

Aus dem
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F. Boege

Durchflusszytometrischer Nachweis
kardiopathogener Autoantikörper
gegen den β_1 -Adrenorezeptor

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Thomas Benninghaus

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. F. Boege

Zweitgutachter: PD Dr. B. Stork

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bornholz B, Benninghaus T, Reinke Y, Felix SB, Roggenbuck D, Jahns-Boivin V, Jahns R, Boege F (2016). A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of β_1 -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Clin Chem Lab Med.* **54**: 683-691.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Ziel der Arbeit.....	4
Material und Methoden.....	5
Zellkultur.....	5
Patientenproben.....	5
Proben, Standards und Kontrollen.....	6
Messverfahren.....	7
Statistik.....	7
Ergebnisse.....	9
Fluoreszenzmikroskopie.....	9
Durchflusszytometrische Messungen.....	10
Validierung des Nachweisverfahrens.....	11
Gütekriterien des Nachweisverfahrens.....	12
Autoantikörper und echokardiographische Befunde.....	13
Diskussion.....	15
Zusammenfassung.....	19
Abkürzungsverzeichnis.....	20
Literaturverzeichnis.....	21
Danksagung.....	27
Eidesstattliche Versicherung.....	28

Einleitung

Herzinsuffizienz war im Jahr 2014 die häufigste Hauptdiagnose stationärer Krankenhausbehandlungen (Statistisches Bundesamt, 2015a) und die vierthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015b). Die häufigste nicht-ischämische Ursache einer chronischen Herzinsuffizienz ist die Dilatative Kardiomyopathie (DCM), die durch eine ventrikuläre Dilatation und ein eingeschränktes ventrikuläres Kontraktionsvermögen gekennzeichnet ist. Die Prognose dieser Erkrankung ist bei progredientem Verlauf ungünstig; etwa ein Drittel der Patienten stirbt an plötzlichem Herztod. DCM ist die Hauptindikation für eine Herztransplantation (Manolio *et al.*, 1992).

Seit drei Jahrzehnten werden für die idiopathische Form der DCM autoimmune Pathomechanismen diskutiert (Wallukat *et al.*, 1987; Limas *et al.*, 1989). Zu den Zielstrukturen kardiopathogener Autoantikörper gehören unter anderem transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wie der β_1 -Adrenorezeptor (Limas *et al.*, 1990; Wallukat *et al.*, 1991; Jahns *et al.* 2004; Wallukat und Schimke, 2014). Für Autoantikörper gegen den β_1 -Adrenorezeptor konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass diese bei den immunisierten Tieren eine hochgradige progressive linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion hervorrufen. Infusionen von Proben erkrankter Tiere in gesunde Tiere führen bei diesen ebenfalls zu einem kardiomyopathischen Phänotyp (Jahns *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2004; Buvall *et al.*, 2006; Jane-Wit *et al.*, 2007). Beim Menschen gibt es eine Assoziation zwischen agonistischen β_1 -Adrenorezeptor-Antikörpern und der DCM (Jahns *et al.*, 2006; Störk *et al.*, 2006; Dandel *et al.*, 2012). Diese Antikörper eignen sich als unabhängiger prädikativer Biomarker für den plötzlichen Herztod (Iwata *et al.*, 2001). Agonistische β_1 -Adrenorezeptor-Antikörper finden sich ebenfalls bei 10-15% der Patienten mit einer Ischämischen Kardiomyopathie (Jahns *et al.*, 1999a) sowie bei bis zu 12% gesunder Probanden (Jahns *et al.*, 1999b; Liu *et al.*, 1999; Bornholz *et al.*, 2013). Die durchgeführten Studien zur Prävalenz von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper bei DCM-Patienten und

gesunden Probanden liefern Ergebnisse zwischen 26% (Jahns *et al.*, 1999b) und 95% (Wallukat *et al.*, 1991), was auf die verschiedenen, nicht standardisierten Nachweisverfahren für Autoantikörper zurückzuführen ist. Für andere kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit dem Auftreten von funktionellen Autoantikörpern gegen GPCR assoziiert sind, wie z. B. für die Peripartale Kardiomyopathie, finden sich bislang keine Angaben zur Prävalenz von Autoantikörpern (Wallukat und Schimke, 2014).

Neue Therapiestrategien bei DCM richten sich spezifisch gegen die kardiopathogenen β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper. Agonistischen Autoantikörpern gegen extrazelluläre Domänen des β_1 -Adrenorezeptors kommt eine kausale Funktion bei der Entstehung linksventrikulärer Dysfunktion zu (Freedman und Lefkowitz, 2004). Daher sind diese Autoantikörper *Targets* möglicher Therapieansätze. Dies sind die extrakorporale Immunabsorption (Felix *et al.*, 2002; Staudt *et al.* 2005; Patel und Hernandez, 2013; Dandel *et al.*, 2013) sowie die Neutralisation der β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper durch systemische Gabe von synthetischen β_1 -Adrenorezeptor-mimetischen Epitopen (Haberland *et al.*, 2011; Münch *et al.*, 2012; Haberland *et al.*, 2014; Boivin *et al.*, 2015). Patienten mit einer DCM und einer reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion profitieren von diesen Therapiestrategien nur dann, wenn bei ihnen β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper nachgewiesen werden können (Patel und Hernandez, 2013; Dandel *et al.*, 2013). Für die erfolgreiche Anwendung dieser neuen Therapiestrategien ist daher eine Labordiagnostik erforderlich, die es ermöglicht, die β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-Titer der Patienten spezifisch und mit hoher Sensitivität frühzeitig zu identifizieren, um so die Therapieindikation zu stellen. Weiterhin kann ein Therapiemonitoring durch die Bestimmung der Autoantikörpertiter unter der Therapie überprüft werden. Auch nach Beendigung der Therapie ist eine regelmäßige Kontrolle sinnvoll, um die Indikation zur Wiederholung der Therapie zu stellen.

