

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Prävalenz und Bedeutung spezifischer inhibitorischer Auto-Antikörper  
gegen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3 bei Patienten mit primär biliärer  
Cholangitis – eine retrospektive Studie aus zwei unabhängigen universitären Zentren aus  
Berlin und Leipzig

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nina Wald de Chamorro  
aus Herdecke

Datum der Promotion: 18.12.2020

*Gewidmet  
meinem Mann César und meinen Töchtern Isabel und Luz*

**Teilergebnisse der folgenden Arbeit wurden als Abstracts veröffentlicht in:**

Z Gastroenterol 2019, 57(09), 238 – 239: „Prävalenz und Bedeutung inhibitorischer Auto-Antikörper gegen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3 bei Patienten mit primär biliärer Cholangitis – eine retrospektive Studie aus zwei universitären Zentren aus Berlin und Leipzig.“ Anmerkung: Es handelt sich um einen Kurzvortrag anlässlich der Jahrestagung der DGVS 2019.

Z Gastroenterol 2019, 57(09), 238: „Assoziation des rs4620530 Single Nucleotide Polymorphismus im muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ3 Gen mit der primär biliären Cholangitis – eine retrospektive Analyse aus zwei universitären Zentren.“ Anmerkung: Es handelt sich um einen Kurzvortrag anlässlich der Jahrestagung der DGVS 2019.

Hepatology 2019, 70(S1), 771A: „Prevalence and relevance of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies of patients with primary biliary cholangitis – a retrospective study of two tertiary centers from Berlin and Leipzig.“ Anmerkung: Es handelt sich um einen Beitrag zur Postersession (Poster of Distinction) anlässlich der Jahrestagung der AASLD 2019.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
2.1. Definition, Ätiologie und Epidemiologie der primär biliären Cholangitis (PBC)....	10
2.2. Klinische und paraklinische Charakteristika .....	11
2.3. Diagnostik und aktuelle Therapieleitlinien .....	12
2.4. Kriterien des Therapieansprechens auf Ursodeoxycholsäure (UDCA) .....	15
2.5. Die Hypothese zum Bikarbonat-Schutzschirm bei der Pathogenese der PBC ...	17
2.6. Hypothesen zum möglichen Einfluss der mAChR3 Auto-Antikörper bei der Pathogenese der PBC .....	19
2.7. Projektspezifische Vorarbeiten.....	23
2.8. Zusammenfassung und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit .....	27
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1. Einschluss der Patienten und Quellen der Dokumentation .....	29
3.2. Erfasste klinische und paraklinische Befunde.....	31
3.3. Bestimmung der Prävalenz und Funktionalität der mAChR3 Auto-Antikörper ....	32
3.4. Statistische Auswertung.....	33
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
4.1. Prävalenz der mAChR3 Auto-Antikörper bei PBC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe .....	34
4.2. Vergleich der Baseline Charakteristika .....	35
4.2.1. Allgemeine Beschreibung.....	35
4.2.1.1. Berliner Kohorte .....	35
4.2.1.2. Leipziger Kohorte .....	37
4.2.2. Klinische Präsentation der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung.....	38
4.2.3. Immunologische Begleiterkrankungen .....	39
4.2.3.1. Berliner Kohorte .....	39
4.2.3.2. Leipziger Kohorte .....	40
4.2.4. Erkrankungsstadium vor Therapieeinleitung .....	41
4.2.4.1. Berliner Kohorte .....	41
4.2.4.2. Leipziger Kohorte .....	43
4.2.5. Laborparameter vor Therapieeinleitung .....	44
4.2.5.1. Berliner Kohorte .....	44
4.2.5.2. Leipziger Kohorte .....	46

4.2.6.	Auto-Antikörper Diagnostik.....	48
4.2.6.1.	Berliner Kohorte .....	48
4.2.6.2.	Leipziger Kohorte .....	50
4.3.	Therapieansprechen .....	51
4.3.1.	Klinische Präsentation bei der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung.....	51
4.3.2.	Leberschädigung und Komplikationen im Verlauf bei der Berliner Kohorte .....	52
4.3.3.	Vergleich der Laborparameter der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung.....	54
4.3.4.	Vergleich der Ansprechraten der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung.....	55
4.3.5.	Normalisierung der Laborparameter unter UDCA-Therapie im Verlauf der Erkrankung bei der Berliner Kohorte .....	57
4.4.	Transplantatfreies Überleben.....	58
4.4.1.	Rate der Lebertransplantationen im Verlauf der Erkrankung.....	58
4.4.1.1.	Berliner Kohorte .....	58
4.4.1.2.	Leipziger Kohorte .....	59
4.4.2.	Prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation der Berliner Kohorte .....	60
4.4.3.	Vergleich des transplantatfreien Überlebens der Berliner Kohorte .....	61
4.4.4.	Auftreten eines Rezidivs bei transplantierten Patienten der Berliner Kohorte .....	62
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
5.1.	Allgemeine Charakteristika der Kohorte im Kontext vergleichbarer Studien .....	65
5.2.	Angewendete Therapien im Kontext der aktuellen Leitlinien-Empfehlungen und Langzeitbeobachtung.....	70
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
ACA	Antikörper gegen Zentromere
AIH	Autoimmunhepatitis
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANA	Antinukleäre Antikörper
AMA	Antimitochondriale Antikörper
AMA-M2	Antimitochondriale Antikörper der Subgruppe 2
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
ChAT	Acetylcholintransferase
CHO	Chinese Ovarian Cells
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
EASL	European Association for the Study of the Liver
EpCAM	Epithelzellmarker
EU	Europäische Union
FMO	Fluorescence minus one
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
hBEC	humane biliäre Epithelzellen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KG	Körpergewicht
LKM-1	Leber-Nieren-Mikrosomen-Typ 1-Antikörper
LLN	“lower limit of normal” (engl.): untere Grenze des Normwertes
mAChR3	Auto-Antikörper gegen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3
mAChR3+	Patienten mit positivem mAChR3 Auto-Antikörperstatus
mAChR3-	Patienten mit negativem mAChR3 Auto-Antikörperstatus

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OCA	Obeticholsäure
pANCA	perinukleäre Anti-Neutrophile-Zytoplasma-Antikörper
PBC	primär biliäre Cholangitis
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
ROC	Receiver Operating Curves
SLA	Lösliches-Leber-Antigen-Antikörper
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur
TPO-AK	Thyreoperoxidase-Antikörper
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
ULN	“upper limit of normal” (engl.): obere Grenze des Normwertes
UDCA	Ursodeoxycholsäure

# 1. Abstract

Die primär biliäre Cholangitis (PBC) gehört zu den seltenen, am ehesten autoimmun vermittelten chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen, deren Ursache nicht vollständig verstanden ist. Dysfunktionale Acetylcholin-vermittelte Signalwege über den in der Leber exklusiv in den Gallenwegen exprimierten muskarinergen Acetylcholinrezeptor vom Typ 3 (mAChR3) könnten an der Pathogenese der PBC beteiligt sein, unter anderem durch eine Beeinträchtigung des biliären Bikarbonat-Schutzschirms, der nach einem neueren hypothetischen Modell das Gallengangsepithel vor dem toxischen Einfluss physiologischer Gallensäuren schützt.

In früheren Arbeiten konnten bereits inhibitorische Auto-Antikörper gegen den mAChR3 (mAChR3 Auto-AK) bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Ziel dieser retrospektiven Studie war die Bestimmung der Prävalenz dieser mAChR3 Auto-AK bei PBC Patienten aus zwei unabhängigen universitären Zentren in Berlin und Leipzig sowie die Evaluierung der Bedeutung dieser AK auf die allgemeinen Charakteristika, das Therapieansprechen auf Ursodeoxycholsäure (UDCA) sowie den Langzeitverlauf bei diesen Patienten. Insgesamt wurden die (para)klinischen Charakteristika von 354 PBC Patienten aus Berlin und 83 PBC Patienten aus Leipzig in Abhängigkeit des mAChR3 Auto-AK Status verglichen. Zusätzlich wurde bei 160 Patienten das Therapieansprechen auf UDCA 12 Monate nach Therapieeinleitung ausgewertet. Bei 48 Patienten wurde zudem die PBC Rezidivrate nach Lebertransplantation in Abhängigkeit des mAChR3 Auto-AK Status evaluiert.

Die Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK war bei PBC Patienten mit 11.2% signifikant höher als bei einer gesunden Kontrollgruppe mit 2.5% ( $p < 0.0001$ ). Darüber hinaus zeigten PBC Patienten mit inhibitorischen mAChR3 Auto-AK (mAChR3+ PBC) im Vergleich zu PBC Patienten ohne inhibitorische mAChR3 Auto-AK (mAChR3- PBC) signifikant höhere Werte für Bilirubin, alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase, welche etablierte Surrogatparameter zur Risikostratifizierung der PBC darstellen. Die mAChR3+ PBC Patienten zeigten 12 Monate nach Therapieeinleitung nach dem Paris I Kriterium signifikant häufiger ein inadäquates Therapieansprechen. In Übereinstimmung mit früheren Studien bestätigten sich in der vorliegenden Kohorte Bilirubin und die



alkalische Phosphatase als relevante Prädiktoren für eine Lebertransplantation. Der mAChR3 Status spielte dagegen keine entscheidende Rolle. Allerdings zeigten mAChR3+ PBC Patienten einen Trend zu höheren Lebertransplantationsraten, aber keinen Unterschied bzgl. des Auftretens von PBC Rezidiven nach erfolgter Transplantation.

In der Zusammenschau dieser Befunde unterstützen die vorliegenden Daten eine mögliche Rolle dysfunktionaler mAChR3-vermittelter Signalwege bei der Pathogenese der PBC. Weitere Analysen in größeren unabhängigen Patientenkohorten sind sinnvoll, um den möglichen Einfluss mAChR3-vermittelter Signalwege auf die Pathogenese und das Therapieansprechen bei der PBC weiter zu evaluieren.

### **Abstract (English version)**

Primary biliary cholangitis constitutes a rare chronic inflammatory biliary disease of largely unknown etiology. Dysfunctional muscarinic acetylcholine receptor type 3 (mAChR3)-mediated signaling, i.e. through specific inhibitory anti-mAChR3 autoantibodies (mAChR3 auto-ab), might play a role in the pathogenesis of PBC by mAChR3 which are exclusively expressed in small bile ducts in the liver. As a consequence of dysfunctional mAChR3 signaling, the so-called protective biliary bicarbonate umbrella which protects the bile duct epithelium against the toxicity of bile acids could be weakened.

Specific inhibitory mAChR3 auto-ab have been detected in various autoimmune disorders in earlier studies. The aim of this retrospective study was to analyze the prevalence of inhibitory mAChR3 auto-ab in two large and independent cohorts of patients with PBC from two university hospitals from Berlin and Leipzig as well as to evaluate the potential relevance of mAChR3 auto-ab concerning the general and clinical characteristics, response to treatment with UDCA and for the long-term outcome of these patients.

Overall, the general and clinical characteristics of 354 PBC patients from Berlin and 83 PBC patients from Leipzig could be evaluated with respect to their mAChR3 auto-ab status. Additionally, we analyzed the response to UDCA therapy after 12 months for 160 PBC patients. For 48 patients, the PBC recurrence rate after liver transplantation was evaluated.

The prevalence rate of inhibitory mAChR3 auto-ab was significantly higher among PBC patients (11.2%) than among the healthy comparison group (2.5%,  $p < 0.0001$ ). PBC patients with inhibitory mAChR3 auto-ab (mAChR3+ PBC) exhibited significantly higher values of alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT) and bilirubin compared to PBC patients without inhibitory mAChR3 auto-ab (mAChR3- PBC) which are important parameters for risk stratification of PBC patients. The mAChR3+ PBC patients were significantly more often non-responders to UDCA therapy after 12 months according to the Paris I criteria. In accordance with previous studies, bilirubin and ALP were relevant predictors for liver transplant. The individual mAChR3 status was not found to be an important factor for liver transplant. However, mAChR3+ PBC patients showed a trend towards a higher rate of liver transplantation but there was no difference of PBC recurrence after transplantation for mAChR3+ and mAChR3- PBC patients.

Taken together, our data appear to support the hypothesis that dysfunctional mAChR3-mediated signaling might be involved in the pathogenesis of PBC. However, in order to evaluate the potential role of inhibitory mAChR3 auto-ab in greater detail, further studies in larger patient cohorts are clearly warranted.

## 2. Einleitung

### 2.1. Definition, Ätiologie und Epidemiologie der primär biliären Cholangitis (PBC)

Die primär biliäre Cholangitis (PBC) ist eine seltene nicht-eitrige, chronisch-entzündliche Gallengangserkrankung [1]. Unbehandelt verläuft die Erkrankung chronisch und kann zur Leberzirrhose führen, weswegen sie bis in die jüngste Vergangenheit als primär biliäre Zirrhose bezeichnet wurde [2, 3]. Die Umbenennung in primär biliäre Cholangitis erfolgte nun, weil aufgrund verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten das Vollbild einer primär biliären Zirrhose praktisch nicht mehr gesehen wird. Das klinische Bild der PBC ist relativ unspezifisch. PBC Patienten<sup>1</sup> stellen sich zumeist zur Abklärung erhöhter Leberwerte, diffuser Oberbauchbeschwerden, Juckreiz (Pruritus) oder chronischer Erschöpfung und Müdigkeit (Fatigue) vor. Für die Diagnosestellung der PBC sind spezifische antimitochondriale oder antinukleäre Antikörper in Kombination mit erhöhten Cholestaseparametern wegweisend [3]. Bei Fehlen dieser Antikörper kann die Histologie entscheidende Hinweise auf das Vorliegen einer PBC liefern. Typisch für die PBC ist eine Entzündung der interlobulären und septalen Gallengänge mit Nekrosen und Granulombildung [3]. Die Therapie der Wahl der PBC besteht aus einer gewichtsadaptierten täglichen Einnahme von Ursodeoxycholsäure (UDCA). Diese Therapie ist in der Regel nebenwirkungsarm und 50-70% der Patienten sprechen gut darauf an [4].

Die PBC gehört zu den seltenen Erkrankungen [5] mit einer Prävalenz von 1.91-40.2/100000 und einer Inzidenz von 0.9-5.8/100000, je nach Studie und untersuchter Region [6]. Sowohl Inzidenz als auch Prävalenz der Erkrankung scheinen in den letzten Jahrzehnten zugenommen zu haben. Betroffen sind überwiegend Frauen mittleren Alters, der Erkrankungsgipfel liegt im 5. Lebensjahrzehnt [3]. Die Krankheit verläuft variabel, je nach Alter und Geschlecht. Bei Männern und jüngeren Frauen wurde ein aggressiverer Verlauf beobachtet, der seltener auf eine Behandlung mit UDCA anspricht. Zusätzlich sind jüngere Frauen überdurchschnittlich oft von Fatigue betroffen, Männer hingegen leiden seltener unter krankheitsspezifischen Symptomen [5].

---

<sup>1</sup> Es sind stets Personen weiblichen und männlichen Geschlechts gleichermaßen eingeschlossen; aus Gründen der einfacheren Lesbarkeit wird im Folgenden nur die männliche Form verwendet.

Bis zu 70% aller PBC Patienten weisen zusätzlich eine extrahepatische Begleiterkrankung aus dem rheumatologischen, endokrinologischen, dermatologischen oder gastrointestinalen Formenkreis auf [7, 8]. In diesem Zusammenhang ist vor allem das sogenannte Sjögren-Syndrom hervorzuheben, von welchem je nach Patientenkollektiv 30-100% der PBC Patienten betroffen sind [9]. Die Assoziation zwischen PBC und anderen Autoimmunerkrankungen legt eine genetisch-immunologische Komponente bei der Pathogenese der PBC nahe [9]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt.

Die PBC tritt in einigen Regionen gehäuft auf, was den Verdacht nahelegt, dass neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen könnten. Bisher konnten jedoch keine spezifischen Auslöser identifiziert werden [5]. Eine neuere griechische Studie kam zu dem Ergebnis, dass Rauchen und häufige Harnwegsinfekte, eine Östrogensersatztherapie und eine positive Familienanamnese Risikofaktoren für die Entwicklung einer PBC darstellen [10].

## **2.2. Klinische und paraklinische Charakteristika**

Bei einer Vielzahl der Erkrankten wird die PBC zufällig aufgrund einer Erhöhung der leberspezifischen Laborparameter diagnostiziert oder weil sich PBC Patienten zur Abklärung ungeklärter, unspezifischer Krankheitssymptome vorstellen. Zu den häufigsten Symptomen gehören Oberbauchbeschwerden, Pruritus sowie Fatigue. Einige PBC Patienten klagen zusätzlich über Gelenkbeschwerden (Arthralgien), Knochenschmerzen verursacht durch Osteoporose oder die Sicca-Symptomatik, bei der die PBC Patienten unter Mund- und Augentrockenheit leiden. Bei manchen PBC Patienten sind Einlagerungen von Fett und/oder Cholesterin unter der Haut als gelbe Einlagerungen erkennbar, sog. Xanthelasmen. Ebenso vorkommen können allgemeine Leberhautzeichen wie z.B. Spider Naevi, Palmarerythem, Lackzunge und -lippen, Caput medusae, und Teleangiektasien, die allerdings auf eine manifeste Leberzirrhose hinweisen [3]. Im fortgeschrittenen Stadium leiden die PBC Patienten an den Komplikationen, die durch Cholestase und Leberzirrhose hervorgerufen werden. Das Endstadium der Krankheit ist die dekompensierte Leberzirrhose.

Laborchemisch zeichnet sich die PBC durch eine Erhöhung der Cholestaseparameter alkalische Phosphatase (AP) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) aus. Zumeist ist auch das Immunglobulin M (IgM) erhöht und/oder es liegt eine Hyperlipidämie vor [6]. Charakteristisch für die PBC ist das Vorhandensein von antimitochondrialen (AMA) und/oder antinukleären (ANA) Auto-Antikörpern im Serum. Bei bis zu 95% der PBC Patienten lassen sich AMAs finden [11], während nur 0,5% der gesunden Bevölkerung diese Auto-Antikörper aufweisen [12]. Die Höhe des Auto-Antikörpertiters korreliert jedoch nicht mit der Schwere oder dem Stadium der Erkrankung [11]. Zudem scheint die Erkrankung bei AMA negativen PBC Patienten einen aggressiveren Verlauf zu nehmen [13]. Tatsächlich weisen PBC Patienten oft auch noch nach einer Lebertransplantation positive AMA-Titer auf [14]. Zu den ANAs gehören Auto-Antikörper gegen die Proteine sp100, gp210 und gegen Zentromere (ACA). Sie können helfen, bei AMA-negativen PBC Patienten die Krankheit zu diagnostizieren [11, 15]. Das Vorhandensein von ANAs scheint mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert zu sein [16]. So tragen PBC Patienten mit positiven gp210-Auto-Antikörpern ein höheres Risiko Leberversagen zu entwickeln, während diejenigen mit zentromeren Auto-Antikörpern eher unter Zirrhose und portaler Hypertension leiden [17].

Histologisch ist die Erkrankung durch eine Zerstörung der intrahepatischen Gallengänge gekennzeichnet, welche zu einer periportalen Entzündung und Fibrose führen. Letztendlich können diese Entzündungs- und Umbauprozesse in einer Leberzirrhose enden [11].

### **2.3. Diagnostik und aktuelle Therapieleitlinien**

Ausschlaggebend für die Diagnose einer PBC ist der Nachweis von zwei der nachfolgenden drei Kriterien:

- Chronisch erhöhte Cholestaseparameter im Serum (mind. 6 Monate)
- Nachweis spezifischer antimitochondrialer Auto-Antikörper bzw. antinukleärer Auto-Antikörper im Serum
- PBC-charakteristische Histologie [1, 3].

Als erster Schritt in der laborchemischen Diagnostik sollten neben den Cholestaseparametern AP und GGT bei Verdacht auf PBC daher die AMAs und das

Gesamt-IgM und Immunglobulin G (IgG) bestimmt werden. Besteht trotz fehlender AMAs weiterhin der klinische Verdacht auf PBC, sollte das Serum auf die für PBC charakteristischen ANAs (sp100, gp210, Lamin, ACA) untersucht werden. Sind weder AMAs noch ANAs im Serum vorhanden, kann die PBC durch die Kombination von erhöhten Cholestaseparametern und einer für die PBC charakteristischen Histologie gesichert werden [3]. Diese wird vor allem dann empfohlen, wenn die Diagnose PBC nicht mit Sicherheit gestellt werden kann oder eine andere begleitende Lebererkrankung (nichtalkoholische Fettlebererkrankungen oder toxische Leberschädigungen) in Betracht gezogen wird. Bei PBC Patienten, die außer erhöhten Cholestaseparametern und AMAs auch erhöhte Transaminasen oder IgG aufweisen, sollte ebenfalls eine Histologie angefertigt werden, um ein sogenanntes Überlappungsphänomen (Overlap) mit einer Autoimmunhepatitis auszuschließen. Weitere Gruppen, bei denen eine Histologie erfolgen sollte, sind junge PBC Patienten und solche, die auf eine Therapie mit UDCA nicht oder nur unzureichend ansprechen [3].

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die aktuellen nationalen und internationalen Therapie-Empfehlungen für die PBC noch einmal übersichtlich aufgeführt.

<b>Behandlung</b>	<b>DGVS 2017</b>	<b>EASL 2017</b>	<b>AASLD 2018</b>
Ursodeoxycholsäure [Erstlinientherapie]	13-15mg/kg KG/d	13-15mg/kg KG/d	13-15mg/kg KG/d
Obeticholsäure [Zweitlinientherapie]	Anfänglich: 5mg/d Nach 6 Monaten: 10mg/d [Mono- oder Kombinationstherapie]	Anfänglich: 5mg/d Nach 6 Monaten: 10mg/d [Mono- oder Kombinationstherapie]	Anfänglich: 5mg/d Nach 3 Monaten: 10mg/d bei Nichtansprechen auf 5mg/d

**Tabelle 1: Therapieempfehlungen zur PBC von DGVS [3], EASL [1] und der AASLD [18]**

DGVS: Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten; EASL: The European Association for the Study of the Liver; AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases; mg/kg KG/d: an das Körpergewicht (KG) adaptierte Tagesdosis (d) in Milligramm (mg)

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, empfehlen die deutschen, europäischen und US-amerikanischen Leitlinien als Standardtherapie bei PBC die Gabe von UDCA in einer gewichtsadaptierten Dosierung von 13-15mg/kg Körpergewicht/Tag (13-15mg/kg KG/d) [1, 3, 18]. Individuen, die lediglich einen positiven AMA-Titer aufweisen, sollten nicht

behandelt werden [3]. UDCA verlängert das transplantatfreie Überleben signifikant und sollte möglichst früh nach Diagnosestellung begonnen und lebenslang fortgeführt werden [11]. Die Behandlung mit UDCA hat bei gleichzeitig guter Verträglichkeit in vielerlei Hinsicht einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf [3]. Durch die regelmäßige Einnahme dieses Medikaments kommt es zu einer Besserung oder Normalisierung des Bilirubins, der Cholestaseparameter und Transaminasen im Serum sowie zu einem niedrigeren AMA-Titer, wobei die Relevanz erniedrigter AMA-Titer letztlich noch nicht abschließend geklärt ist [19, 20]. Die Therapie führt zu einer Verbesserung der pathohistologischen Charakteristika der PBC [21], zu einem verminderten Fortschreiten der Fibrose [22] und Zirrhose [23] und reduziert das Risiko für die Ausbildung von Ösophagusvarizen [24]. Die Behandlung mit UDCA kann das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen [25] und die Zeit bis zur Lebertransplantation bzw. die Überlebenszeit verlängern [25-27].

Jedoch ist das transplantatfreie Überleben von PBC Patienten, die mit UDCA behandelt werden, kürzer als das einer gesunden Population [11, 28]. Dies liegt zum Großteil daran, dass das Ansprechen auf die Therapie mit UDCA heterogen ist. PBC Patienten, deren Laborparameter (insbesondere die AP) sich unter Therapie bessern oder normalisieren, haben eine vergleichbare Lebenserwartung mit der gesunden Kontrollgruppe. PBC Patienten, die nicht oder unzureichend auf die Therapie ansprechen, haben eine niedrigere Lebenserwartung als vergleichbare, aber gesunde Individuen und als PBC Patienten, die adäquat auf die UDCA-Therapie ansprechen [28, 29]. Hinzu kommt, dass UDCA nur das Fortschreiten der Krankheit aufhalten, sie aber nicht heilen kann [11].

Etwa 40% der PBC Patienten sprechen nur unzureichend auf eine Therapie mit UDCA an [11, 28]. Harms et al. [30] kamen jedoch zu dem Schluss, dass selbst PBC Patienten, die ein inadäquates Therapieansprechen zeigten, ein besseres Langzeit-Überleben aufwiesen als PBC-Patienten, die nicht mit UDCA behandelt wurden. Deswegen sollte die Therapie auch bei inadäquatem Therapieansprechen auf UDCA fortgeführt werden [30] und leitlinienkonform eine Kombination mit Obeticholsäure (OCA) eingeführt werden. Lediglich bei Unverträglichkeit von UDCA sollte eine OCA Monotherapie erwogen werden. Die Anfangsdosis von OCA nach der deutschen und europäischen Leitlinie beträgt 5mg/Tag und wird im Laufe der ersten sechs Monate bei Ansprechen und Verträglichkeit

auf 10mg/Tag gesteigert [1, 3]. Die amerikanische Leitlinie empfiehlt ebenfalls eine Startdosis von 5mg/Tag, die nach 3 Monaten auf 10mg/Tag erhöht werden sollte, falls die entsprechenden Laborparameter (u.a. AP und Bilirubin) immer noch erhöht sind und der PBC Patient das Medikament gut verträgt [18]. Die häufigsten Nebenwirkungen von OCA sind vermehrter Juckreiz und eine Erhöhung des LDL-Cholesterins [31, 32]. Die Zulassung von OCA als Kombinationstherapie mit UDCA bei unzureichendem Therapieansprechen von UDCA allein oder als Monotherapie bei Unverträglichkeit von UDCA erfolgte im Mai 2016 in den USA und im Dezember 2016 in der EU. Langzeitdaten zum Nachweis, dass die Therapie mit OCA sich langfristig günstig auf den Verlauf der Erkrankung auswirken kann, fehlen daher bisher [1, 3]. Neuere Studien bestätigen, dass die Einnahme von OCA bei unzureichendem Ansprechen von UDCA zu einer signifikanten Senkung der Cholestaseparameter und der Aspartat-Aminotransferase (AST) [31] bzw. AP und Bilirubin [32] führt.

Für PBC Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose, hepatozellulärem Karzinom oder unerträglichem, therapierefraktärem Juckreiz ist die Lebertransplantation die Therapie der Wahl [6]. Ein Jahr nach der Transplantation leben noch 92-93% der PBC Patienten und nach 5 Jahren 82-90% [33]. Es kann sich jedoch bei bis zu jedem 3. bis 4. Transplantierten erneut eine PBC in der Transplantatleber entwickeln [34, 35].

#### **2.4. Kriterien des Therapieansprechens auf Ursodeoxycholsäure (UDCA)**

Es existieren verschiedene Definitionen für das Ansprechen auf eine Therapie mit UDCA bei Patienten mit PBC. Die verwendeten Parameter beschreiben das biochemische Ansprechen von UDCA anhand von verschiedenen Laborparametern. Es gibt im Wesentlichen zwei verschiedene Herangehensweisen. Bei der ersten wird berechnet, um welchen Faktor ein bestimmter Laborwert über dem oberen Grenzwert (upper limit of normal - ULN) bzw. unter dem unteren Grenzwert (lower limit of normal – LLN) liegt und das Therapieansprechen positiv oder negativ, d.h. binär, bewertet. Auf dieser Methode beruhen die Kriterien Paris I, Paris II, Barcelona, Rotterdam, Toronto, Ehime und Rochester. Bei der zweiten Methode wird ein Score berechnet, in welchen verschiedene metrische Variablen (Laborparameter) einfließen, die letztendlich einen Wert auf einer Skala ergeben. So entwickelte die Global PBC Study Group den sogenannten GLOBE Score und einige britische Institutionen den UK-PBC Score. Das Ziel beider



Herangehensweisen ist es, frühzeitig diejenigen Hochrisikopatienten zu identifizieren, die eine intensiviertere Therapie benötigen.

Die nachfolgende Tabelle 2 stellt die aktuell in den nationalen und internationalen Therapie-Leitlinien empfohlenen Kriterien zur Evaluierung des Ansprechens auf eine Therapie mit UDCA dar, getrennt nach den vorher erwähnten Herangehensweisen.

