Antikörpern nahm von 5 Patienten (31%) vor Therapie auf 8 Patienten (50%) im Verlauf zu. Die Anzahl an Patienten mit den mAChR3 stimulierenden Antikörpern blieb konstant bei 2 (13%) (Abbildung 11; Tabelle 14).

Tabelle 14: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	5 (31)	8 (50)
Stimulation	2 (13)	2 (13)
Kein Effekt	9 (56)	6 (36)

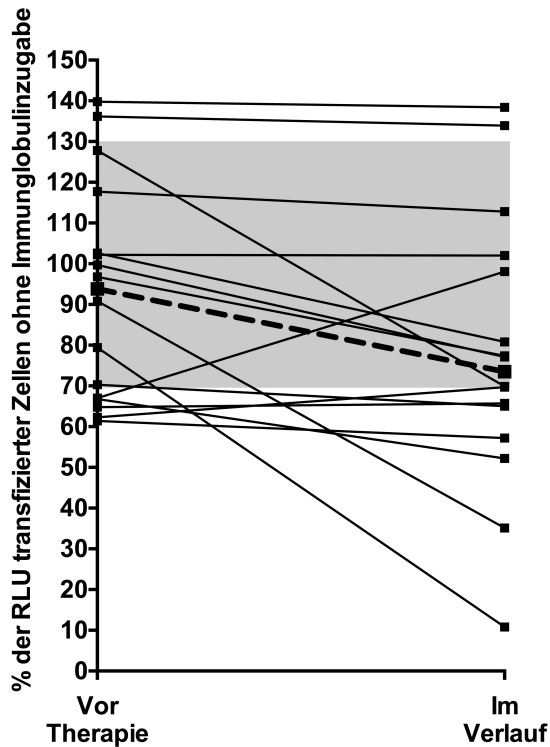


Abbildung 11: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der medianen Rezeptoraktivität im Verlauf ($p < .05$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich.

Messung mit TFK-1-Zellen

Unter Verwendung der den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen nahm unter dem Einfluss der Immunglobuline von 16 immunsuppressiv behandelten PBC-Patienten die mediane Rezeptoraktivität von 40,9% vor Therapiebeginn auf während der Therapie (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) 55,5% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen leicht zu. Diese Veränderung war statistisch nicht signifikant.

Die Anzahl an Patienten mit den mAChR3 inhibierenden Antikörpern (11) änderte sich im Verlauf insgesamt nicht. Bei drei Patienten wurden die inhibierenden Antikörper im Verlauf negativ, jedoch entwickelten drei andere Patienten im Verlauf neu inhibierende Antikörper. Zwei Patienten wiesen vor Therapiebeginn den mAChR3 aktivierende Antikörper auf, bei beiden Patienten wurden diese im Verlauf negativ, wobei einer dieser Patienten dann im Verlauf inhibierende Antikörper aufwies (Abbildung 12; Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	11 (69)	11 (69)
Stimulation	2 (13)	0
Kein Effekt	3 (19)	5 (31)

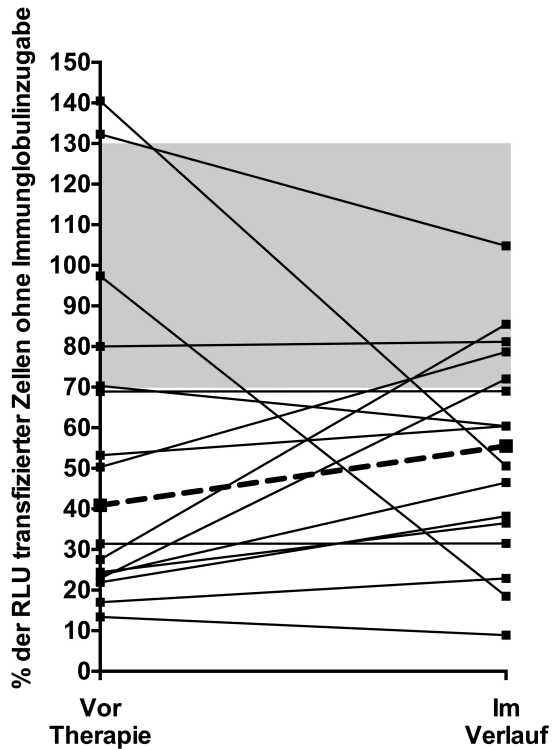


Abbildung 12: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der HEP-G2-Zellen nahm unter dem Einfluss der Immunglobuline der 16 immunsuppressiv behandelten PBC-Patienten die mediane Rezeptoraktivität von 45,6% vor Therapiebeginn auf 61,8% während der Therapie (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) zu (bezogen auf den Messwert der transfizierten, nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen). Diese Veränderung war statistisch nicht signifikant.

Vor Therapie wiesen 10 der 16 Patienten den mAChR3 inhibierende Antikörper auf. Im Verlauf wurden die inhibierenden Antikörper bei zwei Patienten negativ, jedoch entwickelten drei weitere Patienten im Verlauf neu inhibierende

Antikörper. Vor Therapiebeginn hatten die Antikörper eines dieser Patienten eine rezeptoraktivierende Aktivität gezeigt (Abbildung 13; Tabelle 16).

Tabelle 16: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität, gemessen mit nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen im Lumineszenz-Assay vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die mAChR3-Aktivität	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	10 (63)	11 (69)
Stimulation	1 (6)	0
Kein Effekt	5 (31)	5 (31)

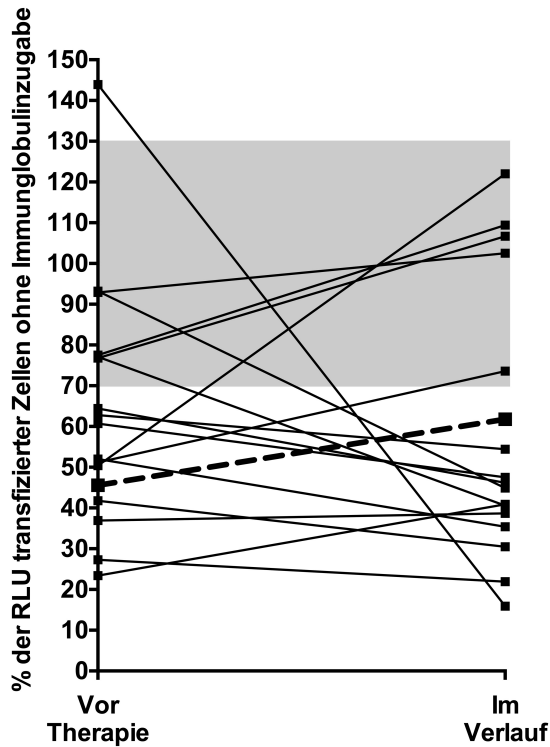


Abbildung 13: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die mAChR3-Aktivität vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen mit den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.2.3 Zusammenfassung der Verläufe funktioneller Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie sowie unter UDCS- bzw. immunsuppressiver Therapie unter Verwendung verschiedener Zelllinien im Lumineszenzassay

In den Abbildungen 14 bis 17 sind die Anti-mAChR3-Reaktivitäten bei Patienten unter verschiedenen Therapieregimen nochmals zusammengefasst.

Eine Inhibition der mAChR3-Aktivität durch Immunglobuline von PBC-Patienten war - wie oben im Einzelnen beschrieben - insbesondere unter Verwendung von TFK-1-Zellen sowie HEP-G2-Zellen zu beobachten. Bei Messung mit den TFK-1-Zellen wiesen vor Therapiebeginn bzw. bei Diagnosestellung insgesamt

32 von 38 Patienten (84%) die mAChR3-Aktivität inhibierende Antikörper auf, im Verlauf noch 27 von 38 (71%). Bei Messung mit HEP-G2 Zellen waren es 24 von 38 (63%) vor Therapiebeginn bzw. bei Diagnosestellung und 26 von 38 (68%) im Verlauf. Bei Messung mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen hingegen konnten vor Therapiebeginn bzw. bei Diagnosestellung nur bei 10 von 38 Patienten (26%) den mAChR3 inhibierende Antikörper festgestellt werden, im Verlauf bei 15 von 38 (39%). Den mAChR3 aktivierende Antikörper wurden insgesamt nur selten beobachtet. Am häufigsten ließen sie sich mit den CHO-Zellen feststellen, bei denen vor Therapie bei 4 Patienten (11%), im Verlauf bei 3 Patienten (8%) solche Antikörper auftraten.

In der mit UDCS und der mit Immunsuppressiva therapierten Gruppe lag bei Messung mit den CHO-Zellen die mediane wie auch die mittlere Rezeptoraktivität insgesamt vor Therapiebeginn und im Verlauf im neutralen Bereich. Lediglich bei den im Verlauf nicht spezifisch therapierten Patienten zeigte sich hier eine inhibierte mediane und mittlere Rezeptoraktivität, die bereits bei Diagnosestellung bestand und im Verlauf tendenziell (jedoch statistisch nicht signifikant) weiter absank.

Jedoch zeigte sich bei Verwendung von CHO-Zellen in der immunsuppressiv therapierten Patientengruppe im Verlauf eine signifikante Abnahme der medianen mAChR3-Aktivität (Abbildung 11). Gleichzeitig nahm in dieser Gruppe die Anzahl der Patienten mit inhibierenden Antikörpern im Verlauf von 31% auf 50% zu (Tabelle 14) und die mittlere mAChR3-Aktivität zeigte eine abnehmende Tendenz (Abbildung 17).

In den übrigen Patientengruppen ließ sich mit keiner Zelllinie im Verlauf eine signifikante Veränderung der medianen mAChR3-Aktivität nachweisen.

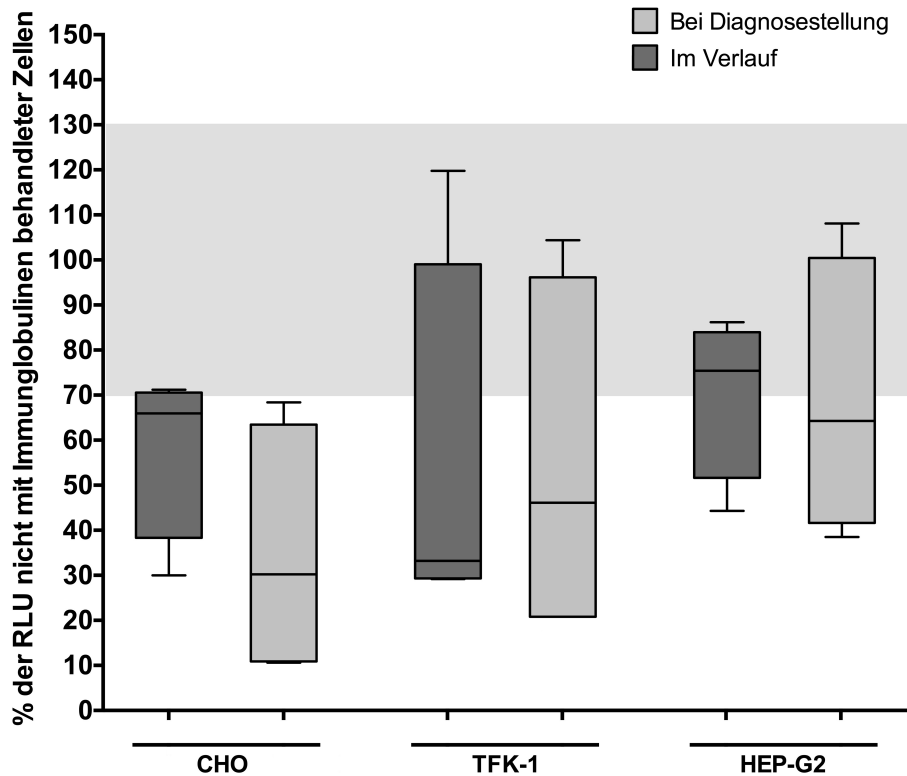


Abbildung 14: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von nicht spezifisch behandelten Patienten (n = 4) bei Diagnosestellung und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay. CHO: den mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: den mAChR3 konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: den mAChR3 nur geringfügig exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich.

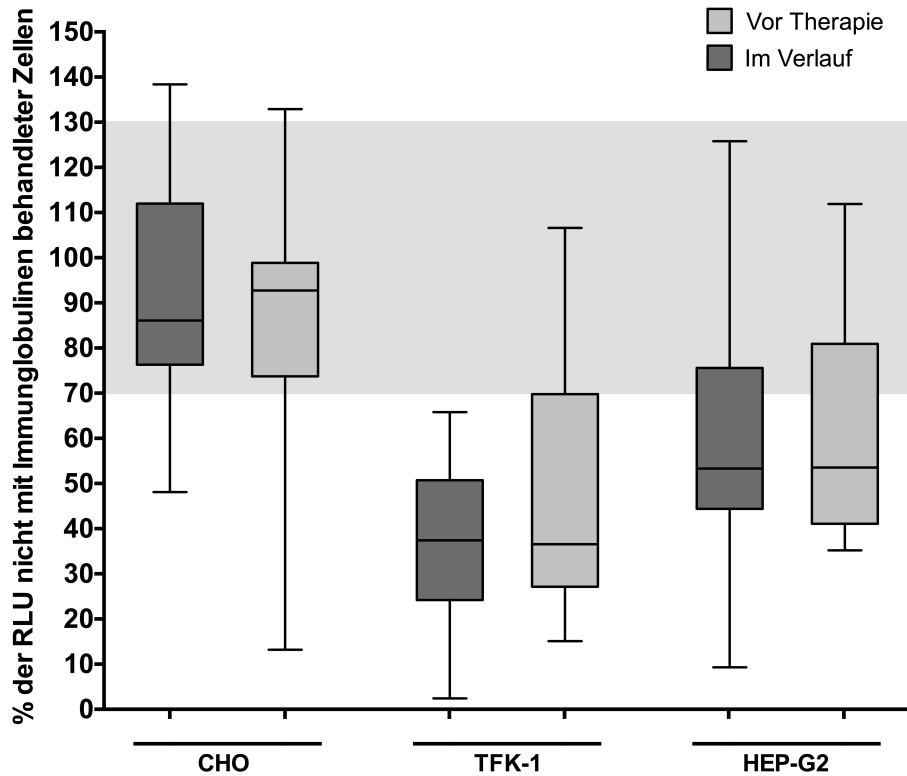


Abbildung 15: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von mit UDCS behandelten Patienten (n = 18) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay. CHO: den mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: den mAChR3 konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: den mAChR3 nur geringfügig exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich.