Eine geeignete Diagnostik zum Nachweis von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern ist derzeit nicht verfügbar, da die β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper sich gegen den zweiten extrazellulären *Loop* des Rezeptors richten, der eine extrazelluläre α -Helix ausbildet (Cherezov *et al.*, 2007). Die kardiopathogenen Autoantikörper binden an bestimmte Konformationen dieser Struktur und induzieren oder stabilisieren dadurch eine aktive oder aktivierte Konformation im Rezeptormolekül (Bornholz *et al.*, 2013). Da die β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper an ein konformationales Epitop des β_1 -Adrenorezeptors in der Zellmembran der intakten Zelle binden, ist eine Kreuzreaktion mit linearen mimetischen Peptiden oder denaturierten Varianten der Zieldomäne nur schwach ausgeprägt (Jahns *et al.*, 1999b; Bornholz *et al.*, 2013; Bornholz *et al.*, 2014). Folglich korrelieren Messungen, die auf der Antikörper-Bindung an lineare Peptidhomologe der Zieldomäne basieren, auch nur schwach mit Messungen, die eine Antikörperbindung an den nativen β_1 -Adrenorezeptor verwenden (Jahns *et al.*, 1999b; Jahns *et al.*, 2000; Bornholz *et al.*, 2013). Daher sind peptidbasierte Immunassays derzeit nicht als prädikative diagnostische Methode zum Nachweis klinisch relevanter β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper anzusehen (Jahns *et al.*, 2015; Bornholz *et al.*, 2014; Jahns *et al.*, 2006).

Ziel der Arbeit

Ein neues Nachweisverfahren für Autoantikörper gegen den β_1 -Adrenorezeptor kann möglicherweise die bestehende diagnostische Lücke in der Früherkennung von Autoantikörpern schließen. Dieses nutzt dabei im Gegensatz zu Festphasen-Immunassays, die mit linearen Peptidhomologen aus der Zieldomäne des Rezeptors arbeiten, den gesamten Rezeptor als Antigen. Das Verfahren basiert auf der durchflusszytometrischen Messung nativer humaner Fibrosarkomzellen, die ein fluoreszenzmarkiertes Konstrukt des β_1 -Adrenorezeptors stabil überexprimieren. Der überexprimierte Rezeptor dient als Antigen mit adäquater Repräsentation des konformationellen Epitopes. Auf diese Weise soll das Verfahren ebenso wie funktionelle Assays zwischen Patienten mit einer DCM und gesunden Probanden unterscheiden.

Material und Methoden

Zellkultur

Es wurden humane Fibrosarkomzellen HT1080 (# DSMZ ACC 315, Braunschweig) verwendet, die ein C-terminal mit *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) markiertes Konstrukt des humanen β_1 -Adrenorezeptors stabil überexprimieren. Die verwendeten Zelllinien wurden als subkonfluente *Monolayer* bei 37 °C in humider Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt in Wachstumsmedium (DMEM *high glucose*, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin [Gibco/ Invitrogen]) kultiviert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mit 0,6 µg/ml Puromycin (Sigma, St. Louis, USA). Beim Passagieren wurden die Zellen nach Abnehmen des überstehenden Kulturmediums zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit EDTA (0,5 ml; 625 µM in PBS; 5 Minuten) abgelöst und in einer 1:6-Verdünnung mit Kulturmedium alle zwei Tage in Zellkulturflaschen (25 cm²) wieder ausgesät. Die für die Messungen verwendeten transfizierten Zellklone exprimierten 2-3 Millionen β_1 -adrenerge Bindungsstellen pro Zelle. Die Expression war über 50 Passagen stabil. Die interpassagere Varianz betrug $\pm 20\%$. Die Wildtyp-Zellen (HT1080) hatten keine β_1 -Adrenorezeptoren auf der Oberfläche und 200 ± 80 β_2 -Adrenorezeptoren pro Zelle. Der Anteil der endogenen β_2 -Adrenorezeptoren auf der Zelloberfläche an allen β -adrenergen Bindungsstellen betrug weniger als 0,01%. Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit einem inversen Mikroskop ausgestattet mit einer *Charge-Coupled-Device*-Kamera aufgenommen. Die lebenden Zellen wurden zur Untersuchung in CO₂-unabhängigem Medium (20% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1% GlutaMAX-I [Gibco/ Invitrogen]) bei 37 °C kultiviert und beobachtet.

Patientenproben

Das Probenmaterial wurde bei Nachuntersuchungen von Patienten mit einer DCM (n = 41, m:w = 9:1, Alter: 35-73 Jahre, Median: 54 Jahre, NYHA III-IV) am Universitätsklinikum Greifswald gewonnen (Reg.-Nr. des Ethikvotums der Ärzte-

kammer Mecklenburg-Vorpommern: III UV 34/04). Die Proben wurden zufällig ausgewählt. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter leitliniengerechter Therapie seit mehr als drei Monaten klinisch stabil. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) lag zwischen 18% und 38% (Median: 30%) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) lag zwischen 52 mm und 75 mm (Median: 69 mm). Ausschlusskriterien waren aktive Infektionen, bekannte Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen, Alkoholabhängigkeit und/ oder Herzinsuffizienz bekannter Ursache. Eine Koronare Herzerkrankung sowie eine akute Myokarditis wurden koronarangiographisch sowie bei entsprechender Indikation (nach Dallas-Kriterien; Aretz, 1986) durch Myokardbiopsie ausgeschlossen. Als Referenz dienten Proben von gesunden Probanden (n = 49, gleiche Alters- und Geschlechtsverteilung) ohne klinische Symptome einer Herzerkrankung, mit unauffälligem echokardiographischem Befund und/ oder normwertigen Plasmaspiegeln von Troponin I und NT-pro-BNP.

Proben, Standards und Kontrollen

Humane Plasma- und Serumproben wurden bei -20 °C für ein Jahr aufbewahrt. Die benötigten IgG-Fractionen wurden aus den Proben durch Mikroaffinitätschromatographie (Protein A/G Agarose plus, Pierce, Rockford, IL, USA) aufgereinigt, der pH-Wert auf 8 eingestellt und die IgG-Fractionen bei -20 °C gelagert. Als Positivkontrolle für IgG gegen ein extrazelluläres Epitop des humanen β_1 -Adrenorezeptor dienten polyklonale Kaninchen-Antikörper (Bioss, Biotrend, Köln), die eine Kreuzreaktion mit der N-terminalen Domäne des humanen β_1 -Adrenorezeptors zeigen. Als Positivkontrolle für DCM-assoziierte humane β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper dienten vereinigte IgG-Fractionen von DCM-Patienten, für die bereits gezeigt wurde, dass diese große Mengen an agonistischen β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern enthalten (Nikolaev *et al.*, 2007; Bornholz *et al.*, 2013). Als Negativkontrolle wurden vereinigte IgG-Fractionen von gesunden Probanden (Privigen, CSL Plasma, Marburg) verwendet, für die

bereits gezeigt wurde, dass diese frei von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern sind (Bornholz *et al.*, 2013).