<b>Binäre Kriterien</b>	<b>Therapieansprechen Evaluiert nach</b>	<b>Inadäquates Therapieansprechen Definiert als</b>	<b>Anzahl Patienten</b>
Rochester [36]	6 Monate	AP $\geq$ 2xULN oder Mayo-Score $\geq$ 4.5	180
Barcelona [28]	12 Monate	Abfall der AP um $\leq$ 40% und AP $\geq$ 1xULN	191
Paris-I [37]	12 Monate	AP $\geq$ 3xULN oder AST $\geq$ 2xULN oder Bilirubin $>$ 1mg/dl	292
Rotterdam [38]	12 Monate	Bilirubin $\geq$ 1xULN und/oder Albumin $<$ 1xULN	375
Toronto [39]	24 Monate	AP $>$ 1.67xULN	69
Paris-II [40]	12 Monate	AP $\geq$ 1.5xULN oder AST $\geq$ 1.5xULN oder Bilirubin $>$ 1mg/dl	165
Ehime [41]	6 Monate	Abfall GGT $\leq$ 70% u. GGT $\geq$ 1xULN	83
<b>Scoring- Systeme</b>	<b>Eingeschlossene Parameter</b>		
UK-PBC [42]	12 Monate	Bilirubin, AP, AST nach 12 Monaten, Albumin und Thrombozyten bei Beginn	1916
GLOBE [43]	12 Monate	Bilirubin, AP, Albumin, Thrombozyten nach 12 Monaten, Alter bei Beginn	4119

**Tabelle 2: Definition des inadäquaten Therapieansprechens nach verschiedenen Kriterien der aktuellen EASL Clinical Practice Guidelines [1]**

ULN: upper limit of normal; EASL: The European Association for the Study of the Liver

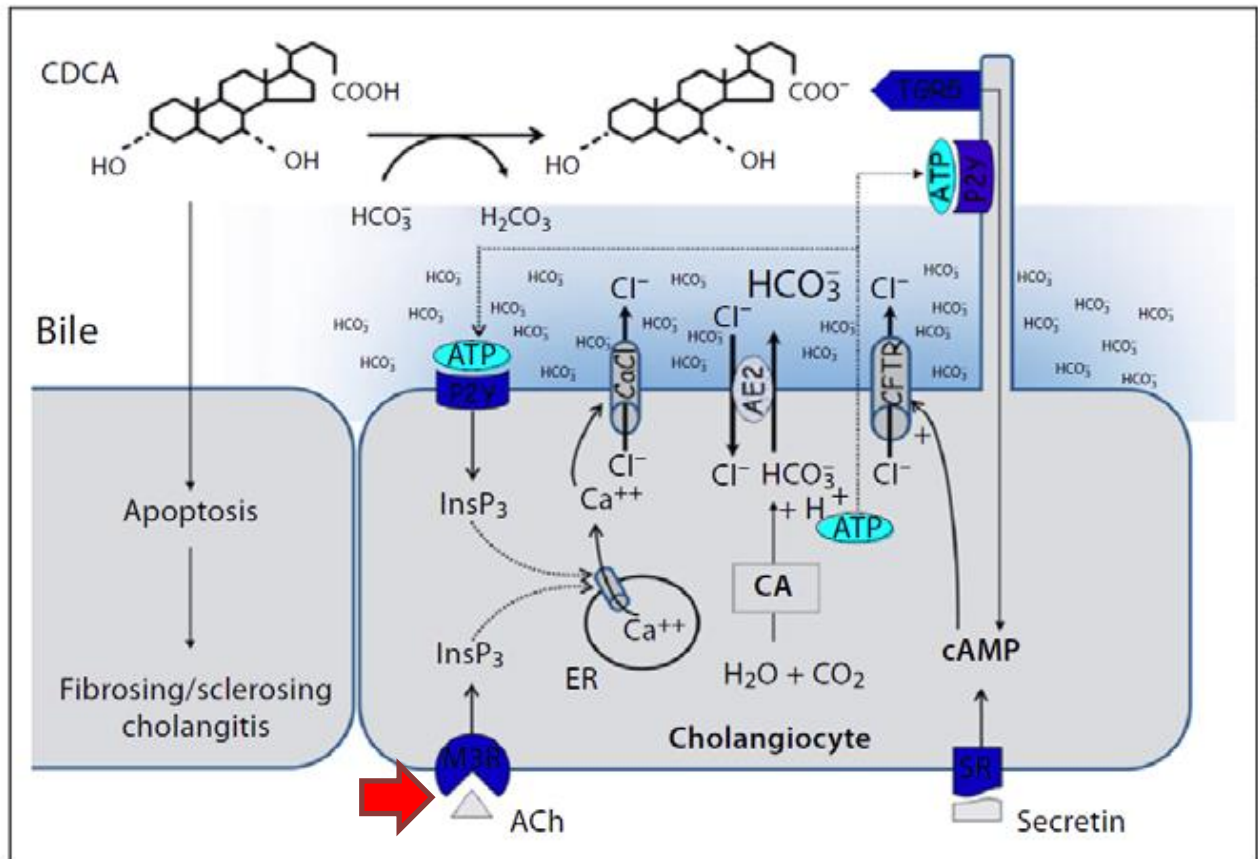
Unter den binären Modellen haben die Paris-I Kriterien die höchste Aussagekraft in Bezug auf die harten Endpunkte Tod oder Lebertransplantation [1, 43], wohingegen sich das Paris-II Kriterium am besten dafür eignet, bei PBC Patienten im Frühstadium Komplikationen aufgrund der Erkrankung zu prognostizieren [40]. Während die meisten Ansätze die Laborparameter nach 12 Monaten Therapie auswerten, zeigt eine neuere

Studie, dass durchaus auch sechs Monate ausreichend sein können [44]. Je nach angelegtem Kriterium sprechen 25% bis 50% der evaluierten PBC Patienten nicht oder nur unzureichend auf eine Therapie mit UDCA an [1]. So konnte gezeigt werden, dass die AP und Bilirubin die beiden wichtigsten prognostischen Marker für den Verlauf der PBC darstellen, es aber für die Bestimmung von Hochrisikopatienten keinen signifikanten Unterschied ergibt, ob als Grenzwert 1.5xULN, 1.67xULN oder 3xULN der AP berechnet werden [45].

## **2.5. Die Hypothese zum Bikarbonat-Schutzschirm bei der Pathogenese der PBC**

Aufgrund der in den vorherigen Abschnitten aufgeführten diagnostischen Bedeutung der AMA und ANA wird die PBC prinzipiell den Auto-Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen zugeordnet. Dennoch ist die Pathogenese der PBC in ihrer Gesamtheit nicht vollständig verstanden und es erscheint sehr wahrscheinlich, dass neben genetischen Faktoren sowie Umweltfaktoren weitere pathogenetische Mechanismen eine Rolle spielen. Vor diesem Hintergrund ist auch eine mögliche Rolle der Gallensäuren in den Fokus gerückt.

Beuers et al. [46] und Hohenester et al. [47, 48] nehmen in ihrem hypothetischen Modell eines sogenannten „biliären Bikarbonat-Schutzschirms“ an, dass sich das Gallengangsepithel, bestehend aus den Cholangiozyten, unter physiologischen Bedingungen vor der potentiellen Toxizität der Gallensäuren (die ja letztendlich Tenside darstellen) schützt, indem es an ihrem apikalen Pol ein alkalisches Milieu herstellt. Essentiell für die Herstellung des alkalischen Milieus ist eine vermehrte Bikarbonat-Sekretion des Gallengangsepithels, deren Mechanismus in der nachfolgenden Abbildung 1 dargestellt wird.



**Abbildung 1: Der sogenannte biliäre Bikarbonat-Schutzschirm nach Hohenester et al. [47]**

ACh: Acetylcholin; ATP: Adenosintriphosphat; CA: Carboanhydrase; CaCl: Calciumabhängiger Chloridkanal; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; CDCA: Chenodesoxycholsäure; CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; ER: endoplasmatisches Retikulum; P2Y: purinerge P2Y Rezeptoren; SR: Secretin Rezeptor; TGR5: G-Protein gekoppelter Gallensäuren Rezeptor; M3R: muskarinerges Acetylcholinrezeptor vom Typ 3 (mAChR3); InsP3: Inositoltriphosphat; AE2: Anionenaustauscher 2

Der Anionenaustauscher 2 (AE 2) ist für den Großteil der Bikarbonat Sekretion verantwortlich. Über diesen Kanal wird Bikarbonat im Austausch für Chlorid aus den Cholangiozyten in das Gallengangslumen sezerniert. Die Sekretionsrate von Bikarbonat wird von verschiedenen Faktoren moduliert, von denen einer die Bindung von Acetylcholin an den muskarinerges Acetylcholinrezeptor vom Typ 3 (M3R bzw. mAChR3) ist.

Wie im Tiermodell von Alvaro et al. [49] gezeigt werden konnte, wird durch Bindung von Acetylcholin (ACh) an den M3R bzw. mAChR3 (roter Pfeil) die intrazelluläre Inositoltriphosphat-Konzentration (InsP3) gesteigert, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca<sup>++</sup>) führt. Gleichzeitig bindet Secretin an den entsprechenden Rezeptor und aktiviert cAMP. Durch die Aktivierung von cAMP und die höhere intrazelluläre Calciumkonzentration strömen mehr Chloridionen durch die

entsprechenden Kanäle aus den Cholangiozyten in das Gallengangslumen. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung des AE 2, wodurch mehr Bikarbonat im Austausch für Chlorid in das Gallengangslumen gelangt. Die Aktivierung des basolateralen M3R bzw. mAChR3 durch Acetylcholin hat allein keine Wirkung auf den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher AE 2. Sie potenziert jedoch die stimulierende Wirkung von Secretin auf diesen Ionenaustauscher und führt zu bikarbonatreichen Gallensäuren. Wird der mAChR3 hingegen durch einen Antagonisten blockiert, verschwindet die potenziierende Wirkung wieder [49].

Eine erhöhte Konzentration von Bikarbonat nahe der Zellmembran der Gallengangsepithelzellen führt zu einer Alkalisierung und damit zu einer Deprotonierung der Gallensäuren. Derart deprotonierte, hydrophile Gallensäuren können nicht mehr in die Cholangiozyten gelangen, wodurch letztere vor den toxischen Auswirkungen der Gallensäuren wie z.B. die Induktion der Apoptose, geschützt sind [46, 47]. Sind die Cholangiozyten hingegen in ihrer Wirkungsweise aufgrund der immunologischen Prozesse bei PBC u.a. durch die Down-Regulation des AE2 eingeschränkt, schreiten Entzündung und Apoptose weiter fort und es kommt zur PBC-typischen Pathohistologie [1].

## **2.6. Hypothesen zum möglichen Einfluss der mAChR3 Auto-Antikörper bei der Pathogenese der PBC**

Gemeinsam mit den Arbeitsgruppen von Reinhild Klein vom Immunpathologischen Labor des Universitätsklinikum Tübingen sowie Christoph Berg vom Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin I (Hepatologie, Gastroenterologie, Infektiologie) untersucht die Arbeitsgruppe Chronisch-entzündliche Gallengangserkrankungen unter Leitung von PD Dr. med. Tobias Müller an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum die Hypothese, dass dysfunktionale mAChR3-vermittelte Signalwege, z.B. durch spezifische inhibitorische Auto-Antikörper gegen mAChR3 (mAChR3 Auto-AK) einen möglichen Einfluss auf die Pathogenese der PBC haben. Diese Hypothese soll in den nachfolgenden Abschnitten erläutert werden.

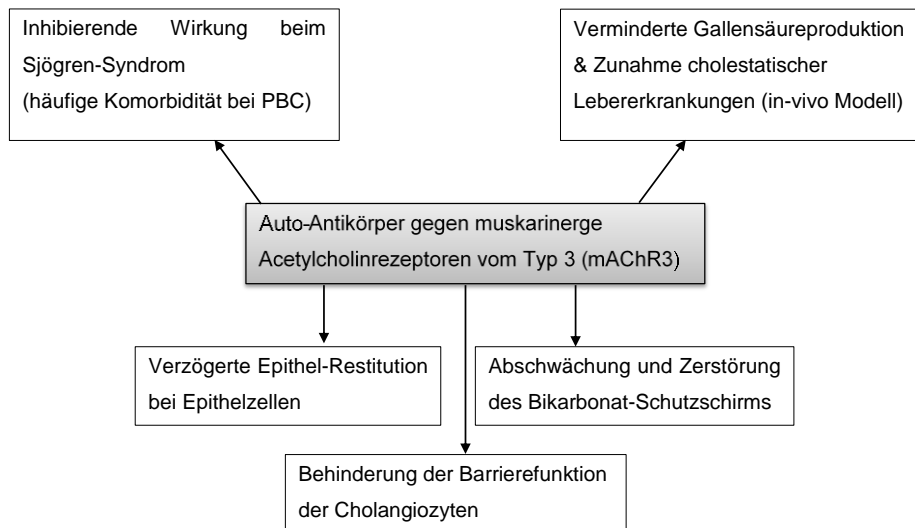
Zunächst konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Blockade des mAChR3 bzw. der Einsatz von spezifischen mAChR3 Antagonisten oder funktionslose mAChR3 Auswirkungen auf die Bikarbonatsekretion bzw. auf die Gallensäureproduktion haben. Zum einen schwächen sie den von Beuers et al. [46] und Hohenester et al. [47] beschriebenen biliären Bikarbonat-Schutzschirm ab. So konnten Alvaro et al. [49] in ihrer Arbeit an Ratten zeigen, dass die Blockade der mAChR3 durch mAChR3 Antagonisten die potenzierende Wirkung auf Secretin aufhebt und somit die Bikarbonat Sekretion über den AE 2 reduziert wird.

Durchschein et al. [50] kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass Mäuse mit funktionslosem mAChR3 eine verminderte Gallensäureproduktion aufwiesen, wahrscheinlich durch eine verminderte Bikarbonatsekretion, und anfälliger für cholestatische Lebererkrankungen waren. Sie konnten außerdem zeigen, dass durch die Gabe von mAChR3-Agonisten die Schwere der Lebererkrankung vermindert werden konnte. Nach der Hypothese des Bikarbonat Schutzschirmes führt die verminderte Bikarbonat Sekretion in den Arbeiten von Alvaro et al. [49] und Durchschein et al. [50] zu einer Zerstörung dieses Schirmes und konsekutiver Apoptose der Cholangiozyten, die sich ohne Schutzschirm nicht mehr gegen das Eindringen toxischer Gallensäuren wehren können. Die mAChR3 könnten auf die gleiche Art und Weise wie mAChR3 Antagonisten wirken und so die Zerstörung des Bikarbonat-Schutzschirmes fördern und zur Pathogenese der PBC beitragen. Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien belegt werden, dass bei PBC Patienten der Ionenaustauscher AE 2 herunterreguliert ist [51-54], was den inhibierenden Effekt der Antikörper gegen mAChR3 in Bezug auf die Zerstörung des Bikarbonat-Schutzschirmes verstärken könnte.

Zum anderen könnten mAChR3 Auto-AK die über tight-junctions aufgebaute Barrierefunktion der Cholangiozyten behindern und so zur Pathogenese der PBC beitragen. Jüngere Studien in intestinale Epithelzellen haben gezeigt, dass Blockaden von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren die Restitution des entsprechenden Epithels herauszögern und Acetylcholinagonisten zum Schutz des Epithels bei entzündlichen Darmerkrankungen beitragen [55-57]. Andere Studien stellten einen stimulierenden Effekt von Acetylcholin auf die Migration [58] und die Proliferation [59] intestinaler Epithelzellen beim Kolonkarzinom fest.

Besonders erwähnenswert für die Hypothese, dass mAChR3 Auto-AK eine Rolle bei der Pathogenese der PBC spielen könnten, ist in diesem Zusammenhang, dass mAChR3 nicht nur in den Cholangiozyten, sondern auch in exokrinen Drüsen beim Sjögren-Syndrom nachgewiesen wurden [60], von welchem je nach Studie und untersuchter Region bis zu 73% der PBC Patienten betroffen sind [61]. Die Leitsymptome des primären Sjögren-Syndroms sind Mund- und Augentrockenheit, die durch die unzureichende Funktion von Speichel- und Tränendrüsen hervorgerufen und oft als Sicca-Symptomatik bezeichnet wird [62, 63]. Die mAChR3 und mAChR3 Auto-AK scheinen bei der Pathogenese des Sjögren-Syndroms, insbesondere bei der Sicca-Symptomatik, eine wesentliche Rolle zu spielen. So waren Mäuse ohne mAChR3 nicht in der Lage, Speichel zu produzieren [64]. Des Weiteren wiesen Dawson et al. [65] in ihrer Studie nach, dass mAChR3 Auto-AK in vitro bei Zellen aus der submandibulären Speicheldrüse von Mensch und Maus zu einer verminderten Speichelproduktion durch Bindung an den mAChR3 führten. Bei der Behandlung des Sicca-Komplexes werden beim Sjögren-Syndrom Muskarinrezeptor-Agonisten wie Pilocarpin eingesetzt [62], was ebenfalls ein Hinweis ist, dass mAChR3 bei der Pathogenese des primären Sjögren-Syndroms eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits aufgeführt, ist das Sjögren-Syndrom eine häufige Begleiterkrankung von PBC Patienten [61, 66] und analog zu einer verminderten Speichelproduktion durch mAChR3 Auto-AK beim Sjögren-Syndrom könnten mAChR3 Auto-AK bei PBC zu einer verminderten Bikarbonat Sekretion führen. Beim Sjögren-Syndrom konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits nachgewiesen werden, dass mAChR3 Auto-AK eine funktionale Wirkung haben [60, 65, 67-69].

In der nachfolgenden Abbildung 2 ist die mögliche Beteiligung der mAChR3 Auto-AK bei der Pathogenese der PBC zur besseren Übersicht graphisch dargestellt.

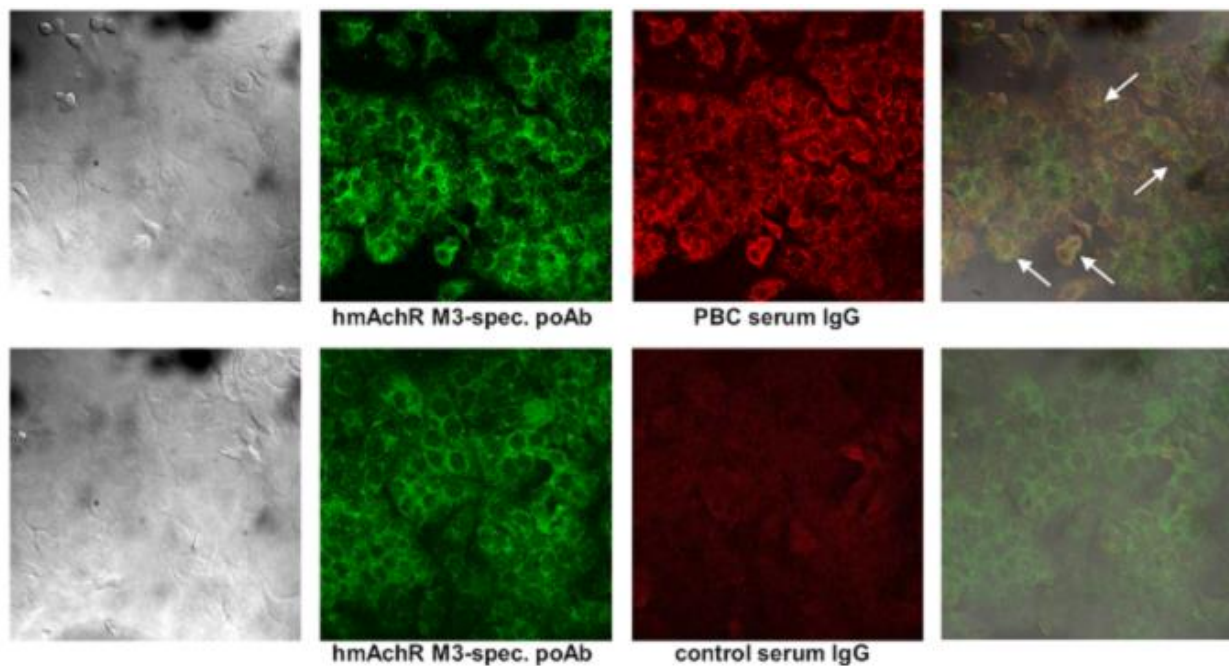


**Abbildung 2: Potenzieller Einfluss der mACHR3 Auto-AK**

Die Zusammenschau dieser Beobachtungen legt nahe, dass mACHR3 Auto-AK eine Rolle bei der Pathogenese der PBC spielen und im Gegensatz zu AMAs sowohl die Organspezifität als auch die typischen Begleiterkrankungen bei PBC Patienten erklären könnten.

## 2.7. Projektspezifische Vorarbeiten

In den Vorarbeiten unserer kooperierenden Arbeitsgruppen von Reinhild Klein und Christoph Berg vom Universitätsklinikum Tübingen wurden erstmalig spezifische mAChR3 Auto-AK bei Patienten mit PBC nachgewiesen, wie nachfolgende Abbildung 3 zeigt [70].



**Abbildung 3: Nachweis spezifischer mAChR3 Auto-AK bei Patienten mit PBC**

Unter Verwendung eines polyklonalen anti-hm-AChR3-Antikörpers können spezifische Auto-AK gegen mAChR3 im Serum von Patienten mit PBC nachgewiesen werden (Pfeile). Modifiziert nach Berg et al. [70]

hmAChR M3-spec poAb: spezifischer polyklonaler Antikörper gegen humane muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3; IgG: Immunglobulin G

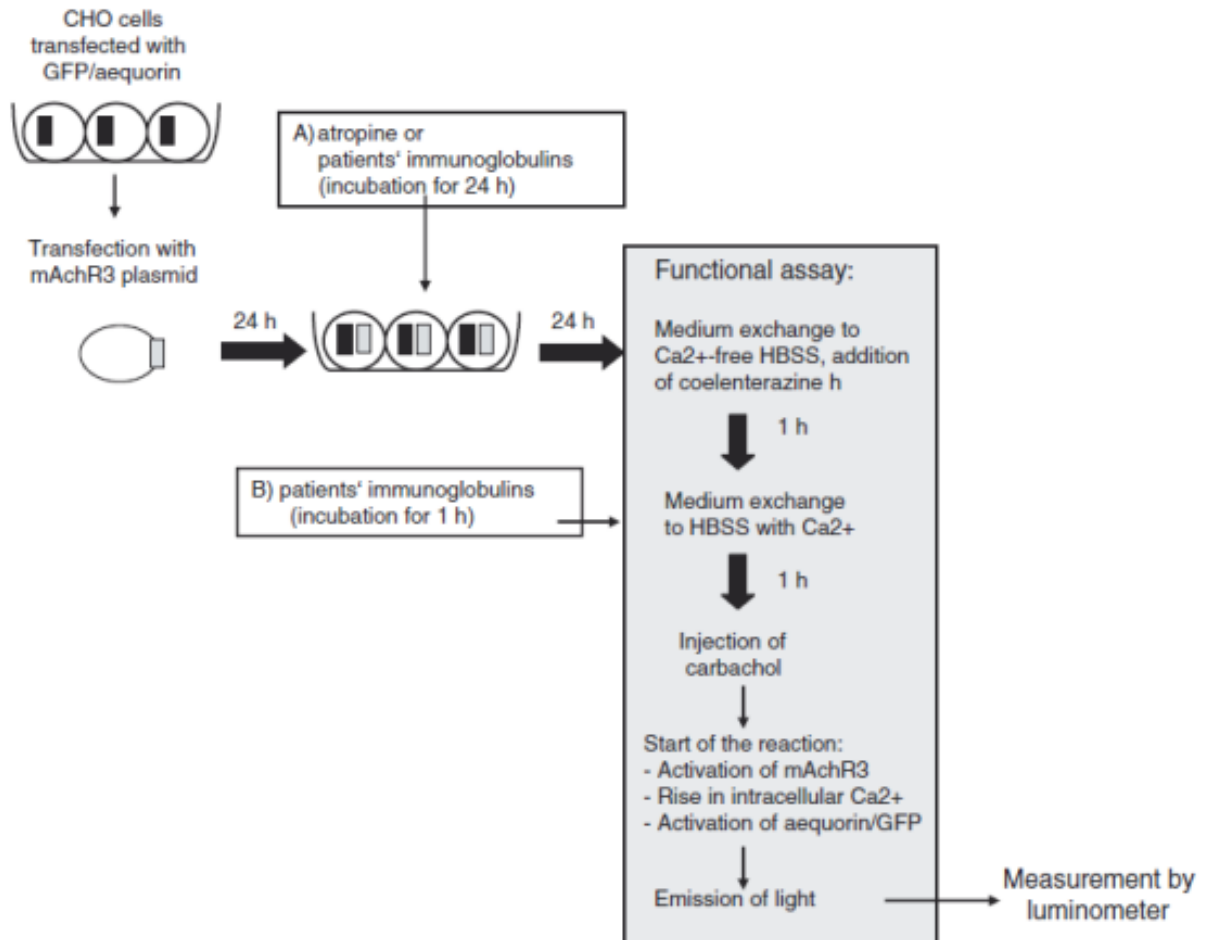
Für diesen Nachweis wurden Zellen, die den mAChR3 exprimieren, fixiert und entweder mit einem spezifischen mAChR3 polyklonalen Antikörper (2. Spalte von Abbildung 3) oder mit Serum von PBC Patienten (3. Spalte, obere Zeile von Abbildung 3) bzw. mit Serum einer gesunden Kontrollgruppe (3. Spalte, untere Zeile von Abbildung 3) inkubiert. In der 4. Spalte von Abbildung 3 wurden die polyklonalen Antikörper gleichzeitig mit den Seren des PBC Patienten bzw. des gesunden Individuums auf die Zellen mit mAChR3 aufgetragen. Hier ist im Vergleich von PBC Patient und gesunder Kontrollperson zu erkennen, dass das Serum vom PBC Patienten mAChR3 Auto-AK aufweist (weiße Pfeile), die an den entsprechenden Rezeptor binden und sich aufgrund der offensichtlichen Co-Lokalisation mit dem polyklonalen Antikörper gelb demarkieren, während im Serum des gesunden Individuums keine Auto-Antikörper nachgewiesen



werden konnten.

Berg et al. [70] fanden in ihrer Arbeit Hinweise darauf, dass die Histologie der PBC Patienten mit mAChR3 Auto-AK ein fortgeschrittenes Stadium im Vergleich zu PBC Patienten ohne diesen Auto-AK aufwies. In einer späteren Arbeit wiesen auch Tsuboi et al. [71] mAChR3 Auto-AK bei japanischen PBC Patienten nach, konnten jedoch keine klinischen Unterschiede zwischen PBC Patienten in Abhängigkeit vom mAChR3 Auto-AK Status feststellen. Bei beiden Studien stützen sich die Erkenntnisse jedoch nur auf wenige PBC Patienten: Bei Berg et al. [70] war nur bei 6 PBC Patienten mit mAChR3 Auto-AK eine Histologie verfügbar (17 bei PBC Patienten ohne mAChR3 Auto-AK). Bei Tsuboi et al. [71] bestand das PBC Patientenkollektiv ohne mAChR3 Auto-AK nur aus 6 Personen. Die beiden hier genannten Arbeiten verglichen die PBC Patientenkollektive lediglich in Abhängigkeit der Prävalenz des mAChR3 Auto-AK und ließen die Funktionalität des mAChR3 Auto-AKs jedoch außer Betracht.

In den weiteren Vorarbeiten unserer Tübinger Kooperationspartner konnten Preuss et al. [60] erstmalig einen Assay zur Funktionalitätsprüfung isolierter mAChR3 Auto-AK aus Seren von Patienten mit gesichertem Sjögren-Syndrom entwickeln. Bei dieser Methode wurde ein Lumineszenz-basiertes Zellkulturmodell verwendet, um die Funktionalität der mAChR3 Auto-AK zu analysieren. Dafür wurden CHO (Chinese Ovarian Cells) mit überexprimierten mAChR3 eingesetzt [60]. Nach Inkubation von Immunglobulinen von Patientenseren wurde der Effekt auf den mAChR3 anhand der Veränderung des Calcium-Einstroms luminometrisch gemessen [60]. Die folgende Abbildung stellt den Prozess graphisch dar.