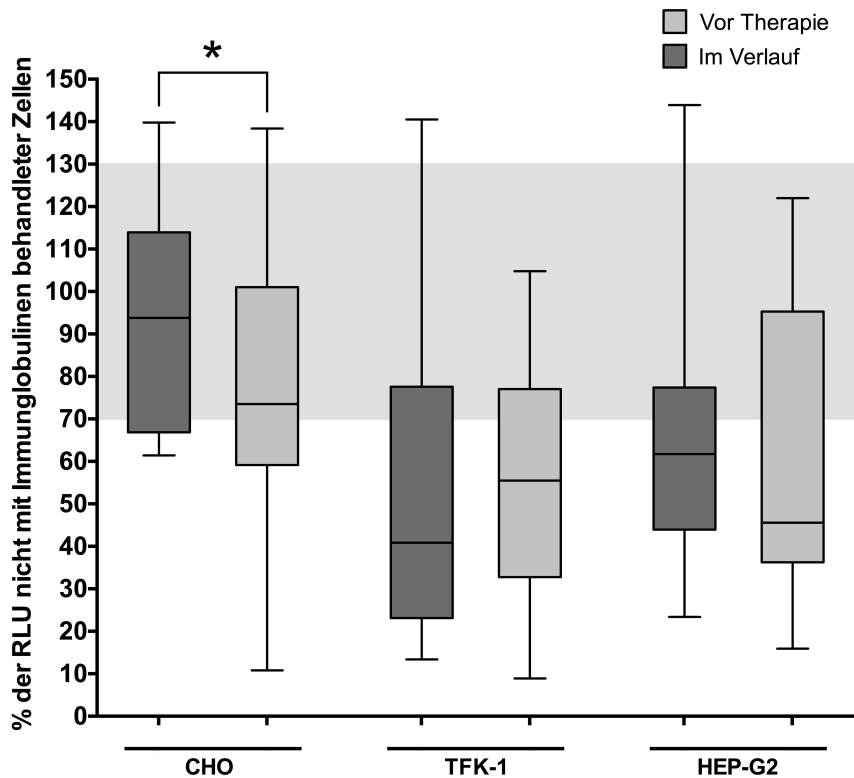


Abbildung 16: mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von immunsuppressiv behandelten Patienten (n = 16) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen mit verschiedenen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay. CHO: den mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: den mAChR3 konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: den mAChR3 nur geringfügig exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich; * $p < .05$ (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

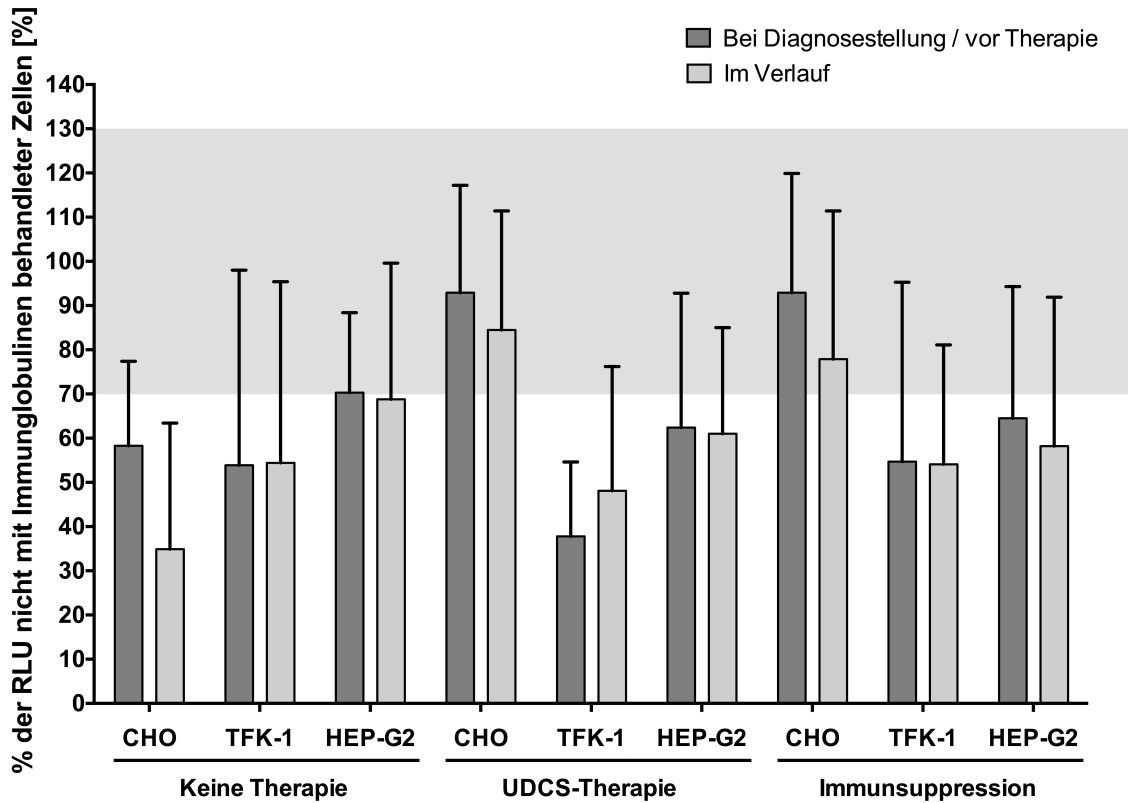


Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der mAChR3-Aktivität unter Einfluss der Immunglobuline von Patienten in verschiedenen Therapiegruppen, gemessen mit unterschiedlichen Zelllinien im mAChR3-Lumineszenz-Assay jeweils vor Therapiebeginn bzw. bei Erstdiagnose und im Verlauf. CHO: den mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: den mAChR3 konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: den mAChR3 nur geringfügig exprimierende HEP-G2-Zellen; grau hinterlegt: Normbereich.

4.3. Untersuchungen zur Validierung des ^3H -Thymidin-Proliferations-Assays

4.3.1 Einfluss von Atropin und Carbachol auf die Proliferation verschiedener Zelllinien im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay

Die Inkubation der Zellen mit Carbachol hatte im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay bei keiner der drei Zelllinien einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation (nicht dargestellt).

Der Einfluss von Atropin auf die Proliferation der verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 18 dargestellt.

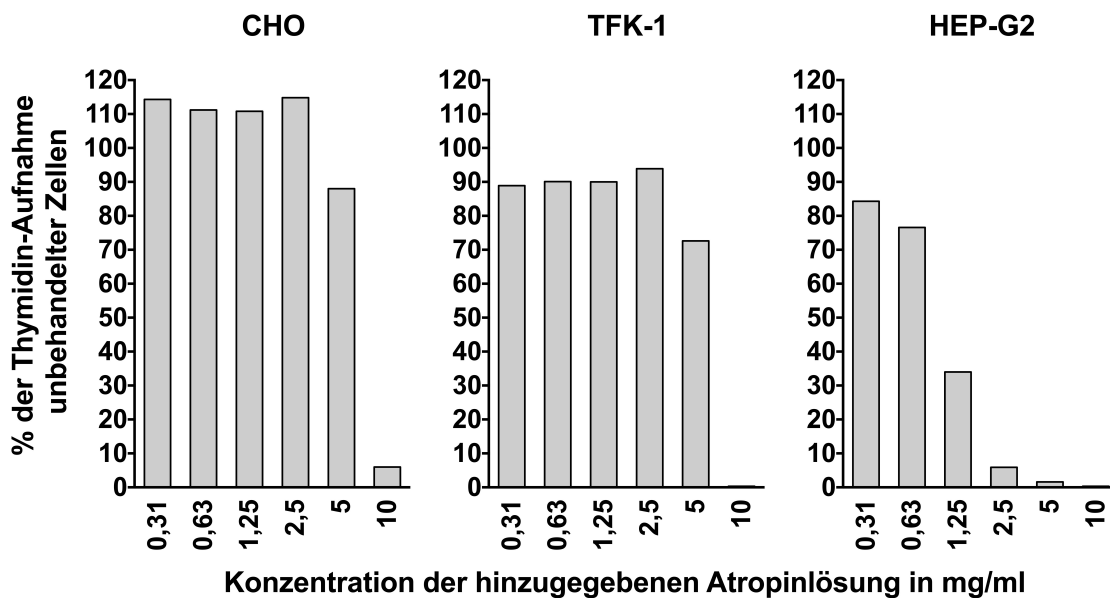


Abbildung 18: Einfluss von Atropin auf die Proliferationsrate verschiedener Zelllinien, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay. Die Zellen wurden für ca. 40 Stunden mit 10 μL einer Atropinlösung der jeweils angegebenen Konzentration inkubiert. CHO: den mAChR3 überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: den mAChR3 konstitutiv exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: den mAChR3 nur geringfügig exprimierende HEP-G2-Zellen.

Atropin hatte auf CHO- und TFK-1-Zellen lediglich in der höchsten getesteten Konzentration (10 mg/ml) einen stark inhibierenden Effekt. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass bei dieser Atropinkonzentration ein direkter zytotoxischer Effekt anstatt einer rezeptorvermittelten Hemmung der Proliferation eingetreten ist. Die Proliferation der HEP-G2 Zellen wurde durch Atropin ab einer Konzentration von 1,25 mg/ml konzentrationsabhängig inhibiert.

4.4 Einfluss von Immunglobulinen aus Seren von PBC-Patienten auf die Proliferation verschiedener Zelllinien, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay

4.4.1 Häufigkeit von die Proliferation inhibierenden und stimulierenden Anti-mAChR3-Antikörpern bei PBC-Patienten ohne Therapie

Wie in Tabelle 17 ersichtlich, hatten die Immunglobuline der PBC-Patienten vor Therapiebeginn bzw. bei Diagnosestellung vor allem auf die Proliferation der HEP-G2-Zellen eine inhibierende Wirkung. Während Antikörper aus nur 16% bzw. 3% der Seren die Proliferation von CHO- bzw. TFK-1-Zellen inhibierten, hatten die Immunglobuline aus allen getesteten Seren inhibierenden Einfluss auf die Proliferation der HEP-G2-Zellen. Die Proliferation stimulierende Antikörper wurden nicht nachgewiesen.

Tabelle 17: Einfluss von Immunglobulinen von 38 untherapierten PBC-Patienten auf die Proliferation verschiedener Zelllinien, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay.

Einfluss der Ig auf die Proliferation	mAchR3-überexprimierende CHO-Zellen	Konstitutiv mAchR3-exprimierende TFK-1-Zellen	Nur gering mAchR3-exprimierende HEP-G2-Zellen
	Anzahl (%)		
Inhibition	6 (16)	1 (3)	38 (100)
Stimulation	0	0	0
Kein Effekt	32 (84)	37 (97)	0

4.4.2 Einfluss von die Proliferation stimulierenden und inhibierenden Antikörpern bei PBC-Patienten im Verlauf ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie

4.4.2.1 Verlauf der Zellproliferation bei vier Patienten, die im Verlauf keine Therapie erhielten

Messung mit CHO-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der vier im Verlauf nicht spezifisch therapierten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der CHO-Zellen von 77,8% bei Diagnosestellung auf im Verlauf (9-177 Monate, Median 103 Monate) 40,7% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen ab. Bei kleiner Stichprobengröße war diese Veränderung nicht signifikant.

Zu Beginn wies in dieser Gruppe lediglich ein Patient die Proliferation inhibierende Antikörper auf. Im Verlauf sank die Proliferationsrate dieses Patienten weiter ab. Ein weiterer Patient, dessen Immunglobuline bei Diagnosestellung die Proliferation nicht beeinflussten, entwickelte im Verlauf neu inhibierende Antikörper (Tabelle 18; Abbildung 19). Diese beiden Patienten hatten auch im mAChR3-Lumineszenz-Assay mit CHO-Zellen einen ähnlichen Verlauf der Antikörper-Aktivität gezeigt (Abbildung 5).

Tabelle 18: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	1 (25)	2 (50)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	3 (75)	2 (50)

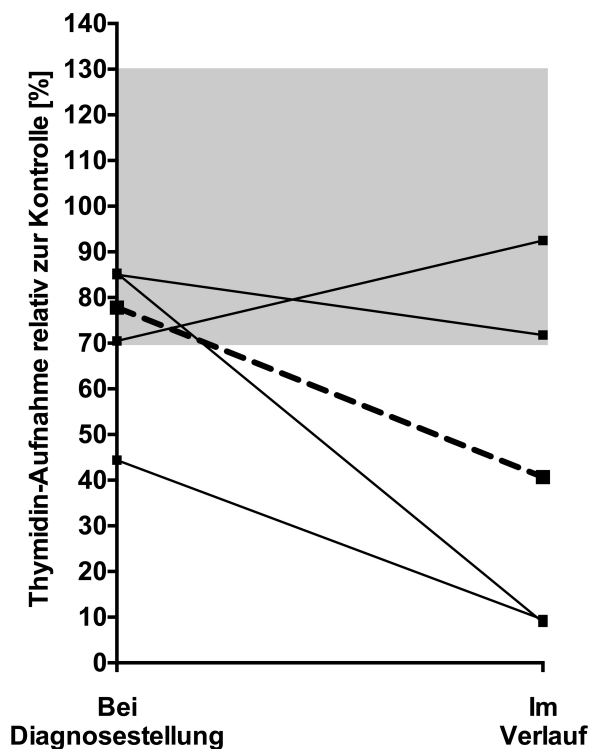


Abbildung 19: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit TFK-1-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der vier im Verlauf nicht spezifisch therapierten Patienten zeigte die mediane Proliferationsrate der den Rezeptor konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen keine signifikante Veränderung (vor Therapie: 103,9% des Wertes der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen, im Verlauf [9-177 Monate, Median 103 Monate]: 97,9%). Weder bei Diagnosestellung, noch im Verlauf konnten die Proliferation beeinflussende Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 20; Tabelle 19).

Tabelle 19: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	0	0
Stimulation	0	0
Kein Effekt	4 (100)	4 (100)

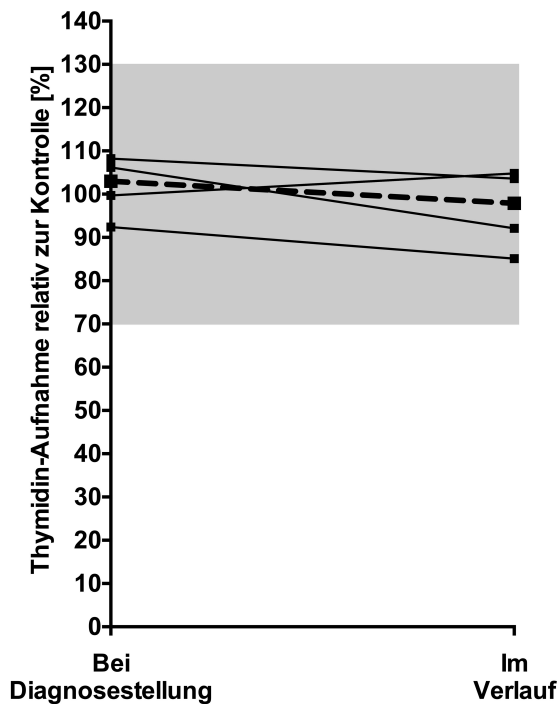


Abbildung 20: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der vier im Verlauf nicht spezifisch therapierten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der den mAChR3 nur wenig exprimierenden HEP-G2-Zellen im Verlauf der Therapie tendenziell ab (vor Therapie: 50,9% des Wertes der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen, im Verlauf [9-177 Monate, Median 103 Monate] 40,9%), der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Sowohl bei Diagnosestellung, als auch im Verlauf wiesen alle Patienten dieser Gruppe Antikörper auf, die die Proliferation der HEP-G2 Zellen inhibierten (Abbildung 21; Tabelle 20).