Messverfahren

Für die Messung der IgG-Bindung an native β_1 -Adrenorezeptor wurden HT1080-Zellen, die YFP-markierte humane β_1 -Adrenorezeptoren überexprimieren, und Wildtyp-Zellen auf 24-*well*-Platten im Verhältnis 1:1 kokultiviert, bis eine Konfluenz von 80% erreicht war. Anschließend wurden die Zellen mit den zu testenden IgG-Fraktionen für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen mit Accutase (Sigma-Aldrich, München) wurden die gebundenen humanen IgG mit Alexa Fluor 647 (AF647) markierten Sekundärantikörpern (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS CANTO II, Software: FACSDiva 6.0, Becton & Dickinson, Heidelberg). Dabei erfolgte die Fluoreszenzanregung mit den Wellenlängen 488 nm (grün) und 633 nm (rot) und die Messung bei 515 nm (YFP) und bei 647 nm (AF647). Es wurden mediane Fluoreszenzintensitäten von über 10^5 Events pro Messung erfasst. Die Auswahl („*Gaten*“) der Zellpopulation intakter Einzelzellen bei den durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mittels Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC). Die Differenzierung zwischen β_1 -Adrenorezeptor-positiven und -negativen Zellen erfolgte anhand des 99%-Konfidenzintervalls der bimodalen logarithmischen Normalverteilung der grünen Fluoreszenzintensität (s. Abbildung 2, S. 9). Die IgG-Bindung an die beiden Zellpopulationen wurde aus dem Median der roten Fluoreszenzintensität als stetige Variable abgeleitet. IgG-Konzentrationen, Troponin I und NT-pro-BNP wurden mittels labormedizinischer Routineverfahren bestimmt.

Statistik

Ergebnisse stetiger Variablen sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA) wurde für lineare Regressionsanalysen, Signifikanztests (Shapiro-Wilk-Test, Mann-

Whitney-U-Test) und *Receiver Operator Characteristics* (ROC) verwendet. *p*-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Ergebnisse

Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 1 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder einer Zellmischung (1:1) von HT1080-Zellen, die 2-3 Millionen YFP-markierte β_1 -Adrenorezeptor pro Zelle stabil überexprimieren, und nativen HT1080-Zellen ohne β_1 -Adrenorezeptor. Die Mischung dieser Zellen wurde mit IgG-Fraktionen von DCM-Patienten inkubiert, für die ein positiver β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-Nachweis vorlag (Bornholz *et al.*, 2013). In den Zellen, die den YFP-markierten β_1 -Adrenorezeptor überexprimieren, ist das antikörperabhängige Fluoreszenzsignal (rot) mit der Fluoreszenz des YFP (grün) an den überexprimierten β_1 -Adrenorezeptor an der Zelloberfläche kolokalisiert. Die β_1 -Adrenorezeptor-negativen, nativen HT1080-Zellen (Pfeile) zeigen hingegen keine β_1 -Adrenorezeptor-abhängige YFP-Fluoreszenz an der Zelloberfläche und wurden durch die fluoreszenzmarkierten β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper der DCM-Patienten kaum gefärbt.

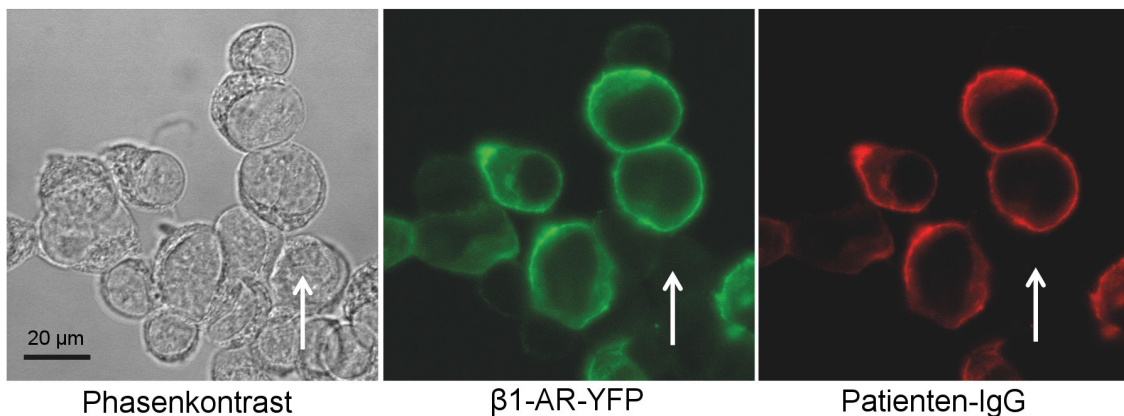


Abbildung 1: Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopische Bilder. Zellmischung (1:1) von Wildtyp (Pfeil)- und β_1 -Adrenorezeptor-YFP-überexprimierenden HT1080-Zellen, inkubiert mit 0,3 g/L IgG von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-positiven DCM-Patienten und AF647-markierten anti-IgG. Grün: Rezeptor. Rot: rezeptorgebundene IgG. Die Skalierung in der linken Abbildung gilt für alle drei Bilder. (vgl. Bornholz *et al.*, 2016)

Durchflusszytometrische Messungen

Abbildung 2 zeigt die repräsentative Darstellung durchflusszytometrisch gemessener Fluoreszenzintensitäten einer 1:1-Mischung der β_1 -Adrenorezeptor-positiven und der β_1 -Adrenorezeptor-negativen Zellpopulation. Anhand der auf der Ordinate dargestellten β_1 -Adrenorezeptor-abhängigen YFP-Fluoreszenz unterscheiden sich diese beiden Populationen. Die beiden Zellpopulationen unterscheiden sich auch hinsichtlich der auf der Abszisse dargestellten roten Fluoreszenzintensität, die von zellgebundenen IgG-Antikörpern abhängt. Als Maß für die Menge der spezifisch an die β_1 -Adrenorezeptor gebundenen IgG dient die Differenz (ΔF_r) von Median der roten Fluoreszenzintensität (AF647) der β_1 -Adrenorezeptor-positiven Zellpopulation und Median der roten Fluoreszenzintensität der β_1 -Adrenorezeptor-negativen Zellpopulation. Diese beiden Zellpopulationen werden anhand der bimodalen logarithmischen Normalverteilung der grünen Fluoreszenzintensitäten unterschieden (Abb. 2, horizontale Linie).