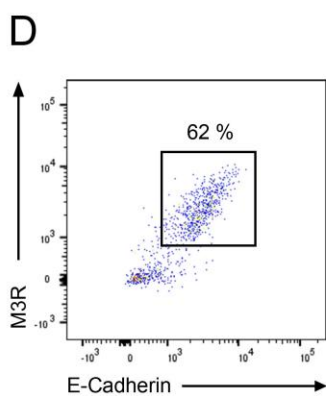
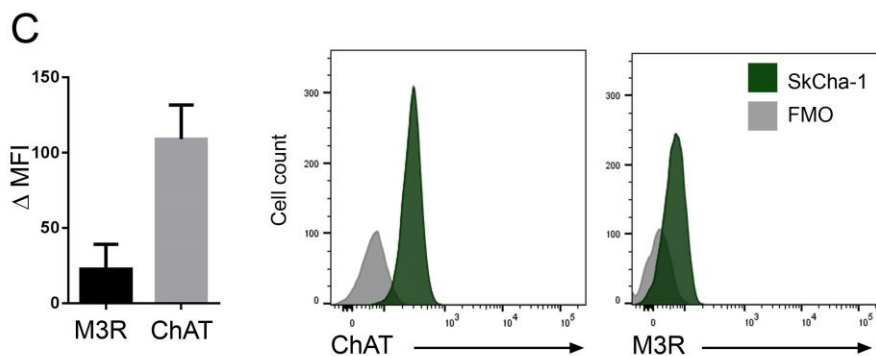
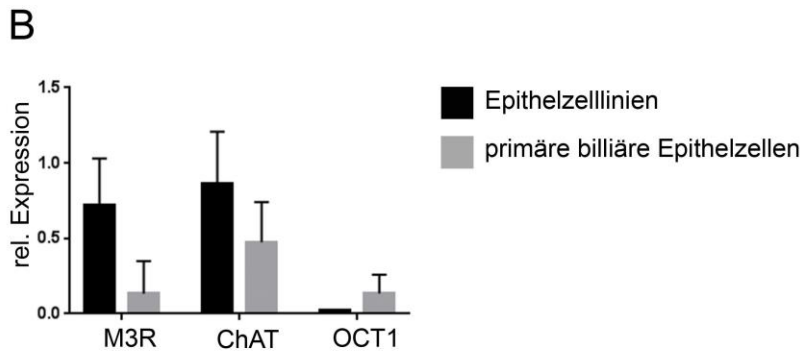
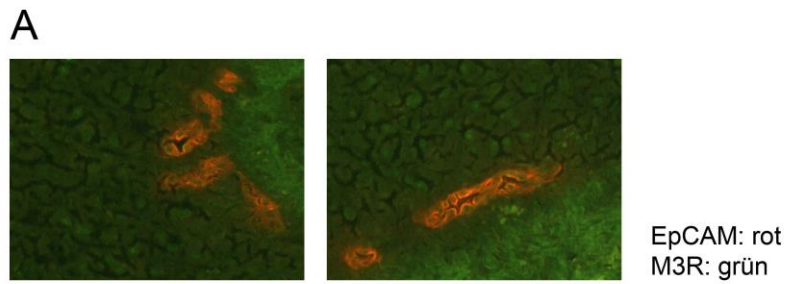
**Abbildung 4: Lumineszenz-basierter Assay zur Funktionalitätsprüfung spezifischer mACHR3 Auto-AK**

Modifiziert nach Preuss et al. [60].

CHO: Chinese hamster ovarian cells; GFP: green fluorescence proteine; mACHR3: muskarinerner Acetylcholinrezeptor vom Typ 3; HBSS: Hanks's balanced salt solution

Diese Untersuchung wurde bisher nur bei Patienten mit Sjögren-Syndrom durchgeführt, es erscheint aber durchaus sinnvoll, das Serum von PBC Patienten ebenfalls auf diese Weise zu untersuchen, da – wie oben dargestellt – bei PBC Patienten mACHR3 Auto-AKs nachgewiesen werden konnten und diese mit der hier vorgestellten Untersuchung auf ihre Funktionalität überprüft werden können. Hier trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, PBC Patienten nach der Funktionalität des mACHR3 Auto-AKs zu vergleichen und somit ein differenzierteres Bild von einem potentiellen Einfluss des mACHR3 Auto-AK auf die Erkrankung PBC zu erhalten.

In unseren weiteren Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass die mACHR3 in der Leber spezifisch für das Gallengangsepithel sind, wie in der nachfolgenden Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Expression von mAChR3 im intra-hepatischen Gallengangsepithel**  
Mit freundlicher Genehmigung von Daniela Paclik, Labor PD Dr. Tobias Müller

EpCAM: Epithelzellmarker; M3R: muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3 (mAChR3); ChAT: Acetylcholintransferase; OCT1: organischer Kationentransporter 1; MFI: mittlere Fluoreszenzintensität; FMO Fluoreszenz minus eins; SkChA-1: Zelllinie eines cholangiozellulären Karzinoms

Teilabbildung A zeigt, dass der mAChR3 in der Leber exklusiv von biliären Epithelzellen (hBEC) exprimiert wird. Dafür wurden Gefrierschnitte gesunder, humaner Leber mit Antikörpern gegen mAChR3 (grün) und dem Epithelzellmarker EpCAM (rot) gefärbt.

In Teilabbildung B wird die quantitative PCR Analyse humaner Epithelzelllinien und isolierter biliärer Epithelzellen dargestellt. Sie bildet die mRNA Expression von mAChR3 und der Acetylcholintransferase (ChAT) ab. Dieses Enzym ist entscheidend für die Synthese von Acetylcholin.

Teilabbildung C zeigt links, dass mAChR3 und ChAT von hBECs exprimiert werden, dargestellt als  $\Delta$  mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Dabei wurde jeweils die MFI der FMO (Fluorescence minus one) Kontrolle von den gefärbten Zellen subtrahiert. Im rechten Teil der Abbildung findet sich ein repräsentatives Histogramm der mAChR3- und ChAT-Expression in Sk-Cha-1 Zellen (grün). Die Kontrolle (FMO - Fluorescence minus one) ist in grau dargestellt.

Teilabbildung D beweist, dass mAChR3 von isolierten hBECs exprimiert werden. Die Zellen wurden aus gesunder Leber isoliert und als lebende, CD45<sup>-</sup>, EpCAM<sup>+</sup> Zellen definiert.

Die oben aufgeführten Vorarbeiten legen somit nahe, dass 1) mAChR3 Auto-AK bei PBC Patienten nachgewiesen werden können und, 2) dass die Expression von mAChR3 in der Leber spezifisch für das Gallengangsepithel ist. Zudem besteht mit dem von Preuss et al. [60] entwickelten *in vitro* System erstmalig die Möglichkeit, die Funktionalität dieser Auto-AK zu testen.

## **2.8. Zusammenfassung und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit**

In dieser Arbeit werden demografische und klinische Merkmale von PBC Patienten mit inhibierenden Auto-Antikörpern gegen mAChR3 mit PBC Patienten ohne diesen inhibierenden Auto-Antikörper verglichen, um so herauszufinden, ob der Verlauf und die Schwere der Erkrankung bei PBC Patienten mit mAChR3 Auto-AK sich von denjenigen ohne inhibierenden mAChR3 Auto-AK unterscheidet. Zudem sollen das Therapieansprechen auf eine Standardtherapie mit UDCA sowie der konsekutive Langzeitverlauf der PBC Patienten in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status miteinander verglichen werden. Damit soll im Sinne eines translationalen Ansatzes überprüft werden, ob sich die auf der Mikroebene entwickelten Hypothesen aus

Kapitel 2.6 auch klinisch, d.h. im Krankheitsbild der Personen mit inhibierenden mAChR3 Auto-AKs wiederfinden lassen, z.B. in Form eines aggressiveren Krankheitsverlaufes. Für diese Analysen wurden Daten von PBC Patienten aus zwei unabhängigen universitären Zentren aus Berlin und Leipzig ausgewertet.

Die vorliegende Arbeit umfasst im Hinblick auf die Fragestellung somit 5 wesentliche Ziele:

- 1.) Bestimmung der Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK bei PBC Patienten sowie einer gesunden Kontrollgruppe.
- 2.) Klinische, laborchemische und histologische Charakterisierung der PBC Patienten in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status
- 3.) Evaluierung des Therapieansprechens auf UDCA nach 12 Monaten in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status
- 4.) Evaluierung des transplantatfreien Überlebens in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status
- 5.) Evaluierung der Rekurrenz der PBC nach erfolgter Lebertransplantation in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status

## **3. Material und Methoden**

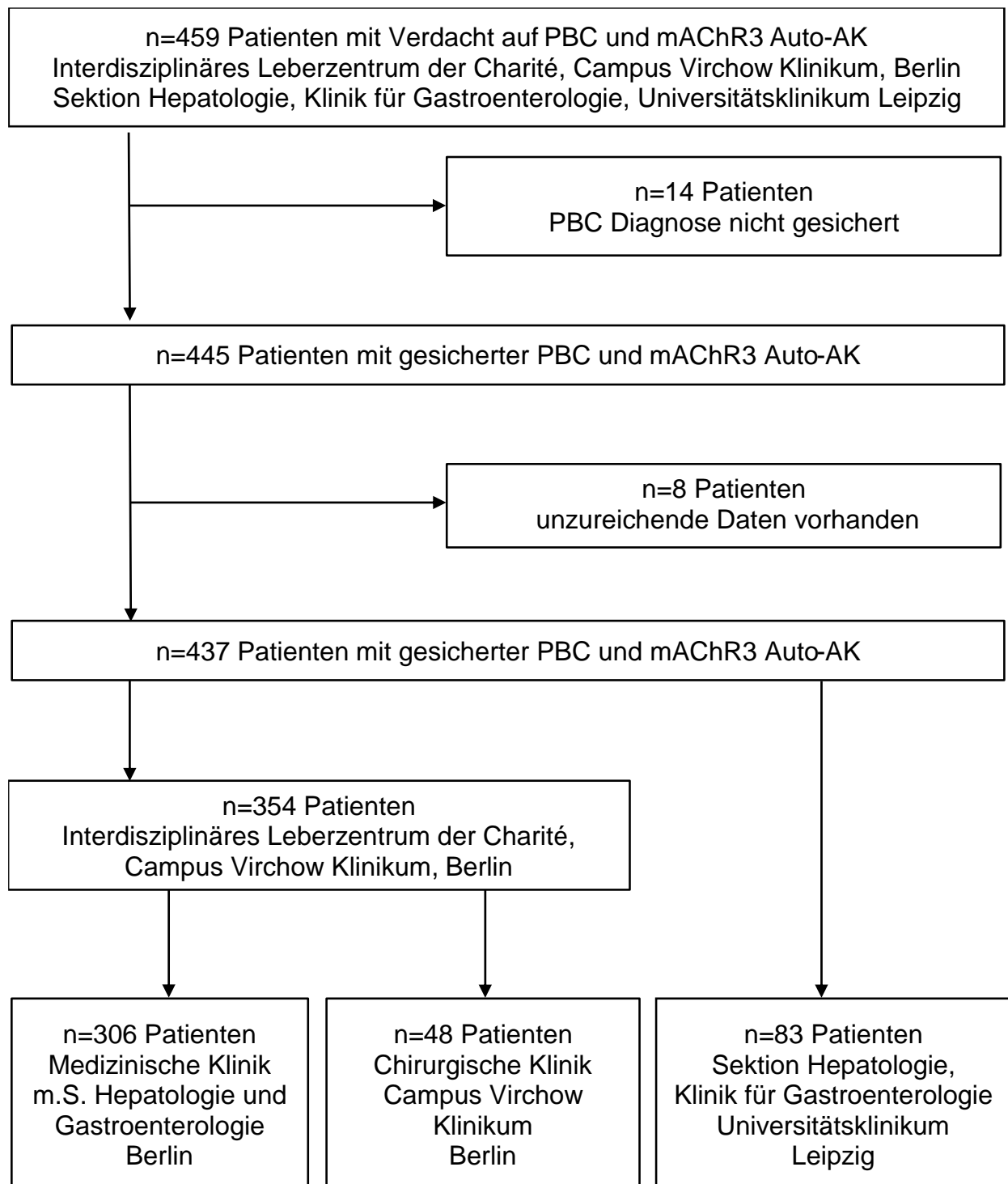
### **3.1. Einschluss der Patienten und Quellen der Dokumentation**

Die Daten für diese retrospektive Arbeit wurden an zwei Universitätskliniken erhoben. Der Großteil der Daten stammt von PBC Patienten, die am interdisziplinären Leberzentrum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Virchow Klinikum (CVK) behandelt wurden. Die zweite Kohorte umfasst PBC Patienten der Sektion Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Leipzig.

Für die Berliner Kohorte dieser Arbeit wurden initial die Daten von 373 PBC Patienten evaluiert, die im Zeitraum von Juni 1978 bis März 2017 am interdisziplinären Leberzentrum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, CVK betreut wurden. Die hier verwendeten Daten wurden der elektronischen Datenerfassung und den Patientenakten des interdisziplinären Leberzentrums der Charité – Universitätsmedizin Berlin, CVK und des Zentralarchivs entnommen. Die den Patientenakten beiliegenden Daten anderer medizinischer Einrichtungen (Arztbriefe, Laborwerte, sonstige Befunde) wurden ebenfalls berücksichtigt.

Voraussetzung für den Einschluss in die vorliegende Studie war die gesicherte Diagnose einer PBC und die Bestimmung des mACHR3 Auto-AKs. Von den 373 Patienten der Medizinischen Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie mit vorhandenem mACHR3 Antikörper wurden 11 Patienten von der Analyse ausgeschlossen, weil sich der Verdacht auf PBC nicht bestätigen ließ. Weitere 8 Patienten konnten aufgrund fehlender Werte nicht mit in die Analyse aufgenommen werden. Insgesamt umfasste die untersuchte Kohorte damit 354 PBC Patienten. Von diesen 354 PBC Patienten stammten 306 Patienten aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie und 48 Patienten aus der Ambulanz für Lebertransplantation der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des CVK. Für die Analyse wurden die beiden Patientengruppen separat ausgewertet: Für den Vergleich der Rezidivraten nach einer Lebertransplantation wurden nur die Daten der Ambulanz für Lebertransplantation herangezogen, die übrige Analyse stützt sich auf die Daten der Hochschulambulanz der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie. Analog zu den Berliner Patienten wurden für die Leipziger Kohorte

dieser Arbeit die Daten von 86 PBC Patienten der Sektion Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Leipzig retrospektiv erfasst, von denen bei 3 die PBC Diagnose nicht endgültig gesichert werden konnte, so dass 83 PBC Patienten aus Leipzig in die Analyse miteinbezogen wurden. Die nachfolgende Abbildung 6 fasst das Einschussverfahren zusammen.



**Abbildung 6: Einschussverfahren von Patientenakten**

### **3.2. Erfasste klinische und paraklinische Befunde**

Zur allgemeinen Beschreibung der Kohorten wurden Informationen zum Geschlecht, Alter und Gewicht erhoben, sowie - falls retrospektiv feststellbar - das Datum der erstmaligen Leberwerterhöhung. Dokumentiert wurden außerdem das Datum der Erstvorstellung, der Erstdiagnose, die Therapieeinleitung mit UDCA und des letzten Eintrages in die Patientenakte. Anhand dieser Zeitangaben konnte der Zeitraum von der ersten Leberwerterhöhung bis zur Therapieeinleitung, die tägliche Dosis UDCA in mg/kg KG/d sowie die Therapiedauer mit UDCA berechnet werden.

Die folgenden Laborparameter wurden vor Therapieeinleitung, 1 Jahr nach Therapieeinleitung und im Verlauf der Erkrankung dokumentiert: Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), AP, GGT, Gesamt-Bilirubin, Albumin, Quick-Wert, Thrombozyten und die Immunglobuline IgM, IgG, IgA. AP und GGT sind PBC-relevante Cholestaseparameter, während erhöhte Transaminasen eher auf eine Leberzellschädigung hinweisen. Ein erhöhtes Bilirubin, und/oder ein erniedrigtes Albumin deuten auf ein biochemisch fortgeschrittenes Stadium hin. Um eine bessere Vergleichbarkeit von Messwerten mit der Literatur sowie zwischen Männern und Frauen zu erreichen und laborabhängige Schwankungen zu eliminieren, sind Bilirubin, AST, ALT, AP und GGT in ULN angegeben. Da die Patienten die Ambulanzen der Medizinischen Kliniken nicht in absolut festen Zeitintervallen aufsuchen, gilt ein Toleranzintervall von +/- 4 Wochen 1 Jahr nach Therapieeinleitung.

Ferner wurden die PBC-typischen Auto-Antikörper erfasst: AMAs, antimitochondriale Antikörper der Subgruppe 2 (AMA-M2) sowie ANAs und davon explizit Antikörper gegen das Protein sp100 (sp100). Auch die für andere autoimmune Lebererkrankungen (primär sklerosierende Cholangitis - PSC, Autoimmunhepatitis - AIH) typischen Auto-Antikörper wurden dokumentiert. Ebenso wurde nach typischen Autoimmunerkrankungen gefragt, die oft mit einer PBC einhergehen wie die Autoimmunthyreoiditis, Autoimmunhepatitis, rheumatische Erkrankungen sowie nach der Sicca-Symptomatik, die typisch für das Sjögren-Syndrom ist.

Um den Zustand der PBC Patienten und die Schwere der Erkrankung zu beschreiben, wurden Symptome wie Fatigue, Pruritus und Ikterus vor Therapieeinleitung und 12 Monate später evaluiert. In den verfügbaren Histologien wurde der Fibrosegrad und das



Erkrankungsstadium nach Ludwig et al. bestimmt [72]. Folgende Endpunkte wurden erhoben: Entwicklung einer Leberzirrhose, Diagnose eines Karzinoms (hepatozelluläres Karzinom - HCC oder cholangiozelluläres Karzinom - CCC), Lebertransplantation, Rezidiv nach Transplantation sowie Tod.

Festzuhalten ist, dass aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie nicht zu jedem PBC Patienten alle Daten verfügbar waren, da die Dokumentation der Patientenakten größtenteils in Papierform erfolgte und einige Ereignisse lange Zeit zurücklagen oder nur unzureichend dokumentiert wurden. Für die Leipziger Kohorte sind zu einigen Variablen keine Daten verfügbar, da diese dort nicht analog zur Berliner Kohorte dokumentiert wurden.

### **3.3. Bestimmung der Prävalenz und Funktionalität der mAChR3 Auto-Antikörper**

Die Methode zur Bestimmung der mAChR3 Auto-AK erfolgte analog zu Preuss et al. [60]. Die Normwerte wurden im Vergleich zur Vorarbeit von Preuss et al. [60] adaptiert. Dafür wurden Grenzwertoptimierungskurven (Receiver Operating Curve-ROC) anhand der vom Luminometer gemessenen Funktionalität des mAChR3 unter Zugabe der isolierten Auto-AK von PBC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen und eine Spezifität von 95% angestrebt. Auf diese Weise wurde der untere luminometrische Grenzwert in der vorliegenden Arbeit bei  $\leq 80\%$  festgelegt, um das Vorhandensein inhibitorischer Auto-AK zu definieren. Dies bedeutet, dass luminometrische Werte bis einschließlich 80%, d.h. eine Auto-AK-vermittelte mAChR3-Funktionseinschränkung auf mindestens 80% im Vergleich zur Kontrolle, als Hinweis auf inhibierende Auto-AK gelten. Die PBC Patienten, deren Wert für den mAChR3 Auto-AK  $\leq 80\%$  beträgt, werden im Folgenden als mAChR3 + PBC Patienten bezeichnet. Die PBC Patienten mit einem mAChR3-Wert  $> 80\%$  werden im Folgenden als mAChR3- PBC Patienten bezeichnet.

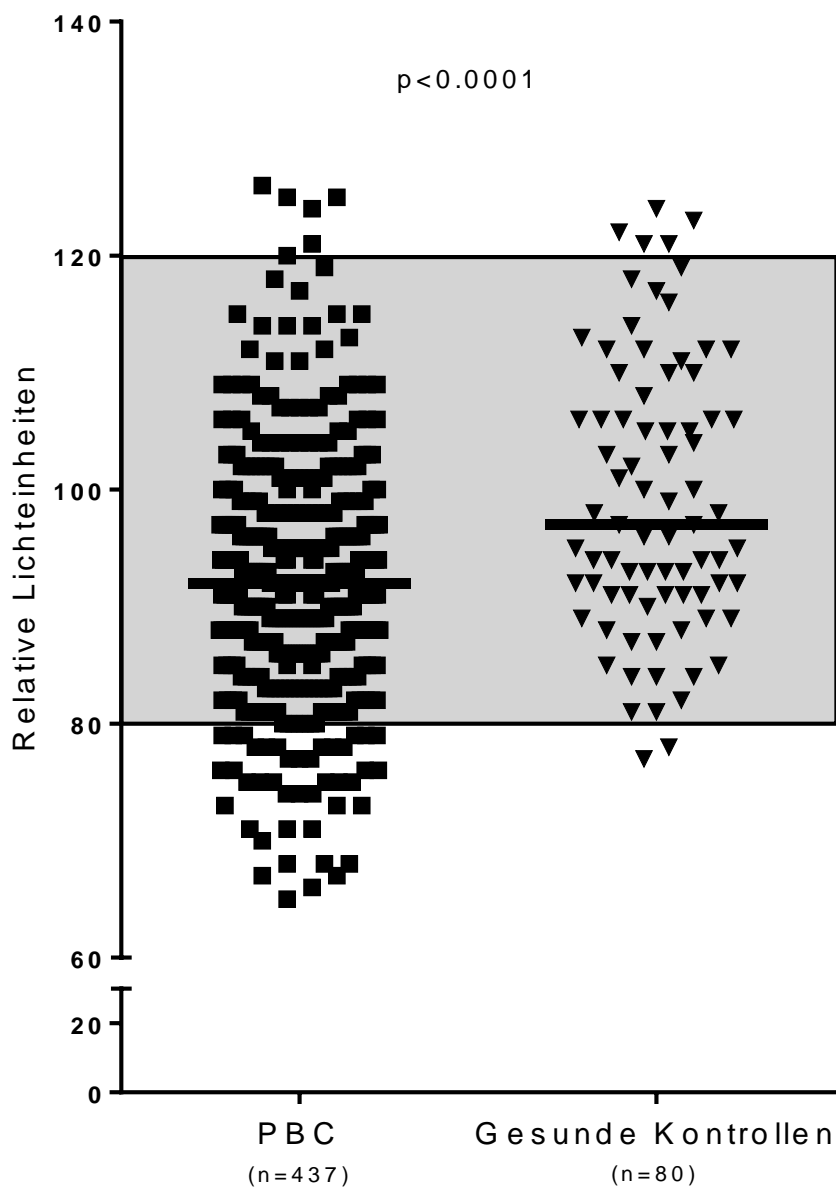
### **3.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 24 für Windows ausgeführt. Für die Beschreibung der Patientenkohorten wurden Häufigkeiten in Anzahl und Prozent angegeben. Bei metrischen Merkmalen wurden der Median sowie der Interquartilsabstand angegeben. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben aus einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Zusammenhänge zwischen zwei nominalen Merkmalen wurden mit dem exakten Test nach Fisher geprüft. Für den Vergleich von zwei abhängigen Stichproben einer nicht normalverteilten Zielgröße wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Für die Bestimmung von Risikofaktoren für das Auftreten definierter Endpunkte (Lebertransplantation, Tod aufgrund leberassoziierter Komplikationen) wurde eine Coxregression nach der Einschlussmethode durchgeführt. Das Überleben beider Gruppen wurde mit einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt und für den Vergleich der Überlebenszeiten der Logrank Test durchgeführt. Für die Berechnung der Signifikanz von Differenzen einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Für die verwendeten statistischen Testverfahren wurde ein Signifikanzniveau von 0.05 (5 %) definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Prävalenz der mAChR3 Auto-Antikörper bei PBC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe

Abbildung 7 zeigt die Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK bei 437 PBC Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe mit 80 Probanden. Hierbei gelten luminometrische Werte bis einschließlich 80 per definitionem als inhibitorische Auto-AK. Werte zwischen 80 und 120 definieren den Normalbereich und Werte ab 120 gelten als exzitatorische Auto-AK.



**Abbildung 7: Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK bei PBC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe** (grau: Normbereich)

Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, zeigte sich bei PBC Patienten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK. Bei den PBC Patienten wiesen 11.2% (49 von 437 Patienten) inhibitorische mAChR3 Auto-AK auf, während in der gesunden Kontrollgruppe nur 2.5% (2 von 80 Probanden) derartige Auto-AK zeigten ( $p < 0.0001$ ).

In den weiteren Abschnitten werden PBC Patienten mit inhibitorischen mAChR3 Auto-AK als mAChR3+ PBC Patienten und PBC Patienten ohne inhibitorische mAChR3 Auto-AK als mAChR3- PBC bezeichnet.

## 4.2. Vergleich der Baseline Charakteristika

### 4.2.1. Allgemeine Beschreibung

#### 4.2.1.1. Berliner Kohorte

Die nachfolgende Tabelle 3 vergleicht allgemeine Charakteristika der Berliner mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten vor Therapieeinleitung.

Parameter	mAChR3+ PBC	n	mAChR3- PBC	n	p
Anteil mAChR3+ bzw. mAChR3- PBC Patienten an Gesamtkohorte° (n=306)	10.8%	33	89.2%	273	
Weiblich° n (%)	30 (90.9)	33	252 (92.3)	273	ns
Alter bei Erstdiagnose * (Jahre)	57 (20)	33	54 (15)	268	ns
Zeitraum von Leberwerterhöhung bis Therapieeinleitung * (Jahre)	1 (9)	12	1 (4)	140	ns
Alter bei Therapieeinleitung* (Jahre)	57.5 (21)	32	55 (15)	257	ns
Beobachtungszeit seit Therapieeinleitung* (Jahre)	14 (11)	32	13 (10)	247	ns
UDCA* (mg/kg KG/d)	12.2 (4.9)	30	12.5 (4.2)	256	ns

**Tabelle 3: Vergleich der allgemeinen Charakteristika der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung**

° Anzahl n (%), \*Median (IQR)

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, umfasste die untersuchte Berliner Gesamtkohorte insgesamt 306 PBC Patienten, von welchen 33 (10.8%) Patienten einen mAChR3 Auto-AK $\leq$ 80 (mAChR3+ PBC) aufwiesen. Der Frauenanteil wies keine signifikanten Unterschiede auf und lag bei den mAChR3+ PBC Patienten bei 90.9%, bei den mAChR3- PBC Patienten bei 92.3%.

Der Altersmedian bei Diagnosestellung lag bei den mAChR3+ PBC Patienten bei 57 Jahren (IQR 20) und bei mAChR3- PBC Patienten bei 54 Jahren (IQR 15) und unterschied sich bei beiden Gruppen nicht signifikant. Das mediane Alter bei Therapieeinleitung mit UDCA betrug bei der mAChR3+ Kohorte 57.5 Jahre (IQR 21) und bei der mAChR3- Kohorte 55 Jahre (IQR 15). Bezüglich des Zeitraums von der ersten, retrospektiv feststellbaren Leberwerterhöhung bis zur Therapieeinleitung gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten. Bei beiden Gruppen verging im Median ein Jahr. Die Beobachtungszeit nach erfolgter Therapieeinleitung belief sich bei den mAChR3 + PBC Patienten im Median auf 14 Jahre (IQR 11) und bei den mAChR3- PBC Patienten auf 13 Jahre (IQR 10); die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren insignifikant.

Auch bezüglich der Therapie mit UDCA ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen: Der Median der täglichen UDCA Gabe belief sich bei den mAChR3+ PBC Patienten auf 12.2mg/kg KG UDCA (IQR 4.9) und bei den mAChR3- PBC Patienten auf 12.5 mg/kg KG UDCA (4.2). Bei beiden Gruppen lag die tägliche UDCA Dosis somit etwas unter der von DGVS, EASL und AASLD empfohlenen Dosis von 13-15mg/kg KG. In der Zusammenschau dieser Befunde lässt sich somit feststellen, dass es hinsichtlich allgemeiner Charakteristika keine signifikanten Unterschiede bei Berliner mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten gab.

#### 4.2.1.2. Leipziger Kohorte

Wie aus der nachfolgenden Tabelle 4 ersichtlich ist, zeigte sich bei den PBC Patienten der Leipziger Kohorte ein ähnliches Bild wie bei den Berliner PBC Patienten, auch wenn sich die Beobachtungen auf weniger Patienten stützen.