Tabelle 20: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von nur gering mAChR3-exprimierenden HEP-G2-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Erstes Serum bei Diagnosestellung (n = 4)	Verlaufsuntersuchung (9-177 Monate, Median 103 Monate) (n = 4)
	Anzahl (%)	
Inhibition	4 (100)	4 (100)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	0	0

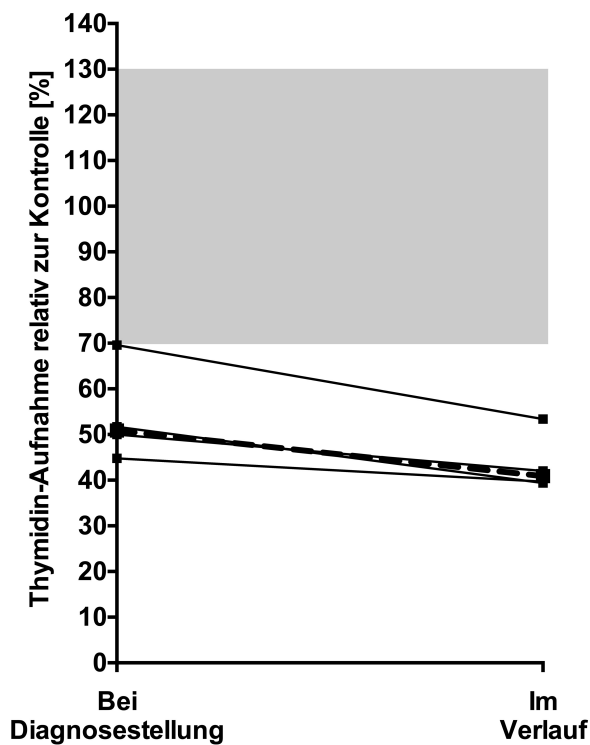


Abbildung 21: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig exprimierenden HEP-G2-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (nicht therapierte Patienten; n = 4). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.4.2.2 Verlauf der Zellproliferation bei 18 Patienten, die mit UDCS behandelt wurden

Messung mit CHO-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 18 im Verlauf mit UDCS behandelten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der den Rezeptor überexprimierenden CHO-Zellen nur geringfügig von vor Therapiebeginn 86,3% auf im Verlauf der Therapie (12-206 Monate, Median 121 Monate) 91,7% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen zu. Die Veränderung war statistisch nicht signifikant.

Vor Therapiebeginn wiesen 4 der 18 Patienten die Proliferation inhibierende Antikörper auf. Im Verlauf wurden die Antikörper bei diesen Patienten jeweils negativ. Ein Patient entwickelte erst im Verlauf inhibierende Antikörper (Abbildung 22; Tabelle 21).

Tabelle 21: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UD-CS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	4 (22)	1 (6)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	14 (78)	17 (94)

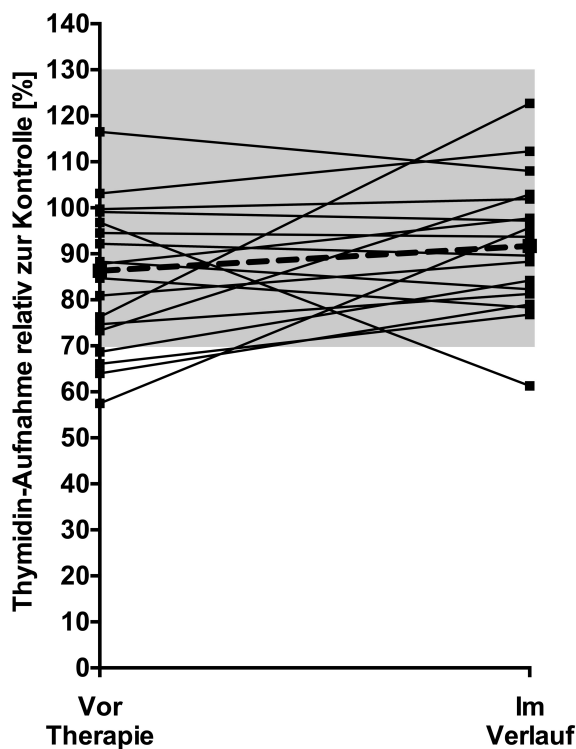


Abbildung 22: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit TFK-1-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 18 im Verlauf mit UDCS behandelten Patienten änderte sich die mediane Proliferationsrate der den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Verlauf nicht signifikant (vor Therapiebeginn 91,1%, im Verlauf [12-206 Monate, Median 121 Monate] 92,3% des Wertes der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen) (Abbildung 23).

Nur ein Patient wies vor Therapiebeginn die Proliferation der TFK-1-Zellen inhibierende Antikörper auf, diese wurden im Verlauf negativ (Tabelle 22).

Tabelle 22: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	1 (6)	0
Stimulation	0	0
Kein Effekt	17 (94)	18 (100)

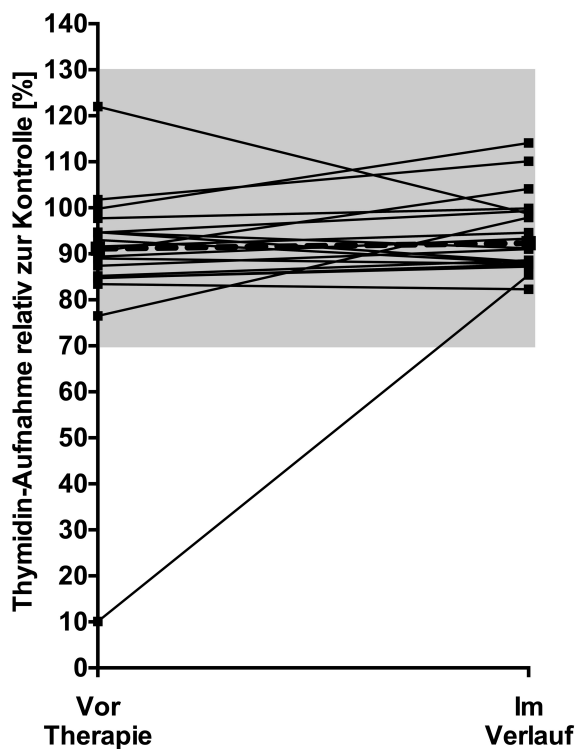


Abbildung 23: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 18 im Verlauf mit UDCS behandelten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der den Rezeptor nur wenig exprimierenden HEP-G2-Zellen geringfügig zu (vor Therapie: 42,9%, während Therapie [12-206 Monate, Median 121 Monate] 47,3% des Wertes der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen; statistisch nicht signifikant).

Vor Therapiebeginn wiesen alle Patienten die Proliferation inhibierende Antikörper auf. Im Verlauf normalisierte sich die Proliferationsrate nur bei einem der 18 Patienten (Abbildung 24; Tabelle 23).

Tabelle 23: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit UDCS-Therapie; n = 18).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 18)	Verlaufsuntersuchung (12-206 Monate, Median 121 Monate) (n = 18)
	Anzahl (%)	
Inhibition	18 (100)	17 (94)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	0	1 (6)

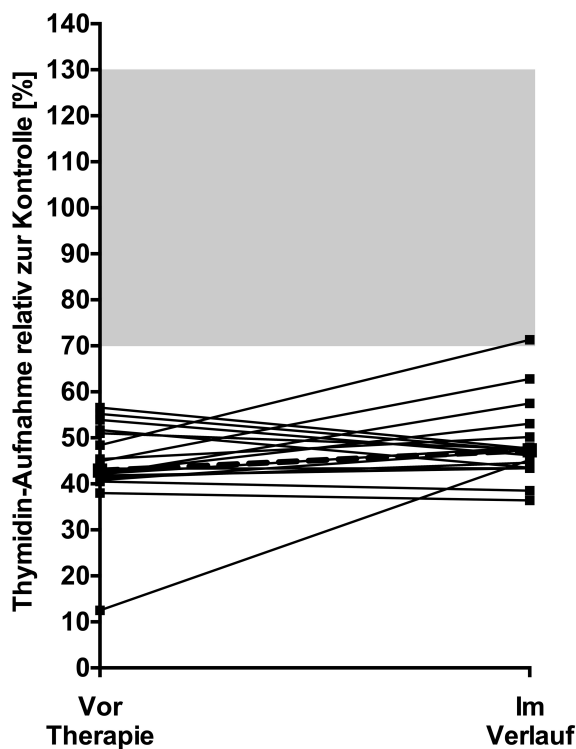


Abbildung 24: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig exprimierenden HEP-G2-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (mit UDCS therapierte Patienten; n = 18). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.4.2.3 Verlauf der Zellproliferation bei 16 Patienten, die immunsuppressiv behandelt wurden

Messung mit CHO-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 16 im Verlauf immunsuppressiv behandelten Patienten änderte sich die mediane Proliferationsrate der den Rezeptor überexprimierenden CHO-Zellen im Verlauf nicht signifikant (vor Therapie 90,4%, im Verlauf [11-213 Monate, Median 107,5 Monate] 90,8% des Wertes der transfizierten, aber nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen).

Die Anzahl an Patienten mit die Proliferation inhibierenden Antikörpern nahm von einem Patient vor Therapie auf vier Patienten im Verlauf zu (Abbildung 25; Tabelle 24).

Tabelle 24: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf der Therapie, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	1 (6)	4 (25)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	15 (94)	12 (75)

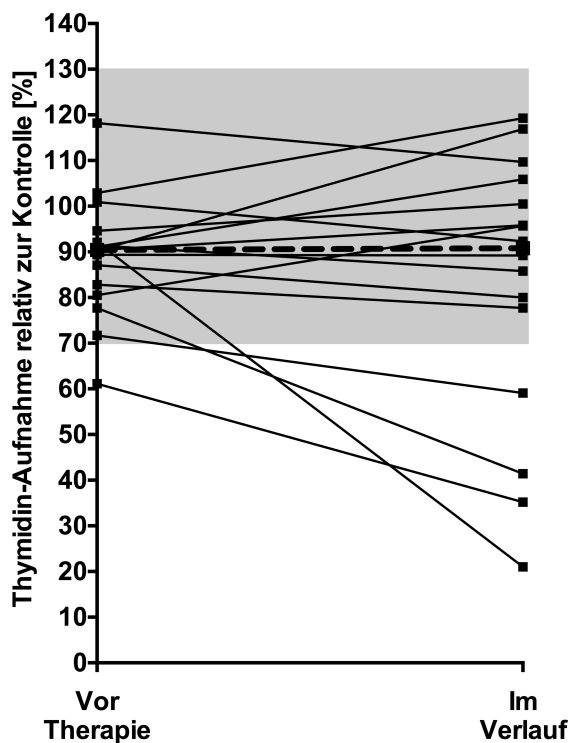


Abbildung 25: Proliferation von den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit TFK-1-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 16 im Verlauf immunsuppressiv behandelten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der den Rezeptor konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen im Verlauf geringfügig ab (vor Therapie: 97,4%, im Verlauf unter Therapie [11-213 Monate, Median 107,5 Monate] 91,5% des Wertes der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen). Die Veränderung war statistisch nicht signifikant.

Vor Therapiebeginn wurden keine die Proliferation beeinflussenden Antikörper beobachtet. Nur bei einem Patienten fanden sich im Verlauf die Proliferation der TFK-1-Zellen inhibierende Antikörper (Abbildung 26; Tabelle 25).

Tabelle 25: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	0	1 (6)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	16 (100)	15 (94)

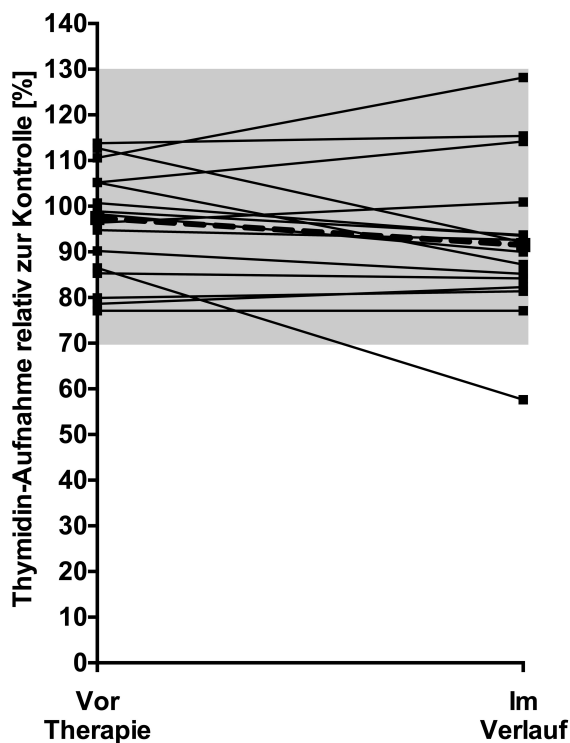


Abbildung 26: Proliferation von den mAChR3 konstitutiv exprimierenden TFK-1-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Messung mit HEP-G2-Zellen

Unter Verwendung der Immunglobuline aus Seren der 16 im Verlauf immunsuppressiv behandelten Patienten nahm die mediane Proliferationsrate der den mAChR3 gering exprimierenden HEP-G2-Zellen von 45,5% vor Therapiebeginn auf 48,6% der nicht mit Immunglobulinen behandelten Zellen während der Therapie (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) geringfügig zu (statistisch nicht signifikant).

Vor Therapiebeginn wiesen alle Patienten die Proliferation inhibierende Antikörper auf, bei einem Patienten wurden sie im Verlauf negativ (Abbildung 27; Tabelle 26).

Tabelle 26: Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferation von den mAChR3 nur gering exprimierenden HEP-G2-Zellen vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay (Patienten mit immunsuppressiver Therapie; n = 16).

Einfluss der Ig auf die Proliferation	Vor Therapiebeginn (n = 16)	Verlaufsuntersuchung (11-213 Monate, Median 107,5 Monate) (n = 16)
	Anzahl (%)	
Inhibition	16 (100)	15 (94)
Stimulation	0	0
Kein Effekt	0	1 (6)

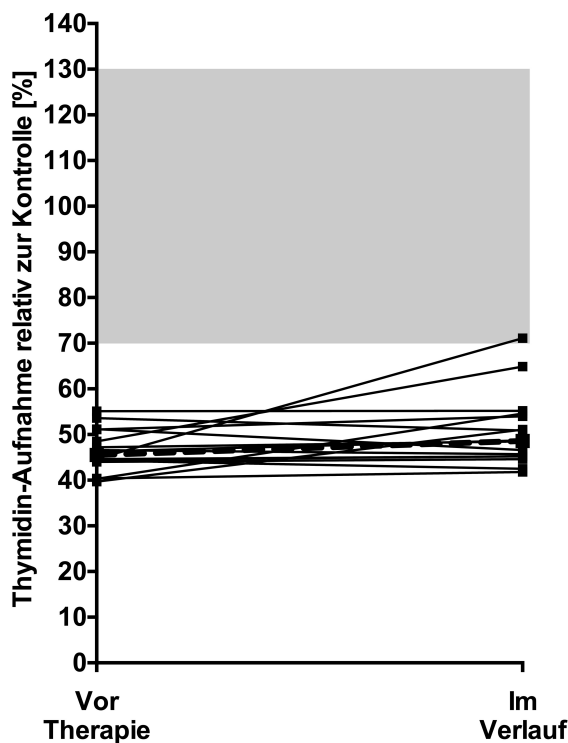


Abbildung 27: Proliferation von den mAChR3 nur geringfügig exprimierenden HEP-G2-Zellen unter Einfluss der Immunglobuline von PBC-Patienten vor Therapiebeginn und im Verlauf unter Therapie, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay (immunsuppressiv therapierte Patienten; n = 16). Durchgezogene Linien: einzelne Patienten; gestrichelte Linie: Median; grau hinterlegt: Normbereich. Die Veränderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.4.3 Zusammenfassung der Verläufe der die Proliferation beeinflussenden Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie sowie unter UDCS- bzw. immunsuppressiver Therapie unter Verwendung verschiedener Zelllinien

In den Abbildungen 28 bis 31 sind die Einflüsse der Immunglobuline der PBC-Patienten auf die Zellproliferation der verschiedenen Zelllinien zusammengefasst.