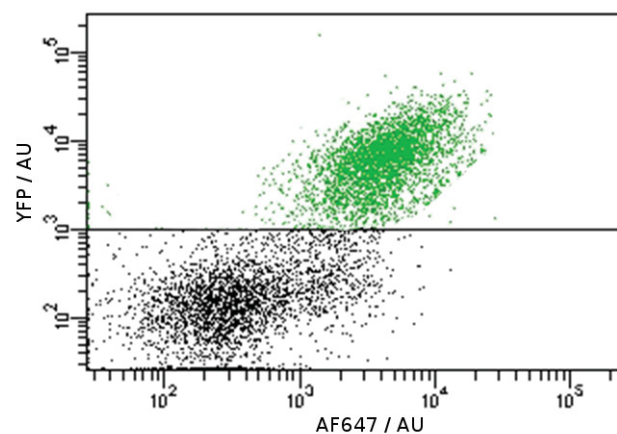


Abbildung 2: Repräsentative Darstellung durchflusszytometrisch gemessener Fluoreszenzen einer 1:1-Mischung von β_1 -Adrenorezeptor-positiven und -negativen Zellen. Abszisse: rote Fluoreszenzintensität (AF647) in AU. Ordinate: grüne Fluoreszenzintensität (YFP) in AU. Horizontale Linie: Trennung der β_1 -Adrenorezeptor-positiven und -negativen Zellpopulationen nach 99%-Konfidenzintervall der bimodalen logarithmischen Normalverteilung der grünen Fluoreszenzintensität. (vgl. Bornholz *et al.*, 2016)

Validierung des Nachweisverfahrens

Ziel ist es, aus den durchflusszytometrisch erhobenen Daten ein valides Maß für die Bindung der Autoantikörper an den β_1 -Adrenorezeptor zu bestimmen. Die Differenz der Mediane der grünen Fluoreszenzintensität (ΔF_g) von β_1 -Adrenorezeptor-positiven und -negativen Zellpopulationen wird als interner Standard für die mittlere Dichte von β_1 -Adrenorezeptoren auf der Oberfläche der transfizierten Zellen verwendet. Dementsprechend lieferte der Quotient der Mediane von roter und grüner Fluoreszenzintensität ($\Delta F_{r/g}$) ein Maß für die β_1 -Adrenorezeptor-spezifische IgG-Bindung, das von möglicherweise auftretenden Fluktuationen der Rezeptorexpression unabhängig ist.

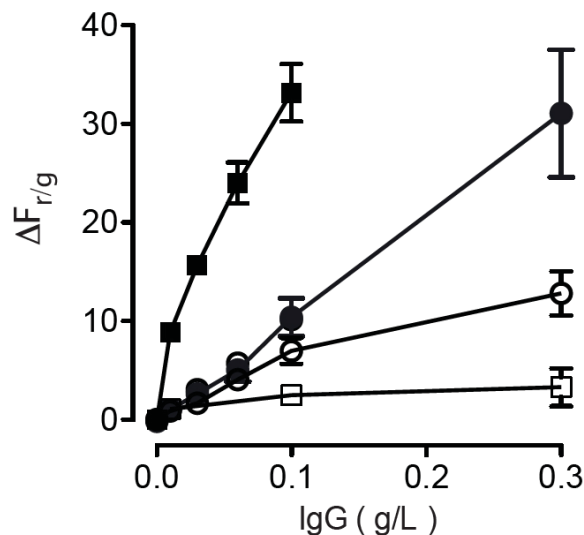


Abbildung 3: $\Delta F_{r/g}$ -Werte in Abhängigkeit von der IgG-Konzentration. Positivkontrolle: Kaninchen, die mit einem Peptidhomologen der N-terminalen Domäne des humanen β_1 -Adrenorezeptor immunisiert wurden (gefüllte Quadrate), IgG von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-positiven DCM-Patienten (gefüllte Kreise), IgG von gesunden Probanden (ungefüllte Kreise), Negativkontrolle: humane IgG ohne β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper (ungefüllte Quadrate). Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$. (vgl. Bornholz *et al.*, 2016)

Um die Linearität der Konzentrationsabhängigkeit von $\Delta F_{r/g}$ zu validieren, wurden Kaninchen-Antikörper gegen Peptidhomologe der N-terminalen Domäne des humanen β_1 -Adrenorezeptors, vereinigte IgG-Fractionen von β_1 -Adrenore-

zeptor-Autoantikörper-positiven DCM-Patienten sowie vereinigte IgG-Fractionen von Gesunden eingesetzt. Als Negativkontrolle dient eine kommerziell erhältliche Zubereitung von humanen IgG-Antikörpern, für die die Abwesenheit von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern zuvor bereits gezeigt wurde (Bornholz *et al.*, 2013). Diese Negativkontrolle (Abb. 3, ungefüllte Quadrate) zeigt im Gegensatz zu den anderen drei IgG-Zubereitungen keinen konzentrationsabhängigen Anstieg von $\Delta F_{r/g}$.

Die Steigung der Kurve für die β_1 -Adrenorezeptor-spezifischen Antikörper aus Kaninchen (Abb. 3, gefüllte Quadrate) sowie für die DCM-assoziierten Autoantikörper (Abb. 3, gefüllte Kreise) ist deutlich steiler als jene für die IgG von gesunden Probanden (Abb. 3, ungefüllte Kreise). Die unterschiedlichen Steigungen der IgG-Bindungskurven zeigen, dass IgG von gesunden Probanden eine geringere Avidität zum β_1 -Adrenorezeptor haben als β_1 -Adrenorezeptor-Antikörper aus dem Blut von DCM-Patienten.

Eine Unterscheidung der IgG-Signale von Autoantikörper-positiven DCM-Patienten und jener von Autoantikörper-negativen gesunden Probanden ist bei einer IgG-Konzentration von 0,3 g/L möglich. Bei IgG-Konzentrationen unterhalb von 0,1 g/L fallen die Kurven zusammen. Daher wird für die durchflusszytometrische Bestimmung von $\Delta F_{r/g}$ eine IgG-Konzentration von 0,3 g/l gewählt.