Parameter	mAChR3+ PBC	n	mAChR3- PBC	n	p
Anteil mAChR3+ bzw. mAChR3- PBC Patienten an Gesamtkohorte° (n=83)	15.7%	13	84.3%	70	
Weiblich° n (%)	12 (92.3)	13	64 (91.4)	70	ns
Alter bei Erstdiagnose * (Jahre)	51 (21)	11	56 (16)	63	ns
Zeitraum von Leberwerterhöhung bis Therapieeinleitung * (Jahre)	2 (-)	2	1 (4)	15	
Alter bei Therapieeinleitung* (Jahre)	60 (-)	2	59 (20)	16	
UDCA* (mg/kg KG/d)	10.6 (-)	2	15.6 (4.7)	18	

**Tabelle 4: Vergleich der allgemeinen Charakteristika der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte vor Therapieeinleitung**

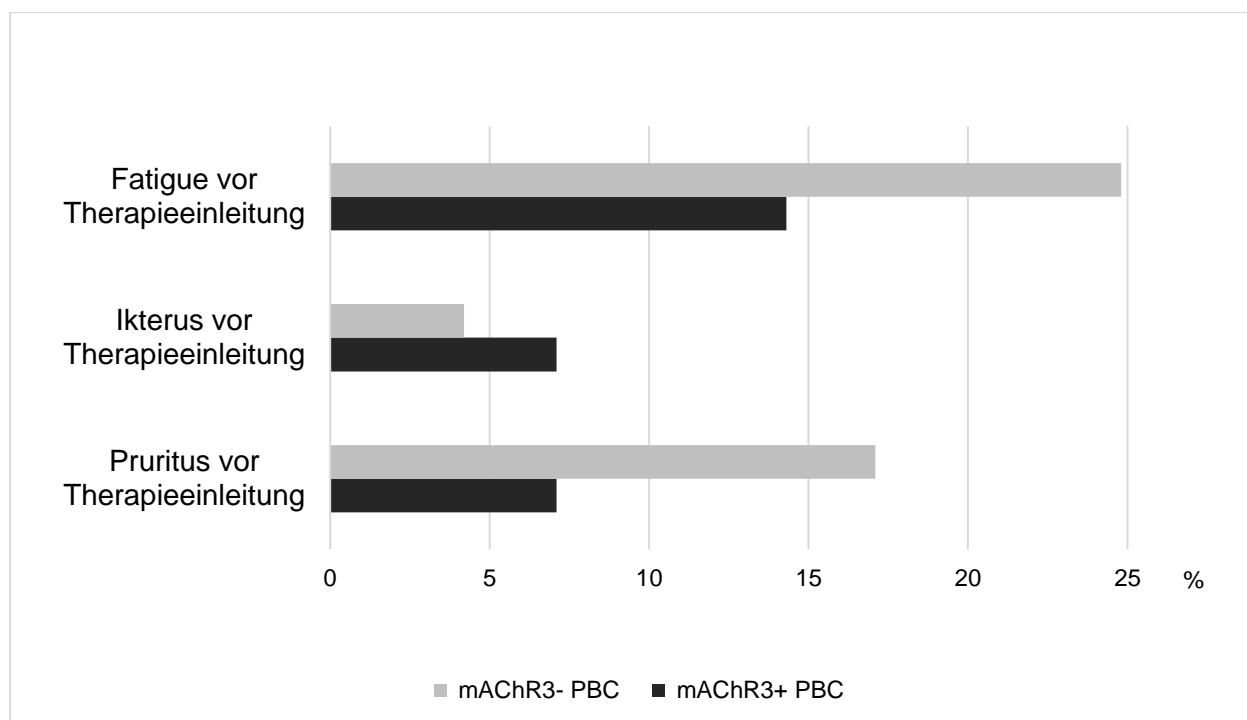
° Anzahl n (%), \*Median (IQR)

Von den insgesamt 83 PBC Patienten, bei denen der mAChR3 Auto-AK bestimmt wurde, wiesen 15.7%, d.h. 13 PBC Patienten einen Wert  $\leq 80$  auf. Von diesen 13 mAChR3+ PBC Patienten waren 12 Frauen (92.3%), was vergleichbar mit dem Frauenanteil der mAChR3- PBC Patienten (91.4%) ist.

Der Altersmedian bei Erstdiagnose der mAChR3+ Patienten lag bei 51 Jahren (IQR 21), der Median der mAChR3- Gruppe lag mit 56 Jahren (IQR 16) nur insignifikant darüber. Bei den übrigen Parametern (Zeitraum von Leberwerterhöhung bis Therapieeinleitung, Alter bei Therapieeinleitung, UDCA-Einnahme) waren zu wenig mAChR3+ PBC Patienten vorhanden, um verlässliche Aussagen zu treffen.

#### 4.2.2. Klinische Präsentation der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung

Es wurden die Symptome Ikterus, Pruritus und Fatigue vor Therapieeinleitung sowie 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA abgefragt. Abbildung 8 stellt die Symptome für beide Gruppen der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung graphisch dar.



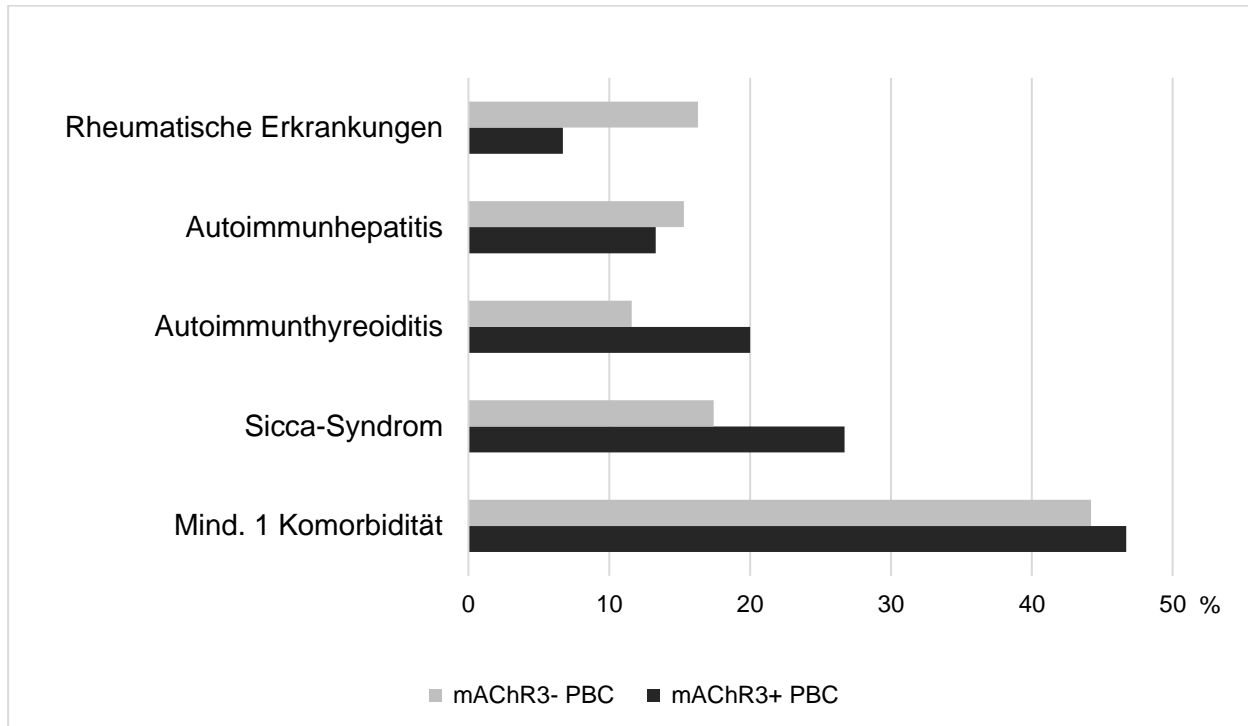
**Abbildung 8: Vergleich der Häufigkeiten der angegebenen Symptome bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung**

Bei den mAChR3+ PBC Patienten war jeweils 1 Patient von 14 von Pruritus oder Ikterus betroffen und 2 von 14 (14.3%) litten unter Fatigue. Bei den mAChR3- PBC Patienten wiesen vor Therapieeinleitung 7 von 165 (4.2%) einen Ikterus auf, 28 von 164 (17.1%) klagten über Pruritus und 41 von 165 Patienten (24.8%) gaben Fatigue als Krankheitssymptom an. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist, bestanden bei allen drei Symptomen keine signifikanten Unterschiede zwischen mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten. Diese Ergebnisse sind allerdings nur bedingt aussagekräftig, da die Fallzahl bei den mAChR3+ PBC Patienten mit 14 sehr gering ist. Vergleichbare Angaben zu den Leipziger PBC Patienten waren nicht verfügbar, sodass diese klinischen Parameter nicht für die Leipziger PBC Kohorte ausgewertet werden konnte.

## 4.2.3. Immunologische Begleiterkrankungen

### 4.2.3.1. Berliner Kohorte

Abbildung 9 stellt die immunologischen Begleiterkrankungen von mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte dar.



**Abbildung 9: Vergleich der Häufigkeiten der immunologischen Begleiterkrankungen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, war bei beiden Gruppen fast die Hälfte aller PBC Patienten von mindestens einer Komorbidität betroffen. Das Sicca-Syndrom war knapp die häufigste Komorbidität bei beiden Gruppen, jedoch litten prozentual gesehen mehr PBC Patienten (26.7% bzw. 4 von 15) aus der mAChR3+ Gruppe an dieser Erkrankung als aus der mAChR3- Gruppe (17.4% bzw. 33 von 190).

Die zweithäufigste Komorbidität bei den mAChR3+ PBC Patienten war die Autoimmunthyreoiditis, an der jeder fünfte Patient erkrankte. Ein AIH-Overlap wurde bei 2 der 15 Patienten aus der mAChR3+ Gruppe beobachtet. Einer der 15 mAChR3+ PBC Patienten wies als Komorbidität eine Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis auf.

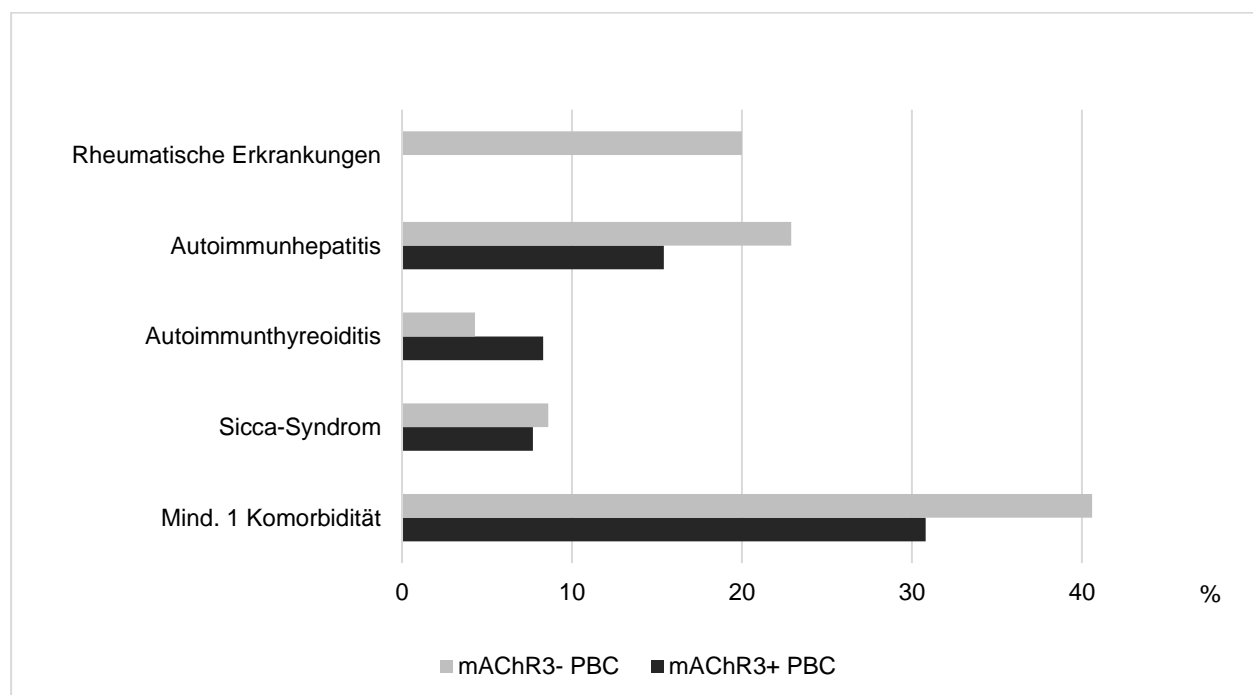


Annähernd genauso häufig wie vom Sicca-Syndrom waren mAChR3- PBC Patienten von rheumatischen Erkrankungen (31 von 190 bzw. 16.3%) und von AIH (29 von 190 bzw. 15.3%) betroffen. Eine Autoimmunthyreoiditis als Begleiterkrankung wurde nur von 11.6% (22 von 190) der mAChR3- PBC Patienten angegeben.

Auch wenn die Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit zwischen mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten nicht das Signifikanzniveau erreichten, schienen mAChR3+ PBC Patienten tendenziell häufiger vom Sicca-Syndrom und Autoimmunthyreoiditis betroffen zu sein, während mAChR3- PBC Patienten öfter rheumatische Erkrankungen als Komorbidität aufwiesen.

#### 4.2.3.2. Leipziger Kohorte

Abbildung 10 stellt die häufigsten Begleiterkrankungen bei den PBC-Patienten der Leipziger Kohorte graphisch dar.



**Abbildung 10: Vergleich der Häufigkeiten der immunologischen Begleiterkrankungen der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte**

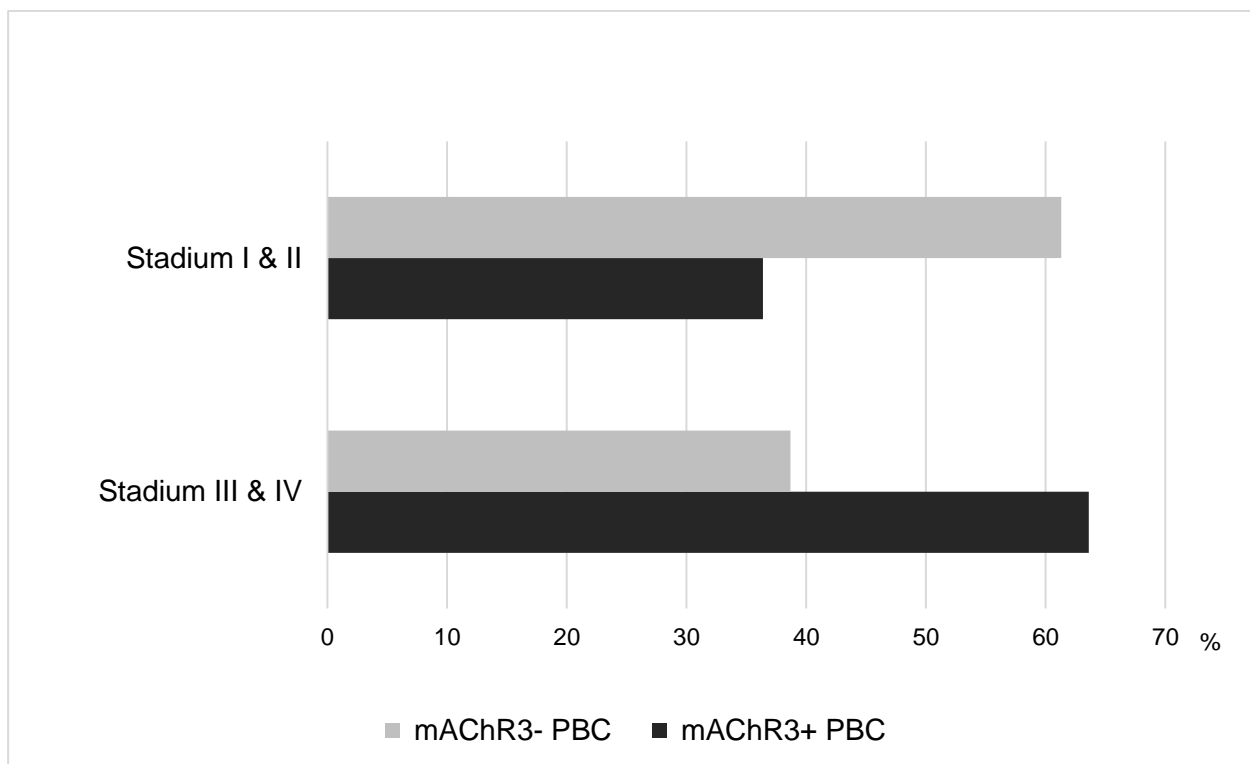
Im Gegensatz zur Berliner Kohorte war die häufigste Komorbidität der Leipziger PBC Patienten die AIH, unter der 15.4% (2 von 13) der mAChR3+ und 22.9% (16 von 70) der mAChR3- PBC Patienten litten. Nach der AIH waren die mAChR3+ PBC Patienten am zweithäufigsten von der Autoimmunthyreoiditis (8.3% bzw. 1 von 12) und dem Sicca-

Syndrom (7.7% bzw. 1 von 13) betroffen. Rheumatische Begleiterkrankungen traten bei den mAChR3+ PBC Patienten nicht auf, wohingegen sie bei den Leipziger mAChR3- PBC Patienten nach der AIH mit 20% (14 von 70) am häufigsten auftraten. Der Anteil der mAChR3- PBC Patienten, die ein Sicca-Syndrom als Begleiterkrankung angaben, war mit 8.6% (6 von 64) fast identisch zu dem der mAChR3+ PBC Patienten. Am seltensten wurde bei den Leipziger mAChR3- PBC Patienten die Autoimmunthyreoiditis mit 4.3% (3 von 70) beschrieben. Analog zur Berliner PBC Kohorte zeigten die Unterschiede zwischen den mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten nur einen Trend ohne statistische Signifikanz.

#### 4.2.4. Erkrankungsstadium vor Therapieeinleitung

##### 4.2.4.1. Berliner Kohorte

Abbildung 11 vergleicht die Unterschiede im histologischen Erkrankungsstadium nach Ludwig et al. [72] bei Berliner mAChR3- und mAChR3+ PBC Patienten vor Therapieeinleitung. Die Stadien wurden dafür in 2 Gruppen eingeteilt. Bei Individuen in Stadium 3 oder 4 ist die Erkrankung bereits weiter fortgeschritten, während sich Individuen in Stadium 1 oder 2 noch am Anfang der Erkrankung befinden.

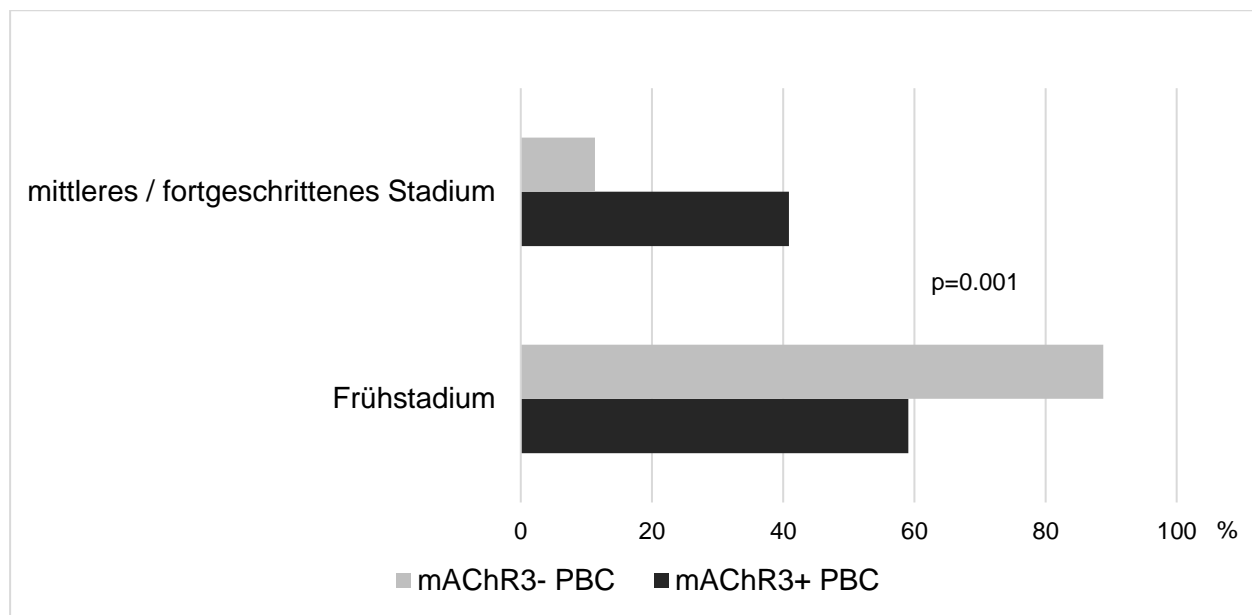


**Abbildung 11: Vergleich des histologischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Die Stadieneinteilung erfolgte nach Ludwig et al. [72]

Tendenziell schienen sich die mAChR3+ PBC Patienten in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung als die mAChR3- PBC Patienten zu befinden, wobei die Gruppe zu klein für eine valide Aussage ist. So wurden 63.6% der mAChR3+ PBC Patienten (7 von 11) entweder in Stadium 3 oder 4 eingeteilt, während es bei den mAChR3- PBC Patienten nur 38.7% (41 von 106) waren.

Neben der histologischen Einteilung gibt es eine biochemische Stadieneinteilung, basierend auf den Laborparametern Bilirubin und Albumin nach Kuiper et al. [38]. Die Patienten werden in drei Stadien eingeteilt. Wenn Bilirubin und Albumin im Normbereich liegen, befinden sich die PBC Patienten noch im Frühstadium. Sobald sich einer der beiden Parameter außerhalb des Normbereiches befindet, wird die Erkrankung als mäßig fortgeschritten klassifiziert, bei beiden Laborparametern außerhalb des Normbereiches als fortgeschritten. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Stadieneinteilung nach Kuiper et al. [38] für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten. Die Stadien mäßig fortgeschritten und fortgeschritten wurden zusammengefasst.



**Abbildung 12: Vergleich des biochemischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

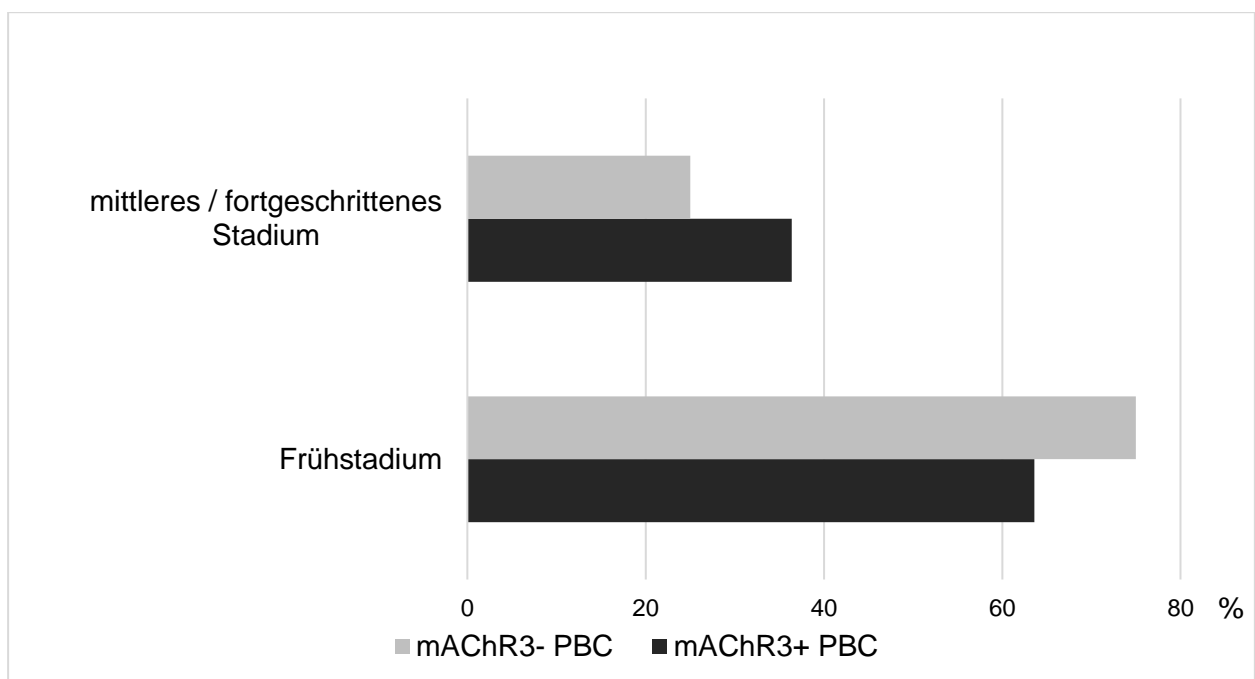
Die Stadieneinteilung erfolgte nach Kuiper et al. [38]

Diese Abbildung zeigt, dass der Anteil an mAChR3- PBC Patienten, die sich biochemisch gesehen im Frühstadium befanden, signifikant höher ausfiel als bei mAChR3+ PBC Patienten. Bei den mAChR3- PBC Patienten befand sich mit 88.8% (148 von 167 Patienten) der Großteil noch im Frühstadium, während es bei den mAChR3+ Patienten mit 59.1% (13 von 22 Patienten) etwas über die Hälfte war. Dementsprechend war die

Erkrankung nur bei einem kleinen Teil der mAChR3- PBC Patienten mäßig oder fortgeschritten (11.2% bzw. 19 von 169 Patienten), während bei den mAChR3+ PBC Patienten vor Therapieeinleitung 40.9% (9 von 22 Patienten) als mäßig oder fortgeschritten klassifiziert wurden.

#### 4.2.4.2. Leipziger Kohorte

Für die Leipziger Kohorte waren lediglich Daten zur biochemischen Stadieneinteilung nach Kuiper et al. [38] verfügbar, zur histologischen Stadieneinteilung waren keine Daten vorhanden. Nachfolgende Abbildung stellt die Stadieneinteilung für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten aus Leipzig graphisch dar.



**Abbildung 13: Vergleich des biochemischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte**

Bei der Leipziger Kohorte gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Stadieneinteilung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten: der überwiegende Teil (mAChR3+: 63.6% bzw. 7 von 11 Patienten; mAChR3-: 75% bzw. 45 von 60 Patienten) wurde vor Therapieeinleitung dem Frühstadium zugeordnet.

## 4.2.5. Laborparameter vor Therapieeinleitung

### 4.2.5.1. Berliner Kohorte

Tabelle 5 führt die Laborparameter für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung auf.

Parameter	mAChR3+ PBC	n	mAChR3- PBC	n	p
ALT * (ULN)	1.5 (1.3)	32	1.2 (1.2)	259	ns
AST * (ULN)	1.1 (1.1)	33	0.9 (0.7)	258	ns
AP * (ULN)	3.8 (2.9)	33	2.0 (2.4)	262	0.000
GGT * (ULN)	5.0 (6.1)	32	3.5 (5.1)	262	0.042
Gesamt-Bilirubin* (ULN)	0.7 (0.8)	33	0.4 (0.3)	250	0.004
ULN Bilirubin > 1° (%)	11 (33.3)	33	25 (10)	250	0.001
Albumin * (g/dl)	4.4 (0.6)	12	4.3 (0.5)	122	ns
Quick * (%)	97 (51)	11	104 (21)	123	ns
Thrombozyten* (/nl)	228 (95.5)	25	261 (104.5)	216	0.009
IgG* (g/l)	4.4 (16.2)	28	0.2 (12.6)	220	ns
IgM* (g/l)	1.7 (3.2)	28	0.05 (2.6)	225	0.054
IgA* (g/l)	1.9 (3.1)	28	0.04 (1.9)	215	0.017

**Tabelle 5: Vergleich der Laborparameter der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung**

° Anzahl n (%); \*Median (IQR)

Wie zu erwarten, zeigte sich für beide Gruppen eine Cholestase mit Erhöhung der AP und GGT sowie eine geringfügige Transaminasenerhöhung bei den mAChR3+ PBC Patienten. Im Vergleich beider Gruppen war die AP signifikant höher bei den mAChR3+ PBC Patienten. Bei dieser Gruppe betrug die AP das 3.8-fache (IQR 2.9) des ULN,

während sie bei den mAChR3- PBC Patienten lediglich 2.0-fach (IQR 2.4) erhöht war. Zusätzlich zeigte sich eine im Vergleich signifikant stärker ausgeprägte GGT-Erhöhung bei den mAChR3+ PBC Patienten. So war die GGT bei den mAChR3+ PBC Patienten im Median 5-fach (IQR 6.1) erhöht, während die Erhöhung bei den mAChR3- PBC Patienten mit 3.5-fach (IQR 5.1) geringer ausfiel.

Die Transaminasen ALT und AST waren bei den mAChR3+ Patienten nur leicht erhöht. Bei den mAChR3- PBC Patienten lag der Median der AST im Normbereich, während die Erhöhung der ALT geringfügig ausfiel. Im Gruppenvergleich zeigte sich eine Tendenz zur stärkeren Erhöhung von ALT und AST bei den mAChR3+ PBC Patienten, jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus.

Der Wert für das Gesamt-Bilirubin war in der mAChR3+ PBC Kohorte signifikant höher als in der mAChR3- PBC Kohorte, ohne jedoch den oberen Grenzwert zu überschreiten. So lag der Median bei den mAChR3+ PBC Patienten bei 0.7 (IQR 0.8), während dieser Wert bei den mAChR3- PBC Patienten nur 0.4 (IQR 0.3) betrug. Der Anteil der PBC Patienten, die über dem oberen Grenzwert lagen, unterschied sich jedoch signifikant: so lag jeder dritte mAChR3+ PBC Patient vor Therapieeinleitung über dem Grenzwert, während es bei den mAChR3- PBC Patienten nur jeder zehnte war.

Der Median der Thrombozytenzahl und des IgA war bei den mAChR3+ PBC Patienten signifikant höher als bei den mAChR3- PBC Patienten. Diese Unterschiede spielten sich jedoch innerhalb des Normbereichs der jeweiligen Laborparameter ab.

Im Referenzbereich lagen bei beiden Gruppen Albumin, der Quick-Wert, die Thrombozyten sowie die Immunglobuline. In der Zusammenschau dieser Befunde zeigten mAChR3+ PBC Patienten aufgrund der deutlich erhöhten AP, GGT und Bilirubin somit vor allem signifikant erhöhte Cholestaseparameter im Vergleich zu den mAChR3- PBC Patienten.

#### 4.2.5.2. Leipziger Kohorte

Tabelle 6 fasst die Laborparameter der Leipziger Kohorte vor Therapieeinleitung zusammen.