Eine Inhibition der Proliferation durch Immunglobuline von PBC-Patienten war vor allem bei den HEP-G2-Zellen zu beobachten. Bei Messung mit diesen wiesen bei Therapiebeginn bzw. vor Diagnosestellung alle 38 Patienten (100%)

die Proliferation inhibierende Antikörper auf, im Verlauf noch 36 von 38 (95%). Bei Messung mit den TFK-1-Zellen wurde sowohl bei Therapiebeginn bzw. vor Diagnosestellung, als auch im Verlauf nur bei einem der 38 Patienten (3%) die Proliferation durch die Immunglobuline gehemmt.

Bei Verwendung von CHO-Zellen fanden sich vor Therapiebeginn bzw. bei Diagnosestellung bei 6 der 38 Patienten (16%) die Proliferation inhibierende Antikörper, im Verlauf bei 7 von 38 (18%). In der nicht therapierten Patientengruppe erreichte die mediane und die mittlere Proliferationsrate der CHO-Zellen bei Diagnosestellung knapp den neutralen Bereich, in der Verlaufsmessung lagen mediane und mittlere Proliferationsrate deutlich im inhibierten Bereich. Dies ist wesentlich auf die im Verlauf starke Inhibition der Proliferation durch Immunglobuline derselben beiden Patienten zurückzuführen, die auch im funktionellen Lumineszenzassay im Verlauf zu einer Inhibition der mAChR3-Funktion führten (Abbildungen 5 und 19).

Eine statistisch signifikante Veränderung der Proliferationsrate im Verlauf ließ sich aber mit keiner Zelllinie und keiner Patientengruppe feststellen.

Die Proliferation aktivierende Antikörper wurden bei keiner Messung beobachtet.

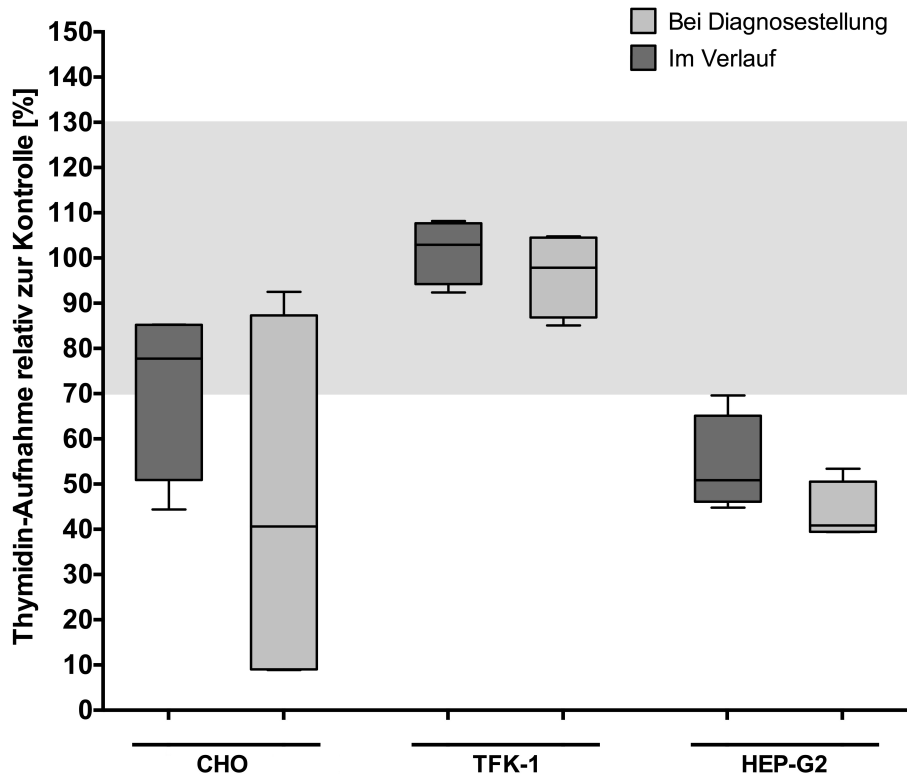


Abbildung 28: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen nicht therapierter PBC-Patienten (n = 4) bei Erstdiagnose und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay. CHO: mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: konstitutiv mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: gering mAChR3-exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich.

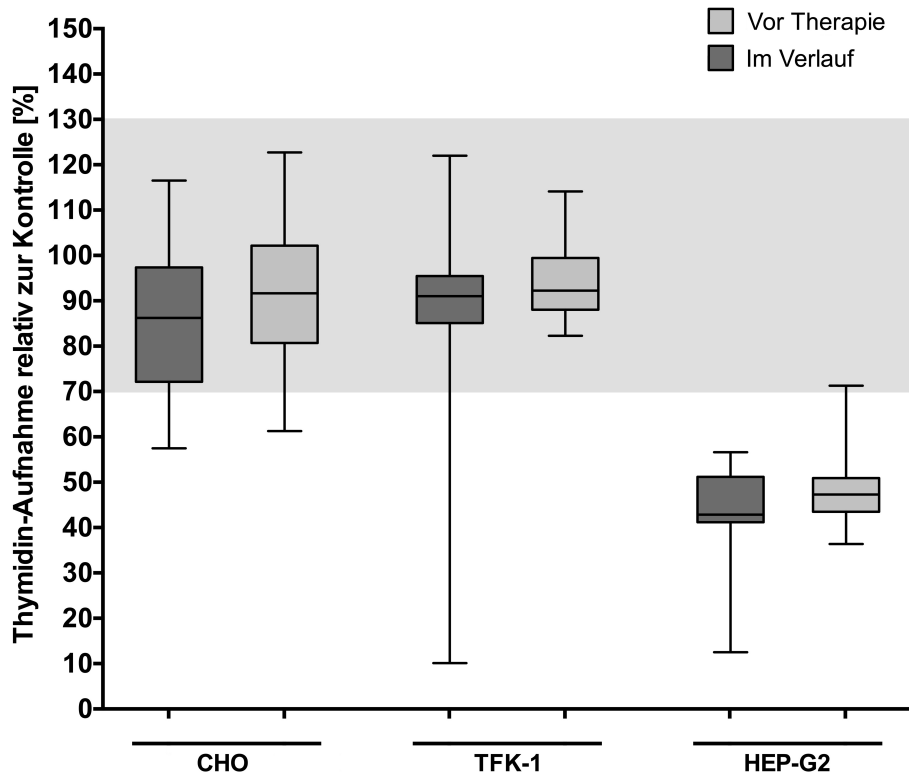


Abbildung 29: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen mit UDCS therapierter PBC-Patienten (n = 18) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay. CHO: mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: konstitutiv mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: gering mAChR3-exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich.

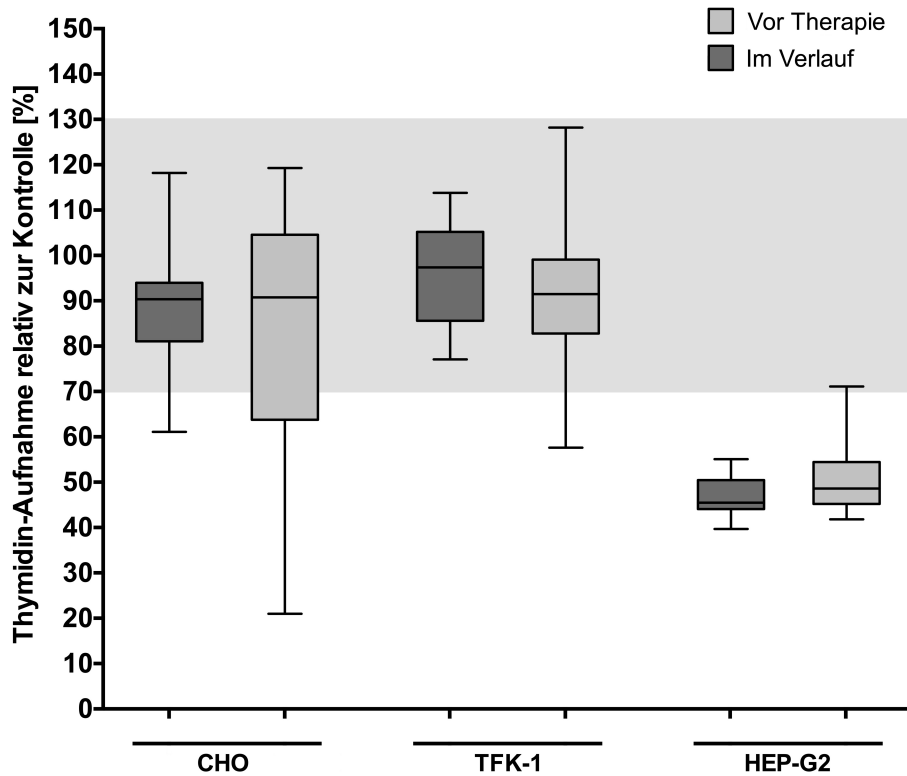


Abbildung 30: Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen immunsuppressiv behandelter PBC-Patienten (n = 16) vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay. CHO: mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: konstitutiv mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: gering mAChR3-exprimierende HEP-G2-Zellen; Box: Median, 25. bis 75. Perzentile; Antennen: höchster und niedrigster Wert; grau hinterlegt: Normbereich.

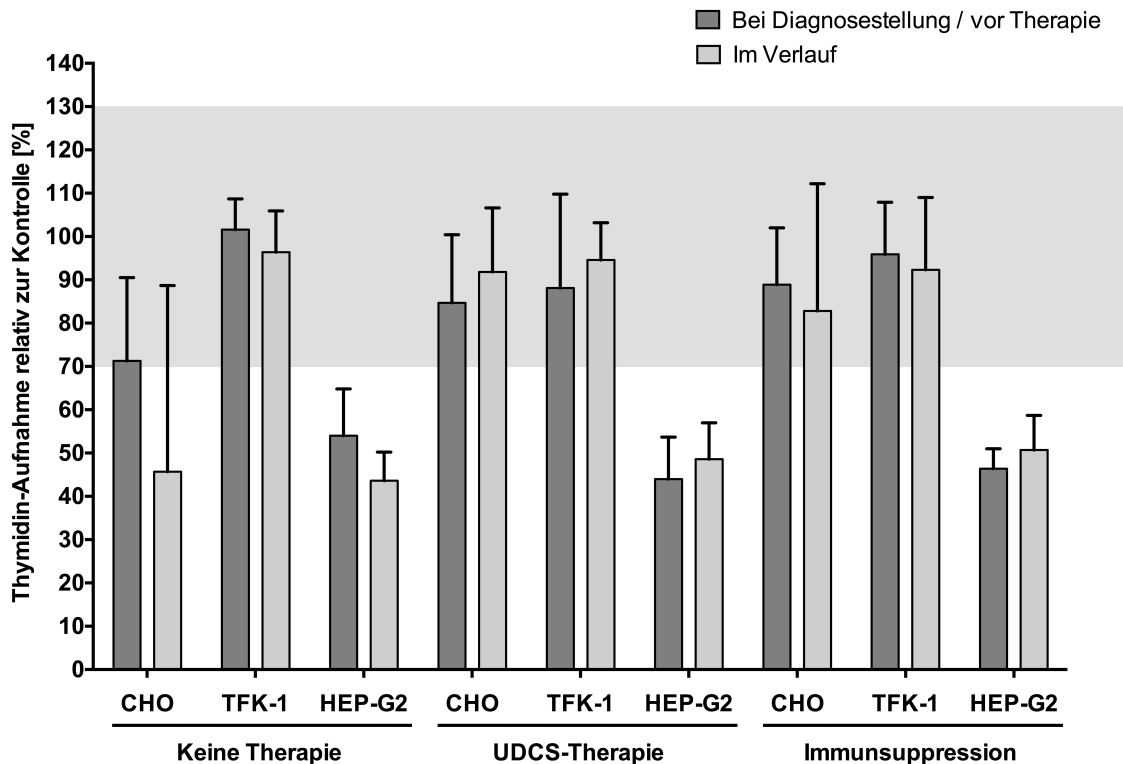


Abbildung 31: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationsraten verschiedener Zelllinien unter Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten aus verschiedenen Therapiegruppen jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. vor Therapiebeginn und im Verlauf, gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay. CHO: mAChR3-überexprimierende CHO-Zellen; TFK-1: konstitutiv mAChR3-exprimierende TFK-1-Zellen; HEP-G2: gering mAChR3-exprimierende HEP-G2-Zellen; grau hinterlegt: Normbereich.

4.5 Korrelation von mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den unter Einfluss der Immunglobuline der PBC-Patienten gemessenen mAChR3-Aktivitäten (gemessen im Lumineszenzassay) und den unter Einfluss der Immunglobuline gemessenen Proliferationsraten (gemessen im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay) der verschiedenen Zelllinien besteht.

Hierfür wurde die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman verwendet. Für keine Zelllinie ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der mAChR3-Aktivität und der Proliferationsrate.

5. Diskussion

Die primär biliäre Cholangitis ist eine chronische cholestatische Lebererkrankung, die immunologisch durch einen Toleranzverlust des Immunsystems gegenüber einigen ubiquitären mitochondrialen Antigenen charakterisiert ist. Bei über 90% der PBC-Patienten sind Antikörper gegen spezifische mitochondriale Antigene (AMA) nachweisbar. Bei etwa 50% der Patienten lassen sich außerdem antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisen, die prognostische und teils diagnostische Bedeutung haben (Hirschfield und Gershwin 2013).

Noch weitestgehend unklar ist die Rolle von Anti-mAChR3-Antikörpern, die von Berg et al. 2010 zum ersten Mal mittels Western Blot und ELISA in Seren von PBC-Patienten nachgewiesen wurden.

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit funktionell am mAChR3 wirksamen und die Zellproliferation beeinflussenden Eigenschaften dieser Antikörper sowie mit Veränderungen der Aktivität und Prävalenz dieser Antikörper im Krankheitsverlauf.