Gütekriterien des Nachweisverfahrens

Zur Bestimmung des prädikativen Wertes von $\Delta F_{r/g}$ für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aufgrund einer DCM werden $\Delta F_{r/g}$ -Werte, die mit den isolierten IgG von DCM-Patienten (n = 41) gewonnen wurden, mit solchen von gesunden Probanden gleichen Alters und Geschlechts (n = 49) verglichen. Alle Patienten befanden sich bei Blutentnahme klinisch in Stadien fortgeschrittener Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) und zeigten eine linksventrikuläre Dilatation sowie eine eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion, für die eine andere Ursache als eine DCM ausgeschlossen wurde.

In der Kontrollgruppe mit gleicher Alters- und Geschlechtsverteilung wurden Erkrankungen des Herzens durch das Fehlen kardiospezifischer klinischer Symptome, einen unauffälligen echokardiographischen Befund und/ oder normwertige kardiale Laborparameter (Troponin I, NT-pro-BNP) ausgeschlossen. Bei 71% (29/41) der DCM-Patienten zeigte sich ein $\Delta F_{r/g}$ -Wert oberhalb der Grenze eines 95%-Konfidenzintervalls der Werte gesunder Kontrollen, der als *Cut-off* verwendet wurde ($p < 0,0001$; Abb. 4A).

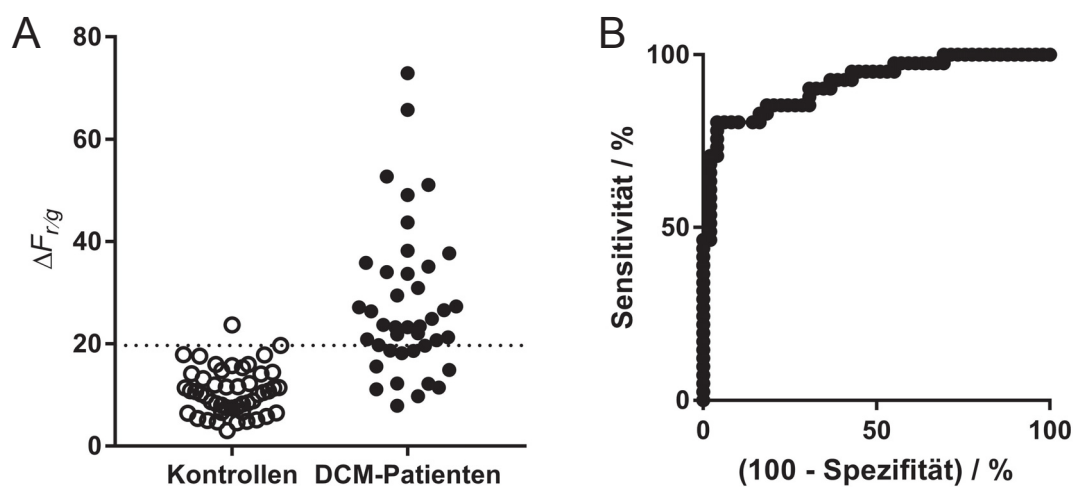


Abbildung 4: Gütekriterien des durchflußzytometrischen Nachweisverfahrens der IgG-Bindung an β_1 -Adrenorezeptoren. A: $\Delta F_{r/g}$ -Werte für IgG von DCM-Patienten ($n = 41$, Kreise) und gesunden Kontrollen ($n = 49$, Punkte), gepunktete Linie: *Cutt-off*-Wert (oberes 95%-Konfidenzintervall für die gesunden Kontrollprobanden). B: ROC-Analyse der Daten aus A.

Die ROC-Analyse (Abb. 4B) zeigt eine Fläche unter der Kurve von $0,9179 \pm 0,0285$ ($p < 0,0001$) und ergibt für den gewählten *Cut-off*-Wert eine Sensitivität von 73% sowie eine Spezifität von 96%.

Autoantikörper und echokardiographische Befunde

Eine Assoziation von $\Delta F_{r/g}$ als Maß für die IgG-Autoantikörper, die an den β_1 -Adrenorezeptor binden, mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) zeigt sich bei den untersuchten DCM-Patienten ($n = 31$) nicht (Abb. 5, $r^2 = 0,0039$).

Auch für den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) zeigt sich bei den untersuchten DCM-Patienten ($n = 26$) keine Assoziation ($r^2 = 0,0887$) mit $\Delta F_{r/g}$ (Abb. 5). Allerdings finden sich bei einem LVEDD > 70 mm bei allen untersuchten DCM-Patienten ($n = 6$) β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-Titer oberhalb des *Cut-off*-Wertes.

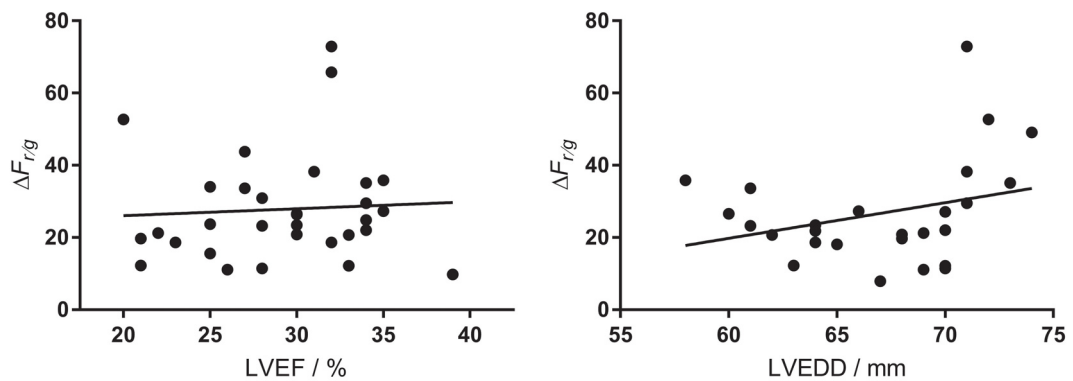


Abbildung 5: Korrelation der Autoantikörper mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und mit dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) bei DCM-Patienten. Die Menge der β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper der DCM-Patienten ($n = 31$) wurde über die IgG-Bindung an β_1 -adrenerge Rezeptoren durchflusszytometrisch gemessen ($\Delta F_{r/g}$ -Werte, Ordinate). Die LVEF und der LVEDD wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmt.