Parameter	mAChR3+ PBC	n	mAChR3- PBC	n	p
ALT * (ULN)	2.9 (2.8)	13	1.3 (1.1)	70	0.006
AST * (ULN)	2.3 (1.8)	13	1.1 (1.1)	69	0.003
AP * (ULN)	4.6 (3.0)	13	1.3 (1.2)	70	0.000
GGT * (ULN)	11 (15)	13	2.9 (5.9)	70	0.000
Gesamt-Bilirubin* (mg/dl)	0.9 (1.3)	13	0.6 (0.7)	61	ns
ULN Bilirubin > 1° (%)	5 (38.5)	13	15 (24.6)	61	ns
Albumin * (g/dl)	4.3 (0.2)	11	4.4 (0.6)	66	ns
Quick * (%)	106 (16)	12	107 (24)	59	ns
Thrombozyten* (/nl)	280 (132)	12	243 (123)	67	ns
IgG* (g/l)	0.13 (0.04)	6	0.11 (0.87)	42	ns
IgM* (g/l)	0.04 (0.05)	6	0.02 (0.03)	42	ns
IgA* (g/l)	0.03 (0.02)	7	0.02 (0.02)	39	ns

**Tabelle 6: Vergleich der Laborparameter der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte vor Therapieeinleitung**

\*Median (IQR)

Wie bei den Berliner PBC Patienten zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Cholestaseparameter AP und GGT. Die AP Erhöhung betrug bei den mAChR3+ PBC Patienten im Median das 4.6-fache (IQR 3.0) und lag damit signifikant über der 1.3-fachen Erhöhung (IQR 1.2) der mAChR3- PBC Patienten.

Der Median der GGT Erhöhung der mAChR3+ PBC Patienten lag 11-fach (IQR 15) über dem oberen Grenzwert, während er bei den mAChR3- Patienten nur das 2.9-fache (IQR 5.9) des oberen Grenzwertes betrug. Die Transaminasenerhöhung fiel bei den mAChR3+ PBC Patienten ebenfalls deutlicher aus und unterschied sich signifikant von den mAChR3- PBC Patienten. So waren die ALT bzw. die AST bei den mAChR3+ PBC Patienten im Median 2.9-fach (IQR 2.8) bzw. 2.3-fach (IQR 1.8) erhöht, wohingegen die Erhöhung bei den mAChR3- PBC Patienten mit 1.3 (IQR 1.1) für die ALT und 1.1 (IQR 1.1) für die AST deutlich moderater ausfiel.

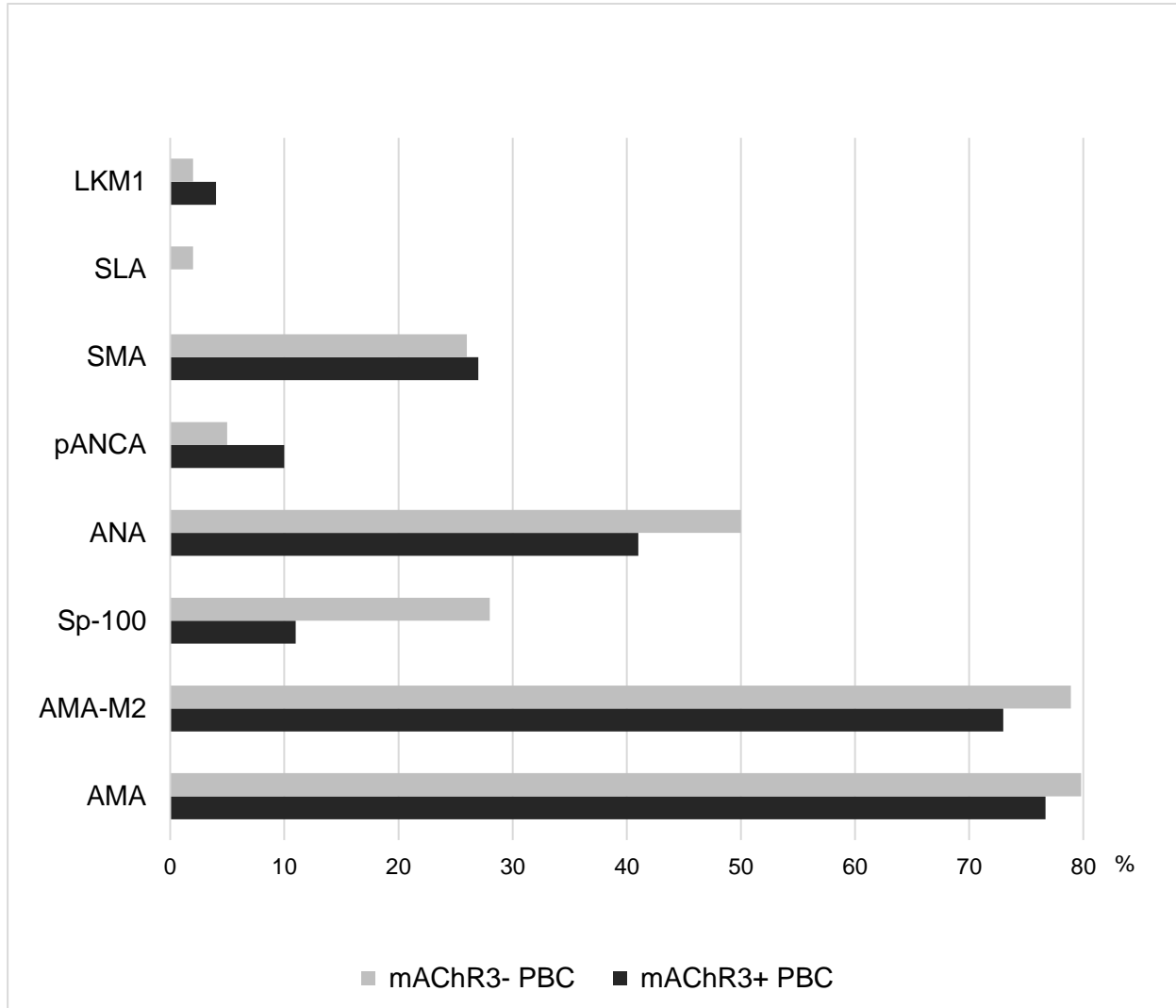
Bei den übrigen Laborparametern (Bilirubin, Albumin, Quick, Thrombozyten und Immunglobuline) befand sich der Median im Normbereich und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten.



## 4.2.6. Auto-Antikörper Diagnostik

### 4.2.6.1. Berliner Kohorte

Abbildung 14 beschreibt die Häufigkeiten charakteristischer Auto-Antikörper für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte.



**Abbildung 14: Vergleich der Häufigkeiten der verschiedenen Auto-AK bei mAChR3+ und - PBC Patienten der Berliner Kohorte**

LKM1: Leber-Nieren-Mikrosomen-Typ 1-Antikörper; SLA: Lösliches-Leber-Antigen-Antikörper; SMA: Antikörper gegen glatte Muskulatur; pANCA: perinukleäre Anti-Neutrophile-Zytoplasma-Antikörper; ANA: antinukleäre Antikörper; Sp-100: antinukleärer Antikörper gegen das Protein Sp-100; AMA-M2: antimitochondriale Antikörper der Subgruppe 2; AMA: antimitochondriale Antikörper

Bei Erstvorstellung wurden am häufigsten AMAs und deren Untereinheit AMA-M2 nachgewiesen. Bei 23 der 30 mAChR3+ PBC Patienten wurde ein positiver AMA-Titer gefunden, was einem Anteil von 76.7% entspricht. Bis auf einen PBC Patienten waren alle ebenfalls positiv für den Anti-M2 Auto-Antikörper. Bei den mAChR3- PBC Patienten

konnten bei 210 von 263 Patienten AMAs nachgewiesen werden, was einem Anteil von 79.8% entspricht und vergleichbar zu demjenigen der mAChR3+ Gruppe war. Positiv für den Anti-M2 Auto-Antikörper waren 203 von 257 mAChR3- PBC Patienten (78.9%).

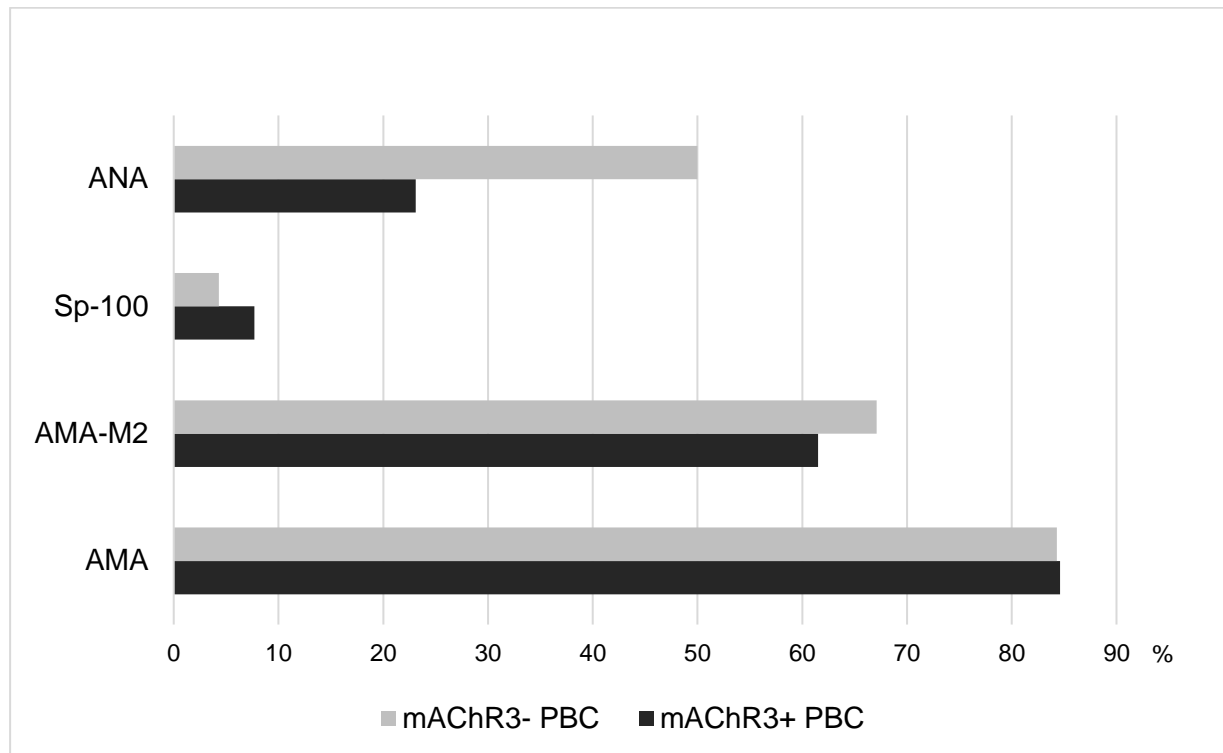
In der Berliner PBC Kohorte konnte nur bei einem der 9 mAChR3+ PBC Patienten (11.1%) sp-100 Antikörper nachgewiesen werden, aber bei 32 von 115 der mAChR3- PBC Patienten (27.8%). Aufgrund der geringen Fallzahl in der mAChR3+ PBC Gruppe sind valide Aussagen zur Signifikanz nur eingeschränkt möglich.

Für die übrigen, nicht-PBC-spezifischen Antikörper (ANA, pANCA, SMA, SLA, LKM1) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden.

Zusammengefasst heißt dies, dass es bezüglich der Auto-Antikörper-Diagnostik keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab. Die Ergebnisse bezüglich des sp-100 Antikörpers sowie der übrigen, nicht PBC-spezifischen Auto-Antikörper sind jedoch aufgrund der geringen Fallzahl eher zurückhaltend zu interpretieren.

#### 4.2.6.2. Leipziger Kohorte

Abbildung 15 fasst die Häufigkeiten der Auto-Antikörper bei mAChR3+ und mAChR3-PBC Patienten aus Leipzig graphisch zusammen.



**Abbildung 15: Vergleich der Häufigkeiten der verschiedenen Auto-AK bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte**

ANA: antinukleäre Antikörper; Sp-100: antinukleärer Antikörper gegen das Protein Sp-100; AMA-M2: antimitochondriale Antikörper der Subgruppe 2; AMA: antimitochondriale Antikörper

Bei beiden Gruppen wiesen über 80% der PBC Patienten AMAs auf (mAChR3+ PBC: 84.6% bzw. 11 von 13 Patienten; mAChR3- PBC: 84.3% bzw. 59 von 70 Patienten), jedoch ließ sich bei nur zwei Drittel der PBC Patienten Auto-Antikörper gegen die M2-Untereinheit finden (mAChR3+ PBC: 61.5% bzw. 8 von 13 Patienten; mAChR3- PBC: 67.1% bzw. 47 von 70 Patienten). Auto-Antikörper gegen sp-100 fanden sich nur bei einem kleinen Teil der Patienten. Nur einer der dreizehn mAChR3+ PBC Patienten (7.7%) besaß einen positiven Titer für diese Auto-Antikörper, bei den mAChR3- PBC Patienten fiel der Anteil mit 4.3% (3 von 70) noch geringer aus.

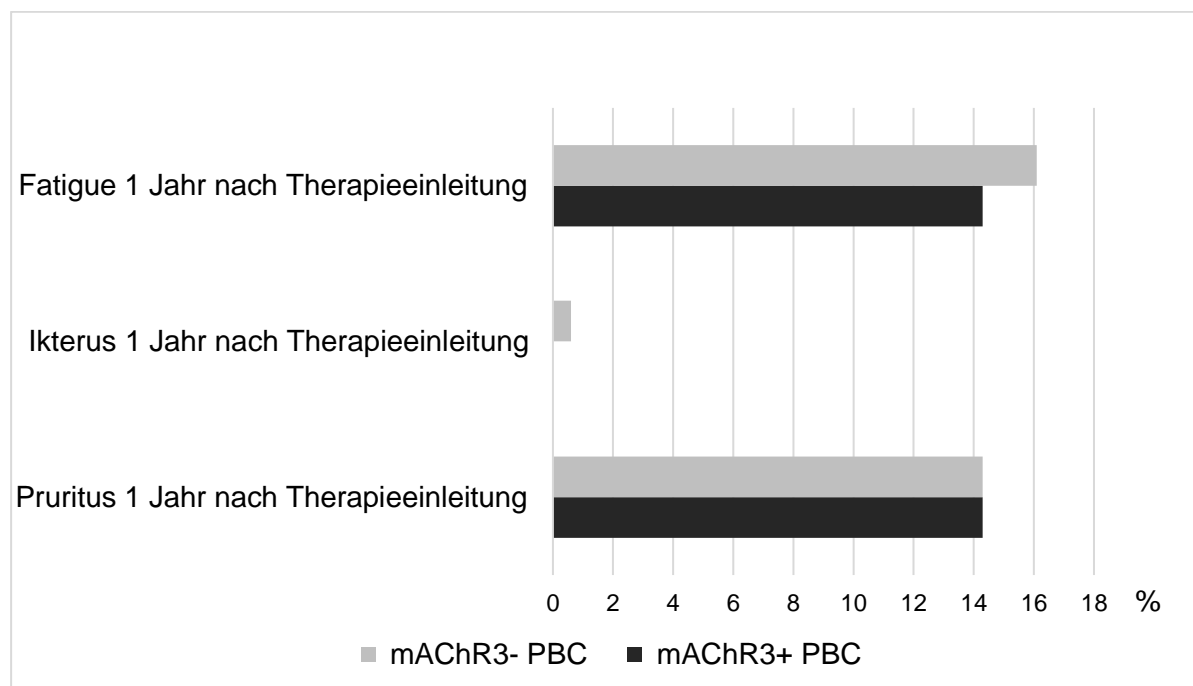
Zusätzlich wurden bei der Hälfte der mAChR3- PBC Patienten (35 von 70 bzw. 50%) ANAs gefunden. Bei den mAChR3+ PBC Patienten konnte dieser Auto-Antikörper bei knapp einem Viertel der Patienten (3 von 13, bzw. 23.1%) gefunden werden. Aufgrund

der geringen Fallzahl waren die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht signifikant, sondern geben lediglich eine Tendenz an.

### 4.3. Therapieansprechen

#### 4.3.1. Klinische Präsentation bei der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung

Abbildung 16 stellt die klinischen Symptome für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung dar.



**Abbildung 16: Vergleich der Häufigkeiten der klinischen Symptome 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, war 12 Monate nach Therapieeinleitung bei den mAChR3+ PBC Patienten die klinische Symptomatik im Wesentlichen unverändert. Nach wie vor klagten 2 der 14 mAChR3+ PBC Patienten über Fatigue. Im Vergleich zur vor 12 Monaten hatte sich die Zahl der PBC Patienten mit Pruritus von 1 auf 2 erhöht und keiner (vorher einer) der mAChR3+ PBC Patienten zeigte einen Ikterus.

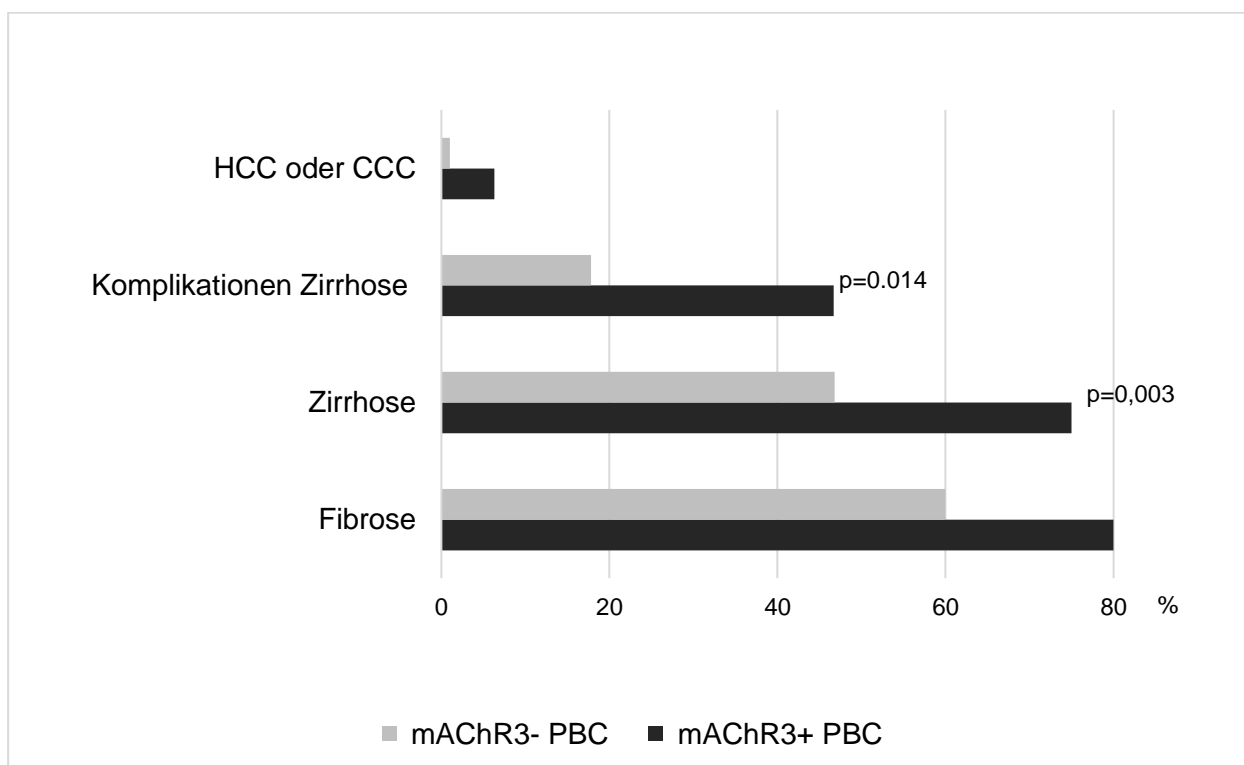
Bei den mAChR3- PBC Patienten hatte sich das klinische Erscheinungsbild geringfügig verändert. Nach 12 Monaten Therapie mit UDCA klagten nur noch 26 von 161 (16.1%) der Erkrankten über Fatigue (vorher: 24.8%). Auch die Zahl der ikterischen mAChR3-

PBC Patienten war rückläufig: Ein Jahr nach Therapieeinleitung sank ihr Anteil von 4.2% auf 0.6% (1 von 162). Im Gegensatz zu dieser Verbesserung blieb der Anteil der mAChR3- PBC Patienten, die an Pruritus litten, fast konstant (14.3% bzw. 23 von 161 Patienten).

Wie vor Therapieeinleitung gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der klinischen Symptomatik bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten.

#### 4.3.2. Leberschädigung und Komplikationen im Verlauf bei der Berliner Kohorte

Die nachfolgende Abbildung 17 beschreibt die Unterschiede im Krankheitsverlauf bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte.



**Abbildung 17: Vergleich des Krankheitsverlaufes bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

HCC: hepatozelluläres Karzinom; CCC: cholangiozelluläres Karzinom

Wie in dieser Abbildung dargestellt, wurde bei 80% der PBC Patienten (12 von 15) aus der mAChR3+ Kohorte eine Fibrose (mild oder fortgeschritten) festgestellt. Bei den mAChR3- PBC Patienten lag der Anteil mit 60% (114 von 190) nur insignifikant niedriger. Im Verlauf wurde bei 24 von 32 der mAChR3+ PBC Patienten sonographisch eine Leberzirrhose diagnostiziert. Dieser Anteil war mit 75% signifikant höher als derjenige bei

mAChR3- PBC Patienten mit 46.8% (125 von 267 Patienten).

Die Komplikationsrate der Leberzirrhose unterschied sich ebenfalls signifikant bei beiden Gruppen, auch wenn beachtet werden muss, dass sich diese Angaben auf wesentlich weniger Daten stützen als die Prävalenz der Leberzirrhose. So kam es fast bei der Hälfte der mAChR3+ PBC Patienten (7 von 15 bzw. 46.7%) im Verlauf der Erkrankung zu Komplikationen im Rahmen der Leberzirrhose während es bei den mAChR3- PBC Patienten unter 20% (32 von 180 bzw. 17.8%) waren. Als Komplikationen der Leberzirrhose wurden hier beispielsweise Aszites oder Varizen bezeichnet.

Bezüglich des Auftretens eines HCC oder CCC unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Insgesamt 1 von 16 der mAChR3+ PBC Patienten (6.3%) entwickelte im Laufe der Erkrankung ein Karzinom, bei den mAChR3- PBC Patienten waren es 2 von 192 (1%).

Insgesamt lässt sich an diesen Ergebnissen der Trend ablesen, dass die mAChR3+ PBC Patienten schwerer von der Erkrankung betroffen waren. Sie waren signifikant häufiger von Leberzirrhose betroffen und entwickelten öfter Komplikation der Zirrhose oder ein Karzinom. Um für diese Tendenzen verlässliche Aussagen zu erhalten, sind jedoch höhere Fallzahlen bei den mAChR3+ PBC Patienten erforderlich.

### 4.3.3. Vergleich der Laborparameter der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung

Tabelle 7 fasst die wichtigsten Laborparameter 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten zusammen.

Parameter	mAChR3+ PBC	n	mAChR3- PBC	n	p
ALT * (ULN)	0.9 (1.2)	12	0.8 (0.5)	147	ns
AST * (ULN)	0.9 (0.7)	12	0.7 (0.4)	148	0.050
AP * (ULN)	1.5 (2.3)	12	1.2 (0.9)	148	0.029
GGT * (ULN)	2.1 (3.6)	12	1.2 (1.6)	148	0.022
Gesamt-Bilirubin* (ULN)	0.3 (0.7)	9	0.4 (0.2)	128	ns

**Tabelle 7: Vergleich der Laborparameter 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

\* Anzahl Median (IQR)

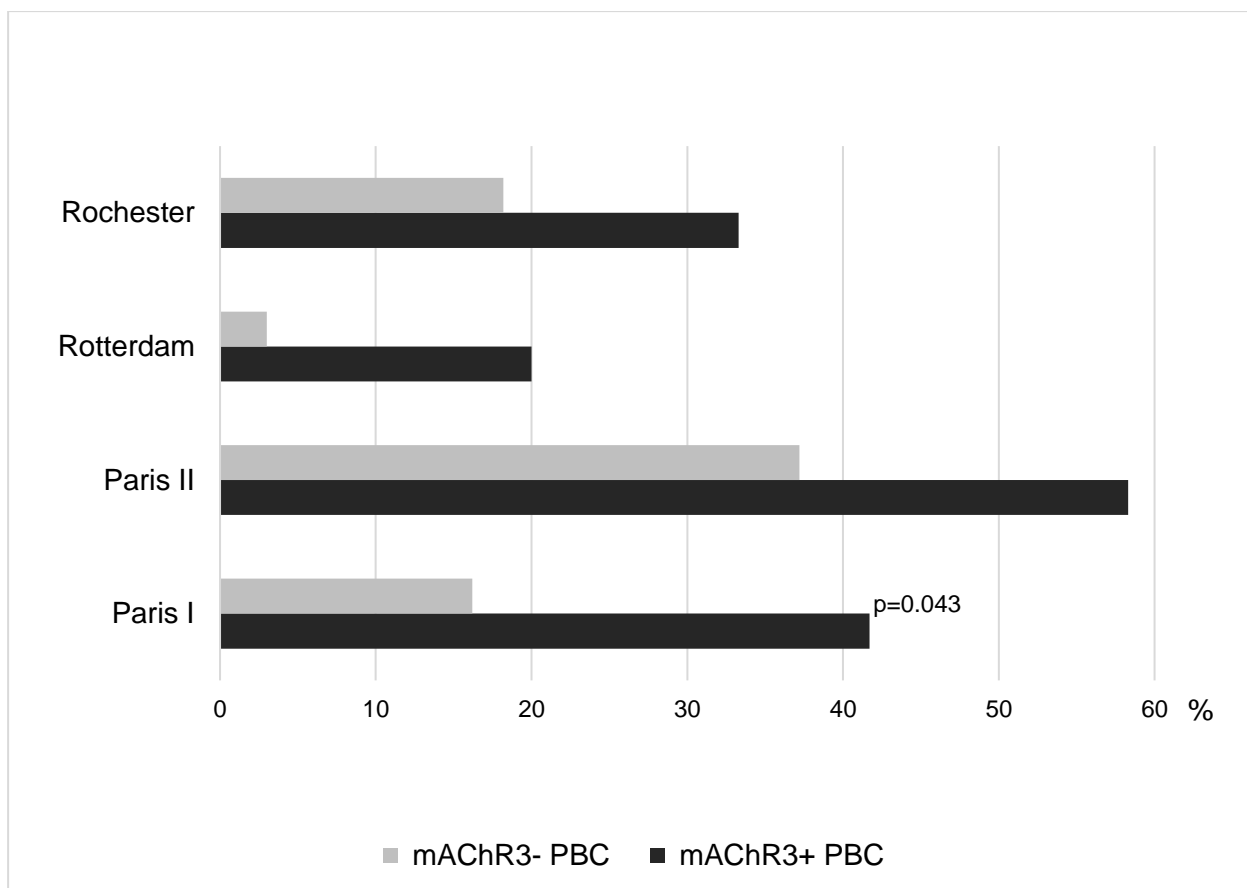
Nachdem die Patienten 12 Monate mit UDCA behandelt worden waren, hatten sich die Laborparameter ALT, AST, AP, GGT und das Gesamt-Bilirubin in beiden Gruppen gebessert, der Median für die Cholestaseparameter befand sich für beide Gruppen jedoch nach wie vor über dem oberen Grenzwert.

In der Gruppe der mAChR3+ PBC Patienten sanken die Transaminasen im Median unter den oberen Grenzwert und lagen im Normbereich. Auch das Bilirubin war weiter gesunken und befand sich 12 Monate nach Therapieeinleitung im unteren Normbereich. Die Cholestaseparameter AP und GGT waren ebenfalls niedriger als vor Therapieeinleitung, auch wenn sie weiterhin über dem oberen Grenzwert lagen. So betrug der Median des AP für mAChR3+ PBC Patienten nach 12 Monaten Therapie mit UDCA nur noch das 1.5-fache (IQR 2.3) des oberen Grenzwertes (vorher: 3.8), der Median des GGT war sogar vom 5-fachen auf das 2.1-fache (IQR 3.6) gesunken. Nach

wie vor waren diese beiden Werte signifikant höher als die Werte der mAChR3- PBC Patienten, die für die AP von 2.0 auf 1.2 (IQR 0.9) und für die GGT von 3.5 auf 1.2 (IQR 1.6) gesunken waren.

#### 4.3.4. Vergleich der Ansprechraten der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung

Abbildung 18 zeigt den Anteil der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten, die nach 12 Monaten UDCA Gabe nicht adäquat auf diese Therapie ansprachen. Für beide Gruppen wurde der Anteil der Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen nach 12 Monaten UDCA Gabe nach den Kriterien Paris I, Paris II, Rotterdam und Rochester berechnet. Wie in Kapitel 2.4 aufgeführt, basieren die Paris I und Paris II Kriterien auf AP, AST und Bilirubin, das Rotterdam Kriterium auf Bilirubin und/oder Albumin und das Kriterium nach Rochester nur auf der AP.