Es konnte der Nachweis von funktionell aktiven, überwiegend den Rezeptor inhibierenden Anti-mAChR3-Antikörpern in einer Gruppe von PBC-Patienten (n = 38) mittels einer von Preuss et al. 2014 vorgeschriebenen, im Immunpathologischen Labor etablierten Lumineszenz-basierten Methode bestätigt werden. Dies gelang am sensitivsten mit Cholangiozyten (TFK1-Zellen) und etwas weniger sensitiv nach leichter Modifikation der Methode auch mit Hepatozyten (HEP-G2-Zellen). Der Nachweis mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen war überraschenderweise weniger sensitiv.

Zudem wurden Veränderungen der funktionellen Aktivität und der Prävalenz dieser Antikörper im Verlauf der Erkrankung untersucht. Hierfür wurde das Patientenkollektiv abhängig von der erhaltenen Therapie in drei Gruppen eingeteilt und jeweils der Einfluss der Immunglobuline eines im Verlauf nach im Median 121 Monaten (Therapie mit UDCS), 107,5 Monaten (immunsuppressive Therapie), bzw. 103 Monaten (keine Therapie) abgenommenen Serums auf die funktionelle Rezeptoraktivität bestimmt. Hierbei konnte nur bei den insgesamt wenig sensitiven Messungen mit CHO-Zellen in der immunsupprimierten

Patientengruppe eine signifikante Zunahme der inhibierenden Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper festgestellt werden. In den anderen Patientengruppen und mit den anderen Zelllinien ließen sich keine signifikanten Veränderungen der Rezeptoraktivität beobachten.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Antikörper des gleichen Kollektivs von PBC-Patienten auf die Zellproliferation von CHO-, TFK1- und HEP-G2-Zellen untersucht. Hierbei konnte bei 100% der untersuchten Immunglobuline eine hemmende Wirkung auf die Proliferation der HEP-G2-Zellen festgestellt werden. Die Proliferation der CHO-Zellen und der TFK-1-Zellen wurde hingegen durch die getesteten Immunglobuline nur wenig beeinflusst, eine proliferationshemmende Wirkung ließ sich dort nur in 16% bzw. 3% der Fälle beobachten. Auch hier wurden Verlaufsmessungen durchgeführt. Dabei zeigte die mediane Proliferationsrate in keiner Therapiegruppe und mit keiner Zelllinie eine signifikante Veränderung im Krankheitsverlauf. Auch die Anzahl an Patienten mit proliferationshemmenden Antikörpern änderte sich im Verlauf nur wenig. Antikörper, die die Proliferation aktivierten, wurden bei keiner Messung festgestellt.

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Patientenkollektiv

In der Literatur ist unter PBC-Patienten eine Geschlechterverteilung mit starker Bevorzugung des weiblichen Geschlechts (Leo et al. 2016) und ein mittleres Erkrankungsalter von etwa 50 Jahren (Griffiths et al. 2014) beschrieben.

Das für diese Arbeit verwendete Patientenkollektiv entspricht diesen Beobachtungen. Von den 38 Patienten, deren Seren untersucht wurden, waren 35 weiblich und 3 männlich, entsprechend einem Verhältnis von Männern zu Frauen von 11,7:1. Auch das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der jeweils ersten vorliegenden Serumprobe liegt mit 48,5 Jahren nah am in der Literatur angegebenen mittleren Erkrankungsalter.

Die Standardtherapie der PBC erfolgt derzeit mit UDCS (Strassburg et al. 2017). Eine zusätzliche Therapie mit immunsupprimierenden Medikamenten wie Azathioprin, Cyclosporin oder Methotrexat wird zwar derzeit zur alleinigen Behandlung der PBC nicht empfohlen (Molinaro und Marschall 2017), findet aber aufgrund assoziierter weiterer Erkrankungen dennoch häufig statt.

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei etwa gleich große Gruppen von Patienten, die nur mit UDCS behandelt wurden (n = 18) und Patienten, die zusätzlich oder ausschließlich eine immunsuppressive Therapie erhielten (n = 16) gebildet werden. Nur vier Patienten in dem hier untersuchten Kollektiv erhielten auch im Verlauf keine spezifische Therapie der PBC. Die Aussagekraft der Ergebnisse in dieser Gruppe ist aufgrund der kleinen Stichprobengröße mit besonderer Zurückhaltung zu bewerten.

5.1.2 mAChR3-Lumineszenz-Assay

Neben den für die PBC charakteristischen AMA sowie bei einigen Patienten vorkommenden ANA (Hirschfeld und Gershwin 2013), wiesen Berg et al. 2010 erstmals auch Autoantikörper gegen den mAChR3 in Seren von PBC-Patienten nach. Solche Anti-mAChR3-Antikörper können funktionell auf den mAChR3 einwirken und diesen aktivieren (Bacman et al. 1998) oder inhibieren (Waterman et al. 2000, Preuss et al. 2014a).

Preuss et al. beschrieben 2014 eine auf Lumineszenzmessungen basierende Methode, um diese Anti-mAChR3-Antikörper mit Hilfe von mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen nachzuweisen und deren funktionelle Aktivität zu quantifizieren (Preuss et al. 2014b). Diese Methode wurde auch in der hier vorgelegten Dissertation verwendet.

Speziell bei PBC-Patienten ist jedoch zusätzlich auch die Wirkung der Antikörper auf Cholangiozyten (in dieser Arbeit TFK-1-Zellen) und Hepatozyten (in dieser Arbeit HEP-G2-Zellen) von Interesse, insbesondere da auch eine pathophysiologische Rolle der Anti-mAChR3-Antikörper bei der PBC möglich erscheint, die unter Umständen auf eine funktionelle Antikörperwirkung auf diese Zelltypen zurückzuführen sein könnte. So ist für Cholangiozyten in der Literatur beschrieben, dass diese den mAChR3 exprimieren und dieser eine

Rolle bei der Regulation der Bicarbonatsekretion spielt (Nathanson et al. 1996; Alvaro et al. 1997; Cassiman et al. 2002; Minagawa et al. 2007). Eine Beeinflussung unter anderem dieser Funktion der Cholangiozyten durch Anti-mAChR3-Antikörper wäre damit denkbar.

Weniger eindeutig ist die Situation bei Hepatozyten, bei denen die funktionelle Bedeutung des mAChR3 bislang weitgehend unklar ist (Li et al. 2009). In einigen Studien konnte auf Hepatozyten keine Expression des mAChR3 nachgewiesen werden (Alvaro et al. 1997). Andere Autoren fanden den mAChR3 zwar auf hepatischen Progenitorzellen, nicht aber auf ausdifferenzierten Hepatozyten (Cassiman et al. 2002). In einer aktuelleren Studie wurde der mAChR3 zwar eindeutig auf ausdifferenzierten Hepatozyten von Mäusen nachgewiesen, seine Funktion blieb jedoch unklar (Li et al. 2009).

In einer vorangegangenen Studie wurden zudem bereits TFK-1- und HEP-G2-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay zum Nachweis von Anti-mAChR3-Antikörpern eingesetzt. Allerdings erwiesen sich die HEP-G2-Zellen dort als nur bedingt geeignet für den Antikörpernachweis, da Messungen mit diesen Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay generell nur sehr niedrige Lumineszenzwerte ergaben, möglicherweise aufgrund einer nur geringen Expression des mAChR3 auf der Zelloberfläche (Frischke 2013).

Im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation wurde dennoch neben CHO- und TFK-1-Zellen auch die HEP-G2-Zelllinie erneut eingesetzt. Durch Optimierung der Transfektion mit dem pG5A GFP/Aequorin Plasmid wurde versucht, die Lumineszenzausbeute zu steigern und so die Aussagekraft der Messungen zu erhöhen. Hierfür wurden verschiedene Transfektionsmethoden getestet und schließlich eine Methode gefunden, mit der die Lumineszenzausbeute mit HEP-G2-Zellen im Vergleich zur vorbeschriebenen Methode mehr als verzehnfacht werden konnte. Diese Methode wurde fortan für die HEP-G2-Zelllinie angewandt, wohingegen bei den CHO- und TFK-1-Zellen die in der Literatur beschriebene Transfektionsmethode unverändert beibehalten wurde.

Es erfolgte dann mit allen drei Zelllinien eine Testvalidierung mit dem mAChR3-Antagonisten Atropin. Wie in der Literatur beschrieben (Preuss et al. 2014b) zeigte sich bei Messung mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen eine

konzentrationsabhängige Hemmung der gemessenen mAChR3-Aktivität. Auch bei den TFK-1- und HEP-G2-Zellen ließ sich die gemessene Rezeptoraktivität mit Atropin hemmen, eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit ließ sich jedoch nicht feststellen.

5.1.3 ³H-Thymidin-Proliferations-Assay

In der Pathogenese der PBC spielt die Zellproliferation, insbesondere die der Cholangiozyten, eine entscheidende Rolle (Priester et al. 2010).

Eine Studie, die wie die hier vorliegende Arbeit den Einfluss von Immunglobulinen von PBC-Patienten auf die Proliferationsrate von TFK-1- und HEP-G2-Zellen untersuchte, zeigte, dass die Proliferation dieser Zelllinien durch die Antikörper beeinflusst wird. Dort wurden die Cholangiozyten durch Immunglobuline von 66,7% und die Hepatozyten durch Immunglobuline von 94,0% der untersuchten PBC-Patienten zur Proliferation angeregt, 2,2% bzw. 2,0% der Immunglobuline inhibierten die Proliferation (Frischke 2013).

Die durch Antikörper vermittelte Beeinflussung der Proliferationsrate könnte eine Rolle in der Pathophysiologie der PBC spielen. Auch hier könnten insbesondere Anti-mAChR3-Antikörper von Bedeutung sein.

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren, insbesondere der mAChR3, sind bei verschiedenen Zellarten an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Yan et al. 1995; De Sarno et al. 2003; Tobin und Budd 2003; Shafer und Williams 2004; Gautam et al. 2009; Yanamadala et al. 2009). Die genaue Wirkung ist dabei nicht nur vom Zelltyp, sondern auch vom intra- und extrazellulären Milieu abhängig (Nicke et al. 1999). Auch bei Cholangiozyten ist an der Regulation dieser Vorgänge der mAChR3 beteiligt (LeSage et al. 1999). Unklarer ist auch hier die Situation bei den Hepatozyten. Wie in Kapitel 5.1.2 bereits ausgeführt, liegen über den Einfluss des mAChR3 auf Hepatozyten, auch bezüglich eines möglichen Effektes auf ihre Proliferation, bislang nur unzureichende Erkenntnisse vor.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der ³H-Thymidin-Proliferations-Assay wie in der oben genannten Studie von Frischke am MicroBeta 2 LumiJet durchgeführt. Der einzige methodische Unterschied bei der Durchführung des

Assays bestand darin, dass hier analog zum Vorgehen im mAChR3-Lumineszenz-Assay eine Verdünnung der Immunglobuline von 1:10 gewählt wurde, während Frischke im ^3H -Thymidin-Proliferations-Assay eine Verdünnung von 1:100 gewählt hatte.

Es wurden zur Validierung der Methode zunächst Versuchsreihen durchgeführt, bei denen die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des mAChR3-Agonisten Carbachol und des mAChR3-Antagonisten Atropin inkubiert wurden. Hierbei konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien ein Effekt von Carbachol auf die Proliferation festgestellt werden. Atropin hatte bei Testung mit den CHO- und den TFK-1-Zellen lediglich in der höchsten getesteten Konzentration (Zugabe von 10 μL einer Atropinlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml) eine Auswirkung auf die Proliferation, die hierbei fast vollständig unterdrückt wurde. Bereits bei Verdünnung der zugegebenen Atropinlösung im Verhältnis 1:2 war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, was Ausdruck eines nicht spezifisch rezeptorvermittelten zytotoxischen Effekt des hochkonzentrierten Atropins sein könnte. Im Gegensatz dazu konnte bei den HEP-G2-Zellen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation bereits ab einer Konzentration der hinzugegebenen Atropinlösung von 1,25 mg/ml festgestellt werden. Möglich ist auch hier ein nicht spezifisch rezeptorvermittelter zytotoxischer Effekt des Atropins, auf den die Hepatozyten-Zelllinie möglicherweise empfindlicher reagiert. Jedoch ist in Zusammenschau mit den in Kapitel 5.3 beschriebenen Ergebnissen der Messungen mit Immunglobulinen auch eine rezeptorvermittelte proliferationshemmende Wirkung von mAChR3-Antagonisten und funktionellen Anti-mAChR3-Antikörpern auf die HEP-G2-Zellen denkbar.

5.2 Diskussion der Ergebnisse der Messungen mit Seren von PBC-Patienten

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse im mAChR3-Lumineszenz-Assay

5.2.1.1 Häufigkeit inhibierender und stimulierender Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie

Die Häufigkeit von Anti-mAChR3-Antikörpern in den Seren von PBC-Patienten wird in der Literatur mit je nach Messmethode unterschiedlichen Werten angegeben. Messungen mittels ELISA unter Verwendung eines aus 25 Aminosäuren bestehenden Teilpeptids des mAChR3 ergaben eine Antikörper-Prävalenz von 22%. Bei Messung mittels Western Blot wurden bei 33% der PBC-Patienten Anti-mAChR3-Antikörper detektiert (Berg et al. 2010). Bei Messung mittels funktionellem mAChR3-Lumineszenz-Assay und TFK-1-Zellen wird eine Prävalenz von 86,7% beschrieben, wobei in dieser Studie sämtliche nachgewiesenen Antikörper eine den Rezeptor inhibierende Wirkung zeigten (Frischke 2013).

Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte im funktionellen mAChR3-Lumineszenz-Assay zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer PBC bzw. vor Beginn der Therapie besonders bei den Messungen mit TFK-1-Zellen eine große Häufigkeit von inhibierenden Anti-mAChR3-Antikörpern festgestellt werden, die mit 84% sehr nah am in der Literatur beschriebenen Wert liegt. Anders als vorbeschrieben wurde hier auch ein kleiner Anteil (5%) rezeptoraktivierender Antikörper festgestellt.

Etwas seltener wurden bei den Messungen mit HEP-G2-Zellen funktionelle Anti-mAChR3-Antikörper detektiert. Hier wurden in 63% der Patientenseren rezeptorinhibierende Antikörper nachgewiesen, in 3% der Seren rezeptoraktivierende Antikörper. Bei Messung mit mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen konnten überraschenderweise nur in 26% der Fälle inhibierende und in 11% der Fälle stimulierende Antikörper nachgewiesen werden. In 63% der Fälle zeigten die Immunglobulinfraktionen aus den jeweiligen Patientenseren keine funktionelle Aktivität am mAChR3 der CHO-Zellen. Die

funktionelle, überwiegend inhibierende Rezeptoraktivität der Anti-mAChR3-Antikörper erwies sich somit als zelllinienspezifisch.