Diskussion

Die entwickelte durchflusszytometrische Methode zum Nachweis von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern im Blut von Patienten nutzt native β_1 -adrenerge Rezeptoren als Antigen. Mit Hilfe dieser Methode konnte bei 71% der untersuchten Patienten mit DCM Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Prävalenz von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern, die über deren Fähigkeit zur Rezeptorstimulation ermittelt wurde: 50-70% bei DCM-Patienten gegenüber nur 5-10% in der gesunden Population (Wallukat und Schimke, 2014; Nikolaev *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; Patel und Hernandez, 2013). Das Analytikverfahren scheint geeignet zur Unterscheidung von physiologischen und pathologischen Spiegeln von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern in humanen IgG-Zubereitungen.

Wie in der Literatur beschrieben (Bornholz *et al.*, 2014; Jahns *et al.*, 1999b), zeigt sich, dass die chemische Fixierung zur Zerstörung des Epitops führt, dessen Ziel die DCM-assoziierten β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper sind. Daher müssen Immunassays, die auf denaturierten oder synthetischen Epitoprepräsentationen basieren, als unzuverlässig angesehen werden (Jahns und Boege, 2015), und ein auf nativen Zellen basierendes Assay scheint besser für eine valide und aussagekräftige Bewertung klinisch relevanter humaner β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper geeignet zu sein. Unter den bereits entwickelten Nachweisverfahren (Nikolaev *et al.*, 2007; Bornholz *et al.*, 2013; Holthoff *et al.*, 2012; Wallukat *et al.*, 2001; Christ *et al.*, 2005; Eckerle *et al.*, 2013) bietet das hier vorgestellte die Vorteile, dass es zum einen auf einer stabilen immortalisierten humanen Zelllinie basiert und zum anderen mit der Durchflusszytometrie eine analytische Plattform nutzt, die in klinischen Routinelaboratorien vorhanden ist. Des Weiteren bietet es die Möglichkeit zur Standardisierung.

Ähnliche Nachweisverfahren zu dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten für β_1 -adrenerge Autoantikörper wurden ebenfalls für Autoantikörper gegen andere Membranproteine wie den Rezeptor des *Thyreoidae* stimulierenden Hormons (TSH) (Lytton *et al.*, 2010), den *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (Lazar-Molnar *et*

al., 2014), β_2 - und α_2 -Adrenorezeptor (Li *et al.*, 2014), den muskarinergen M_2 -Rezeptor (Preuss *et al.*, 2014) und dopaminergen D_2 -Rezeptor (Dale *et al.*, 2012) entwickelt. Die Kolokalisation von IgG mit biofluoreszenten β_1 -Adrenorezeptor auf der Oberfläche nativer Zellen, die hier durchflusszytometrisch gemessen wird, kann ebenfalls durch quantitative Epifluoreszenzmikroskopie oder mittels Mikrotiterplatten-Epifluoreszenz-Lesegerät bestimmt werden (Roggenbuck *et al.*, 2013). Es wurde aber in früheren Arbeiten (Bornholz *et al.*, 2013) festgestellt, dass diese alternativen Messverfahren der Fluoreszenz durch die Variabilität des Hintergrundsignals beeinträchtigt werden, welches zu hoch ist, um eine Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, die für eine diagnostische Anwendung erforderlich ist. Daher scheint die Durchflusszytometrie das geeignetste Ausleseverfahren zu sein.

Eine Bewertung steht noch aus, ob die durchflusszytometrische Methode zur Identifikation und zum Monitoring von Patienten geeignet ist, bei denen ein Risiko besteht, eine β_1 -Autoantikörper-assoziierte chronische Herzinsuffizienz und/oder eine DCM zu entwickeln. Klinische Korrelationen lassen vermuten, dass eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität von DCM-Patienten assoziiert ist mit β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern, die die Rezeptoraktivität modulieren (z. B. Rezeptorstimulation), aber nicht mit β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern, die lediglich an den Rezeptor binden, ohne seine Funktion zu verändern (Störk *et al.*, 2006; Jahns *et al.*, 1999b; Nikolaev *et al.*, 2007; Iwata *et al.*, 2001). Diese funktionelle Unterscheidung der Autoantikörper erfolgt bei dem entwickelten Nachweisverfahren nicht. Obwohl der Test Personen bzw. Patienten mit β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern im Blut zuverlässig erkennt, ist wahrscheinlich ein darauffolgender funktioneller Test erforderlich, um unter den β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-positiven Individuen jene zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Autoimmun-DCM bzw. Herzinsuffizienz aufgrund von Antikörpern haben, die den kardialen β_1 -Adrenorezeptor aktivieren (Störk *et al.*, 2006; Jahns *et al.*, 1999b).

Die funktionelle Wirkung von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern wird an isolierten Kardiomyozyten, d. h. durch Änderungen der Spontan-Schlagfrequenz pri-

märer neonataler Kardiomyozyten (Wallukat *et al.*, 2001) bzw. humaner embryonaler Kardiomyozyten (Bornholz *et al.*, 2013) oder durch die Induktion eines Kalziumeinstroms, eines Aktionspotentials oder einer Zellverkürzung in primären ventrikulären Rattenkardiomyozyten (Christ *et al.*, 2005; Eckerle *et al.*, 2013) getestet. Diese Assays gelten als Goldstandard, da sie direkt an den angenommenen kardiopathogenen Mechanismen der β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper ansetzen. Allerdings sind diese Methoden schwierig zu standardisieren und für die Laboratoriumsdiagnostik ungeeignet, da sie auf Primärkultur von differenzierten Zellen basieren. Geeignete funktionelle Nachweisverfahren basieren auf Zelllinien, die *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) Reporter für die aktivierungsassoziierte Konformationsänderung des β_1 -Adrenorezeptor überexprimieren (Bornholz *et al.*, 2013) oder auf der β_1 -Adrenorezeptor-vermittelten Modulation des intrazellulären zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) (Nikolaev *et al.*, 2007). Diese FRET-basierten Assays können im Schnellverfahren auf 96-*well*-Platten ausgelesen werden, eine Technik, die als Hochdurchsatz-Diagnostikverfahren in einigen Laboratorien zur Verfügung steht. Angesichts der Komplexität von benötigter Ausstattung und Standardisierung ist die Möglichkeit einer Anpassung dieser FRET-Verfahren an eine breitere diagnostische Verwendung jedoch zweifelhaft. Es ist daher eher zu erwarten, dass sie von wenigen spezialisierten Zentren als Bestätigungstests angeboten werden ebenso wie die auf primären Kardiomyozyten basierenden funktionellen Assays.