**Abbildung 18: Vergleich des inadäquaten Therapieansprechens bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung**

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, war die Rate derjenigen PBC Patienten, die inadäquat



auf die Therapie mit UDCA ansprechen, in der Gruppe der mAChR3+ PBC Patienten bei jedem der oben genannten Kriterien höher. Dieser Unterschied war nach dem Paris I Kriterium mit  $p=0.043$  signifikant. Nach dem Rotterdam Kriterium wurde die Signifikanz mit  $p=0.058$  knapp verpasst. Bei der mAChR3+ PBC Gruppe waren 41.7% bzw. 5 von 12 Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen nach dem Paris I Kriterium und 58.3% bzw. 7 von 12 nach dem Paris II Kriterium. Bei den mAChR3- PBC Patienten waren es nach dem Paris I Kriterium nur 16.2% bzw. 24 von 148 Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen, nach dem Paris II Kriterium stieg diese Rate auf 37.2% (55 von 155 Patienten).

Da sich wie in Abschnitt 4.2.4.1 beschrieben, biochemisch gesehen der Großteil der mAChR3- PBC Patienten vor Therapieeinleitung in einem Frühstadium der PBC befanden, ist das Paris II Kriterium am besten geeignet, Risikopatienten herauszufiltern. Bei den mAChR3+ PBC Patienten sollte zur Risikostratifizierung noch das Paris I Kriterium herangezogen werden, da sich 40% vor Therapieeinleitung bereits in einem mäßig fortgeschrittenen oder fortgeschrittenen Stadium befanden.

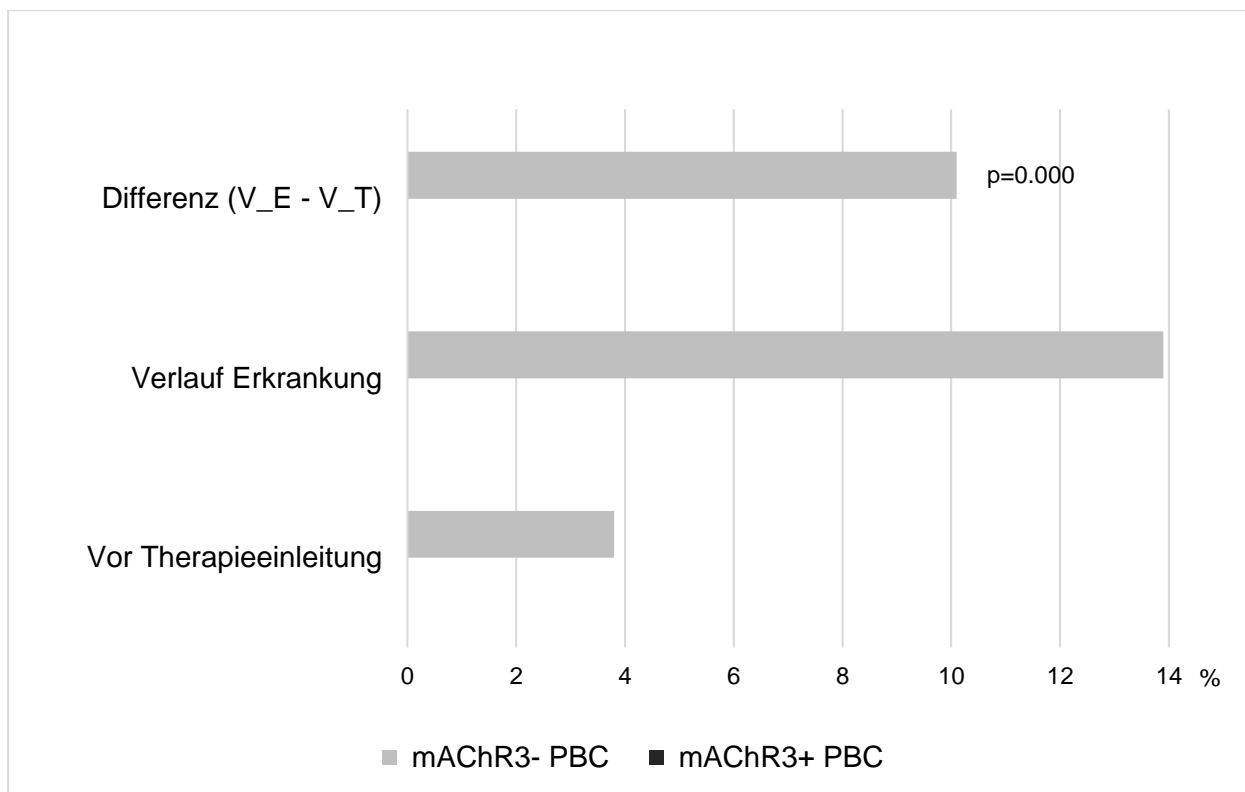
Bei beiden Gruppen gab es nach dem Rotterdam Kriterium mit 20% (2 von 10) der mAChR3+ PBC Patienten und 3% (4 von 132) der mAChR3- PBC Patienten die wenigsten Patienten, die inadäquat auf eine Therapie mit UDCA ansprechen. Dies stimmt auch mit den vorherigen Beobachtungen aus Kapitel 4.2.5 überein, wonach der Median für Albumin und Bilirubin nicht oder nur geringfügig über dem Grenzwert lag. Nach dem Rochester Kriterium lag die Rate derjenigen Patienten, die inadäquat auf eine UDCA Therapie ansprechen, bei den mAChR3+ PBC Patienten mit 33.3% (4 von 12) ca. 15 Prozentpunkte über derjenigen der mAChR3- PBC Patienten mit 18.2% (27 von 148).

Zusammenfassend lässt sich eine Tendenz ablesen, nach der sich in der mAChR3+ Gruppe mehr PBC Patienten befanden, die unzureichend auf eine Therapie mit UDCA ansprechen, dieses Ergebnis jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht für alle Kriterien signifikant war.

#### 4.3.5. Normalisierung der Laborparameter unter UDCA-Therapie im Verlauf der Erkrankung bei der Berliner Kohorte

Für beide Gruppen wurde der Anteil derjenigen PBC Patienten, bei denen die Laborparameter Bilirubin, AST, ALT, GGT und AP im Referenzbereich lagen, vor Therapieeinleitung und im Verlauf der Erkrankung berechnet sowie die Differenzen (Verlauf der Erkrankung – vor Therapieeinleitung) gebildet.

Die nachfolgende Abbildung 19 vergleicht den Anteil von mAChR3- und mAChR3+ PBC Patienten, bei denen die oben genannten Laborparameter vor bzw. nach Therapieeinleitung im Normbereich lagen.



**Abbildung 19: Vergleich der Normalisierung der Laborparameter vor Therapieeinleitung und im Verlauf der Erkrankung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

V\_E – V\_T; Verlauf der Erkrankung – vor Therapieeinleitung

Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, gab es in der mAChR3+ Gruppe vor Therapieeinleitung keinen einzigen der 33 PBC Patienten, bei dem alle Laborparameter im Referenzbereich lagen. Auch bei der mAChR3- Gruppe lagen lediglich 3.8% (10 von 264) der PBC Patienten mit allen genannten Laborparametern im Referenzbereich, d.h. die beiden Gruppen unterschieden sich vor Therapieeinleitung nicht signifikant

voneinander. Im Verlauf der Erkrankung hatte sich bei den mAChR3+ PBC Patienten das Bild nicht verändert, nach wie vor zeigte keiner der verbliebenen 20 Patienten alle 5 Laborparameter im Normbereich. Bei den mAChR3- PBC Patienten hatte sich dieser Anteil derjenigen, die mit allen 5 Werten im Normbereich liegen, um 10 Prozentpunkte auf 13.9% (26 von 187 Patienten) erhöht, die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nach wie vor nicht signifikant.

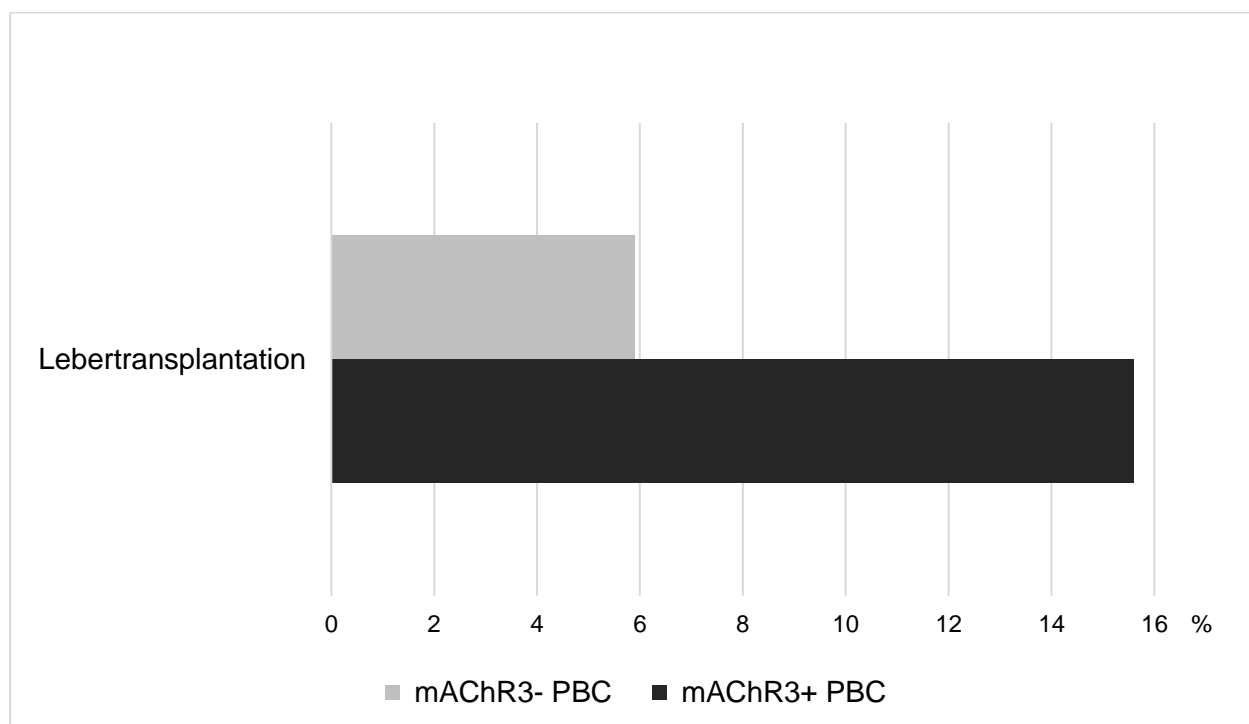
Die Differenz (Verlauf der Erkrankung – vor Therapieeinleitung) in der mAChR3- Gruppe war signifikant, d.h. ein signifikanter Anteil der Patienten aus dieser Gruppe hat eine Normalisierung der Laborparameter im Verlauf der Erkrankung im Vergleich vor Therapieeinleitung erzielt. Bei der mAChR3+ Gruppe war hingegen keine Entwicklung zu einer Normalisierung der Laborparameter zu beobachten.

#### 4.4. Transplantatfreies Überleben

##### 4.4.1. Rate der Lebertransplantationen im Verlauf der Erkrankung

###### 4.4.1.1. Berliner Kohorte

Die nachfolgende Abbildung 20 zeigt den Anteil der Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte im Verlauf der Erkrankung.

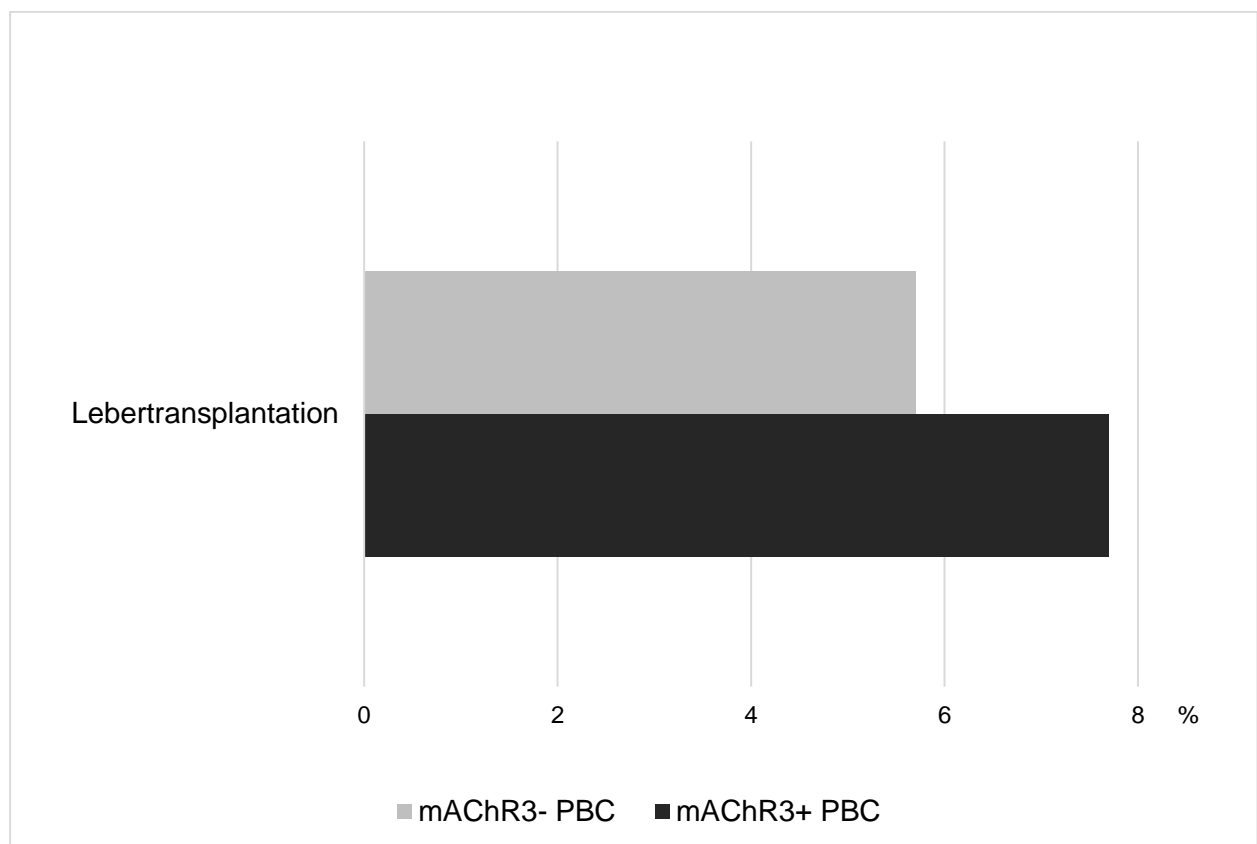


**Abbildung 20: Vergleich der Rate an Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Insgesamt lag der Anteil der Lebertransplantationen unter den mAChR3+ PBC Patienten circa 10% über dem Anteil der Lebertransplantationen bei mAChR3- PBC Patienten. Das 5% Signifikanzniveau wurde mit  $p=0.058$  allerdings knapp nicht erreicht. So erhielten aus der mAChR3+ PBC Gruppe 15.6% (5 von 32 Patienten) eine Transplantation, während sich in der mAChR3- PBC Gruppe nur 5.9% (16 von 269 Patienten) einem solchen Eingriff unterziehen mussten.

#### 4.4.1.2. Leipziger Kohorte

Der Anteil der Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte wird in der nachfolgenden Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Vergleich der Rate an Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte**

Aus der mAChR3+ PBC Gruppe wurde einer der dreizehn Patienten (7.7%) transplantiert, während es in der mAChR3- PBC Gruppe vier von 70 Patienten (5.7%) waren. Wie bei den Berliner PBC Patienten, war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

#### 4.4.2. Prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation der Berliner Kohorte

Insgesamt unterzogen sich 21 von 301 Berliner PBC Patienten (6.9%) einer Lebertransplantation (zu 5 Patienten gibt es keine Angaben). Wie bereits im vorigen Kapitel (4.4.1) aufgeführt, wurde im Verlauf bei den mAChR3+ PBC Patienten häufiger eine Lebertransplantation notwendig als bei den mAChR3- PBC Patienten.

Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der uni- und multivariaten Analyse im Hinblick auf prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation.

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	$\rho$	Hazard ratio (95% CI)		$\rho$	Hazard ratio (95% CI)	
Bilirubin (mg/dl)	.000	1.4	(1.2-1.6)	.03	1.2	(1.01-1.3)
Alkalische Phosphatase (xULN*)	.000	1.3	(1.1-1.4)	.001	1.4	(1.2-1.7)
Immunglobulin M (g/l)	.000	1.0	(1.0-1.0)			
Immunglobulin A (g/l)	.005	1.0	(1.0-1.0)			
Immunglobulin G (g/l)	.009	1.0	(1.0-1.0)			
mAChR3 Auto-AK-Dummy	.158	2.2	(0.7-6.6)			
PBC-Stadium I/II vs III/IV	.005	4.5	(1.6-12.7)	.028	3.5	(1.1-10.7)

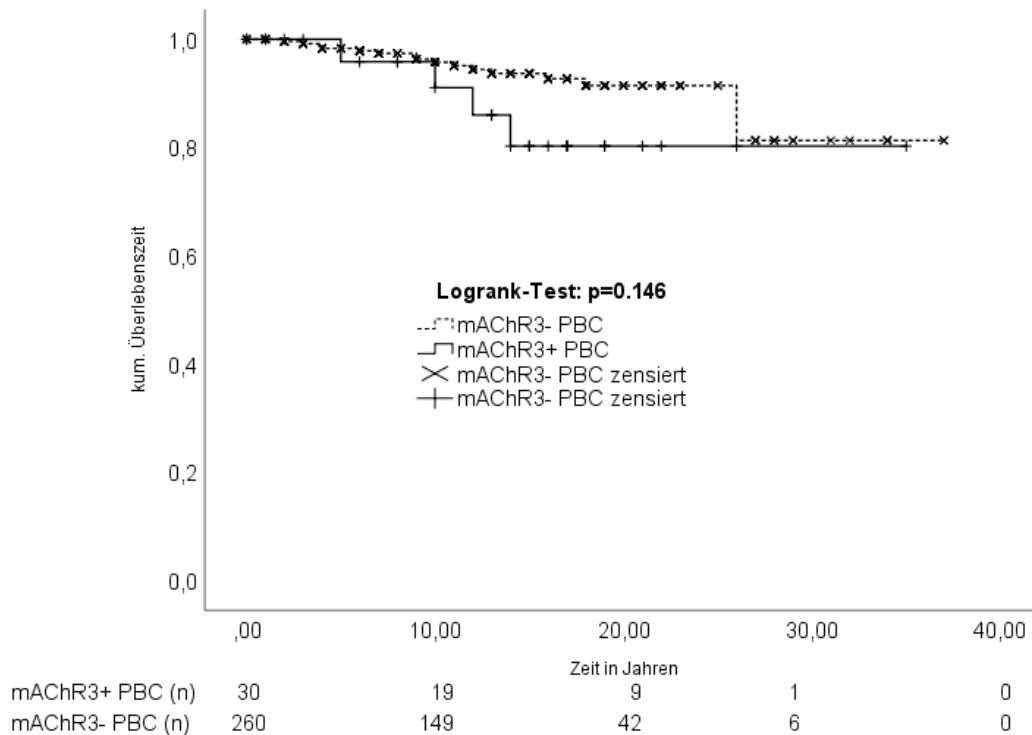
**Tabelle 8: Prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation der Berliner PBC Kohorte**

\*ULN: upper limit of normal

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, war in der univariaten Analyse der mAChR3 Auto-AK kein signifikanter prädiktiver Faktor für eine Lebertransplantation. Einzig Bilirubin, die AP und das Erkrankungsstadium waren sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation.

#### 4.4.3. Vergleich des transplantatfreien Überlebens der Berliner Kohorte

Die nachfolgende Abbildung 22 vergleicht die Überlebenszeiten bis zur Lebertransplantation bzw. zum Tod aufgrund leberassoziierter Komplikationen für mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten.

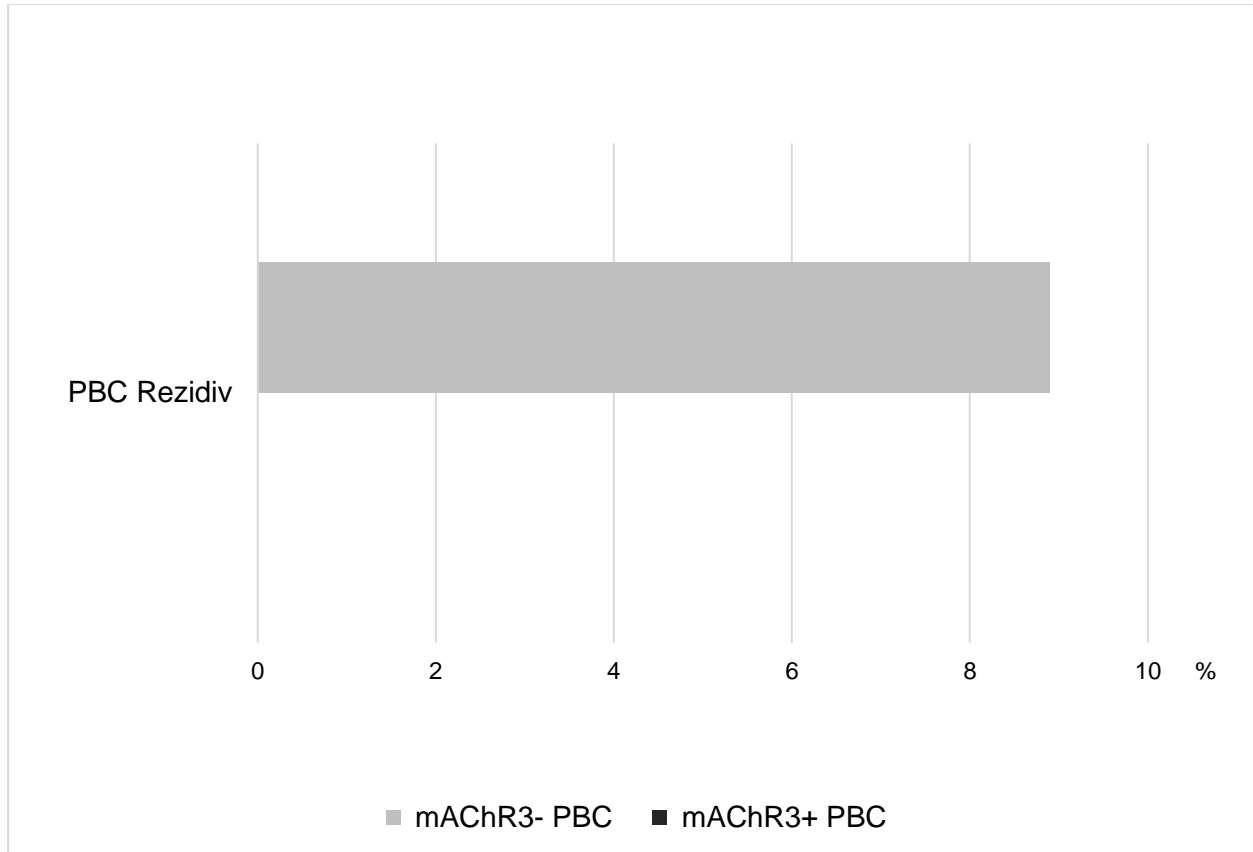


**Abbildung 22: Vergleich der Überlebenszeiten bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Die 10-Jahres-Überlebensrate betrug für die mAChR3- PBC Patienten 95.1% und für die mAChR3+ PBC Patienten 91%. Nach 20 Jahren lebten noch 80.3% der mAChR3+ und 91.4% der mAChR3- PBC Patienten. Am Ende der Beobachtungszeit nach 37 Jahren wurde die Überlebensrate der mAChR3- PBC Patienten auf 81.3% und die der mAChR3+ PBC Patienten nach wie vor auf 30.3% geschätzt. Die Unterschiede in den Überlebenszeiten bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten waren nicht signifikant.

#### 4.4.4. Auftreten eines Rezidivs bei transplantierten Patienten der Berliner Kohorte

Die nachfolgende Abbildung 23 vergleicht die Rate der Patienten aus der mAChR3+ und mAChR3- PBC Gruppe, bei denen es nach erfolgter Lebertransplantation zu einem Wiederauftreten der PBC kam.



**Abbildung 23: Vergleich der PBC Rezidivraten nach erfolgter Lebertransplantation bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte**

Diese Kohorte umfasste 56 Patienten, von welchen bei insgesamt 48 Patienten wiederholte Leberbiopsien nach erfolgter Transplantation zur Verlaufskontrolle bzw. Rezidivausschluss durchgeführt worden waren, sodass die Diagnose eines PBC-Rezidivs histologisch gesichert werden konnte. Von diesen 48 Patienten wiesen 3 Patienten inhibitorische mAChR3 Auto-AK auf. Keiner der 3 mAChR3+ PBC Patienten erlitt ein Rezidiv im Transplantat, während ein PBC Rezidiv bei 4 von 45 (8.9%) mAChR3- PBC Patienten gesichert werden konnte, was allerdings keine Signifikanz erreichte.

## 5. Diskussion

Die PBC stellt eine seltene, am ehesten autoimmun-vermittelte chronisch-entzündliche Gallengangserkrankung dar, deren Ursache nicht vollständig verstanden ist. Dysfunktionale Acetylcholin-vermittelte Signalwege über den muskarinergen Rezeptor vom Typ 3 (mAChR3) könnten an der Pathogenese der PBC beteiligt sein, unter anderem durch eine konsekutive Beeinträchtigung des sogenannten biliären Bikarbonat-Schutzschirms, der nach einer neueren Hypothese das Gallengangsepithel vor dem potentiell toxischen Einfluss physiologischer Gallensäuren schützt.

Ziel der hier vorliegenden retrospektiven Studie war die Evaluierung der Prävalenz spezifischer inhibitorischer mAChR3 Auto-AK in zwei unabhängigen PBC Kohorten aus zwei universitären Zentren in Berlin und Leipzig im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowie die Untersuchung der möglichen Bedeutung dieser mAChR3 Auto-AK auf die allgemeinen klinischen und paraklinischen Charakteristika, das Therapieansprechen auf eine UDCA Standardtherapie sowie den konsekutiven Langzeitverlauf dieser Patienten. Insgesamt wurden die klinischen und paraklinischen Charakteristika von 354 PBC Patienten aus Berlin und 83 PBC Patienten aus Leipzig in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status verglichen. Zusätzlich konnte bei 160 PBC Patienten das Therapieansprechen auf UDCA 12 Monate nach Therapieeinleitung ausgewertet werden. Bei 48 PBC Patienten konnte zudem die PBC Rezidivrate nach erfolgter Lebertransplantation anhand histologischer Kriterien evaluiert werden.

Folgende wesentliche Erkenntnisse können aus der vorliegenden Studie gewonnen werden:

- Die Prävalenz spezifischer inhibitorischer mAChR3 Auto-AK war bei Patienten mit PBC mit 11.2% signifikant höher als die Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK bei einer gesunden Kontrollgruppe mit 2.5% ( $p < 0.0001$ ).
- Die demografischen Merkmale der hier untersuchten PBC Kohorten stimmten weitestgehend mit vergleichbaren Studienpopulationen überein, wobei der Anteil AMA-negativer PBC Patienten insgesamt höher war.



- In beiden Kohorten zeigten PBC Patienten mit inhibitorischen mAChR3 Auto-AK (mAChR3+) im Vergleich zu PBC Patienten ohne inhibitorische mAChR3 Auto-AK (mAChR3-) signifikant höhere Werte für Bilirubin, AP und GGT. Die übrigen Laborparameter unterschieden sich nicht signifikant bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten.
- Tendenziell schien die Erkrankung bei mAChR3+ PBC Patienten weiter fortgeschritten zu sein. So wurde bei mAChR3+ PBC Patienten signifikant öfter Leberzirrhose diagnostiziert und bei ihnen kam es im Verlauf der Erkrankung häufiger zu den damit daher einhergehenden Komplikationen.
- Die in den beiden Zentren angewendete Erstlinientherapie mit UDCA entsprach den aktuell gültigen europäischen, amerikanischen und deutschen Leitlinien. Die Tagesdosis lag dabei im unteren empfohlenen Bereich von 13-15mg UDCA/kg KG/d.
- mAChR3+ PBC Patienten zeigten 12 Monate nach Therapieeinleitung einer Erstlinientherapie mit UDCA nach dem Paris I Kriterium signifikant häufiger ein inadäquates Therapieansprechen. Für die übrigen Kriterien wie z.B. Paris II oder Rotterdam waren die Unterschiede im Therapieansprechen nach 12 Monaten dagegen nicht signifikant unterschiedlich, zeigten aber einen vergleichbaren Trend zu einem schlechteren Therapieansprechen bei mAChR3+ PBC Patienten. Keiner der mAChR3+ PBC Patienten erreichte eine Normalisierung seiner Leberwerte im Verlauf der Erkrankung, wohingegen 13.9% der mAChR3- PBC Patienten eine vollständige Normalisierung der Leberwerte erzielten.
- In Übereinstimmung mit früheren Studien bestätigten sich in der vorliegenden Kohorte Bilirubin, die AP sowie das Erkrankungsstadium als relevante Prädiktoren für eine Lebertransplantation im Langzeitverlauf. Der individuelle mAChR3 Auto-AK Status spielte hierbei keine entscheidende Rolle.
- Die Überlebenszeiten der mAChR3+ PBC Patienten wichen nicht signifikant von denen der mAChR3- PBC Patienten ab.
- mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten zeigten keine Unterschiede bzgl. des Auftretens von PBC Rezidiven nach erfolgter Transplantation.