5.2.1.2 Verlauf der inhibierenden und stimulierenden Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie

Die PBC ist eine chronische Erkrankung mit insgesamt guter Prognose. Ein Großteil der Patienten lebt dementsprechend über viele Jahre mit der Erkrankung. Bei Patienten, die gut auf die UDCS-Therapie ansprechen, weicht die Langzeitüberlebensrate nicht signifikant von der Langzeitüberlebensrate der Allgemeinbevölkerung ab. Patienten, die nicht gut auf die UDCS-Therapie ansprechen, zeigen hingegen ein signifikant kürzeres Langzeitüberleben (Pares 2006). Für diese Patienten, wie auch für Patienten mit einem Overlap-Syndrom von PBC und AIH und für Patienten, die bereits eine Lebertransplantation benötigten, kommen verschiedene zusätzliche medikamentöse Therapieoptionen in Frage, die oftmals immunsuppressive Medikamente beinhalten (Floreani und Mangini 2017).

Von Interesse ist daher nicht nur die generelle Häufigkeit von Anti-mAChR3-Antikörpern, sondern auch der zeitliche Verlauf der Antikörperaktivität unter verschiedenen Therapieregimen. Um dies zu untersuchen, wurde das untersuchte Patientenkollektiv in drei Gruppen unterteilt: 18 der Patienten hatten eine Therapie nur mit UDCS erhalten, 16 der Patienten hatten eine immunsuppressive Therapie erhalten (15 davon in Kombination mit UDCS) und 4 Patienten hatten im Verlauf keine spezifische Therapie erhalten. Neben den Seren vor Therapiebeginn bzw. zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurde bei jedem Patienten ein weiteres Serum im Krankheitsverlauf analysiert. Die Therapiedauer zum Abnahmezeitpunkt dieses Serums lag bei den nur mit UDCS therapierten Patienten im Median bei 121 Monaten (12 - 206 Monaten), bei den immunsuppressiv behandelten Patienten bei 107,5 Monaten (11 - 213 Monaten). Bei den vier Patienten, die im beobachteten Zeitraum nicht spezifisch therapiert wurden, erfolgte die Verlaufsmessung nach einer Krankheitsdauer von im Median 103 Monaten (9 - 177 Monaten).

Abgesehen von der nicht spezifisch therapierten Patientengruppe, deren Messergebnisse aufgrund der sehr kleinen Stichprobengröße ($n = 4$) nur sehr bedingt aussagekräftig sind, zeigte sich in den Verlaufsmessungen die größte relative Veränderung der Prävalenz nachgewiesener inhibitorischer Anti-mAChR3-Antikörper bei den immunsupprimierten Patienten und Messung mit CHO-Zellen. Hier wurden vor Therapiebeginn bei 31%, in der Verlaufsmessung bei 50% der Patienten inhibitorische Antikörper nachgewiesen. Diese Veränderung drückte sich auch in der medianen Rezeptoraktivität aus, die in dieser Gruppe von im Median 93,8% vor Therapiebeginn auf im Median 73,5% in der Verlaufsmessung signifikant abnahm ($p < .05$). Bei Messung mit den TFK-1-Zellen blieb in dieser Patientengruppe die Anzahl an Patienten mit inhibitorischen Antikörpern konstant (69%), bei Messung mit den HEP-G2-Zellen änderte sie sich nur gering von 63% vor Therapie auf 69% im Verlauf. Mit den TFK-1-Zellen und den HEP-G2-Zellen konnte im Verlauf keine signifikante Änderung der medianen Rezeptoraktivität unter dem Einfluss der Antikörper der immunsupprimierten Patienten nachgewiesen werden.

Bei den mit UDCS behandelten Patienten und den nicht therapierten Patienten war im Verlauf bei keiner Zelllinie eine signifikante Veränderung der Reaktivität der Anti-mAChR3-Antikörper zu beobachten.

Insgesamt scheint damit die Therapie der PBC, unabhängig davon, ob immunsuppressive Medikamente eingesetzt werden oder ausschließlich mit UDCS behandelt wird, wenig Einfluss auf die Reaktivität von Anti-mAChR3-Antikörpern bei Cholangiozyten und Hepatozyten zu haben. Lediglich bei den insgesamt weniger sensitiven Messungen mit CHO-Zellen ließ sich wie oben beschrieben eine signifikante Zunahme der rezeptorhemmenden Aktivität unter immunsuppressiver Therapie nachweisen. Diese Beobachtung sollte mit weiteren Versuchen validiert werden.

Die Messergebnisse mit den Cholangiozyten und Hepatozyten passen zu der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass auch der Titer der für die PBC pathognomonischen AMA im Krankheitsverlauf - unabhängig von der erhaltenen Therapie - keine signifikanten Änderungen zeigt (Van Norstrand et al. 1997; Benson et al. 2004; Tana et al. 2015).

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay

5.2.2.1 Häufigkeit die Proliferation beeinflussender Antikörper bei 38 PBC-Patienten vor Therapie

Im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay wurde vor allem die Proliferation der HEP-G2-Zellen durch die Antikörper der PBC-Patienten beeinflusst. Überraschenderweise zeigten die Immunglobuline der PBC-Patienten mit dieser Zelllinie - im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen aktivierenden Wirkung (Frischke 2013) – zu 100% eine die Proliferation inhibierende Wirkung. Die Proliferation der TFK-1-Zellen wurde dagegen kaum durch die getesteten Immunglobuline beeinflusst. Nur 3% der PBC-Patienten wiesen die Proliferation der TFK-1-Zellen inhibierende Antikörper auf, die Proliferation aktivierende Antikörper wurden wie auch bei den anderen Zelllinien nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Frischke für 66,7% der untersuchten Immunglobuline eine die Proliferation der TFK-1-Zellen stimulierende Wirkung beschrieben.

Ähnlich wie bei den TFK-1-Zellen fielen in den hier durchgeführten Untersuchungen die Ergebnisse bei Messung mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen aus, bei denen die Immunglobuline der PBC-Patienten ebenfalls größtenteils (84% der Fälle) keine Auswirkung auf die Proliferationsrate hatten und nur in 16% der Fälle eine Inhibition der Proliferation beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse passen zur zuvor festgestellten fehlenden Wirkung von Atropin und Carbachol auf die Proliferation von CHO- und TFK-1-Zellen und zur vorhandenen, konzentrationsabhängigen Hemmung der Proliferation von HEP-G2-Zellen durch Atropin, sodass eine über den mAChR3 und entsprechende Anti-mAChR3-Antikörper vermittelte proliferationshemmende Wirkung auf Hepatozyten denkbar ist. Es kommt aber dennoch auch eine Hemmung der Proliferation über andere in den Immunglobulinfraktionen vorhandene Antikörper und andere Signalwege infrage.

Ebenfalls möglich wäre, dass die vor allem bei den Hepatozyten beobachtete, proliferationsinhibierende Wirkung zwar auf Anti-mAChR3-Antikörper zurückzuführen ist, aber über einen anderen Signalweg vermittelt wird. Wie in der Literatur beschrieben käme zum Beispiel eine die Proliferation beeinflussende Wirkung in Betracht, die nicht über den im mAChR3-Lumineszenz-Assay getesteten $G_{q/11}$ /PLC-Signalweg vermittelt wird, sondern über einen Signalweg, der insbesondere das C-terminale Ende des mAChR3 involviert und unabhängig vom $G_{q/11}$ /PLC-Signalweg die Expression des anti-apoptischen Bcl-2-Proteins beeinflusst (Tobin und Budd 2003). Dies könnte auch eine Erklärung für die starke Organ- bzw. Zelllinienspezifität der beobachteten Proliferationshemmung liefern, da unterschiedliche Zellarten beispielsweise Unterschiede in der Bcl-2-Expression aufweisen könnten.

Die hier vorliegende Arbeit verwendete, abgesehen von einer unterschiedlichen Verdünnung der Antikörper, die gleiche Methodik für die Durchführung des ^3H -Thymidin-Proliferations-Assays sowie auch die gleichen Cholangiozyten- und Hepatozyten-Zelllinien wie die oben bereits erwähnte Arbeit von Frischke. Hier ist eine Diskrepanz der Ergebnisse auffällig. Während Frischke mit beiden Zelllinien hauptsächlich (66,7% bzw. 94,0% der Patienten bei Testung mit TFK-1- bzw. HEP-G2-Zellen) proliferationsaktivierende Antikörper fand, konnten in der hier vorliegenden Arbeit ausschließlich Antikörper festgestellt werden, die die Zellproliferation hemmten. Möglicherweise bewirkt der erwähnte Unterschied in der Verdünnung der Antikörper eine unterschiedliche Reaktion der Zellen hinsichtlich der Proliferationsrate. Als mögliche Erklärung für die Diskrepanz kommen jedoch auch Unterschiede in Alter, Wachstumsphase oder Anzahl von Passagen der Zellen in Betracht. Auch in der Literatur sind unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Wirkungen des mAChR3 auf die Zellproliferation und Apoptose in Abhängigkeit vom Zustand der Zelle *in vitro* beschrieben (Nicke et al. 1999; Shafer und Williams 2004). Eine solche Abhängigkeit vom Zustand der Zellen wäre auch im Falle einer nicht über den mAChR3 vermittelten Wirkung plausibel.

In vivo ist bei PBC-Patienten eine unterschiedliche Wirkung von Autoantikörpern auf die Zellproliferation in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

ebenfalls denkbar. So ist in sehr frühen Krankheitsphasen der PBC teilweise eine gesteigerte Proliferation der Cholangiozyten zu beobachten, der weitere Verlauf der Erkrankung ist dann jedoch durch eine zunehmende Apoptose der Cholangiozyten und einen Verlust der kleinen Gallengänge gekennzeichnet (Priester et al. 2010).

5.2.2.2 Verlauf der die Proliferation beeinflussender Antikörper bei PBC-Patienten ohne Therapie, unter Therapie mit UDCS und unter immunsuppressiver Therapie

Analog zum Vorgehen beim mAChR3-Lumineszenz-Assay wurden auch im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay Verlaufsmessungen durchgeführt und in Abhängigkeit von der erhaltenen Therapie ausgewertet.

In den Verlaufsmessungen ergaben sich lediglich geringe Veränderungen der beobachteten Prävalenz proliferationshemmender Antikörper. Auch im Verlauf konnten solche Antikörper vor allem bei Messung mit den HEP-G2-Zellen nachgewiesen werden.

Unter UDCS-Therapie nahm die Prävalenz proliferationshemmender Antikörper im Verlauf jeweils geringfügig ab, bei Messung mit den CHO-Zellen von 22% auf 6%, bei Messung mit den TFK-1-Zellen von 6% auf 0% und bei Messung mit den HEP-G2-Zellen von 100% auf 94%.

Bei den immunsuppressiv therapierten Patienten nahm die Prävalenz proliferationshemmender Antikörper im Verlauf bei Messung mit den CHO-Zellen bzw. mit den TFK-1-Zellen jeweils leicht zu von 6% auf 25% bzw. von 0% auf 6%. Bei Messung mit den HEP-G2-Zellen nahm sie leicht ab von 100% auf 94%.

Bei den nicht spezifisch therapierten Patienten wies lediglich bei Messung mit den CHO-Zellen ein Patient (25%) im Verlauf neu inhibierende Antikörper auf, ansonsten ergaben sich in dieser Patientengruppe keine Veränderungen. Die Ergebnisse in dieser Patientengruppe sind - wie auch bereits in Kapitel 5.2.1.2 ausgeführt - bei sehr kleiner Stichprobengröße (n = 4) nur bedingt aussagekräftig.

Die mediane Proliferationsrate zeigte unabhängig von der verwendeten Zelllinie bei keiner Patientengruppe eine signifikante Veränderung.

In Übereinstimmung mit den unter 5.2.1.2 diskutierten Ergebnissen der Verlaufsmessungen der funktionellen Antikörper-Aktivität änderten sich somit auch die proliferationshemmenden Antikörper-Reaktivitäten im Krankheitsverlauf nur wenig.

5.2.3 Diskussion der Korrelation von mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate

Wie in den Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 bereits diskutiert, wurde die Aktivität des mAChR3 bei den CHO-Zellen im mAChR3-Lumineszenz-Assay im Vergleich zu den anderen Zelllinien insgesamt nur wenig durch Anti-mAChR3-Antikörper beeinflusst und auch im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay zeigte sich nur eine geringe Beeinflussung der CHO-Zellen durch die Immunglobuline der PBC-Patienten. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate ließ sich nicht feststellen.

Mit den TFK-1-Zellen war im mAChR3-Lumineszenz-Assay bei einem großen Anteil der getesteten Immunglobulinfractionen eine Rezeptorinhibierung zu beobachten, jedoch zeigten die Immunglobuline bei dieser Zelllinie kaum Auswirkungen auf die Proliferationsrate. Auch hier ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen mAChR3-Aktivität und Proliferationsrate nachweisen.

Bei den HEP-G2-Zellen wirkten die getesteten Immunglobuline zu einem hohen Prozentsatz sowohl hemmend auf die Rezeptoraktivität, als auch hemmend auf die Proliferationsrate. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Rezeptorhemmung und Hemmung der Proliferationsrate konnte jedoch auch mit dieser Zelllinie nicht festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die insbesondere bei den Hepatozyten beobachtete Hemmung der Proliferation durch die untersuchten Immunglobulinfractionen über andere Mechanismen und nicht durch die festgestellten Anti-mAChR3-Antikörper vermittelt ist bzw. dass die Hemmung der Proliferation zumindest nicht direkt von der funktionellen Aktivität dieser Antikörper am mAChR3 abhängt.

5.3 Ausblick

In den hier durchgeführten Experimenten konnte das gehäufte Vorkommen von funktionell wirksamen Anti-mAChR3-Antikörpern bei PBC-Patienten durch Nachweis im mAChR3-Lumineszenz-Assay bestätigt werden. Dabei konnten mit Cholangiozyten und Hepatozyten bei deutlich mehr Patienten solche Antikörper nachgewiesen werden als mit den mAChR3 überexprimierenden CHO-Zellen. Es besteht offenbar eine organ- bzw. zelllinienspezifische Wirkung der nachgewiesenen Anti-mAChR3-Antikörper. Die Ursache für diese Zelllinienspezifität könnte neben Unterschieden in der Rezeptorexpression beispielsweise auch in organspezifischen Subtypen des mAChR3 oder organspezifischen Varianten der nachgeschalteten Signalwege liegen. Jedoch scheint auch der Zustand der Zelle und das intrazelluläre Milieu ein wichtiger Faktor bezüglich der Art und des Ausmaßes der Antikörperwirkung zu sein. Diese Faktoren sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Klinische Relevanz hätten zudem auch Studien, die an aus Biopsiematerial von PBC-Patienten gewonnenen Zellen durchgeführt werden. Aufgrund der festgestellten Zelllinienspezifität sowohl der funktionellen Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper, als auch der proliferationsmodulierenden Antikörperaktivität könnten hieraus validere Rückschlüsse auf die in vivo-Effekte der Anti-mAChR3-Antikörper bei an PBC erkrankten Menschen gewonnen werden. Neben PBC-Patienten könnten solche weiterführenden Studien auch andere Lebererkrankungen wie die primär sklerosierende Cholangitis und die autoimmune Hepatitis einschließen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten bei PBC-Patienten im Erkrankungsverlauf unter Verwendung von Cholangiozyten und Hepatozyten keine wesentlichen Veränderungen der Prävalenz und der Aktivität von funktionell aktiven und die Proliferation beeinflussenden Antikörpern festgestellt werden. Diese Ergebnisse erscheinen schlüssig in Hinblick darauf, dass auch bei den für die Erkrankung pathognomonischen AMA in der Literatur keine signifikanten Veränderungen im Krankheitsverlauf beschrieben werden (Van Norstrand et al. 1997; Benson et al. 2004; Tana et al. 2015). Dennoch wäre

auch eine Bestätigung dieser Ergebnisse mit aus Biopsiematerial von PBC-Patienten gewonnenen Zellen sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Die PBC ist eine chronische cholestatische Lebererkrankung, deren Ursachen und Pathomechanismen noch nicht genau geklärt sind. Sie geht mit einer autoimmun bedingten Zerstörung der kleinen intrahepatischen Gallengänge einher und kann in fortgeschrittenen Stadien zu einer Schädigung des gesamten Leberparenchyms bis hin zum Vollbild einer Leberzirrhose führen (Kaplan 1996).