Folglich werden praktische *Screening*-Verfahren benötigt, die eine standardisierbare Identifikation von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper-positiven Individuen ermöglichen und die Lücke zwischen der klinischen Routinediagnostik und einem Bestätigungstest für potentiell kardiopathogene funktionelle Effekte von β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörpern in spezialisierten Zentren schließen. Die hier vorgestellte Nachweismethode ist möglicherweise ein solches *Screening*-Verfahren. Gleichwohl muss die konkrete Rolle dieses Assays im Rahmen einer diagnostischen Gesamtstrategie in einer prospektiven diagnostischen Kohortenstudie validiert werden (Deubner *et al.*, 2010).

Der entwickelte durchflusszytometrische Nachweis kardiopathogener Autoantikörper gegen den β_1 -Adrenorezeptor kann zur Untersuchung der Prävalenz dieser Autoantikörper bei weiteren kardiovaskulären Erkrankungen genutzt werden sowie zur Identifikation und zum *Monitoring* von Patienten, bei denen aufgrund dieser Antikörper das Risiko für eine DCM und Herzinsuffizienz besteht.

Zusammenfassung

Hintergrund

Bei bestimmten Formen der Herzinsuffizienz spielen Autoantikörper gegen den kardialen β_1 -adrenergen Rezeptor eine ursächliche Rolle. Um davon betroffene Patienten einer spezifischen Therapie zuzuführen, ist ein frühzeitiger Nachweis prognostisch bedeutsam. Dazu soll eine durchflusszytometrische Nachweismethode für kardiopathogene Autoantikörper dienen, die auf deren Bindung an den β_1 -adrenergen Rezeptor in der Zellmembran intakter humaner Zellen basiert.

Methodik

Ausgangspunkt für den Nachweis sind humane Fibrosarkomzellen (HT1080), die ein biofluoreszentes Konstrukt des humanen β_1 -adrenergen Rezeptors stabil überexprimieren. Diese Zellen präsentieren an ihrer Oberfläche das konformationelle Epitop, an das die Autoantikörper binden. So können gereinigte Antikörperpräparationen aus Serum nach Fluoreszenzmarkierung mittels Sekundäranantikörper durchflusszytometrisch untersucht werden.

Ergebnisse

Die durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzintensitäten ergibt ein Maß für die Bindung der Autoantikörper an den β_1 -adrenergen Rezeptor. Die Menge an Autoantikörpern gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor kann bei variabler Antikörper-Gesamtmenge untersucht werden. Bei gleicher Antikörper-Gesamtmenge weisen Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) eine größere Menge an Autoantikörpern gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor auf als Gesunde. Bei 71% der DCM-Patienten konnte mit diesem Verfahren ein Nachweis von Autoantikörperbindung an den β_1 -adrenergen Rezeptor erbracht werden.

Schlussfolgerungen

Die entwickelte Nachweismethode misst durchflusszytometrisch die Menge der Autoantikörper, die an den β_1 -adrenergen Rezeptor in humanen Zellen bindet. Sie kann im untersuchten Kollektiv zuverlässig zwischen DCM-Patienten und gleichaltrigen Herzgesunden unterscheiden (Sensitivität: 73%, Spezifität: 96%).

Abkürzungsverzeichnis

AAK	Autoantikörper
AF	Alexa Fluor
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
AR	Adrenerger Hormonrezeptor
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>DULBECCO's modified EAGLE's medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
HT	Humane Fibrosarkomzellen
IgG	Immunglobulin G
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mF	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
ROC	<i>Receiver Operator Characteristics</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
TSH	<i>Thyreoidea</i> stimulierendes Hormon
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Literaturverzeichnis

- Aretz HT (1986). Diagnosis of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Med. Clin. North Am.* **70**: 1215-1226.
- Boivin V, Beyersdorf N, Palm D, Nikolaev VO, Schlipp A, Müller J, *et al.* (2015). Novel Receptor-Derived Cyclopeptides to Treat Heart Failure Caused by Anti- β_1 -Adrenoceptor Antibodies in a Human-Analogous Rat Model. *PLoS ONE* **10**: e0117589.
- Bornholz B, Benninghaus T, Reinke Y, Felix SB, Roggenbuck D, Jahns-Boivin V, Jahns R, Boege F (2016). A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of β_1 -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Clin Chem Lab Med.* **54**: 683-691.
- Bornholz B, Roggenbuck D, Jahns R, Boege F (2014). Diagnostic and therapeutic aspects of β_1 -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Autoimmun. Rev.* **13**: 954-962.
- Bornholz B, Weidtkamp-Peters S, Schmitmeier S, Seidel CAM, Herda LR, Felix SB, *et al.* (2013). Impact of human autoantibodies on β_1 -adrenergic receptor conformation, activity, and internalization. *Cardiovasc. Res.* **97**: 472–480.
- Buvall L, Bollano E, Chen J, Shultze W, Fu M (2006). Phenotype of early cardiomyopathic changes induced by active immunization of rats with a synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human β_1 -adrenergic receptor. *Clin. Exp. Immunol.* **143**: 209-215.
- Caforio ALP, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ (2002). Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur. J. Heart Fail.* **4**: 411-417.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* (2007). High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β_2 -Adrenergic G Protein–Coupled Receptor. *Science* **318**: 1258-1265.

- Christ T, Adolph E, Schindelhauer S, Wettwer E, Dobrev D, Wallukat G, et al. (2005) Effects of immunoglobulin g from patients with dilated cardiomyopathy on rat cardiomyocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**: 445-452.
- Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, et al. (2012). Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain* **135**: 3453-3468.
- Dandel M, Wallukat G, Englert A, Hetzer R (2013). Immunoabsorption therapy for dilated cardiomyopathy and pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler. Suppl.* **14**: 203-211.
- Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R (2012). Long-term benefits of immunoabsorption in β_1 -adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* **14**: 1374–1388.
- Deubner N, Berliner D, Schlipf A, Gelbrich G, Caforio AL, Felix SB, et al. (2010). Cardiac β_1 -adrenoceptor autoantibodies in human heart disease: rationale and design of the Etiology, Titre-Course, and Survival (ETiCS) Study. *Eur. J. Heart Fail.* **12**: 753-762.
- Eckerle LG, Felix SB, Herda LR (2013). Measurement of antibody effects on cellular function of isolated cardiomyocytes. *J. Vis. Exp.*: e4237.
- Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Große Y, Stangl V, Spielhagen T, et al. (2002). Removal of Cardiodepressant Antibodies in Dilated Cardiomyopathy by Immunoabsorption. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**: 646-652.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (2004). Anti- β_1 -adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J. Clin. Invest.* **113**: 1379-1382.
- Fukuda Y, Miyoshi S, Tanimoto K, Oota K, Fujikura K, Iwata M, et al. (2004). Autoimmunity against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors induces early afterdepolarization and decreases in K-channel density in rabbits. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**: 1090-1100.