## **5.1. Allgemeine Charakteristika der Kohorte im Kontext vergleichbarer Studien**

Die allgemeinen Charakteristika der in dieser Arbeit ausgewerteten PBC Kohorten aus Leipzig und Berlin stimmten sowohl bei mAChR3+ als auch bei mAChR3- PBC Patienten im Wesentlichen mit vergleichbaren Studien überein. So zeigte sich erwartungsgemäß bei beiden Kohorten eine starke Prädominanz des weiblichen Geschlechts. Eine Überblicksarbeit von Boonstra et al. [73] gab einen durchschnittlichen Frauenanteil von 92% an, mit Schwankungen zwischen 76% und 100% je nach Studienpopulation. Damit lag der Frauenanteil sowohl bei Berliner als auch Leipziger mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten ziemlich genau im Durchschnitt (Berliner Kohorte: mAChR3+ PBC: 90.9%, mAChR3- PBC: 92.3%; Leipziger Kohorte: mAChR3+ PBC: 92.3%, mAChR3- PBC: 91.4%). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung lag bei den mAChR3+ PBC Patienten bei circa 57 (Berliner Kohorte) bzw. 51 (Leipziger Kohorte) Jahren, bei den mAChR3- PBC Patienten bei circa 54 (Berliner Kohorte) bzw. 56 (Leipziger Kohorte) Jahren und fügte sich somit in die in der Literatur angeführten Altersangaben, wonach überwiegend Frauen mittleren Alters von der Erkrankung betroffen sind, ein [3, 8, 74] und war fast identisch mit dem Durchschnittsalter der Multicenter Studie von Harms et al [4]. Auch Tsuboi et al. [71] fanden keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit und ohne mAChR3 Auto-AK in Bezug auf Alter und Geschlecht. Sie stützten ihre Auswertungen jedoch nur auf das Vorhandensein des mAChR3 Auto-AKs, ohne die Funktionalität mit in die Analyse einzubeziehen. Bemerkenswert ist jedoch, dass in ihrer untersuchten Kohorte über 90% der PBC Patienten positive mAChR3 Auto-AK aufweisen, jedoch unabhängig von der Funktionalität der untersuchten Auto-AK.

In der Autoimmundiagnostik fanden sich in beiden Kohorten untypisch viele AMA-negative PBC Patienten. So liegt bei den meisten Studien der Anteil der AMA-positiven Patienten zwischen 90 und 95% [4, 6, 17, 33, 34, 75, 76], während sich dieser Anteil in der vorliegenden Arbeit bei den Berliner mAChR3+ PBC Patienten lediglich auf 76.7% und bei den mAChR3- PBC Patienten auf 79.8% belief. Auch die Leipziger Kohorte wies mit 84.6% (mAChR3+ PBC) bzw. 84.3% (mAChR3- PBC) einen unterdurchschnittlichen Anteil an AMA-positiven Patienten auf. Die verhältnismäßig niedrige Rate an Berliner und Leipziger Patienten mit AMA Antikörpern war aber vergleichbar mit zwei neueren Studien. Floreani et al. [77] berichteten in ihrer Arbeit über einen Anteil von 81.7% AMA-positiven

Patienten, die an einem italienischen tertiären Zentrum behandelt wurden. Beretta-Piccoli et al. [78] konnten unter den Schweizer PBC Patienten, die an allen Universitätskliniken und zwei sekundären Zentren in der Schweiz betreut wurden, ebenfalls nur 88% AMA-positive Patienten identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls nur Patienten evaluiert, die an einem tertiären Zentrum behandelt wurden. Die Behandlung an einem solchen Zentrum schließt naturgemäß überproportional viele Spezialfälle ein, zu denen auch die Diagnosestellung bei AMA-negativen Patienten gehört. Auffällig bei der Leipziger Kohorte ist außerdem der niedrige Anteil an AMA-M2 positiven PBC-Patienten, der sowohl bei den mAChR3+ als auch bei den mAChR3- Patienten bei unter 70% lag (mAChR3+ PBC: 61.5%, mAChR3- PBC: 67.1%).

Sowohl bei den Berliner mAChR3+ und mAChR3- als auch bei den Leipziger mAChR3- PBC Patienten konnten bei knapp der Hälfte der Erkrankten ANAs nachgewiesen werden (Berlin: mAChR3+ PBC: 41%, mAChR3- PBC: 50%; Leipzig: mAChR3- PBC: 50%). Dieser Anteil lag damit geringfügig unter denjenigen, die Muratori et al. sowie Worman und Courvalin [79, 80] in ihren Studien fanden. Bei den Leipziger mAChR3+ PBC Patienten konnten dagegen nur in 23.1% der Fälle ANAs nachgewiesen werden, was den Beobachtungen von Pares et al. [81] entsprach.

In Bezug auf den sp-100 Auto-Antikörper befand sich die Berliner mAChR3- PBC Kohorte mit 28% fast genau im Mittelfeld im Vergleich zu anderen Studien [79, 82-84]. Dagegen fand sich der Anteil der PBC Patienten mit sp-100 Auto-Antikörper im Vergleich zu zuvor genannten Studien sowohl für Berliner mAChR3+ PBC Patienten als auch für Leipziger mAChR3- und mAChR3+ PBC Patienten deutlich am unteren Rand (Berlin: mAChR3+ PBC: 11%; Leipzig: mAChR3+ PBC: 7.7%, mAChR3- PBC: 4.3%).

Interessanterweise fanden sich bei fast 27% der Berliner mAChR3+ und bei 26% der Berliner mAChR3- PBC Patienten Auto-Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA), was einen Hinweis auf einen AIH Overlap darstellen könnte, da diese Auto-Antikörper typisch für die AIH Typ I sind [85]. Eine Studie von Pares et al. [81] fand hingegen lediglich bei 5-10% der Patienten einen positiven SMA-Titer. Bei der Befragung nach immunologischen Begleiterkrankungen gaben 13.3% der mAChR3+ und 15.3% der mAChR3- PBC Patienten an, zusätzlich an einer AIH zu leiden, was in etwa mit dem Nachweis an SMA

Auto-Antikörpern übereinstimmt. LKM Auto-Antikörper konnte bei einem von 24 (4%) Berliner mAChR3+ und bei vier (von 207, d.h. 2%) der Berliner mAChR3- PBC Patienten nachgewiesen werden. Ebenso wie für den SMA Auto-Antikörper gab es für die LKM Auto-Antikörper keine Daten für die Leipziger Patienten. Wie bereits in Abschnitt 4.2.6 dargestellt, gab es keine signifikanten Unterschiede in der Antikörper Diagnostik bei Berliner und Leipziger mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten. Damit reiht sich die vorliegende Arbeit bei Tsuboi et al. [71] ein, die ebenfalls keine signifikanten Differenzen in der Antikörperdiagnostik in Abhängigkeit des individuellen mAChR3 Auto-AK Status feststellte.

Im Vergleich zu vorhergehenden Studien waren die klinischen Symptome Ikterus, Pruritus und Fatigue bei Berliner mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten geringer ausgeprägt, auch wenn diese Ergebnisse durch die geringe Fallzahl (14) in der mAChR3+ Gruppe nur bedingt aussagekräftig erscheinen. Insbesondere mAChR3+ PBC Patienten präsentierten sich vor Therapieeinleitung symptomarm: 7.1% gaben Pruritus bzw. Ikterus als Symptom an und 14.3% klagten über Fatigue. Bei den mAChR3- PBC Patienten litten 17.1% unter Pruritus, 24.8% unter Fatigue und 4.2% wiesen einen Ikterus vor Therapieeinleitung auf. Diese Werte lagen am unteren Rand der in anderen Studien gefundenen Prozentwerte von 18-70% [6, 7, 33, 34, 86] für Pruritus und 21-80% für die Fatigue [7, 11, 33, 34, 74, 86]. Talwalkar und Lindor [7] fanden in ihrer Studie eine Prävalenz von 10% an Patienten mit Ikterus. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Mehrheit der Patienten sich im Anfangsstadium der Erkrankung befand und zum anderen an der Art der Datenerfassung (retrospektiv, d.h. die Erinnerungen an die Symptome bzw. deren Beginn war bei Befragung bereits verblasst).

In der vorliegenden Arbeit waren aus der Berliner Kohorte 46.7% der mAChR3+ PBC Patienten und 44.2% der mAChR3- Patienten von immunologischen Begleiterkrankungen betroffen. Der Anteil der PBC-Patienten, die zusätzlich an einer anderen Autoimmunerkrankung leiden, schwankt je nach Studie und untersuchter Region zwischen 32 und 70%, wobei auch die Häufigkeit/Reihenfolge der gefundenen Komorbiditäten unterschiedlich ausfällt [33, 66, 77, 87]. Die hier gefundenen Werte befanden sich damit für Berliner mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten im Mittelfeld. In einer Übersichtsarbeit von Chalifoux et al. [61] schwankte die Prävalenz des Sjögren-Syndroms zwischen 3.5 und 73%, Floreani et al. [9] fanden in ihrem Review eine Spannbreite von 30-100%. Vom

Sicca-Komplex, der oft das Leitsymptom des Sjögren-Syndroms darstellt, sind je nach Studie zwischen 34% [87] und 75% [7] der PBC Patienten betroffen. In dieser Arbeit litten von den Berliner mAChR3+ PBC Patienten 26.7% unter einem Sicca-Syndrom, bei den mAChR3- Patienten waren es mit nur 17.4% fast 10% weniger. Bei den Leipziger Patienten litten mit 7.7% der mAChR3+ und 8.6% der mAChR3- Patienten vergleichsweise wenig Erkrankte unter dem Sicca Syndrom. Wie bereits in Abschnitt 2.6 erwähnt, ist die Sicca-Symptomatik charakteristisch für das Sjögren-Syndrom [62, 63] und könnte ein Hinweis darauf sein, dass Patienten, die von der Sicca-Symptomatik betroffen sind, ein dem der Sicca-Symptomatik zugrundeliegendes Sjögren-Syndrom als Komorbidität aufwiesen. Da die beiden mAChR3+ Kollektive eher klein waren, wären multizentrische Studien mit größeren Fallzahlen von Vorteil, um überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen mAChR3+ Patienten und der für das Sjögren-Syndrom typischen Sicca-Symptomatik gibt.

Verglichen mit der Überblicksstudie von Floreani et al. [9], nach der 2-20% der PBC Patienten ein AIH-Overlap aufwiesen, lagen die hier betrachteten Patientenkohorten aus Berlin und Leipzig im oberen Mittelfeld. Bei den Leipziger Patienten trat die Autoimmunhepatitis geringfügig häufiger auf als bei Berliner Patienten und bei beiden Kohorten lag der Anteil der mAChR3- Patienten mit AIH Overlap etwas höher als bei mAChR3+ PBC Patienten (Berlin: mAChR3+ PBC: 13.3%, mAChR3- PBC: 15.3%; Leipzig: mAChR3+ PBC: 15.4%, mAChR3- PBC: 22.9%). Da sich die Ergebnisse für die mAChR3+ Patienten erneut auf geringe Fallzahlen stützen, wären Multicenter Studien mit mehr Beobachtung von Vorteil, um zu robusten Ergebnissen zu gelangen. Zusätzlich muss beachtet werden, dass es keine eindeutige Definition eines AIH-Overlap in der Literatur gibt, wodurch sich zumindest ein Teil der Schwankungen erklären lässt [9].

Die Autoimmunthyreoiditis fand sich in der Literatur bei knapp über 20% [9, 77] bis 57% [87] der Patienten. In der vorliegenden Arbeit waren aus der dem Leipziger Kollektiv und den Berliner mAChR3- Patienten wesentlich weniger (Berlin: PBC-: 11.6%; Leipzig: mAChR3+ PBC: 8.3%, mAChR3- PBC: 4.3%) betroffen, während die Berliner mAChR3+ PBC Gruppe mit 20% am unteren Rand lag. Aufgrund der geringen Anzahl der mAChR3+ PBC Patienten waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Bei den rheumatischen Erkrankungen lagen die mAChR3- PBC Patienten aus Berlin und Leipzig mit 16.3% bzw. 20% geringfügig über den Zahlen (bis zu 15%), die man in der Literatur findet [7, 77, 87],

während die mAChR3+ PBC Patienten deutlich darunter lagen (Berlin: mAChR3+ PBC: 6.7%; Leipzig: mAChR3+ PBC: 0%). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier erhobenen Zahlen für die Begleiterkrankungen vergleichbar mit denen aus der Literatur sind und es keine signifikanten Unterschiede zwischen mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten beider Kohorten gibt.

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien [37, 40, 81] präsentierten sich sowohl mAChR3+ als auch mAChR3- PBC Patienten beider Kollektive vor Therapieeinleitung mit erhöhten Cholestaseparametern. Die Erhöhung fiel jedoch bei mAChR3+ PBC Patienten deutlich stärker aus. So zeichneten sich die mAChR3+ Patienten bei Erstvorstellung im Vergleich zu mAChR3- Patienten durch statistisch signifikant höhere Werte von Bilirubin, AP und GGT aus. Verglichen mit zwei neuen multizentrischen Studien von Harms et al. [4] sowie Lammers et al. [43] fiel insbesondere bei mAChR3+ PBC Patienten die Erhöhung der alkalischen Phosphatase deutlich stärker aus (Berlin: mAChR3+ PBC: 3.8xULN; Leipzig: mAChR3+ PBC: 4.6xULN vs. 2.2xULN bzw. 2.1xULN), während dieser Wert bei den Berliner mAChR3- PBC Patienten mit 2.0xULN vergleichbar ausfiel und bei den Leipziger mAChR3- PBC Patienten mit 1.3xULN darunter lag. Bei den Leipziger mAChR3+ PBC Patienten konnte zusätzlich eine deutliche Transaminasenerhöhung beobachtet werden. Bei den Leipziger mAChR3- Patienten und der Berliner Kohorte wurde hingegen nur eine geringfügige Erhöhung der Transaminasen festgestellt, die vergleichbar mit den beiden oben genannten Studien ist [4, 43].

Auch wenn sich der Median des Gesamt-Bilirubin Wertes für mAChR3+ und mAChR3- Patienten aus Berlin und Leipzig im Normbereich befand und wie bei den Transaminasen vergleichbar mit den Werten der Studie von Harms et al. [4] sowie Lammers et al. [43] war, lag er bei den mAChR3+ PBC Patienten der Berliner Kohorte signifikant über dem Wert der mAChR3- Patienten. Dies passte zu der Beobachtung, dass ein Drittel der mAChR3+ PBC Patienten der Berliner Kohorte einen erhöhten Bilirubin-Wert vor Therapieeinleitung aufwiesen, während es bei den mAChR3- PBC Patienten nur knapp ein Zehntel war. Nach den Kriterien von Kuiper et al. [38] befanden sich von den mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte signifikant mehr Patienten in einem frühen Stadium der Erkrankung (88.8%), nicht nur im Vergleich zu mAChR3+ PBC Patienten (59.1%), sondern auch im Vergleich zu anderen Studien, bei denen der Anteil der PBC Patienten,

die sich vor Therapieeinleitung im Frühstadium befinden, zwischen 44 % und 73% lag [38, 88]. Im Gegensatz zu anderen Studien [38, 44, 89], waren weder bei den Berliner noch bei den Leipziger Patienten die Werte für das Immunglobulin M erhöht.

Auch wenn sich die Resultate aus der hier untersuchten Kohorte größtenteils mit anderen Studien decken, muss den Ergebnissen dieser Untersuchung die teilweise geringen Fallzahlen aus der mAChR3+ Gruppe beider Kohorten kritisch entgegengehalten werden. Weitere multizentrische Studien mit höheren Fallzahlen erscheinen daher unbedingt nötig, um hier eine abschließende Klärung herbeizuführen.

## **5.2. Angewendete Therapien im Kontext der aktuellen Leitlinien-Empfehlungen und Langzeitbeobachtung**

Die in den aktuellen Leitlinien implementierten etablierten Kriterien für das Therapieansprechen 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA konnten in der vorliegenden Studie bei 160 Patienten ausgewertet werden. Der konsekutive Langzeitverlauf konnte bei bis zu 301 Patienten ausgewertet werden; Die überwiegende Mehrzahl der Patienten erhielt eine leitlinienkonforme körpergewichtsadaptierte Erstlinientherapie mit UDCA. Die Tagesdosis bei den mAChR3+ PBC Patienten betrug im Median 12.2mg UDCA /kg KG und bei den mAChR3- PBC Patienten 12.5mg/kg KG und befand sich somit im Vergleich zur aktuellen Therapieempfehlung (13-15mg UDCA/kg KG) im eher niedrigen Bereich [1, 3, 18].

Nach 12 Monaten UDCA-Gabe hatten sich sowohl bei den mAChR3+ als auch bei den mAChR3- Patienten die Laborparameter (Cholestaseparameter, Transaminasen und Gesamt-Bilirubin) verbessert und lagen bei den Transaminasen und dem Gesamt-Bilirubin unterhalb des oberen Grenzwertes. Auch die Cholestaseparameter waren niedriger als vor Therapieeinleitung lagen jedoch noch 1.5fach (mAChR3+ PBC) bzw. 1.2fach (mAChR3- PBC) für die AP und 2.1fach (mAChR3+ PBC) bzw. 1.2fach (mAChR3- PBC) für die GGT über dem oberen Grenzwert. Diese Unterschiede zwischen mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten waren auch 12 Monate nach Therapieeinleitung weiterhin signifikant. Die Laborparameter (AP, GGT, AST, ALT und Bilirubin) waren 12 Monate nach Therapieeinleitung im Vergleich zu der Multicenter-Studie von Lammert et al. [43] bei den mAChR3- PBC Patienten fast identisch, während bei den mAChR3+ PBC Patienten die

AP etwas höher ausfiel.

Der Anteil der mAChR3- PBC Patienten, bei denen sich im Verlauf der Erkrankung alle 5 Laborwerte (AP, GGT, AST, ALT und Bilirubin) im Normbereich befanden, hatte sich um 10% von 3.8% auf 13.9% erhöht, während es bei den mAChR3+ PBC Patienten nach wie vor keinen einzigen gab, der mit allen fünf vorher genannten Laborparametern im Normbereich lag.

Die klinischen Symptome Fatigue, Ikterus und Pruritus blieben bei der mAChR3+ PBC Gruppe fast unverändert. Lediglich zwei mAChR3+ PBC Patienten klagten über Pruritus (vor Therapieeinleitung: 1 Patient) oder Fatigue, während kein mAChR3+ PBC Patient aus der Gruppe einen Ikterus aufwies (vor Therapieeinleitung: 1 Patient). Da die Symptome jedoch lediglich bei 14 Patienten erhoben wurden, war die Aussagekraft eingeschränkt. Bei der mAChR3- PBC Gruppe war der Anteil der Patienten, die 12 Monate nach Therapieeinleitung unter Juckreiz litten, ebenfalls fast unverändert. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da UDCA keine Auswirkungen auf Pruritus hat [6]. Der Anteil der ikterischen Patienten war hingegen gesunken, was sich wahrscheinlich auf die Besserung der Laborparameter nach der Gabe von UDCA zurückführen ließ. Auch über Fatigue klagten weniger Patienten als vor Therapieeinleitung, ein Ergebnis, das sich auch in der Studie von Pares et al. [81] wiederfindet.

Unabhängig vom angewendeten Kriterium war das initiale Therapie-Ansprechen in der mAChR3- Kohorte sehr gut, während es in der mAChR3+ Gruppe prozentual gesehen mehr Patienten mit einem inadäquaten Ansprechen auf UDCA gab. Diese Unterschiede waren jedoch bis auf das Paris I Kriterium - vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl der mAChR3+ PBC Gruppe nicht signifikant; hier sind weitere Analysen in größeren Kohorten notwendig, um zu einem eindeutigen Ergebnis zu gelangen. Das Therapie-Ansprechen scheint in der mAChR3- Kohorte besser als in anderen Studien [37, 38, 40, 44] gewesen zu sein, in welchen über eine Rate an inadäquatem Therapieansprechen von bis zu 63 % je nach Kriterium berichtet wird.

So lag der Anteil der PBC Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen nach den Paris-I Kriterien bei der mAChR3- Gruppe bei nur 16.2% und bei der mAChR3+ Gruppe signifikant höher bei 41.7%. In der Literatur wurden für diese Definition abhängig von der



Studienpopulation Werte zwischen 24% und 39% beschrieben [37, 40, 44]; somit war das Therapieansprechen der mACHR3- Patienten verglichen mit diesen Studien exzellent und das der mACHR3+ PBC Patienten eher schlecht. Nach den Paris-II Kriterien, die vor allem Patienten im Frühstadium der PBC im Blick haben, betrug die Rate der Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen bei den mACHR3- Patienten 37.2% und bei den mACHR3+ Patienten wiederum 58.3%. Dies war jedoch für die mACHR3- Patienten ein gutes und für die mACHR3+ Patienten ein akzeptables Ergebnis, da bei Corpechot et al. [40] nach diesem Kriterium 52% der PBC Erkrankten nicht adäquat auf die UDCA Therapie ansprachen. Nach dem Kriterium von Rotterdam, welches Bilirubin und Albumin miteinbezieht, reagierten bei den mACHR3- PBC Patienten lediglich 3.0% mit inadäquatem Therapieansprechen und bei den mACHR3+ PBC Patienten ebenfalls im Vergleich mit den Paris Kriterien niedrige 20%; dieser Unterschied ist knapp nicht signifikant. Auch bei Corpechot et al. [40] und Kuiper et al. [38] lag der Prozentsatz der Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen mit 13% bzw. 24% unter demjenigen nach den Paris-I und -II Kriterien, bei Zhang et al. [44] lag er mit 51.5% jedoch wesentlich höher. Diese große Varianz der Ergebnisse bei den Therapieansprechraten könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Erkrankung bei den Patienten vor Therapieeinleitung je nach Studie unterschiedlich stark ausgeprägt war. So könnte für das exzellente Therapieansprechen der mACHR3- PBC Gruppe das frühe Erkrankungsstadium eine Ursache gewesen sein. Dass die mACHR3+ PBC Patienten tendenziell schlechter auf die UDCA Therapie ansprachen, könnte daran liegen, dass die Patienten bereits bei Therapieeinleitung höhere Cholestaseparameter und ein höheres Bilirubin sowie ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium (mit Leberzirrhose) aufwiesen. Wird die Therapie erst in einem solch fortgeschrittenen Stadium begonnen, ist die Rate der Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen höher [37, 38, 90]. Ein anderer Grund für das schlechtere Ansprechen auf die UDCA Therapie könnte gewesen sein, dass UDCA durch die Anwesenheit des mACHR3 Auto-AK nicht mehr seine volle Wirkung entfalten konnte und deswegen der Anteil der Patienten mit inadäquatem Therapieansprechen höher war.

Zu dem Ergebnis, dass sich die mACHR3+ PBC Patienten biochemisch in einem weiter fortgeschrittenen Erkrankungsstadium befanden als mACHR3- PBC Patienten passt auch, dass bei den mACHR3+ PBC Patienten signifikant häufiger Leberzirrhose in der Abdomensonografie (75%) festgestellt wurde als bei der mACHR3- PBC Gruppe (46.8%). Auch der weitere Verlauf schien darauf aufbauend bei den mACHR3+ PBC Patienten

schwerer zu sein, da sie öfter Komplikationen im Rahmen der Leberzirrhose entwickelten. Letztendlich benötigten bedingt durch das Fortschreiten der Erkrankung 15.6% der mAChR3+ PBC Patienten eine Lebertransplantation, während es bei den mAChR3- PBC Patienten mit 5.9% knapp 10% weniger waren. Bei der mAChR3+ PBC Gruppe war die Rate an Lebertransplantationen verglichen mit anderen Studien wesentlich höher, während die der mAChR3- PBC Patienten im Mittelfeld lag. So fanden beispielsweise Floreani et al. [111] an ihrem tertiären Zentrum lediglich eine Transplantationsrate von 2.7% und bei Prince et al. [110] mussten sich 9% der unter-65-jährigen einer Lebertransplantation unterziehen.

Bei beiden Gruppen lagen die 10-Jahres-Überlebensraten mit 95.1% bei mAChR3- und 91% bei mAChR3+ PBC Patienten über den in der Literatur gefundenen 79-85% [4, 8, 34, 35]. Auch nach 20 Jahren lebten mit 80.3% (mAChR3+ PBC) bzw. 91.4% (mAChR3- PBC) noch mehr PBC Patienten als in anderen Studien, bei denen die 20-Jahres-Überlebensrate 49-66% betrug [8, 34, 35]. Ein Grund für die unterschiedlichen Überlebensraten könnte sein, dass sich v.a. die Patienten aus der mAChR3- PBC Gruppe noch im Frühstadium der Erkrankung befanden und mit dem rechtzeitigen Beginn der UDCA Therapie die Überlebenswahrscheinlichkeit gestiegen ist [37]. Übereinstimmend mit der Literatur [37, 43] waren ein erhöhtes Bilirubin und eine erhöhte AP vor Therapieeinleitung ein Prädiktor für eine Lebertransplantation.

Verglichen mit anderen Studien [6, 35, 90, 91], bei denen bis zu 34% ein PBC-Rezidiv nach Transplantation erlitten, waren in der vorliegenden Arbeit wesentlich weniger Patienten betroffen (kein Patient aus der mAChR3+ PBC Gruppe und 4 (8.9%) aus der mAChR3- PBC Gruppe). Alle Rezidive wurden histologisch gesichert. Diese Rezidivrate war deutlich niedriger als in der Studie von Jacob et al. [91], die ebenfalls die transplantierten PBC Patienten des Charité Virchow Klinikums evaluiert hatte und zwischen 1989 und 2003 bei 14 der 100 transplantierten PBC Patienten (14%) ein histologisch bestätigtes Rezidiv bestätigen konnten. Insbesondere Patienten, die Tacrolimus erhielten, waren früher und öfter von einem Rezidiv betroffen. Diese Diskrepanz bzgl. der PBC Rezidivrate könnte unter anderem mit dem Behandlungsschema der Immunsuppressiva nach der Transplantation oder mit dem Alter des Patienten bei Transplantation zusammenhängen. So hat sich nach Charatcharoenwitthaya et al. [35] zumindest in den USA das Behandlungsschema mit

Immunsuppressiva in den letzten Jahrzehnten einige Male verändert. Dies könnte auch die Unterschiede in der Rezidivhäufigkeit im Vergleich zu der Studie zu Jacob et al. [91] erklären, die einen anderen Zeitraum und eine andere Patientenkohorte als die vorliegende Arbeit betrachtet.

In der Zusammenschau der hier vorliegenden Studie scheinen unsere Daten somit eine mögliche Bedeutung dysfunktionaler ACh-vermittelter Signalwege durch spezifische inhibitorische mAChR3 Auto-AK bei der Pathogenese der PBC zu bestätigen. So zeigten die hier untersuchten PBC Kohorten aus zwei unabhängigen universitären Zentren bei PBC Patienten mit inhibitorischen mAChR3 Auto-AK eine signifikante Erhöhung der Cholestaseparameter Bilirubin, AP und GGT im Vergleich zu PBC Patienten ohne inhibitorische mAChR3 Auto-AK. Zudem sprachen PBC Patienten mit inhibitorischen mAChR3 Auto-AK schlechter auf eine Erstlinientherapie mit UDCA an. Weitere Analysen in größeren unabhängigen Patientenkohorten erscheinen daher sinnvoll, um den möglichen Einfluss mAChR3-vermittelter Signalwege auf die Pathogenese und das Therapieansprechen bei der PBC weiter zu evaluieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e. and L. European Association for the Study of the, *EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis*. J Hepatol, 2017. 67(1): p. 145-172.
2. Beuers, U., M.E. Gershwin, R.G. Gish, P. Invernizzi, D.E. Jones, K. Lindor, X. Ma, I.R. Mackay, A. Pares, A. Tanaka, J.M. Vierling, and R. Poupon, *Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'*. J Hepatol, 2015. 63(5): p. 1285-7.
3. Strassburg, C.P., S. Beckebaum, A. Geier, D. Gotthardt, R. Klein, M. Melter, E. Schott, U. Spengler, F. Tacke, M. Trauner, C. Weiler-Normann, T.J. Weismüller, A. Tannapfel, J.J. Tischendorf, and C. Schramm, *S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen*. 2017, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
4. Harms, M.H., W.J. Lammers, D. Thorburn, C. Corpechot, P. Invernizzi, H.L.A. Janssen, P.M. Battezzati, F. Nevens, K.D. Lindor, A. Floreani, C.Y. Ponsioen, M.J. Mayo, G.N. Dalekos, T. Bruns, A. Pares, A.L. Mason, X. Verhelst, K.V. Kowdley, J.C. Goet, G.M. Hirschfield, B.E. Hansen, and H.R. van Buuren, *Major Hepatic Complications in Ursodeoxycholic Acid-Treated Patients With Primary Biliary Cholangitis: Risk Factors and Time Trends in Incidence and Outcome*. Am J Gastroenterol, 2018. 113(2): p. 254-264.
5. Griffiths, L., J.K. Dyson, and D.E. Jones, *The new epidemiology of primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2014. 34(3): p. 318-28.
6. Carey, E.J., A.H. Ali, and K.D. Lindor, *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2015. 386(10003): p. 1565-75.
7. Talwalkar, J.A. and K.D. Lindor, *Primary biliary cirrhosis*. Lancet, 2003. 362(9377): p. 53-61.
8. Floreani, A., D. Caroli, A. Variola, E.R. Rizzotto, S. Antoniazzi, M. Chiaramonte, N. Cazzagon, C. Brombin, L. Salmaso, and V. Baldo, *A 35-year follow-up of a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis seen at a single centre*. Liver Int, 2011. 31(3): p. 361-8.
9. Floreani, A., I. Franceschet, and N. Cazzagon, *Primary biliary cirrhosis: overlaps*

- with other autoimmune disorders*. Semin Liver Dis, 2014. 34(3): p. 352-60.
10. Gatselis, N.K., K. Zachou, V. Lygoura, K. Azariadis, P. Arvaniti, E. Spyrou, G. Papadamou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, and E.I. Rigopoulou, *Geoepidemiology, clinical manifestations and outcome of primary biliary cholangitis in Greece*. Eur J Intern Med, 2017. 42: p. 81-88.
  11. Ali, A.H., E.J. Carey, and K.D. Lindor, *Diagnosis and management of primary biliary cirrhosis*. Expert Rev Clin Immunol, 2014. 10(12): p. 1667-78.
  12. Mattalia, A., S. Quaranta, P.S. Leung, M. Bauducci, J. Van de Water, P.L. Calvo, F. Danielle, M. Rizzetto, A. Ansari, R.L. Coppel, F. Rosina, and M.E. Gershwin, *Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults*. Hepatology, 1998. 27(3): p. 656-61.
  13. Juliusson, G., M. Imam, E.S. Bjornsson, J.A. Talwalkar, and K.D. Lindor, *Long-term outcomes in antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis*. Scand J Gastroenterol, 2016. 51(6): p. 745-52.
  14. Dubel, L., O. Farges, H. Bismuth, M. Sebagh, J.C. Homberg, and C. Johanet, *Kinetics of anti-M2 antibodies after liver transplantation for primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1995. 23(6): p. 674-80.
  15. Bowlus, C.L. and M.E. Gershwin, *The diagnosis of primary biliary cirrhosis*. Autoimmun Rev, 2014. 13(4-5): p. 441-4.
  16. Nakamura, M., H. Kondo, T. Mori, A. Komori, M. Matsuyama, M. Ito, Y. Takii, M. Koyabu, T. Yokoyama, K. Migita, M. Daikoku, S. Abiru, H. Yatsushashi, E. Takezaki, N. Masaki, K. Sugi, K. Honda, H. Adachi, H. Nishi, Y. Watanabe, Y. Nakamura, M. Shimada, T. Komatsu, A. Saito, T. Saoshiro, H. Harada, T. Sodeyama, S. Hayashi, A. Masumoto, T. Sando, T. Yamamoto, H. Sakai, M. Kobayashi, T. Muro, M. Koga, Z. Shums, G.L. Norman, and H. Ishibashi, *Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2007. 45(1): p. 118-27.
  17. Nakamura, M., *Clinical significance of autoantibodies in primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2014. 34(3): p. 334-40.
  18. Lindor, K.D., C.L. Bowlus, J. Boyer, C. Levy, and M. Mayo, *Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases*. Hepatology, 2019. 69(1): p. 394-419.
  19. Poupon, R.E., B. Balkau, E. Eschwege, and R. Poupon, *A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study*

- Group*. N Engl J Med, 1991. 324(22): p. 1548-54.
20. Heathcote, E.J., K. Cauch-Dudek, V. Walker, R.J. Bailey, L.M. Blendis, C.N. Ghent, P. Michieletti, G.Y. Minuk, S.C. Pappas, L.J. Scully, and et al., *The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1994. 19(5): p. 1149-56.
  21. Poupon, R.E., K.D. Lindor, A. Pares, O. Chazouilleres, R. Poupon, and E.J. Heathcote, *Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2003. 39(1): p. 12-6.
  22. Corpechot, C., F. Carrat, A.M. Bonnard, R.E. Poupon, and R. Poupon, *The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2000. 32(6): p. 1196-9.
  23. Angulo, P., K.P. Batts, T.M. Therneau, R.A. Jorgensen, E.R. Dickson, and K.D. Lindor, *Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1999. 29(3): p. 644-7.
  24. Lindor, K.D., R.A. Jorgensen, T.M. Therneau, M. Malinchoc, and E.R. Dickson, *Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis*. Mayo Clin Proc, 1997. 72(12): p. 1137-40.
  25. Poupon, R.E., K.D. Lindor, K. Cauch-Dudek, E.R. Dickson, R. Poupon, and E.J. Heathcote, *Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1997. 113(3): p. 884-90.
  26. Poupon, R.E., R. Poupon, and B. Balkau, *Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group*. N Engl J Med, 1994. 330(19): p. 1342-7.
  27. Lindor, K.D., T.M. Therneau, R.A. Jorgensen, M. Malinchoc, and E.R. Dickson, *Effects of ursodeoxycholic acid on survival in patients with primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1996. 110(5): p. 1515-8.
  28. Pares, A., L. Caballeria, and J. Rodes, *Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid*. Gastroenterology, 2006. 130(3): p. 715-20.
  29. Ornlousson, K.T., S.H. Lund, S. Olafsson, O.M. Bergmann, and E.S. Bjornsson, *Biochemical response to ursodeoxycholic acid among PBC patients: a nationwide population-based study*. Scand J Gastroenterol, 2019. 54(5): p. 609-616.
  30. Harms, M.H., H.R. van Buuren, C. Corpechot, D. Thorburn, H.L.A. Janssen, K.D.

- Lindor, G.M. Hirschfield, A. Pares, A. Floreani, M.J. Mayo, P. Invernizzi, P.M. Battezzati, F. Nevens, C.Y. Ponsioen, A.L. Mason, K.V. Kowdley, W.J. Lammers, B.E. Hansen, and A.J. van der Meer, *Ursodeoxycholic acid therapy and liver transplant-free survival in patients with primary biliary cholangitis*. *J Hepatol*, 2019. 71(2): p. 357-365.
31. Hirschfield, G.M., A. Mason, V. Luketic, K. Lindor, S.C. Gordon, M. Mayo, K.V. Kowdley, C. Vincent, H.C. Bodhenheimer, Jr., A. Pares, M. Trauner, H.U. Marschall, L. Adorini, C. Sciacca, T. Beecher-Jones, E. Castelloe, O. Bohm, and D. Shapiro, *Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid*. *Gastroenterology*, 2015. 148(4): p. 751-61 e8.
  32. Nevens, F., P. Andreone, G. Mazzella, S.I. Strasser, C. Bowlus, P. Invernizzi, J.P. Drenth, P.J. Pockros, J. Regula, U. Beuers, M. Trauner, D.E. Jones, A. Floreani, S. Hohenester, V. Luketic, M. Shiffman, K.J. van Erpecum, V. Vargas, C. Vincent, G.M. Hirschfield, H. Shah, B. Hansen, K.D. Lindor, H.U. Marschall, K.V. Kowdley, R. Hooshmand-Rad, T. Marmon, S. Sheeron, R. Pencek, L. MacConell, M. Pruzanski, D. Shapiro, and P.S. Group, *A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis*. *N Engl J Med*, 2016. 375(7): p. 631-43.
  33. Lleo, A., S. Marzorati, J.M. Anaya, and M.E. Gershwin, *Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview*. *Hepatol Int*, 2017. 11(6): p. 485-499.
  34. Lindor, K.D., M.E. Gershwin, R. Poupon, M. Kaplan, N.V. Bergasa, E.J. Heathcote, and D. American Association for Study of Liver, *Primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2009. 50(1): p. 291-308.
  35. Charatcharoenwitthaya, P., S. Pimentel, J.A. Talwalkar, F.T. Enders, K.D. Lindor, R.A. Krom, and R.H. Wiesner, *Long-term survival and impact of ursodeoxycholic acid treatment for recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2007. 13(9): p. 1236-45.
  36. Angulo, P., K.D. Lindor, T.M. Therneau, R.A. Jorgensen, M. Malinchoc, P.S. Kamath, and E.R. Dickson, *Utilization of the Mayo risk score in patients with primary biliary cirrhosis receiving ursodeoxycholic acid*. *Liver*, 1999. 19(2): p. 115-21.
  37. Corpechot, C., L. Abenavoli, N. Rabahi, Y. Chretien, T. Andreani, C. Johanet, O. Chazouilleres, and R. Poupon, *Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2008. 48(3): p. 871-7.

38. Kuiper, E.M., B.E. Hansen, R.A. de Vries, J.W. den Ouden-Muller, T.J. van Ditzhuijsen, E.B. Haagsma, M.H. Houben, B.J. Witteman, K.J. van Erpecum, H.R. van Buuren, and P.B.C.S.G. Dutch, *Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid*. *Gastroenterology*, 2009. 136(4): p. 1281-7.
39. Kumagi, T., M. Guindi, S.E. Fischer, T. Arenovich, R. Abdalian, C. Coltescu, E.J. Heathcote, and G.M. Hirschfield, *Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis*. *Am J Gastroenterol*, 2010. 105(10): p. 2186-94.
40. Corpechot, C., O. Chazouilleres, and R. Poupon, *Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome*. *J Hepatol*, 2011. 55(6): p. 1361-7.
41. Azemoto, N., M. Abe, Y. Murata, Y. Hiasa, M. Hamada, B. Matsuura, and M. Onji, *Early biochemical response to ursodeoxycholic acid predicts symptom development in patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis*. *J Gastroenterol*, 2009. 44(6): p. 630-4.
42. Carbone, M., S.J. Sharp, S. Flack, D. Paximadas, K. Spiess, C. Adgey, L. Griffiths, R. Lim, P. Trembling, K. Williamson, N.J. Wareham, M. Aldersley, A. Bathgate, A.K. Burroughs, M.A. Heneghan, J.M. Neuberger, D. Thorburn, G.M. Hirschfield, H.J. Cordell, G.J. Alexander, D.E. Jones, R.N. Sandford, G.F. Mells, and U.-P. Consortium, *The UK-PBC risk scores: Derivation and validation of a scoring system for long-term prediction of end-stage liver disease in primary biliary cholangitis*. *Hepatology*, 2016. 63(3): p. 930-50.
43. Lammers, W.J., G.M. Hirschfield, C. Corpechot, F. Nevens, K.D. Lindor, H.L. Janssen, A. Floreani, C.Y. Ponsioen, M.J. Mayo, P. Invernizzi, P.M. Battezzati, A. Pares, A.K. Burroughs, A.L. Mason, K.V. Kowdley, T. Kumagi, M.H. Harms, P.J. Trivedi, R. Poupon, A. Cheung, A. Lleo, L. Caballeria, B.E. Hansen, H.R. van Buuren, and P.B.C.S.G. Global, *Development and Validation of a Scoring System to Predict Outcomes of Patients With Primary Biliary Cirrhosis Receiving Ursodeoxycholic Acid Therapy*. *Gastroenterology*, 2015. 149(7): p. 1804-1812 e4.
44. Zhang, L.N., T.Y. Shi, X.H. Shi, L. Wang, Y.J. Yang, B. Liu, L.X. Gao, Z.W. Shuai, F. Kong, H. Chen, W. Han, S.M. Han, Y.Y. Fei, Q.C. Cui, Q. Wang, M. Shen, D. Xu, W.J. Zheng, Y.Z. Li, W. Zhang, X. Zhang, and F.C. Zhang, *Early biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis of primary biliary*



- cirrhosis: results of a 14-year cohort study*. Hepatology, 2013. 58(1): p. 264-72.
45. Lammers, W.J., H.R. van Buuren, G.M. Hirschfield, H.L. Janssen, P. Invernizzi, A.L. Mason, C.Y. Ponsioen, A. Floreani, C. Corpechot, M.J. Mayo, P.M. Battezzati, A. Pares, F. Nevens, A.K. Burroughs, K.V. Kowdley, P.J. Trivedi, T. Kumagi, A. Cheung, A. Lleo, M.H. Imam, K. Boonstra, N. Cazzagon, I. Franceschet, R. Poupon, L. Caballeria, G. Pieri, P.S. Kanwar, K.D. Lindor, B.E. Hansen, and P.B.C.S.G. Global, *Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: an international follow-up study*. Gastroenterology, 2014. 147(6): p. 1338-49 e5; quiz e15.
  46. Beuers, U., S. Hohenester, L.J. de Buy Wenniger, A.E. Kremer, P.L. Jansen, and R.P. Elferink, *The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies*. Hepatology, 2010. 52(4): p. 1489-96.
  47. Hohenester, S., L. Maillette de Buy Wenniger, D.M. Jefferson, R.P. Oude Elferink, and U. Beuers, *Biliary bicarbonate secretion constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in man*. Dig Dis, 2011. 29(1): p. 62-5.
  48. Hohenester, S., L.M. Wenniger, C.C. Paulusma, S.J. van Vliet, D.M. Jefferson, R.P. Elferink, and U. Beuers, *A biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes*. Hepatology, 2012. 55(1): p. 173-83.
  49. Alvaro, D., G. Alpini, A.M. Jezequel, C. Bassotti, C. Francia, F. Fraioli, R. Romeo, L. Marucci, G. Le Sage, S.S. Glaser, and A. Benedetti, *Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions*. J Clin Invest, 1997. 100(6): p. 1349-62.
  50. Durchschein, F., E. Krones, M.J. Pollheimer, G. Zollner, M. Wagner, J.P. Raufman, and P. Fickert, *Genetic Loss of the Muscarinic M3 Receptor (M3 -R) Markedly Alters Bile Formation and Cholestatic Liver Injury in Mice*. Hepatol Res, 2017. 48(3): p. 68-77.
  51. Prieto, J., C. Qian, N. Garcia, J. Diez, and J.F. Medina, *Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. 105(2): p. 572-8.
  52. Medina, J.F., A. Martinez, J.J. Vazquez, and J. Prieto, *Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1997. 25(1): p. 12-7.

53. Fernandez-Barrena, M.G., M. Barcena-Varela, and J.M. Banales, *New evidence supporting the biliary bicarbonate umbrella theory*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2017. 41(2): p. 126-128.
54. Chang, J.C., S. Go, D.R. de Waart, P. Munoz-Garrido, U. Beuers, C.C. Paulusma, and R. Oude Elferink, *Soluble Adenylyl Cyclase Regulates Bile Salt-Induced Apoptosis in Human Cholangiocytes*. Hepatology, 2016. 64(2): p. 522-34.
55. Khan, R.I., T. Yazawa, A.S. Anisuzzaman, S. Semba, Y. Ma, J. Uwada, H. Hayashi, Y. Suzuki, H. Ikeuchi, M. Uchino, A. Maemoto, I. Muramatsu, and T. Taniguchi, *Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1842(4): p. 635-45.
56. Dhawan, S., I.H. Hiemstra, C. Verseijden, F.W. Hilbers, A.A. Te Velde, L.E. Willemsen, J. Stap, J.M. den Haan, and W.J. de Jonge, *Cholinergic receptor activation on epithelia protects against cytokine-induced barrier dysfunction*. Acta Physiol (Oxf), 2015. 213(4): p. 846-59.
57. Zhang, Y. and J. Li, *Carbachol ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial tight junction damage by down-regulating NF-kappabeta and myosin light-chain kinase pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 428(2): p. 321-6.
58. Belo, A., K. Cheng, A. Chahdi, J. Shant, G. Xie, S. Khurana, and J.P. Raufman, *Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. 300(5): p. G749-60.
59. Cheng, K., R. Samimi, G. Xie, J. Shant, C. Drachenberg, M. Wade, R.J. Davis, G. Nomikos, and J.P. Raufman, *Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. 295(3): p. G591-7.
60. Preuss, B., S. Tunaru, J. Henes, S. Offermanns, and R. Klein, *A novel luminescence-based method for the detection of functionally active antibodies to muscarinic acetylcholine receptors of the M3 type (mAChR3) in patients' sera*. Clin Exp Immunol, 2014. 177(1): p. 179-89.
61. Chalifoux, S.L., P.G. Konyon, G. Choi, and S. Saab, *Extrahepatic Manifestations of Primary Biliary Cholangitis*. Gut Liver, 2017. 11(6): p. 771-780.
62. Ramos-Casals, M., A.G. Tzioufas, and J. Font, *Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts*. Ann Rheum Dis, 2005. 64(3): p. 347-54.

63. Both, T., V.A. Dalm, P.M. van Hagen, and P.L. van Daele, *Reviewing primary Sjogren's syndrome: beyond the dryness - From pathophysiology to diagnosis and treatment*. Int J Med Sci, 2017. 14(3): p. 191-200.
64. Matsui, M., D. Motomura, H. Karasawa, T. Fujikawa, J. Jiang, Y. Komiya, S. Takahashi, and M.M. Taketo, *Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(17): p. 9579-84.
65. Dawson, L.J., J. Stanbury, N. Venn, B. Hasdimir, S.N. Rogers, and P.M. Smith, *Antimuscarinic antibodies in primary Sjogren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells*. Arthritis Rheum, 2006. 54(4): p. 1165-73.
66. Gershwin, M.E., C. Selmi, H.J. Worman, E.B. Gold, M. Watnik, J. Utts, K.D. Lindor, M.M. Kaplan, J.M. Vierling, and U.P.E. Group, *Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients*. Hepatology, 2005. 42(5): p. 1194-202.
67. Sumida, T., H. Tsuboi, M. Iizuka, H. Asashima, and I. Matsumoto, *Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome*. Mod Rheumatol, 2013. 23(5): p. 841-5.
68. Appel, S., S. Le Hellard, O. Bruland, J.G. Brun, R. Omdal, G. Kristjansdottir, E. Theander, G. Nordmark, M. Kvarnstrom, P. Eriksson, L. Ronnblom, M. Wahren-Herlenius, and R. Jonsson, *Potential association of muscarinic receptor 3 gene variants with primary Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis, 2011. 70(7): p. 1327-9.
69. Yu, X., G. Riemekasten, and F. Petersen, *Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor M3 in Sjogren's syndrome and corresponding mouse models*. Front Biosci (Landmark Ed), 2018. 23: p. 2053-2064.
70. Berg, C.P., K. Blume, K. Lauber, M. Gregor, P.A. Berg, S. Wesselborg, and G.M. Stein, *Autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptors found in patients with primary biliary cirrhosis*. BMC Gastroenterol, 2010. 10: p. 120.
71. Tsuboi, H., H. Ohira, H. Asashima, S. Tsuzuki, M. Iizuka, N. Matsuo, Y. Kondo, I. Matsumoto, and T. Sumida, *Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatol Res, 2014. 44(14): p. E471-9.
72. Ludwig, J., E.R. Dickson, and G.S. McDonald, *Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)*. Virchows Arch A

- Pathol Anat Histol, 1978. 379(2): p. 103-12.
73. Boonstra, K., U. Beuers, and C.Y. Ponsioen, *Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review*. J Hepatol, 2012. 56(5): p. 1181-8.
  74. Selmi, C., P.L. Meroni, and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis and Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis*. J Autoimmun, 2012. 39(1-2): p. 34-42.
  75. Hu, C.J., F.C. Zhang, Y.Z. Li, and X. Zhang, *Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us?* World J Gastroenterol, 2010. 16(29): p. 3616-29.
  76. Leung, P.S., R.L. Coppel, A. Ansari, S. Munoz, and M.E. Gershwin, *Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1997. 17(1): p. 61-9.
  77. Floreani, A., I. Franceschet, N. Cazzagon, A. Spinazze, A. Buja, P. Furlan, V. Baldo, and M.E. Gershwin, *Extrahepatic autoimmune conditions associated with primary biliary cirrhosis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2015. 48(2-3): p. 192-7.
  78. Terziroli Beretta-Piccoli, B., G. Stirnimann, A. Cerny, D. Semela, R. Hessler, B. Helbling, F. Stickel, C. Kalid-de Bakker, F. Bihl, E. Giostra, M. Filipowicz Sinnreich, C. Oneta, A. Baserga, P. Invernizzi, M. Carbone, and J. Mertens, *Geoepidemiology of Primary Biliary Cholangitis: Lessons from Switzerland*. Clin Rev Allergy Immunol, 2018. 54(2): p. 295-306.
  79. Muratori, P., L. Muratori, R. Ferrari, F. Cassani, G. Bianchi, M. Lenzi, L. Rodrigo, A. Linares, D. Fuentes, and F.B. Bianchi, *Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2003. 98(2): p. 431-7.
  80. Worman, H.J. and J.C. Courvalin, *Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis*. Autoimmun Rev, 2003. 2(4): p. 211-7.
  81. Pares, A., L. Caballeria, J. Rodes, M. Bruguera, L. Rodrigo, A. Garcia-Plaza, J. Berenguer, D. Rodriguez-Martinez, J. Mercader, and R. Velicia, *Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver*. J Hepatol, 2000. 32(4): p. 561-6.
  82. Bluthner, M., C. Schafer, C. Schneider, and F.A. Bautz, *Identification of major linear epitopes on the sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology*. Autoimmunity, 1999. 29(1): p. 33-42.
  83. Zuchner, D., T. Sternsdorf, C. Szostecki, E.J. Heathcote, K. Cauch-Dudek, and H.

- Will, *Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 1997. 26(5): p. 1123-30.
84. Evans, J., A. Reuben, and J. Craft, *PBC 95k, a 95-kilodalton nuclear autoantigen in primary biliary cirrhosis*. *Arthritis Rheum*, 1991. 34(6): p. 731-6.
85. Miyake, Y., Y. Iwasaki, H. Kobashi, T. Yasunaka, F. Ikeda, A. Takaki, R. Okamoto, K. Takaguchi, H. Ikeda, Y. Makino, M. Ando, K. Sakaguchi, and K. Yamamoto, *Clinical features of antinuclear antibodies-negative type 1 autoimmune hepatitis*. *Hepatol Res*, 2009. 39(3): p. 241-6.
86. Prince, M., A. Chetwynd, W. Newman, J.V. Metcalf, and O.F. James, *Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years*. *Gastroenterology*, 2002. 123(4): p. 1044-51.
87. Muratori, P., A. Fabbri, C. Lalanne, M. Lenzi, and L. Muratori, *Autoimmune liver disease and concomitant extrahepatic autoimmune disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015. 27(10): p. 1175-9.
88. Murillo Perez, C.F., J.C. Goet, W.J. Lammers, A. Gulamhusein, H.R. van Buuren, C.Y. Ponsioen, M. Carbone, A. Mason, C. Corpechot, P. Invernizzi, M.J. Mayo, P.M. Battezzati, A. Floreani, A. Pares, F. Nevens, K.V. Kowdley, T. Bruns, G.N. Dalekos, D. Thorburn, G. Hirschfield, N.F. LaRusso, K.D. Lindor, K. Zachou, R. Poupon, P.J. Trivedi, X. Verhelst, H.L.A. Janssen, B.E. Hansen, and G.P.S. Group, *Milder disease stage in patients with primary biliary cholangitis over a 44-year period: A changing natural history*. *Hepatology*, 2018. 67(5): p. 1920-1930.
89. ter Borg, P.C., S.W. Schalm, B.E. Hansen, H.R. van Buuren, and P.B.C.S.G. Dutch, *Prognosis of ursodeoxycholic Acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. Results of a 10-yr cohort study involving 297 patients*. *Am J Gastroenterol*, 2006. 101(9): p. 2044-50.
90. Kumagi, T. and E.J. Heathcote, *Primary biliary cirrhosis*. *Orphanet J Rare Dis*, 2008. 3: p. 1.
91. Jacob, D.A., U.P. Neumann, M. Bahra, J. Klupp, G. Puhl, R. Neuhaus, and J.M. Langrehr, *Long-term follow-up after recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplantation in 100 patients*. *Clin Transplant*, 2006. 20(2): p. 211-20.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der sogenannte biliäre Bikarbonat-Schutzschirm nach Hohenester et al. [47] .....	18
Abbildung 2: Potenzieller Einfluss der mAChR3 Auto-AK.....	22
Abbildung 3: Nachweis spezifischer mAChR3 Auto-AK bei Patienten mit PBC.....	23
Abbildung 4: Lumineszenz-basierter Assay zur Funktionalitätsprüfung spezifischer mAChR3 Auto-AK.....	25
Abbildung 5: Expression von mAChR3 im intra-hepatischen Gallengangsepithel ....	26
Abbildung 6: Einschussverfahren von Patientenakten .....	30
Abbildung 7: Prävalenz inhibitorischer mAChR3 Auto-AK bei PBC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe.....	34
Abbildung 8: Vergleich der Häufigkeiten der angegebenen Symptome bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung .....	38
Abbildung 9: Vergleich der Häufigkeiten der immunologischen Begleiterkrankungen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	39
Abbildung 10: Vergleich der Häufigkeiten der immunologischen Begleiterkrankungen der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte .....	40
Abbildung 11: Vergleich des histologischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	41
Abbildung 12: Vergleich des biochemischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	42
Abbildung 13: Vergleich des biochemischen Erkrankungsstadiums vor Therapieeinleitung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte .....	43
Abbildung 14: Vergleich der Häufigkeiten der verschiedenen Auto-AK bei mAChR3+ und - PBC Patienten der Berliner Kohorte.....	48
Abbildung 15: Vergleich der Häufigkeiten der verschiedenen Auto-AK bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte .....	50
Abbildung 16: Vergleich der Häufigkeiten der klinischen Symptome 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der	

Berliner Kohorte.....	51
Abbildung 17: Vergleich des Krankheitsverlaufes bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	52
Abbildung 18: Vergleich des inadäquaten Therapieansprechens bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte 12 Monate nach Therapieeinleitung	55
Abbildung 19: Vergleich der Normalisierung der Laborparameter vor Therapieeinleitung und im Verlauf der Erkrankung bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	57
Abbildung 20: Vergleich der Rate an Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	58
Abbildung 21: Vergleich der Rate an Lebertransplantationen bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte .....	59
Abbildung 22: Vergleich der Überlebenszeiten bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	61
Abbildung 23: Vergleich der PBC Rezidivraten nach erfolgter Lebertransplantation bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	62

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapieempfehlungen zur PBC von DGVS [3], EASL [1] und der AASLD [18] .....	13
Tabelle 2: Definition des inadäquaten Therapieansprechens nach verschiedenen Kriterien der aktuellen EASL Clinical Practice Guidelines [1] .....	16
Tabelle 3: Vergleich der allgemeinen Charakteristika der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung.....	35
Tabelle 4: Vergleich der allgemeinen Charakteristika der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte vor Therapieeinleitung.....	37
Tabelle 5: Vergleich der Laborparameter der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte vor Therapieeinleitung .....	44
Tabelle 6: Vergleich der Laborparameter der mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Leipziger Kohorte vor Therapieeinleitung .....	46
Tabelle 7: Vergleich der Laborparameter 12 Monate nach Therapieeinleitung mit UDCA bei mAChR3+ und mAChR3- PBC Patienten der Berliner Kohorte .....	54
Tabelle 8: Prädiktive Faktoren für eine Lebertransplantation der Berliner PBC Kohorte .....	60



## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nina Wald de Chamorro, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Prävalenz und Bedeutung spezifischer inhibitorischer Auto-Antikörper gegen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ 3 bei Patienten mit primär biliärer Cholangitis – eine retrospektive Studie aus zwei unabhängigen universitären Zentren aus Berlin und Leipzig“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.







## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Privatdozenten Dr. med. Tobias Müller für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin zu promovieren. Ich möchte mich bei ihm ganz herzlich für die gute Betreuung, die umfangreiche Unterstützung und die konstruktive Kritik bedanken.

Ein weiterer besonderer Dank gelten Elise Leicht und Lena Maria Greverath für die Unterstützung mit Rat und Tat.

Zudem danke ich Frau Dr. rer. nat. Daniela Paclik (Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Berlin) für die Bereitstellung der Abbildung 5.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern Jürgen und Angelika für die Kinderbetreuung, so dass ich ausreichend Zeit für das Anfertigen der Arbeit finden konnte.

Ein weiterer Dank gilt meinem Bruder Stefan für das Korrekturlesen dieser Arbeit und der Kinderbetreuung während des Schreibens.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann César für die hilfreiche Unterstützung in jeglicher Hinsicht beim Anfertigen dieser Arbeit.