Derzeitige Standardtherapie der PBC ist laut aktueller Leitlinie eine Dauertherapie mit UDCS (Strassburg et al. 2017). Aufgrund anderer assoziierter Autoimmunerkrankungen oder einer stattgehabten Lebertransplantation erhält jedoch ein Teil der PBC-Patienten zusätzlich zur UDCS-Therapie eine immunsuppressive Therapie.

Bei über 90% der PBC-Patienten sind Autoantikörper gegen mitochondriale Antigene (AMA) nachweisbar, die sehr spezifisch für die Erkrankung sind und daher große diagnostische Bedeutung haben (Kaplan 1996). 2010 wiesen Berg et al. bei PBC-Patienten erstmals auch Antikörper gegen ein rekombinantes Peptid des muskarinischen Acetylcholinrezeptors Typ 3 (Anti-mAChR3-Antikörper) nach.

Einige Studien haben gezeigt, dass solche Anti-mAChR3-Antikörper auch die Rezeptoraktivität beeinflussen können (Frischke 2013; Preuss et al. 2014a; Preuss et al. 2014b). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese funktionelle und die Proliferation beeinflussende Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper bei PBC-Patienten zu re-evaluieren und Änderungen in der Aktivität und Prävalenz der Antikörper im Krankheitsverlauf unter verschiedenen Therapieregimen zu analysieren.

Hierfür wurden Seren von 38 PBC-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. vor Therapiebeginn und im Verlauf der Erkrankung (ohne Therapie, n = 4; unter Therapie mit UDCS, n = 18; unter immunsuppressiver Therapie, n = 16) untersucht.

Um sicher zu sein, dass mögliche Effekte auf Antikörper und nicht andere Faktoren in den Patientenserum zurückzuführen sind, wurden aus allen Seren Immunglobuline durch Ammoniumsulfatfällung isoliert.

Die Untersuchung der aus den Seren isolierten Immunglobulinfraktionen erfolgte mit einer in der Literatur vorbeschriebenen, teilweise leicht modifizierten Lumineszenz-basierten Methode. Hierbei wurden neben mAChR3-überexprimierenden CHO-Zellen auch Cholangiozyten (TFK-1-Zellen) und Hepatozyten (HEP-G2-Zellen) eingesetzt.

Zudem wurde im selben Patientenkollektiv mittels eines ³H-Thymidin-basierten Proliferations-Assay auch die Prävalenz und Aktivität von die Zellproliferation beeinflussenden Antikörpern untersucht. Auch hier wurden entsprechende Verlaufsmessungen durchgeführt.

Es konnte besonders mit TFK-1-Zellen und HEP-G2-Zellen eine hohe Prävalenz von rezeptorinhibierenden Anti-mAChR3-Antikörpern von 84% bzw. 63% festgestellt werden. Ein kleiner Prozentsatz der Anti-mAChR3-Antikörper (5% bei den TFK-1-Zellen, 3% bei den HEP-G2-Zellen) zeigte zudem rezeptoraktivierende Aktivität. Mit den CHO-Zellen gelang der Antikörper-Nachweis überraschenderweise trotz der Überexpression des Rezeptors weniger sensitiv. Bei 63% der Patienten ließen sich mit dieser Zelllinie keine funktionell aktiven Anti-mAChR3-Antikörper nachweisen, bei 26% inhibierende und bei 11% aktivierende Antikörper.

Grund hierfür ist vermutlich eine Zell- bzw. Organspezifität der nachgewiesenen Anti-mAChR3-Antikörper, die beispielsweise auf zellspezifischen Subtypen des mAChR3 oder zellspezifischen Varianten der nachgeschalteten Signalwege beruhen könnte. Zudem scheint auch der Zustand der Zellen und das intrazelluläre Milieu Einfluss auf die Antikörperwirkung zu haben.

Im Verlauf der Erkrankung ergaben sich bei den Messungen mit TFK-1-Zellen und HEP-G2-Zellen unter keiner der Therapieformen signifikante Veränderungen der Antikörper-Aktivität am mAChR3 oder wesentliche Veränderungen der Antikörper-Prävalenz. Bei den weniger sensitiven Messungen mit CHO-Zellen ergab sich lediglich in der Gruppe der immunsupprimierten Patienten im Verlauf eine statistisch signifikante Zunahme der rezeptorinhibierenden Aktivität der Anti-mAChR3-Antikörper, in den übrigen beiden Gruppen ließen sich auch mit den CHO-Zellen keine signifikanten Veränderungen feststellen. Analog zu den für die Erkrankung

pathognomonischen AMA scheinen damit auch die funktionellen Anti-mAChR3-Antikörper im Krankheitsverlauf wenig Dynamik bezüglich ihrer Prävalenz und Aktivität zu zeigen.

Im ³H-Thymidin-Proliferations-Assay konnte hauptsächlich eine die Proliferation inhibierende Antikörperwirkung auf HEP-G2-Zellen gezeigt werden. Diese Zellen wurden durch die Antikörperfraktionen aller untersuchten Patientenseren in ihrer Proliferation gehemmt. Mit TFK-1-Zellen und CHO-Zellen war deutlich seltener eine Proliferationshemmung zu beobachten (3% bzw. 16%). Ob diese ebenfalls sehr organ- bzw. zellspezifisch die Proliferation inhibierende Wirkung durch Anti-mAChR3-Antikörper oder andere Antikörper aus den Seren der PBC-Patienten verursacht wurde, musste in dieser Arbeit offen bleiben. Im Krankheitsverlauf zeigte die proliferationsbeeinflussende Aktivität der Antikörper bei keiner Zelllinie und keiner Patientengruppe eine signifikante Veränderung. Angesichts der starken Zellspezifität der nachgewiesenen Antikörper könnten künftige Studien an aus Biopsiematerial von PBC-Patienten gewonnenen Cholangiozyten und Hepatozyten helfen, die mögliche pathogenetische Bedeutung der Antikörper besser zu verstehen. Diese Studien sollten nach Möglichkeit auch erneute Verlaufsmessungen beinhalten, um zu überprüfen, ob sich die hier gewonnenen Erkenntnisse an diesen Zellen bestätigen lassen.

Literaturverzeichnis

Ahrens, E. H., Jr., Payne, M. A., Kunkel, H. G., Eisenmenger, W. J. and Blondheim, S. H. (1950). "Primary biliary cirrhosis." *Medicine (Baltimore)* 29(4): 299-364.

Alvaro, D., Alpini, G., Jezequel, A. M., Bassotti, C., Francia, C., Fraioli, F., Romeo, R., Marucci, L., Le Sage, G., Glaser, S.S., Benedetti, A. (1997). "Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions." *J Clin Invest* 100(6): 1349-1362.

Angulo, P., Batts, K. P., Therneau, T. M., Jorgensen, R. A., Dickson, E. R. and Lindor, K. D. (1999). "Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* 29(3): 644-647.

Bacman, S., Perez Leiros, C., Sterin-Borda, L., Hubscher, O., Arana, R. and Borda, E. (1998). "Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjogren's syndrome." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(1): 151-156.

Benson G.D., Kikuchi K., Miyakawa H., Tanaka A., Watnik M.R., Gershwin M.E. (2004): "Serial analysis of antimitochondrial antibody in patients with primary biliary cirrhosis." *Clin Dev Immunol.* 11:129-133.

Berg, C.P., Blume, K., Lauber, K., Gregor, M., Berg, P.A., Wesselborg, S., Stein, G.M. (2010). "Autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptors found in patients with primary biliary cirrhosis." *BMC Gastroenterol* 10:120–7.

Berg, P.A. and Klein, R. (1992). "Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and other disorders: definition and clinical relevance." *Dig Dis* 10(2): 85-101.

Beuers, U., Gershwin, M. E., Gish, R. G., Invernizzi, P., Jones, D. E., Lindor, K., Ma, X., Mackay, I.R., Parés, A., Tanaka, A., Vierling, J.M., Poupon, R. (2015). "Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'." *Hepatology* 62(5): 1620-1622.

Boonstra, K., Beuers, U. and Ponsioen, C. Y. (2012). "Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review." *J Hepatol* 56(5): 1181-1188.

Bosch, A., Dumortier, J., Maucort-Boulch, D., Scoazec, J. Y., Wendum, D., Conti, F., Morard, I., Rubbia-Brandt, L., Terris, B., Radenne, S., Abenavoli, L., Poupon, R., Chazouillères, O., Calmus, Y., Boillot, O., Giostra, E., Corpechot, C. (2015). "Preventive administration of UDCA after liver transplantation for primary biliary cirrhosis is associated with a lower risk of disease recurrence." *J Hepatol* 63(6): 1449-1458.

Boyer, J. L. (1996). "Bile duct epithelium: frontiers in transport physiology." *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): G1-5.

Burdon, D., Patel, R., Challiss, R. A. and Blank, J. L. (2002). "Growth inhibition by the muscarinic M(3) acetylcholine receptor: evidence for p21(Cip1/Waf1) involvement in G(1) arrest." *Biochem J* 367(Pt 2): 549-559.

Calmus, Y., Gane, P., Rouger, P. and Poupon, R. (1990). "Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid." *Hepatology* 11(1): 12-15.

Cassiman D., Libbrecht L., Sinelli N., Desmet V., Denef C., Roskams T. (2002). "The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3." *Am J Pathol.* Aug;161(2):521-30.

Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J. (1998). "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." *Pharmacol Rev* 50(2): 279-290.

Chazouilleres, O. (2015). "Overlap Syndromes." *Dig Dis* 33 Suppl 2: 181-187.

Copaci, I., Micu, L., Iliescu, L. and Voiculescu, M. (2005). "New therapeutical indications of ursodeoxycholic acid." *Rom J Gastroenterol* 14(3): 259-266.

Culp, K. S., Fleming, C. R., Duffy, J., Baldus, W. P. and Dickson, E. R. (1982). "Autoimmune associations in primary biliary cirrhosis." *Mayo Clin Proc* 57(6): 365-370.

De Sarno, P., Shestopal, S. A., King, T. D., Zmijewska, A., Song, L. and Jope, R. S. (2003). "Muscarinic receptor activation protects cells from apoptotic effects of DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial inhibition." *J Biol Chem* 278(13): 11086-11093.

Do Carmo, A., Balca-Silva, J., Matias, D. and Lopes, M. C. (2013). "PKC signaling in glioblastoma." *Cancer Biol Ther* 14(4): 287-294.

Dyson, J. K., Wilkinson, N., Jopson, L., Mells, G., Bathgate, A., Heneghan, M. A., Neuberger, J., Hirschfield, G.M., Ducker, S.J.; UK-PBC Consortium, Sandford, R., Alexander, G., Stocken, D., Jones, D.E. (2016). "The inter-relationship of symptom severity and quality of life in 2055 patients with primary biliary cholangitis." *Aliment Pharmacol Ther.*

Floreani, A., Franceschet, I., Cazzagon, N., Spinazze, A., Buja, A., Furlan, P., Baldo, V., Gershwin, M.E. (2015). "Extrahepatic autoimmune conditions associated with primary biliary cirrhosis." *Clin Rev Allergy Immunol* 48(2-3): 192-197.

Floreani, A. and Mangini, C. (2017). "Primary biliary cholangitis: Old and novel therapy." *Eur J Intern Med*.

Frischke, S. (2013): "Einfluss von Immunglobulinen auf die Funktionalität des M3-Rezeptors in Cholangiozyten und Hepatozyten, sowie auf deren Zellproliferation." Masterarbeit.

Gautam, D., Jeon, J., Starost, M. F., Han, S. J., Hamdan, F. F., Cui, Y., Parlow, A.F., Gavrilova, O., Szalayova, I., Mezey, E., Wess, J. (2009). "Neuronal M3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(15): 6398-6403.

Goldblatt, J., James, O. F. and Jones, D. E. (2001). "Grip strength and subjective fatigue in patients with primary biliary cirrhosis." *JAMA* 285(17): 2196-2197.

Grando, S. A., Horton, R. M., Pereira, E. F., Diethelm-Okita, B. M., George, P. M., Albuquerque, E. X., Conti-Fine, B.M. (1995). "A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 105(6): 774-781.

Griffiths, L., Dyson, J. K. and Jones, D. E. (2014). "The new epidemiology of primary biliary cirrhosis." *Semin Liver Dis* 34(3): 318-328.

Grover, V. P., Southern, L., Dyson, J. K., Kim, J. U., Crossey, M. M., Wylezinska-Arridge, M., Patel, N., Fitzpatrick, J.A., Bak-Bol, A., Waldman, A.D., Alexander, G.J., Mells, G.F., Chapman, R.W., Jones, D.E., Taylor-Robinson, S.D. (2016). "Early primary biliary cholangitis is characterised by brain abnormalities on cerebral magnetic resonance imaging." *Aliment Pharmacol Ther* 44(9): 936-945.

Gutcher, I., Webb, P. R. and Anderson, N. G. (2003). "The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C." *Cell Mol Life Sci* 60(6): 1061-1070.

Hirschfield, G. M. and Gershwin, M. E. (2013). "The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis." *Annu Rev Pathol* 8: 303-330.

Hollingsworth, K. G., Jones, D. E., Taylor, R., Frith, J., Blamire, A. M. and Newton, J. L. (2010). "Impaired cerebral autoregulation in primary biliary cirrhosis: implications for the pathogenesis of cognitive decline." *Liver Int* 30(6): 878-885.

Hollingsworth, K. G., Newton, J. L., Taylor, R., McDonald, C., Palmer, J. M., Blamire, A. M., Jones, D.E. (2008). "Pilot study of peripheral muscle function in primary biliary cirrhosis: potential implications for fatigue pathogenesis." *Clin Gastroenterol Hepatol* 6(9): 1041-1048.

Jopson, L. and Jones, D. E. (2015). "Fatigue in Primary Biliary Cirrhosis: Prevalence, Pathogenesis and Management." *Dig Dis* 33 Suppl 2: 109-114.

Juran, B. D. and Lazaridis, K. N. (2014). "Environmental factors in primary biliary cirrhosis." *Semin Liver Dis* 34(3): 265-272.

Kaplan, M. M. (1996). "Primary biliary cirrhosis." *N Engl J Med* 335(21): 1570-1580.