- Haberland A, Wallukat G, Berg S, Schulz A-M, Freyse E-J, Vetter R, *et al.* (2014). Neutralization of pathogenic β_1 -receptor autoantibodies by aptamers in vivo: the first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* **393**: 177-180.
- Haberland A, Wallukat G, Dahmen C, Kage A, Schimke I (2011). Aptamer neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies isolated from patients with cardiomyopathies. *Circ. Res.* **109**: 986-992.
- Holthoff H-P, Zeibig S, Boivin V, Bauer J, Lohse MJ, Kääh S, *et al.* (2012). Detection of Anti β_1 -AR Auto-Antibodies in Heart Failure by a Cell-Based Competition ELISA. *Circ. Res.* **111**: 675-684.
- Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S (2001). Autoantibodies against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**: 418-424.
- Jahns R, Boege F (2015). Questionable validity of peptide-based elisa strategies in the diagnostics of cardiopathogenic autoantibodies that activate g-protein-coupled receptors. *Cardiology* **131**: 149-150.
- Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, *et al.* (2004). Direct evidence for a β_1 -adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **113**: 1419-1429.
- Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F, Lohse MJ (2000). Modulation of β_1 -Adrenoceptor Activity by Domain-Specific Antibodies and Heart Failure-Associated Autoantibodies. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**: 1280-1287.
- Jahns R, Boivin V, Lohse MJ (2006). β_1 -Adrenergic Receptor Function, Autoimmunity, and Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc. Med.* **16**: 20-24.
- Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Boege F, Lohse MJ, Inselmann G (1999a). Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomy

- opathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**: 1545-1551.
- Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F (1999b). Autoantibodies Activating Human β_1 -Adrenergic Receptors Are Associated With Reduced Cardiac Function in Chronic Heart Failure. *Circulation* **99**: 649-654.
- Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, Yong S, Wickley PJ, Clark P, *et al.* (2007). β_1 -Adrenergic Receptor Autoantibodies Mediate Dilated Cardiomyopathy by Agonistically Inducing Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation* **116**: 399-410.
- Lazar-Molnar E, Tebo AE (2014). Autoimmune NMDA receptor encephalitis. *Clin. Chim. Acta* **438**: 90-97.
- Li H, Yu X, Liles C, Khan M, Vanderlinde-Wood M, Galloway A, *et al.* (2014). Autoimmune basis for postural tachycardia syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* **3**: e000755.
- Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C (1989). Autoantibodies Against β -Adrenoceptors in Human Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circ. Res.* **64**: 97-103.
- Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C (1990). Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **119**: 1322-1328.
- Liu H, Zhao R, Zhi J, Wu B, Fu M (1999). Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. *Autoimmunity* **29**: 43-51.
- Lytton S, Kahaly G (2010). Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmun. Rev.* **10**: 116-122.
- Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR (1992). Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. *Am. J. Cardiol.* **69**: 1458-1466.

- Münch G, Boivin-Jahns V, Holthoff H-P, Adler K, Lappo M, Truöl S, *et al.* (2012). Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti- β_1 -adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters. *Eur. J. Heart Fail.* **14**: 1230-1239.
- Nikolaev VO, Boivin V, Störk S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ, *et al.* (2007). A Novel Fluorescence Method for the Rapid Detection of Functional β_1 -Adrenergic Receptor Autoantibodies in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**: 423-431.
- Patel P, Hernandez A (2013). Targeting anti- β_1 -adrenergic receptor antibodies for dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* **15**: 724-729.
- Pei J, Li N, Chen J, Li X, Zhang Y, Wang Z, *et al.* (2012) The predictive values of beta1-adrenergic and m2 muscarinic receptor autoantibodies for sudden cardiac death in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **14**: 887-894.
- Preuss B, Tunaru S, Henes J, Offermanns S, Klein R (2014). 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**: 179-189.
- Roggenbuck D, Hiemann R, Bogdanos D, Reinhold D, Conrad K (2013). Standardization of automated interpretation of immunofluorescence tests. *Clin. Chim. Acta* **421**: 168-169.
- Statistisches Bundesamt (2015a). Gesundheit. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12, Reihe 6.2.1, aktualisiert am 11.01.2016.
- Statistisches Bundesamt (2015b). Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4, aktualisiert am 06.01.2016.
- Staudt A, Dörr M, Staudt Y, Böhm M, Probst M, Empen K, *et al.* (2005). Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am. Heart J.* **150**: 729-736.

- Störk S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE, *et al.* (2006). Stimulating autoantibodies directed against the cardiac β_1 -adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **152**: 697-704.
- Wallukat G, Morwinski M, Kowal K, Förster A, Boewer V, Wollenberger A (1991). Autoantibodies against the β -adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: β -adrenergic agonism without desensitization. *Eur. Heart J.* **12 Suppl. D**: 178-181.
- Wallukat G, Nissen E (2001). Anti β_1 -adrenoreceptor autoantibodies analyzed in spontaneously beating neonatal rat heart myocyte cultures—Comparison of methods autoantibodies analyzed in spontaneously beating neonatal rat heart myocyte cultures—Comparison of methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **37**: 175-176.
- Wallukat G, Schimke I (2014). Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Semin. Immunopathol.* **36**: 351-363.
- Wallukat G, Wollenberger A (1987). Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed. Biochim. Acta* **46**: 634-639.

Danksagung

Frau Dr. Bornholz gilt mein besonderer Dank für die experimentelle Anleitung und ihre stete Unterstützung während des gesamten Projektes.

Herrn Dr. Sobek danke ich für seine freundliche Unterstützung und wertvolle Hinweise bei den durchflusszytometrischen Messungen.

Herrn Prof. Dr. Felix danke ich für das freundliche Zurverfügungstellen des Probenmaterials der Patienten.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Boege, sei für die freundliche Überlassung des Themas, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und die Übernahme des Referates gedankt.

Herrn PD Dr. Stork danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

30. August 2016, Thomas Benninghaus