Kendall, J. M. and Badminton, M. N. (1998). "Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era." *Trends Biotechnol* 16(5): 216-224.

Kikuchi, K., Lian, Z. X., Yang, G. X., Ansari, A. A., Ikehara, S., Kaplan, M., Miyakawa, H., Coppel, R.L., Gershwin, M.E. (2005). "Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis." *Gastroenterology* 128(2): 304-312.

Koo, N. Y., Li, J., Hwang, S. M., Choi, S. Y., Lee, S. J., Oh, S. B., Kim, J.S., Lee, E.B., Song, Y.W., Park, K. (2008). "Functional epitope of muscarinic type 3 receptor which interacts with autoantibodies from Sjogren's syndrome patients." *Rheumatology (Oxford)* 47(6): 828-833.

Kostenis, E., Zeng, F. Y. and Wess, J. (1999). "Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins." *Life Sci* 64(6-7): 355-362.

Koulentaki, M., Ioannidou, D., Stefanidou, M., Maraki, S., Drigiannakis, I., Dimoulios, P., Melono, J.M., Tosca, A., Kouroumalis, E.A. (2006). "Dermatological manifestations in primary biliary cirrhosis patients: a case control study." *Am J Gastroenterol* 101(3): 541-546.

Kremer, A. E., Namer, B., Bolier, R., Fischer, M. J., Oude Elferink, R. P. and Beuers, U. (2015). "Pathogenesis and Management of Pruritus in PBC and PSC." *Dig Dis* 33 Suppl 2: 164-175.

Laurin, J. M., DeSotel, C. K., Jorgensen, R. A., Dickson, E. R. and Lindor, K. D. (1994). "The natural history of abdominal pain associated with primary biliary cirrhosis." *Am J Gastroenterol* 89(10): 1840-1843.

LeSage, G., Alvaro, D., Benedetti, A., Glaser, S., Marucci, L., Baiocchi, L., Eisel, W., Caligiuri, A., Phinizy, J.L., Rodgers, R., Francis, H., Alpini, G. (1999). "Cholinergic system modulates growth, apoptosis, and secretion of cholangiocytes from bile duct-ligated rats." *Gastroenterology* 117(1): 191 – 199.

Li, J. H., Gautam, D., Han, S.-J., Guettier, J.-M., Cui, Y., Lu, H., Deng, C., O'Hare, J., Jou, W., Gavrilova, O., Buettner, C., Wess, J. (2009). "Hepatic

Muscarinic Acetylcholine Receptors Are Not Critically Involved in Maintaining Glucose Homeostasis in Mice." *Diabetes*, 58(12), 2776–2787.

Lindor, K. D., Gershwin, M. E., Poupon, R., Kaplan, M., Bergasa, N. V., Heathcote, E. J., American Association for Study of Liver Diseases (2009). "Primary biliary cirrhosis." *Hepatology* 50(1): 291-308.

Lindstrom, J. (1997). "Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease." *Mol Neurobiol* 15(2): 193-222.

Lleo, A., Jepsen, P., Morengi, E., Carbone, M., Moroni, L., Battezzati, P. M., Podda, M., Mackay, I.R., Gershwin, M.E., Invernizzi, P. (2016). "Evolving Trends in Female to Male Incidence and Male Mortality of Primary Biliary Cholangitis." *Sci Rep* 6: 25906.

Loewi, O. (1921). "Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. II. Mitteilung." *Pflügers Arch Ges Physiol*. 193: 201–213.

Ludwig, J., Dickson, E. R. and McDonald, G. S. (1978). "Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)." *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 379(2): 103-112.

Marczinovits, I., Kovacs, L., Gyorgy, A., Toth, G. K., Dorgai, L., Molnar, J., Pokorny, G. (2005). "A peptide of human muscarinic acetylcholine receptor 3 is antigenic in primary Sjogren's syndrome." *J Autoimmun* 24(1): 47-54.

Minagawa, N., Nagata, J., Shibao, K., Masyuk, A. I., Gomes, D. A., Rodrigues, M. A., Lesage, G., Akiba, Y., Kaunitz, J.D., Ehrlich, B.E., Larusso, N.F., Nathanson, M.H. (2007). "Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile." *Gastroenterology*, 133(5), 1592–1602.

Mizuno, N. and Itoh, H. (2009). "Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways." *Neurosignals* 17(1): 42-54.

Molinaro, A. and Marschall, H. U. (2017). "Why Doesn't Primary Biliary Cholangitis Respond to Immunosuppressive Medications?" *Curr Hepatol Rep* 16(2): 119-123.

Mutimer, D. J., Fussey, S. P., Yeaman, S. J., Kelly, P. J., James, O. F. and Bassendine, M. F. (1989). "Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* 10(4): 403-407.

Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa, S., Matsumoto, N., Nakamura, K., Manabe, T., Taketo, M.M., Mikoshiba K. (2004). "M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice." *J Physiol* 558(Pt 2): 561-575.

Nakanuma, Y., Zen, Y., Harada, K., Sasaki, M., Nonomura, A., Uehara, T., Sano, K., Kondo, F., Fukusato, T., Tsuneyama, K., Ito, M., Wakasa, K., Nomoto, M., Minato, H., Haga, H., Kage, M., Yano, H., Haratake, J., Aishima, S., Masuda, T., Aoyama, H., Miyakawa-Hayashino, A., Matsumoto, T., Sanefuji, H., Ojima, H., Chen, T.C., Yu, E., Kim, J.H., Park, Y.N., Tsui, W. (2010). "Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement." *Pathol Int* 60(3): 167-174.

Nathanson, M. H., Burgstahler, A. D., Mennone, A. and Boyer, J. L. (1996). "Characterization of cytosolic Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia." *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): G86-96.

Nevens, F., Andreone, P., Mazzella, G., Strasser, S. I., Bowlus, C., Invernizzi, P., Drenth, J.P., Pockros, P.J., Regula, J., Beuers, U., Trauner, M., Jones, D.E., Floreani, A., Hohenester, S., Luketic, V., Shiffman, M., van Erpecum, K.J., Vargas, V., Vincent, C., Hirschfield, G.M., Shah, H., Hansen, B., Lindor, K.D., Marschall, H.U., Kowdley, K.V., Hooshmand-Rad, R., Marmon, T., Sheeron, S., Pencek, R., MacConell, L., Pruzanski M., Shapiro, D.; POISE Study Group (2016). "A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis." *N Engl J Med* 375(7): 631-643.

Nicke, B., Detjen, K. and Logsdon, C. D. (1999). "Muscarinic cholinergic receptors activate both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells." *J Biol Chem* 274(31): 21701-21706.

Pares, A., Caballeria, L. and Rodes, J. (2006). "Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid." *Gastroenterology* 130(3): 715-720.

Park, K., Park, S. and Jackson, M. W. (2013). "The inhibitory effects of antimuscarinic autoantibodies in the sera of primary Sjogren syndrome patients on the gastrointestinal motility." *Mol Immunol* 56(4): 583-587.

Patel, A. and Seetharam, A. (2016). "Primary Biliary Cholangitis: Disease Pathogenesis and Implications for Established and Novel Therapeutics." *J Clin Exp Hepatol* 6(4): 311-318.

Poupon R.E., Bonnand A.M., Chrétien Y., Poupon R. (1999). "Ten-year survival in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group." *Hepatology*. Jun;29(6):1668-71.

Preuss, B., Frischke, S., Klein, R. (2014a). "Expression des muskarinischen Acetylcholinrezeptors M3 (M3AChR) auf humanen Cholangiozyten und Einfluss von humanen Immunglobulinen auf die Rezeptoraktivität und die Zellproliferation." *Z. Gastroenterol.* 52: 81 (Abstract).

- Preuss, B., Tunaru, S., Henes, J., Offermanns, S. and Klein, R. (2014b). "A novel luminescence-based method for the detection of functionally active antibodies to muscarinic acetylcholine receptors of the M3 type (mAChR3) in patients' sera." *Clin Exp Immunol* 177(1): 179-189.
- Priester, S., Wise, C, and Glaser, S.S. (2010). "Involvement of cholangiocyte proliferation in biliary fibrosis." *World J Gastrointest Pathophysiol.* Jun 15; 1(2): 30–37.
- Prince, M. I., Chetwynd, A., Craig, W. L., Metcalf, J. V. and James, O. F. (2004). "Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort." *Gut* 53(6): 865-870.
- Proctor, G. B. and Carpenter, G. H. (2007). "Regulation of salivary gland function by autonomic nerves." *Auton Neurosci* 133(1): 3-18.
- Purohit, T. and Cappell, M. S. (2015). "Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy." *World J Hepatol* 7(7): 926-941.
- Qin, K., Dong, C., Wu, G. and Lambert, N. A. (2011). "Inactive-state preassembly of G(q)-coupled receptors and G(q) heterotrimers." *Nat Chem Biol* 7(10): 740-747.
- Rhee, S. G. (2001). "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Annu Rev Biochem* 70: 281-312.
- Rishe, E., Azarm, A. and Bergasa, N. V. (2008). "Itch in primary biliary cirrhosis: a patients' perspective." *Acta Derm Venereol* 88(1): 34-37.
- Saibil, S. D., Jones, R. G., Deenick, E. K., Liadis, N., Elford, A. R., Vainberg, M. G., Baerg, H., Woodgett, J.R., Gerondakis, S., Ohashi, P.S. (2007). "CD4+ and CD8+ T cell survival is regulated differentially by protein kinase C θ , c-Rel, and protein kinase B." *J Immunol* 178(5): 2932-2939.
- Saijo, K., Mecklenbrauker, I., Schmedt, C. and Tarakhovsky, A. (2003). "B cell immunity regulated by the protein kinase C family." *Ann N Y Acad Sci* 987: 125-134.
- Scheuer, P. (1967). "Primary biliary cirrhosis." *Proc R Soc Med* 60(12): 1257-1260.
- Selmi, C., Mayo, M. J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R. G., Gordon, S.C., Wright, H.I., Zweiban, B., Podda, M., Gershwin, M.E. (2004). "Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment." *Gastroenterology* 127(2): 485-492.

Shafer, S. H. and Williams, C. L. (2004). "Elevated Rac1 activity changes the M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of proliferation to induction of cell death." *Mol Pharmacol* 65(5): 1080-1091.

Smyk, D., Cholongitas, E., Kriese, S., Rigopoulou, E. I. and Bogdanos, D. P. (2011). "Primary biliary cirrhosis: family stories." *Autoimmune Dis* 2011: 189585.

Solerio, E., Isaia, G., Innarella, R., Di Stefano, M., Farina, M., Borghesio, E., Framarin, L., Rizzetto, M., Rosina, F. (2003). "Osteoporosis: still a typical complication of primary biliary cirrhosis?" *Dig Liver Dis* 35(5): 339-346.

Soros, P., Bottcher, J., Maschek, H., Selberg, O. and Muller, M. J. (1998). "Lipoprotein-X in patients with cirrhosis: its relationship to cholestasis and hypercholesterolemia." *Hepatology* 28(5): 1199-1205.

Strassburg, C.P., Beckebaum, S., Geier, A., Gotthardt, D., Klein, R., Melter, M., Schott, E., Spengler, U., Tacke, F., Trauner, M., Weiler-Normann, C., Weismüller, T.J., Tannapfel, A., Tischendorf, J.J., Schramm, C. (2017). "S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen." Retrieved 27.01.2019, from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-0271_S2k_Autoimmune_Lebererkrankungen_2017-11.pdf.

Sun, Y., Zhang, W., Evans, J. F., Floreani, A., Zou, Z., Nishio, Y., Qi, R., Leung, P.S., Bowlus, C.L., Gershwin, M.E. (2016). "Autotaxin, Pruritus and Primary Biliary Cholangitis (PBC)." *Autoimmun Rev* 15(8): 795-800.

Tana M.M., Shums Z., Milo J., Norman G.L., Leung P.S., Gershwin M.E., Nouredin, M., Kleiner, D.E., Zhao, X., Heller, T., Hoofnagle, J.H. (2015). "The Significance of Autoantibody Changes Over Time in Primary Biliary Cirrhosis." *Am J Clin Pathol*. Oct;144(4):601-6.

Tobin, A. B. and Budd, D. C. (2003). "The anti-apoptotic response of the Gq/11-coupled muscarinic receptor family." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1182-1185.

Van Norstrand M.D., Malinchoc M., Lindor K.D., Therneau T.M., Gershwin M.E., Leung P.S., Dickson, E.R., Homburger, H.A. (1997). „Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression.“ *Hepatology* 25: 6-11.

Wang, J. J., Yang, G. X., Zhang, W. C., Lu, L., Tsuneyama, K., Kronenberg, M., Véla, J.L., Lopez-Hoyos, M., He, X.S., Ridgway, W.M., Leung, P.S., Gershwin, M.E. (2014). "Escherichia coli infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice." *Clin Exp Immunol* 175(2): 192-201.

Waterman, S. A., Gordon, T. P. and Rischmueller, M. (2000). "Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjogren's syndrome." *Arthritis Rheum* 43(7): 1647-1654.

Webb, G. J., Siminovitch, K. A. and Hirschfield, G. M. (2015). "The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: A comprehensive review." *J Autoimmun* 64: 42-52.

Wendum, D., Boelle, P. Y., Bedossa, P., Zafrani, E. S., Charlotte, F., Saint-Paul, M. C., Michalak, S., Chazouillères, O., Corpechot, C. (2015). "Primary biliary cirrhosis: proposal for a new simple histological scoring system." *Liver Int* 35(2): 652-659.

Witt-Sullivan, H., Heathcote, J., Cauch, K., Blendis, L., Ghent, C., Katz, A., Milner, R., Pappas, S.C., Rankin, J., Wanless, I.R. (1990). "The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada." *Hepatology* 12(1): 98-105.

Yan, G. M., Lin, S. Z., Irwin, R. P. and Paul, S. M. (1995). "Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons." *Mol Pharmacol* 47(2): 248-257.

Yanamadala, V., Negoro, H. and Denker, B. M. (2009). "Heterotrimeric G proteins and apoptosis: intersecting signaling pathways leading to context dependent phenotypes." *Curr Mol Med* 9(5): 527-545.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, im Immunpathologischen Labor unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein durchgeführt.

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

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Beate Preuß und Sarai Frischke) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Dossenheim, den 08.04.2019

Christian Tim Mayer

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Reinhild Klein bedanken, die mir die Anfertigung dieser Doktorarbeit im Immunpathologischen Labor ermöglichte und mir während der gesamten Zeit stets sehr geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand. Unsere zahlreichen Gespräche waren für mich auf fachlicher und persönlicher Ebene eine große Bereicherung und Motivation.

Mein Dank gilt des Weiteren Frau Dr. Beate Preuß und Sarai Frischke für die Einweisung in die Geräte und Methoden des Immunpathologischen Labors und den stets interessanten und ergiebigen fachlichen Austausch in unseren regelmäßigen Besprechungen. Ebenso möchte ich allen weiteren MitarbeiterInnen des Immunpathologischen Labors für die Unterstützung, die freundliche Zusammenarbeit und die immer sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken.