

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

DISSERTATION

**Untersuchung zur Bedeutung genetischer Polymorphismen des  
muskarinergen Acetylcholinrezeptors Typ 3 bei chronisch-  
entzündlichen Gallengangserkrankungen**

**Investigation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Type 3 Gene  
Polymorphisms in chronic inflammatory bile duct diseases**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Maria Greverath

aus Bissendorf

**Datum der Promotion: 05.03.2021**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung und Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Darstellung des Forschungsstandes</b>	<b>6</b>
<i>Chronisch-entzündliche Gallengangserkrankungen</i>	6
<i>Hypothetisches Modell des biliären Bikarbonat-Schutzschirms</i>	8
<i>Hypothese zur Rolle des muskarinergen Acetylcholinrezeptors Typ 3</i>	9
<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	10
<b>Vertiefende Darstellung der Methodik</b>	<b>11</b>
<i>Studienpopulation</i>	11
<i>DNA-Isolation und Genotypenanalyse</i>	13
<i>MACHR3-Expression in Lebergewebe in Abhängigkeit des rs4620530-Genotyps</i>	15
<i>Statistische Analysen</i>	15
<b>Ergebnisse</b>	<b>16</b>
<i>Ergebnisse der Genotypenanalyse</i>	16
<i>Klinische und paraklinische Charakteristika der Studienpopulation</i>	19
<i>Einjahresansprechrare auf UDCA</i>	22
<i>Nachweis der mAChR3-Expression im Gallengangsepithel</i>	24
<b>Diskussion und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen</b>	<b>25</b>
<i>Interpretation der Ergebnisse</i>	25
<i>Limitationen und Stärken der Arbeit</i>	29
<i>Mögliche klinische Anwendungen des mAChR3 rs4620530 Risikoallels</i>	30
<i>Weiterführende wissenschaftliche Fragestellung</i>	31
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>33</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>39</b>
<i>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen</i>	40
<b>Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)</b>	<b>41</b>
<b>Sonderdruck der Publikation</b>	<b>43</b>
<i>Greverath, L. M., Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. &amp; Muller, T. Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. Hepatology Research: the official journal of the Japan Society of Hepatology (2019)</i>	44
<b>Lebenslauf</b>	<b>51</b>
<b>Vollständige Publikationsliste</b>	<b>57</b>
<b>Danksagung</b>	<b>59</b>

## Zusammenfassung und Abstract

**Einleitung:** Dysfunktionale Signalwege des muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ 3 (mAChR3) könnten durch eine Beeinträchtigung der biliären Bikarbonatsekretion an der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen wie der primär biliären Cholangitis (PBC) und der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) beteiligt sein. Ziel der vorliegenden Studie war, die mögliche Bedeutung der bekannten Einzelpunktmutationen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) rs11578320, rs6690809, rs6429157, rs7548522 und rs4620530 im Gen des mAChR3 (*CHRM3*) bei Patient\*innen mit PBC, PSC, chronischer Hepatitis C (CHC), sowie einer Kontrollkohorte mit gesunden Proband\*innen zu untersuchen.

**Methoden:** Bei 306 Patient\*innen mit PBC, 205 Patient\*innen mit PSC, 208 Patient\*innen mit CHC und 240 gesunden Proband\*innen der Universitätskliniken Berlin und Leipzig wurden mittels Polymerasekettenreaktion und Schmelzkurvenanalyse die Genotypen der *CHRM3*-SNPs bestimmt. In der PBC-Kohorte wurden zusätzlich Daten bezüglich der allgemeinen klinischen und paraklinischen Charakteristika erhoben, sowie das Therapieansprechen auf Ursodesoxycholsäure (UDCA) nach 12 Monaten in Relation zu dem zugrundeliegenden *CHRM3*-Genotyp untersucht. Desweiteren wurden mAChR3-Expressionsanalysen in explantiertem Lebergewebe von Patient\*innen mit PBC und PSC durchgeführt, um die Expression des mAChR3 in Abhängigkeit des *CHRM3*-Genotyps zu untersuchen.

**Ergebnisse:** Die Untersuchungen zu SNP rs4620530 des *CHRM3*-Gens zeigten sowohl signifikante Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Genotypen zwischen PBC-Patient\*innen und der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,008$ ), als auch zwischen PBC- und den PSC- und CHC-Patient\*innen ( $p=0,005$  beziehungsweise  $p=0,009$ ). Dies ließ sich auf Unterschiede im Vorkommen des T-Allels zurückführen, welches in PBC-Patient\*innen zu 49,3%, bei PSC-Patient\*innen zu 39,8%, bei CHC-Patient\*innen zu 35,7% und in den gesunden Kontrollen zu 40% nachgewiesen werden konnte. Das *CHRM3* rs4620530 T-Allel war dabei mit dem Vorkommen einer PBC assoziiert (odds ratio [OR] =1,461, 95% confidence interval [CI] 1,147-1,861,  $p=0,002$ ). Bei den PBC Patient\*innen zeigten jedoch initiale Laborparameter, Komorbiditäten und Einjahres-Therapieansprechen auf UDCA anhand von etablierten

Kriterien keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen des *CHRM3* rs4620540. In Immunblots an Gewebe explantierter Lebern von PBC- und PSC-Erkrankten konnte die Expression des mAChR3 speziell in den Gallengängen nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster zeigte jedoch keine spezifischen Veränderungen im Vergleich der verschiedenen Genotypen des *CHRM3* rs4620540.

**Schlussfolgerung:** Das T-Allel des SNP rs4620530 im *CHRM3*-Gen scheint ein potentieller genetischer Risikofaktor für die PBC zu sein.

## Abstract

**Introduction:** An impaired function of the muscarinic acetylcholine receptor type 3 (mAChR3) might be involved in an altered bicarbonate secretion in bile ducts. This presumably leads to chronic inflammatory biliary diseases such as primary biliary cholangitis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). The aim of the present study was to investigate the prevalence of five well-characterized specific single nucleotide polymorphisms (SNP) within the *CHRM3* gene (rs11578320, rs6690809, rs6429157, rs7548522 and rs4620530) in patients with PBC and PSC. Patients with chronic hepatitis C (CHC) and healthy individuals (HC) served as respective control cohorts.

**Methods:** Using PCR and melt curve analysis, *CHRM3* genotyping was performed in 306 PBC patients, 205 PSC patients, 208 patients with CHC and 240 HC from two independent tertiary care university centers in Berlin and Leipzig in Germany. In PBC patients baseline characteristics and response to ursodeoxycholic acid (UDCA) therapy applying established response criteria at 12 months after the initiation of UDCA treatment were also evaluated according to the underlying *CHRM3* genotype. To evaluate the expression of mAChR3 in relation to the underlying *CHRM3* genotype, immunofluorescence and immunoblots have been performed on explanted liver tissue from PBC and PSC patients.

**Results:** The *CHRM3* rs4620530 genotype distribution in patients with PBC significantly differed from patients with PSC ( $p=0.005$ ), CHC ( $p=0.009$ ) and healthy controls ( $p=0.008$ ), which was primarily due to a substantial over-representation of the T allele in PBC (49.3% in PBC versus 39.8% in PSC, 35.7% in CHC and 40% in HC). This indicated a potential association of the rs4620530 T allele with PBC (odds ratio

[OR] = 1.461, 95% confidence interval [CI] 1.147-1.861;  $p=0.002$ ). The prevalence of TT/TG genotypes was significantly higher in patients with PBC compared to patients with PSC (74.5% vs. 61.0%;  $p=0.001$ ) and patients with CHC (74.5% vs. 63.5%). Further analysis revealed no obvious correlation with baseline characteristics and UDCA treatment response in patients with PBC. Immunoblots of explanted liver tissue from PBC patients exhibited specific expression of mAChR3 exclusively in bile ducts, but no obvious variance in the expression pattern in-between genotypes of rs4620530.

**Conclusion:** The T allele of *CHRM3* SNP rs4620530 was identified as a potential genetic risk factor for the development of PBC.

## Manteltext

Der folgende Text stellt eine Vertiefung der Darstellung des Forschungsstandes, der Methodik, der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse von der Publikation Greverath, L. M., Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. 2019, *Hepatology Research: the official journal of the Japan Society of Hepatology (2019)*<sup>1</sup> dar. Wenn nicht anders benannt, wurden alle beschriebenen Experimente, Untersuchungen und Analysen von mir durchgeführt.

## Darstellung des Forschungsstandes

### ***Chronisch-entzündliche Gallengangserkrankungen***

Die primär biliäre Cholangitis (PBC) ist am ehesten charakterisiert durch eine chronische, immunvermittelte, nicht eitrige Destruktion der kleinen bis mittelgroßen intrahepatischen Gallengänge, während die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) eine Entzündung der größeren intrahepatischen, aber auch extrahepatischen Gallengänge darstellt. Die daraus entstehende Cholestase präsentiert sich klinisch mit erhöhten Cholestaseparametern, wie der Alkalischen Phosphatase (AP) und Gammaglutamyltransferase ( $\gamma$ -GT). Im Krankheitsverlauf kann es ebenfalls zu einem Anstieg der Aminotransferasen kommen. Unabhängig von Stadium und Krankheitsprogress stellen Erschöpfung (Fatigue) und Juckreiz (Pruritus) die häufigsten Symptome dar<sup>2,3</sup>. Als pathophysiologische bzw. ätiologische Ursache wird ein komplexes Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Einflüssen aus der Umwelt und autoimmunen Prozessen vermutet<sup>4</sup>.

Mit einer geschätzten Gesamtinzidenz zwischen 0,9 bis 5,8 in 100.000 Personen gehört die PBC zu den seltenen Erkrankungen. Ihre Prävalenz variiert zwischen 1,91 und 40,2 pro 100.000 Individuen und der Anteil an weiblichen Erkrankten beträgt ungefähr 92%<sup>5</sup>. Als serologische Marker werden Antikörper gegen eine Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (PDC) genutzt, welche auch als antimitochondriale Antikörper (AMA) bezeichnet werden. Diese AMAs können in 90-

95% der PBC-Patient\*innen detektiert werden. Weniger als 1% der Gesamtbevölkerung kann positiv auf das Vorhandensein von AMAs gescreent werden<sup>2</sup>. Bei einigen Fällen erscheinen neben den serologischen und histologischen Merkmalen der PBC auch Zeichen einer Autoimmunhepatitis (AIH). Dies wird als sogenanntes AIH-Overlap-Syndrom bezeichnet<sup>6</sup>. Desweiteren können auch extrahepatische Manifestationen, wie die Osteoporose und das Sicca-Syndrom, bei Patient\*innen mit PBC beobachtet werden<sup>4,6</sup>. Zusätzlich zu solchen extrahepatischen Manifestationen wird auch eine erhöhte Rate an Autoimmunerkrankungen, beziehungsweise rheumatischen Erkrankungen beschrieben. Zu diesen zählen zum Beispiel autoimmune Schilddrüsendiffunktionen und die systemische Sklerose<sup>4</sup>. In diesem Zusammenhang ist vor allem das Sjögren´s Syndrom (SS) hervorzuheben, von dem nahezu 40% der PBC-Patient\*innen betroffen sind<sup>7</sup>. Bei dem SS leiden die Betroffenen besonders an trockenen Augen (Xerophthalmie) oder einem trockenen Mund (Xerostomie)<sup>7</sup>.

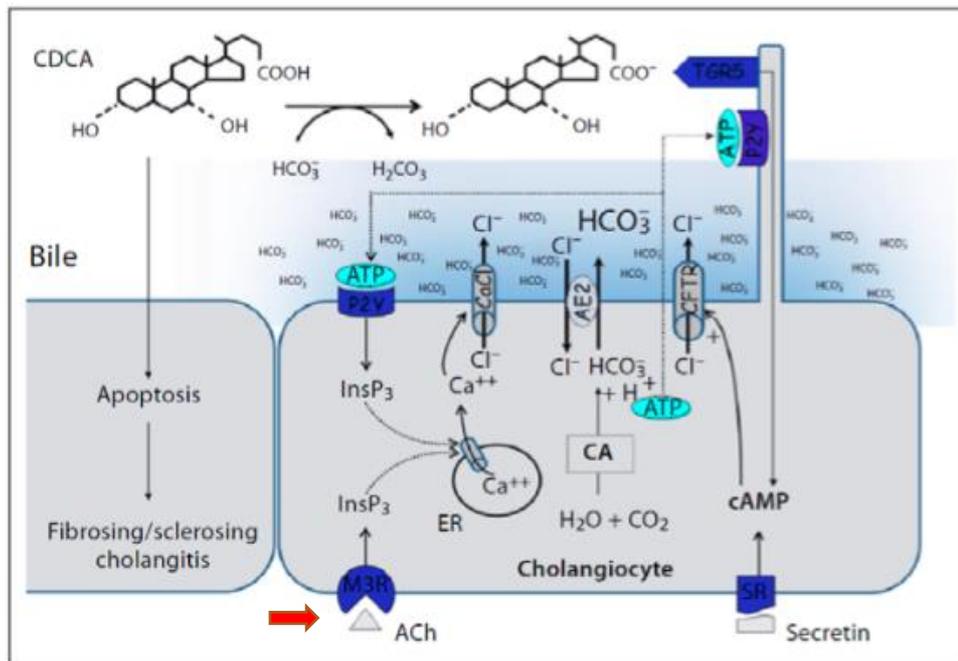
Obwohl AMAs als krankheitsspezifische Antikörper der PBC angesehen werden, konnten bisher im Tiermodell durch den passiven Antikörpertransfer oder die Immunisierung der Tiere mit dem Zielantigen der AMAs, keine PBC-ähnlichen Erkrankungen ausgelöst werden<sup>8,9</sup>. Die Reduktion der AMA-Titer führte in Studien ebenfalls nicht zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs<sup>10</sup>. Diese Studienergebnisse lassen an der Hypothese zweifeln, AMAs wären die alleinige Ursache der Autoimmunität der PBC. Ferner befindet sich das Antigen der AMAs, der Pyruvatdehydrogenasekomplex, ubiquitär im menschlichen Körper. Die Organspezifität der PBC (ausschließlicher Befall der Gallengänge) kann durch das Vorhandensein von AMAs daher nicht vollständig erklärt werden.

Die PSC betrifft in über 60% der Fälle Männer mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 30-40 Jahren. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zeigen mit einem Auftreten von 60-80% eine erhöhte Prävalenz bei Patient\*innen mit PSC<sup>2</sup>. Bei dem klinischen Verdacht einer PSC werden zur Diagnosestellung bildgebende Maßnahmen wie zum Beispiel die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) verwendet. Eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) kann ebenfalls durchgeführt werden. Die ERCP bietet neben diagnostischen Möglichkeiten auch therapeutische Optionen, wie zum Beispiel die Dilatation entzündlich veränderter Gallengänge<sup>11,12</sup>. Die Mechanismen der Pathogenese sind bei der PSC, ähnlich wie bei der PBC, noch nicht vollständig geklärt.

### **Hypothetisches Modell des biliären Bikarbonat-Schutzschirms**

Obwohl die Immunpathogenese der chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen nicht hinreichend geklärt ist, werden sie in der Literatur den autoimmunvermittelten Erkrankungen zugeordnet<sup>4,12</sup>. Ulrich Beuers et al.<sup>13</sup> und Simon Hohenester et al.<sup>14</sup> haben ein hypothetisches Modell zu der Entstehung der entzündlichen Cholangiopathien entworfen, welches einen besonderen Schwerpunkt auf den möglichen Einfluss der Gallensäuren legt. Die Schädlichkeit der Gallensäuren und die gewebedurchdringenden Eigenschaften werden determiniert durch die Polarität und Protonierung der Säure. Die Toxizität von Gallensäuren und das zytolytische Potential an den Gallengangsepithelien ist somit abhängig vom pH-Wert des umliegenden Milieus<sup>14</sup>. Die Gallengangsepithelzellen (Cholangiozyten) schützen sich vor hydrophoben Gallensäuren, indem sie ein alkalisches Milieu an der Oberfläche ihrer apikalen Membran herstellen. Die Sekretion von Bikarbonat scheint hierbei eine große Rolle zu spielen und wird in dem hypothetischen Modell von Beuers und Hohenester als sogenannter *Bikarbonat-Schutzschirm* bezeichnet<sup>13,14</sup>. Der Mechanismus dieses Modells ist wie folgt: die Aktivierung des basolateral lokalisierten muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ 3 (mAChR3) führt über intrazelluläre Calcium-induzierte Signalwege zu einer Aktivierung des Anionen-Austauschers 2 (AE2). Durch die Aktivierung des AE2 kommt es zu einer luminalen Bikarbonatsekretion. Dies reduziert die lokale Konzentration der toxischen und tensidischen Komponenten in der Gallenflüssigkeit. Eine eingeschränkte Bikarbonatsekretion und folglich ein weniger alkalisches Milieu im Gallengangslumen hat möglicherweise einen negativen Effekt auf die Cholangiozyten und führt zum Absterben der Zellen. Die Gallensäure-induzierte Apoptose der Cholangiozyten führt zu einer reaktiven Inflammation und triggert Autoimmunprozesse in den Gallengängen. Das Modell des *Bikarbonat-Schutzschirms* könnte eine Schlüsselrolle in dem Verständnis der Pathogenese von entzündlichen Gallengangserkrankungen spielen<sup>13</sup>. Dementsprechend kann unter Anwendung dieses Modells eine fehlerhafte Funktion des mAChR3 einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung der PBC haben.

In der nachfolgenden **Abbildung 1** ist das hypothetische Modell des *Bikarbonat-Schutzschirms* noch einmal graphisch dargestellt.



**Abbildung 1: Hypothese des *Bikarbonat-Schutzschirms* nach Hohenester et al.<sup>14</sup>**

An der basolateralen Seite der Cholangiozyten befindet sich der muskarinerge Acetylcholinrezeptor Typ 3 (hier M3R, siehe Pfeil). Über intrazelluläre Signalkaskaden mit Inositoltriphosphat (InsP<sub>3</sub>) und die Freisetzung von Calcium kommt es zur Sezernierung von Chlorid, welches über den Anionen-Austauscher 2 (AE2) im Austausch mit Bikarbonat wieder in die Zelle aufgenommen wird. Durch diesen Mechanismus entsteht an der luminalen Seite der Zelle ein alkalisches Milieu, welches vor den toxischen und tensidischen Eigenschaften der Gallensäuren schützt.

### ***Hypothese zur Rolle des muskarinergen Acetylcholinrezeptors Typ 3***

Bei der häufigsten Komorbidität der PBC, dem SS, sind mAChR3-vermittelte Signalwege schon früh als entscheidender Aspekt in der Immunpathogenese beschrieben worden<sup>15</sup>. Desweiteren konnten spezifische Antikörper gegen den mAChR3 bereits in Seren von Patient\*innen mit SS detektiert werden<sup>15,16</sup>. Vor dem Hintergrund, dass das SS ein hohes konkordantes Vorkommen mit der PBC hat, erscheint es plausibel, dass die Entstehung chronisch-entzündlicher Gallengangserkrankungen auf vergleichbaren Mechanismen beruhen könnte<sup>17</sup>. In experimentellen Arbeiten zu muskarinergen Acetylcholinrezeptoren konnte gezeigt werden, dass der mAChR3 nicht nur in exokrinen Drüsen exprimiert wird (wie zum Beispiel in Speicheldrüsen, welche beim SS eine wichtige Rolle spielen), sondern auch in der Leber<sup>18</sup>. Die Expression des Rezeptors zeigte sich innerhalb der Leber

hochspezifisch in den Gallengängen<sup>18</sup>. Die physiologische Stimulation des Gallenflusses in den Gallengängen erfolgt parasymphatisch mithilfe des Neurotransmitters Acetylcholin. Der Rezeptor für die afferente Innervation des Parasympathikus ist der basolateral lokalisierte mAChR3. Dieser aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, wodurch an der luminalen Seite der Zellen Bikarbonat in das Gallengangslumen sezerniert wird<sup>18,19</sup>.

Wie in der vorausgegangenen **Abbildung 1** erkennbar, stellt der mAChR3 (hier genannt M3R, siehe Pfeil) einen wichtigen Aspekt im Modell des biliären *Bikarbonat-Schutzschirms* dar. Gestützt wird diese Annahme durch eine neuere Arbeit von Durchschein et al.<sup>19</sup>, in welcher Experimente an Mäusen mit funktionslosem mAChR3 durchgeführt wurden. Nach Ausschaltung des mAChR3-Gens (*CHRM3*) konnte in dieser Studie ein deutlich reduzierter Fluss des biliären Bikarbonats detektiert werden. Es zeigte sich dadurch eine erhöhte Suszeptibilität der Mäuse für gallensäureinduzierte Schäden. Die Mäuse entwickelten im Verlauf chronische Cholangitiden, sowie biliäre Leberzirrhosen. Es konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass durch die Hinzugabe von mAChR3-Agonisten (zum Beispiel Bethanechol) die Ausprägung der Lebererkrankung gemindert werden konnte<sup>19</sup>. Insgesamt ließen diese Studienergebnisse darauf schließen, dass der genetische Verlust des mAChR3 zu der Entstehung von chronischen Gallengangserkrankungen führen kann.

### **Zielsetzung der Arbeit**

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass Polymorphismen im mAChR3-Rezeptorgen einen Einfluss auf die protektiven Mechanismen der Cholangiozyten in Menschen haben und so zu der Entstehung von Cholangiopathien beitragen können. Diese genetischen Veränderungen könnten zu einem Defekt im biliären *Bikarbonat-Schutzschirm* führen und für die Entstehung einer Cholangiopathie prädisponieren. In einer Studie von Appel et al.<sup>20</sup> an Patient\*innen mit SS konnten fünf Einzelpunktmutationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) im *CHRM3*-Gen identifiziert werden, welche mit dem Vorliegen des SS assoziiert waren. In Anbetracht der beschriebenen Koexistenz von PBC und SS, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob auch eine Assoziation der Polymorphismen mit der PBC

vorliegt. Desweiteren sollten die Genotypen mit den klinischen Parametern der Patient\*innen und das Einjahresansprechen auf die Therapie korreliert werden.

Für die vorliegende Arbeit formulierte ich die folgenden vier wesentlichen Ziele:

1. Die Ermittlung von Genotypenprävalenzen der Polymorphismen rs11578320, rs6690809, rs6429157, rs7548522 und rs4620530 im mAChR3-Gen bei Patient\*innen mit PBC und PSC, sowie in gesunden und erkrankten Kontrollkohorten
2. Die klinische und laborchemische Charakterisierung der PBC-Kohorte in Abhängigkeit der mAChR3-Genotypen
3. Die Korrelation zwischen mAChR3 Genotypen und den Einjahresansprechraten auf die Erstlinientherapie mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) in der PBC-Kohorte
4. Expressionsanalysen des mAChR3 in explantiertem Lebergewebe von PBC- und PSC-Patient\*innen in Relation zu dem zugrundeliegenden mAChR3-Genotyp

## **Vertiefende Darstellung der Methodik**

### ***Studienpopulation***

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Ethikkommissionen der Universitäten Berlin (EA2/035/07) und Leipzig (085/18-Ik) genehmigt und alle Studienteilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis. Patient\*innen mit der Diagnose PBC und PSC, die von 2003 bis 2017 am Interdisziplinären Leberzentrum des Campus Virchow Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin und am Universitätsklinikum Leipzig behandelt wurden, konnten für die initiale Studienpopulation eingeschlossen werden und wurden retrospektiv von mir analysiert.

Voraussetzung für den Einschluss in die Kohorte war die Diagnosestellung nach den Diagnosekriterien der aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien<sup>2,6</sup>. Die Diagnose der PBC konnte gestellt werden bei Patient\*innen mit erhöhten Cholestaseparametern, wie AP und  $\gamma$ -GT, über mindestens 6 Monate, sowie positive AMAs als spezifische serologische Marker der PBC. Bei sogenannten AMA-negativen Patient\*innen wurde die Diagnose mithilfe von antinukleären Antikörpern (ANA) gegen 'nuclear dots' bzw. sp100, die Kernmembran bzw. pg210 oder Zentromere (ACA)

gestellt. Bei Verdacht auf PBC, jedoch negativen serologischen Markern, wurde die Diagnose mithilfe einer Leberbiopsie gesichert. In der Histologie zeigten sich PBC-typische Zeichen, wie zum Beispiel Cholangitis der interlobulären und septalen Gallengänge bzw. „floride Gallengangsläsionen“<sup>2,6</sup>. Anhand der vorhandenen Arztbriefe, Laborparameter und dokumentierten klinischen Verläufen im Patientenverwaltungssystem (SAP) erhob ich die Daten an den jeweiligen Kliniken in Berlin und Leipzig.

Die Therapie der ersten Wahl zur Behandlung der PBC ist nach aktuellen Versorgungsleitlinien die Gabe von 13-15 mg/kg Körpergewicht (KG)/Tag UDCA<sup>2</sup>. Die UDCA-Therapie verbessert die Laborparameter, verlängert das transplantatfreie Überleben und verzögert die fibrotische Progression in den Gallengängen<sup>5</sup>. Gemäß den aktuellen Leitlinien, soll das Therapieansprechen auf UDCA nach einem Jahr evaluiert werden. Bei mangelhaften Ansprechen auf die Erstlinientherapie sollte gegebenenfalls eine Anpassung des Therapieschemas erfolgen oder Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden<sup>4</sup>. Um das adäquate Ansprechen auf eine Therapie mit UDCA zu untersuchen, wurden in unserer Kohorte bereits etablierte Kriterien (Barcelona und Paris-II<sup>6</sup>) angewandt. Die Barcelona-Kriterien für ein adäquates Ansprechen werden erfüllt, wenn die AP um mehr als 40% nach einem Jahr abgesunken ist oder sich im Normbereich befindet. Wenn die AP oder die Aspartataminotransferase nach einem Jahr weniger als das 1,5-fache des Normwertes beträgt oder sich das Bilirubin innerhalb des Referenzbereichs befindet, spricht man von einem Therapieansprechen nach Paris-II-Kriterien. Neben den Einjahresansprechraten auf UDCA wurde auch die Notwendigkeit einer Lebertransplantation im Endstadium der Erkrankung in dieser Studie erfasst.

Die Diagnose der PSC wurde gestellt bei Patient\*innen mit chronischer Cholestase, charakteristischen Veränderungen in der Bildgebung und Ausschluss einer sogenannten sekundär sklerosierenden Cholangitis, bei der im Gegensatz zur PSC zumeist ein auslösendes Ereignis identifiziert werden kann. Die chronische Hepatitis C (CHC), hier als erkrankte Kontrollkohorte gewählt, wurde diagnostiziert bei dem Vorliegen eines positiven anti-HCV-Tests in der Routinediagnostik (Architect Anti-HCV, ABBOTT, Wiesbaden) und nachweisbarer HCV-RNA (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV<sup>®</sup> Roche Diagnostics, Mannheim) im Serum für über 6 Monate. Als gesunde Kontrollen (HC) dienten Blutspender im Alter von über 60 Jahren ohne Nachweis einer Lebererkrankung oder relevanten Komorbidität.

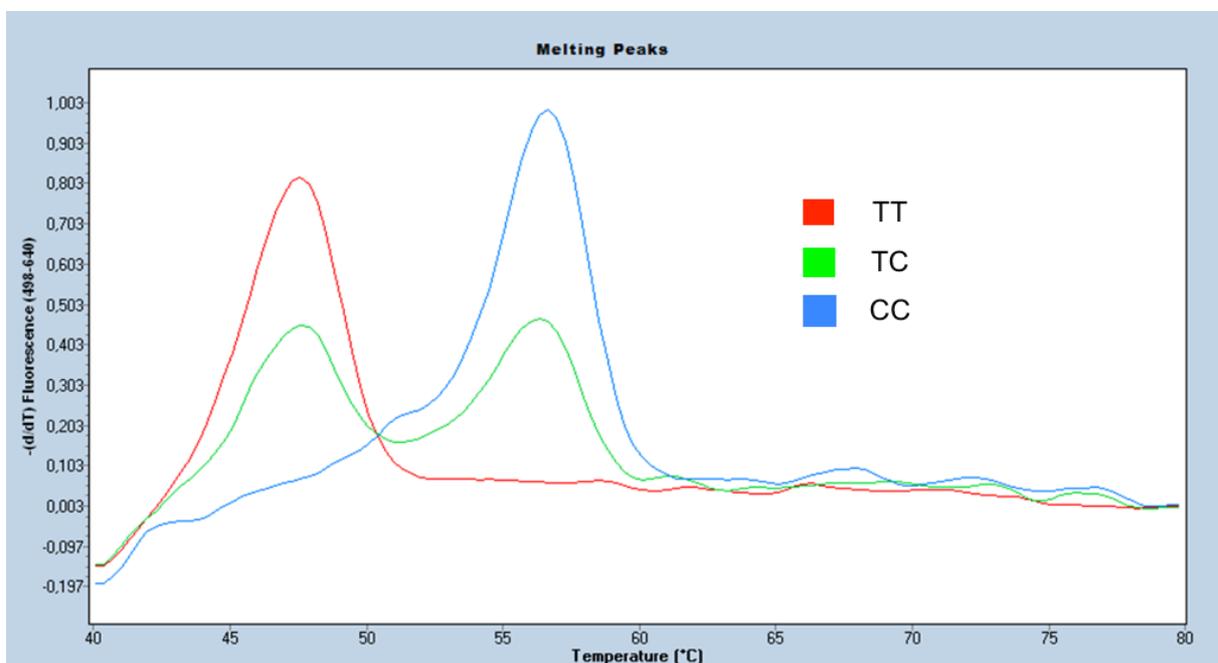
Insgesamt eingeschlossen in die Studie wurden 306 PBC-, 208 PSC-, 208 CHC-Patient\*innen, sowie 240 gesunde Blutspender.

### ***DNA-Isolation und Genotypenanalyse***

Für die Durchführung der DNA-Isolation, sowie für die Genotypenanalyse verwendete ich standardisierte, bereits etablierte Protokolle des Labors für Hepatologie der Universitätsklinik Leipzig. Die Isolation der DNA aus dem bei -20°C gelagertem Vollblut der Patient\*innen erfolgte mithilfe des GenUp Blood DNA Kits der Firma Biotech Rabbit (Berlin). Der Vorgang gliedert sich in die wesentlichen drei Schritte der Lyse, Waschung und Elution in einem säulenbasierten Minifiltersystem. Um die DNA aus den Zellen des Blutes freizusetzen, wurde eine Protease (Proteinase K), sowie ein Lysepuffer (LC Puffer) hinzugegeben und nach einer 10-minütigen Inkubation bei 56°C das Kondensat herunterzentrifugiert. Nach Hinzugabe eines Bindungspuffers (Binding BL) folgte die Aufreinigung im Minifiltersystem durch mehrere Waschprozesse mit verschiedenen Waschpuffern (Wash A, Wash B) und mehreren Zentrifugationsschritten. Anschließend wurde die DNA mithilfe eines Elutionspuffers gelöst und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Qualität der isolierten DNA wurde durch Messung des DNA-Gehalts im Eluat in ng/ul an einem Spektralphotometer (Nano-Drop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) überprüft. Die spezifischen Primer (F1, F2 vorwärts und R1, R2 rückwärts) und Sonden zur Detektion der SNPs wurden anhand der verfügbaren Sequenzen der NCBI-Datenbank erstellt und durch die Firma Eurogentec (Lüttich, Belgien) hergestellt. Für die Etablierung des Genotypen-Assays wurden Kontroll-DNAs mit jeweils einem Vorwärtsprimer (Primer 1) und einem Rückwärtsprimer (Primer 2) mit dem Polymerase-Reaktionsmix MyTaq HS Mix von Bioron (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio USA) und DNA-freiem Wasser gemischt. Anschließend durchliefen diese Ansätze die Schritte der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation der Polymerasenkettenreaktion (PCR) in einem PCR-Blockcycler. Durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein 1%-iges Agarosegel mit anschließender Auswertung des Gelbildes mit der Alpha-Imager Software (Alpha Innotech) wurde die Primerkombination erfasst, welche die besten Resultate in der DNA-Amplifikation ergab. Darauffolgend wurde 20 ng/ul DNA der Patient\*innen für die jeweils 5 verschiedenen SNPs mit dem PCR-Mastermix vermengt. Die PCR-Konditionen waren

wie folgt: 12 Minuten Denaturierung bei 95°C, 45 Zyklen Denaturierung für 5 Sekunden bei 95°C, Primerhybridisierung bei 60°C für 40 Sekunden und Elongation für 1,5 Minuten bei 72°C. Nach Zugabe von spezifischen Ankern und den dazu passenden fluoreszierenden Sensoren zu dem amplifizierten PCR-Produkt folgte die Ermittlung der Genotypen mittels einer Schmelzkurvenanalyse. Die Schmelzkurven wurden detektiert nach einer Denaturierung für 5 Sekunden bei 95°C zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, einer Pause von 20 Sekunden bei 40°C zum Anlagern der Sonden und einem weiteren langsamen Erhitzen auf 80°C für 3 Minuten zum gezielten Abschmelzen der Sonden. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Nachweis der Hybridisierung von Nukleinsäuren mithilfe von *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), welche die genaue Zuordnung von homozygoten oder heterozygoten Genotypen erlaubt. Eine Qualitätskontrolle der ermittelten Genotypen erfolgte mithilfe einer Sanger-Sequenzierung über die Firma Eurofines Scientific, Luxemburg.

In der nachfolgenden **Abbildung 2** ist ein Beispiel der Schmelzkurven für den SNP rs11578320, sowie die Zuordnung der jeweiligen Genotypen gezeigt.



**Abbildung 2.** Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse des SNPs rs11578320 im LightCycler (Roche, Basel, Schweiz). Die Temperatur ist an der horizontalen Achse aufgetragen, die Intensität des Fluoreszenzsignals an der vertikalen Achse. Nach der Amplifikation der DNA mittels PCR erfolgte anhand dieser Graphen die Zuordnung der Genotypen TT (rot), TC (grün) und CC (blau).

### ***MACHR3-Expression in Lebergewebe in Abhängigkeit des rs4620530-Genotyps***

Zur Untersuchung des Einflusses der *CHRM3*-Polymorphismen auf das mAChR3-Rezeptorprotein sollten Expressionsanalysen an humanem Lebergewebe in Abhängigkeit der Genotypen erfolgen. Die bisher einzige kausale Therapieoption von schwer verlaufenden chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen ist die Durchführung einer Lebertransplantation. Bei einigen PSC- und PBC-Patient\*innen unserer Studienpopulation war dies im fortgeschrittenem Krankheitsstadium notwendig. Die Lebertransplantationen wurden in der Chirurgischen Klinik Campus Charité Mitte I Campus Virchow-Klinikum durchgeführt. Während der Operationen konnte Gewebe der explantierten erkrankten Lebern entnommen und asserviert werden. In Zusammenarbeit mit den Kollegen der Chirurgischen Klinik PD Moritz Schmelzle und PD Sascha Chopra wurden für die geplanten Expressionsanalysen des mAChR3 diese Gewebeproben an den Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe für chronisch-entzündliche Gallengangserkrankungen Prof. Dr. Oren Shibolet des Department of Gastroenterology and Hepatology des Tel Aviv-Sourasky Medical Centers der Sackler Faculty of Medicine nach Tel-Aviv versandt und vor Ort aufgearbeitet. Die Isolation der humanen Cholangiozyten aus den Zelllysaten erfolgte nach der immuno-magnetischen Methode, welche im Rahmen vorheriger Kooperationen bereits in vergleichbaren Projekten erfolgreich etabliert und durchgeführt wurde<sup>21-23</sup>. Die Durchführung der Methodik wurde ausführlich in der Arbeit von Mueller et al.<sup>22</sup> erläutert. Das Protein Cytokeratin 19 (CK-19) diente für die Immunblots als bekannter positiver Marker der Gallengangsepithelzellen und bei den Immunfluoreszenzfärbungen als Antigen für die CK19-Antikörper. Der mAChR3 wurde mithilfe von Anti-mAChR3-Antikörpern als Primärantikörper (R&S Systems, Abindon, UK and Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) detektiert. Anschließend wurde mittels sekundärer Antikörper die Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und in Abhängigkeit der Genotypen des rs4620530 miteinander verglichen. Ferner erfolgte die Quantifizierung der Proteinexpression in Relation zu den mAChR3 Genotypen von PBC- und PSC-Patient\*innen mithilfe von Immunblots.

### ***Statistische Analysen***

Für die die statistischen Analysen dieser Arbeit nutzte ich die Software IBM SPSS Statistics (Version 24.0 SPSS für Windows; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Ich führte

ebenfalls eine Testung auf Normalverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der gesunden Kontrollkohorte (HC) durch. Der Pearson's Chi-Quadrat-Test wurde verwendet um die Gruppen auf Unterschiede zwischen dichotomen Daten zu untersuchen. Kontinuierliche Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Für die Erfassung von Assoziationen der SNPs mit PBC bzw. PSC, CHC oder HC wurde eine binär-logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Quantitative Daten wurden als Median und Spannweite  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Berechnung der Haplotypen und Struktur des Kopplungsgleichgewichts (Linkage Disequilibrium, LD) erfolgte mithilfe der Haploview 4.2 Software (Broad Institute, Cambridge, USA). Ein  $p$ -Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet. Die  $p$ -Werte wurden nicht auf Mehrfachtestung korrigiert.

## **Ergebnisse**

### ***Ergebnisse der Genotypenanalyse***

Diese Darstellung der Ergebnisse stellt eine Ergänzung zu den Ergebnissen der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikation dar<sup>1</sup>. Meine statistische Analyse der Genotypenanalyse ergab folgende Verteilung der Genotypen: In der PBC-Kohorte betrug der Anteil des TT-Genotyps des SNP rs4620530 im *CHRM3*-Gen 24,2% (74/306), des TG-Genotyps 50,3% (154/306) und des GG-Genotyps 25,5% (78/306). Diese Verteilung unterschied sich signifikant von der Prävalenz der Genotypen in der gesunden Kontrollkohorte (TT = 16,7%, TG = 46,7%, GG = 36,7%) mit einem  $p$ -Wert von 0,008. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen der PBC-Kohorte und der PSC-Kohorte mit einem  $p$ -Wert von 0,005. Es konnte ebenfalls im Vergleich zur unabhängigen Vergleichsgruppe der CHC-Patient\*innen ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen des SNP rs4620530 ermittelt werden ( $p=0,009$ ). Hinsichtlich der SNPs rs6690809, rs11578320, rs6429157 und rs7548522 war die Verteilung der Genotypen ähnlich zwischen PBC, PSC, CHC und HC. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Vergleichsanalyse in den unterschiedlichen Kohorten ermittelt werden.

Die folgende **Tabelle 1** zeigt die Darstellung der Prävalenzen der *CHRM3*-Polymorphismen der PBC-Gesamtkohorte, wie auch die Gegenüberstellung der Prävalenzen der PSC-Patient\*innen, der CHC-Kohorte und den gesunden Kontrollen.

**Tabelle 1. Prävalenzen der *CHRM3*-Genotypen im Vergleich\***

SNP	PBC <sup>1</sup> (%)	PSC <sup>2</sup> (%)	CHC <sup>3</sup> (%)	HC <sup>4</sup> (%)	PBC vs. HC	PBC vs. PSC	PBC vs. CHC
n	306	205	208	240	<i>p</i> <sup>x</sup>	<i>p</i> <sup>x</sup>	<i>p</i> <sup>x</sup>
<b>rs11578320</b>							
TT	239 (78,1)	157 (76,6)	180 (86,5)	195 (81,3)			
TC	66 (21,6)	48 (23,4)	27 (13,0)	43 (17,9)	0,465	0,800	0,260
CC	1 (0,3)		1 (0,5)	2 (0,8)			
<b>rs6690809</b>							
GG	57 (18,6)	40 (19,5)	47 (22,6)	59 (24,6)			
GA	163 (53,3)	97 (47,3)	100 (48,1)	115 (47,9)	0,221	0,385	0,444
AA	86 (28,1)	68 (33,2)	61 (29,3)	66 (27,5)			
<b>rs6429157</b>							
AA	100 (32,7)	73 (35,6)	71 (34,1)	75 (31,3)			
AG	152 (49,7)	88 (42,9)	90 (43,3)	115 (47,9)	0,646	0,295	0,257
GG	54 (17,6)	44 (21,5)	47 (22,6)	50 (20,8)			
<b>rs7548522</b>							
CC	271 (88,6)	177 (86,3)	185 (88,9)	200 (83,3)			
CT	34 (11,1)	28 (13,7)	21 (10,1)	40 (16,7)	0,077	0,646	0,636
TT	1 (0,3)		2 (1,0)				
<b>rs4620530</b>							
TT	74 (24,2)	38 (18,5)	33 (15,9)	40 (16,7)			
TG	154 (50,3)	87 (42,4)	99 (47,6)	112 (46,7)	0,008	0,005	0,009
GG	78 (25,5)	80 (39,0)	76 (36,5)	88 (36,7)			

<sup>1</sup>PBC: Primär biliäre Cholangitis; <sup>2</sup>PSC: Primär sklerosierende Cholangitis; <sup>3</sup>CHC: Chronische Hepatitis C, <sup>4</sup>HC: Gesunde Kontrollen,

*p*<sup>x</sup>: Werte wurden mithilfe des Chi Quadrat-Test nach Pearson ermittelt

\*Tabelle modifiziert nach Greverath et al. 2019<sup>1</sup>

Die statistisch signifikanten Unterschiede der Gruppen in der Genotypenanalyse des rs4620530 ließen sich auf ein deutlich häufigeres Vorkommen des T-Allels bei PBC-Patient\*innen von 49,3% im Vergleich zu 40% in Gesunden, 39,8% in PSC- und 35,7% in CHC-Patient\*innen zurückführen. Es wurde eine Assoziation des T-Allels mit der PBC mit einer Odds Ratio (OR) von 1,461 und einem 95% Konfidenzintervall (CI) von 1,147-1,861 (*p*=0,002) im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe erfasst. Das T-Allel des rs4620530 zeigte keine Assoziation mit der PSC und der CHC im Vergleich mit der gesunden Kontrollkohorte (PSC vs. HC: *p*=0,941, CHC vs. HC: *p*=0,918). Die

Verteilung der einzelnen Allele der *CHRM3*-Polymorphismen, sowie die potentielle Assoziation der Allele von PBC, PSC und CHC im Vergleich zu den Gesunden sind in der nachfolgenden **Tabelle 2** aufgeführt.

**Tabelle 2. Prävalenzen und Assoziationen der *CHRM3*-Allele\***

SNPs	Kohorte	Frequenz der Allele (%)		OR (95% CI)		$p^x$
<b>rs11578320</b>		<b>T</b>	<b>C</b>			
	HC <sup>1</sup> (n=240)	433 (90,2)	47 (9,8)			
	PBC <sup>2</sup> (n=306)	544 (88,9)	68 (11,1)	1,152	(0,778-1,705)	0,481
	PSC <sup>3</sup> (n=205)	362 (88,3)	48 (11,7)	1,22	(0,789-1,870)	0,357
	CHC <sup>4</sup> (n=208)	387 (93,0)	29 (7,0)	0,69	(0,426-1,119)	0,132
<b>rs6690809</b>		<b>G</b>	<b>A</b>			
	HC (n=240)	233 (48,5)	247 (51,5)			
	PBC (n=306)	277 (45,3)	335 (54,7)	1,141	(0,898-1,450)	0,281
	PSC (n=205)	177 (43,2)	233 (56,8)	1,242	(0,953-1,619)	0,109
	CHC (n=208)	194 (46,6)	222 (53,4)	1,079	(0,830-1,404)	0,569
<b>rs6429157</b>		<b>A</b>	<b>G</b>			
	HC (n=240)	265 (55,2)	215 (44,8)			
	PBC (n=306)	352 (57,5)	260 (42,5)	1,098	(0,863-1,398)	0,445
	PSC (n=205)	234 (57,1)	176 (42,9)	1,079	(0,827-1,407)	0,576
	CHC (n=208)	232 (55,8)	184 (44,2)	0,978	(0,751-1,273)	0,866
<b>rs7548522</b>		<b>C</b>	<b>T</b>			
	HC (n=240)	440 (91,7)	40 (8,3)			
	PBC (n=306)	576 (94,1)	36 (5,9)	1,455	(0,912-2,320)	0,116
	PSC (n=205)	382 (93,2)	28 (6,8)	1,24	(0,751-2,049)	0,401
	CHC (n=208)	391 (93,9)	25 (6,1)	0,703	(0,419-1,181)	0,183
<b>rs4620530</b>		<b>T</b>	<b>G</b>			
	HC (n=240)	192 (40)	288 (60)			
	PBC (n=306)	302 (49,3)	310 (50,7)	1,461	(1,147-1,861)	<b>0,002</b>
	PSC (n=205)	163 (39,8)	247 (60,2)	0,99	(0,756-1,296)	0,941
	CHC (n=208)	165 (35,7)	251 (60,3)	0,986	(0,754-1,289)	0,918

$p^x$ -Werte wurden mithilfe des Chi Quadrat-Test nach Pearson ermittelt,

<sup>1</sup>HC: gesunde Kontrollen, <sup>2</sup>PBC: primär biliäre Cholangitis, <sup>3</sup>PSC: primär sklerosierende Cholangitis,

<sup>4</sup>CHC: Chronische Hepatitis C, OR: odds ratio, CI: confidence interval

\*Tabelle modifiziert nach Greverath et al. 2019<sup>1</sup>

Neben der in **Tabelle 2** dargestellten Vergleiche der PBC-, PSC- und CHC-Kohorten mit den gesunden Kontrollen führte ich Assoziationsanalysen der *CHRM3*-Allele bei den PBC-Patient\*innen gegenüber der PSC-Kohorte durch. Es zeigte sich eine Assoziation des T-Allels mit der PBC im Vergleich zu den PSC-Patient\*innen (PBC vs. PSC: OR=1,476, 95%CI 1,146-1,902,  $p=0,003$ ). Aufgrund der deutlich statistisch

signifikanten Unterschiede des rs4620530 zwischen PBC-Patient\*innen und Gesunden, zwischen PBC-Patient\*innen und PSC-Patient\*innen, sowie einer positiven Assoziation des T-Allels mit der PBC könnte dieses T-Allel des rs4620530 ein potentieller Risikofaktor für die Entwicklung einer PBC sein.

In verschiedenen genetischen Modellen zeigte das T-Allel sowohl im dominanten Modell (TT vs. TG/GG), als auch im rezessiven Modell (TT/TG vs. GG) signifikante Unterschiede im Vergleich mit Gesunden (dominant: OR=1,595, 95% CI 1,039-2,448,  $p=0,033$ , rezessiv: OR=1,871, 95% CI 1,172-2,444,  $p=0,005$ ). Das Vorkommen der TT/TG-Genotypen war mit 74,5% (228/306) ebenfalls signifikant höher bei Patient\*innen mit PBC als in PSC-Erkrankten mit 61,0% (125/205,  $p=0,001$ ) und zeigte auch in der logistischen Regression eine signifikante Assoziation mit der PBC mit einer OR von 1,871 (95% CI 1,279-2,737,  $p=0,001$ ) im Vergleich zur PSC. Im Vergleich der Verteilung der TT/TG-Genotypen mit den CHC-Erkrankten zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied (74,5% in PBC vs. 63,5% in CHC,  $p=0,007$ ) und einer Assoziation der PBC gegenüber CHC-Patient\*innen mit einer OR von 1,683 (95%CI 1,149-2,465,  $p=0,008$ ).

In der Haplotypenanalyse der Gesamtkohorte zeigte sich das Vorkommen von insgesamt 17 verschiedenen Haplotypen. Der TAACG-Haplotyp (in der Reihenfolge rs11578320, rs6690809, rs6429157, rs7548522, rs4620530) kam in der gesunden Kontrollkohorte zu 26,1%, in PSC-Patient\*innen zu 26,1% und in CHC-Patient\*innen zu 21,5% vor und stellt somit den Wildtyp dar. Der TAACT-Haplotyp, welcher das potentielle Risikoallel des rs4620530 beinhaltet, unterschied sich deutlich in der Ausprägung bei den PBC-Patient\*innen im Vergleich zu den Gesunden. In der PBC-Kohorte trugen 27,4% den TAACT-Haplotyp, während es in der gesunden Kontrollkohorte lediglich 15,9% waren. Dieser Unterschied war statistisch signifikant und zeigte eine Assoziation mit der PBC im Vergleich zu HC-Kohorte (OR=2,37, 95%CI 1,01-5,55,  $p=0,047$ ). Die Ergebnisse der Haplotypenanalyse sind in der Tabelle 3 (Table 3) meiner Publikation Greverath et al. dargestellt<sup>1</sup>.

### ***Klinische und paraklinische Charakteristika der Studienpopulation***

Nach der von mir durchgeführten Sichtung der Arztbriefe und Erhebung der klinischen Daten der Studienpopulation ergaben sich folgende Ergebnisse: der Anteil an weiblichen Patient\*innen betrug 92,5% in der PBC-Kohorte, 36,6% in der PSC-

Kohorte, 89,9% in der Gruppe der CHC-Patient\*innen und 85% bei den gesunden Kontrollen. In der PBC-Kohorte entwickelten 18,6% der Patient\*innen eine Leberzirrhose, 10,1% erhielten insgesamt eine Lebertransplantation. Bei den PSC-Erkrankten betrug die Rate der Leberzirrhose 29,8% und es wurde bei 31,2% der Kohorte eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt. Bei den PBC-Patient\*innen berichteten 21,2% über Symptome des Sicca-Komplexes, insgesamt 3 Patient\*innen erhielten die Diagnose eines SS. Es zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen von rheumatischen Erkrankungen (wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, systemische Sklerose, Lupus Erythematodes) und Osteoporose (14,1% bzw. 16,3%) bei Patient\*innen mit PBC. In beiden Kohorten der chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen konnte eine erhöhte Rate von überlappenden Eigenschaften der Autoimmunhepatitis im Sinne eines AIH-Overlap Syndroms beobachtet werden (PBC=13,4%, PSC=11,2%).

In der nachfolgenden **Tabelle 3** sind die laborchemischen Parameter der Gesamtkohorte der Patient\*innen mit PBC vor der Einleitung einer Therapie mit UDCA dargestellt.

**Tabelle 3. Ausgangslaborparameter der PBC-Gesamtkohorte**

Charakteristika	n=306		
	Median	± SD	Spannweite
<b>Alter bei erster Laborauffälligkeit (Jahre)</b>	51	13,198	(13-78,7)
<b>Albumin (mg/dl)</b>	41,9	4,759	(13-57,8)
<b>Quick (%)</b>	99	15,097	(26-139)
<b>Thrombozyten (/nl)</b>	249	73,636	(73-461)
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	0,5	1,672	(0,1-16)
<b>Alkalische Phosphatase (xULN<sup>1</sup>)</b>	2,15	1,972	(0,3-11,4)
<b>γ-Glutamyltransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	2,92	5,922	(0,1-44,1)
<b>Aspartataminotransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	1,03	1,340	(0,34-18)
<b>Alaninaminotransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	1,09	1,685	(0,27-15)
<b>Immunglobulin G (g/L)</b>	10,32	4,646	(1,2-24,2)
<b>Immunglobulin G4 (g/L)</b>	0,28	0,506	(0,01-3,5)
<b>Immunglobulin M (g/L)</b>	3,9	1,934	(0,2-10,6)
<b>Immunglobulin A (g/L)</b>	2,2	1,246	(0,1-12,5)
<b>AMA positiv n (%)</b>		240 (78,4)	
<b>AMA-M2 positiv n (%)</b>		211 (69,0)	
<b>Anti-sp100 positiv n (%)</b>		44 (14,4)	
<b>Anti-gp210 positiv n (%)</b>		41 (13,4)	

<sup>1</sup> ULN: oberer Normwert, SD: Standardabweichung, AMA: Antimitochondriale Antikörper

Das mittlere Alter bei Vorstellung in der Klinik aufgrund von erhöhten Laborparametern betrug in der Gruppe der PBC-Patient\*innen 51 Jahre. Zu diesem Zeitpunkt waren die Cholestaseparameter (AP und  $\gamma$ -GT) im Median das 2- bis 3-fache des Normwertes erhöht. Die Aminotransferasen zeigten bei der Erstvorstellung keinen Anstieg. Die Syntheseparameter der Leber (Albumin, Quick), die Thrombozyten und das Bilirubin waren zu Beginn der Erkrankung im Normbereich. In der PBC-Kohorte wurden 78,4% positiv auf PBC-spezifische AMAs getestet, 14,4% auf sp100-Antikörper und 13,4% auf gp210-Antikörper.

Neben der Auswertung der laborchemischen Parameter in der PBC-Gesamtkohorte führte ich ebenfalls Untersuchungen an zwei Untergruppen der Gesamtkohorte im Vergleich durch. Um den Zusammenhang zwischen den Genotypen des *CHRM3* rs4620530 mit den initialen Laborwerten zu untersuchen, wurden die Parameter der PBC-Erkrankten mit dem TT- und TG-Genotyp mit denen der Patient\*innen mit GG-Genotyp miteinander verglichen. Die leberspezifischen Laborparameter, sowie die Immunglobuline und Auto-Antikörper der Patient\*innen zeigten in dieser Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen des rs4620530 Polymorphismus. Der Vergleich der beiden Untergruppen ist in meiner Publikation Greverath et al. noch einmal tabellarisch illustriert (Table 4a)<sup>1</sup>.

Die Patient\*innen mit einer PSC litten zu 49,8% an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (5,9% Morbus Crohn und 43,9% Colitis Ulcerosa), 2,4% entwickelten im Verlauf der Erkrankung ein cholangiozelluläres Karzinom. Bei der Erhebung der klinischen Daten der PSC-Patient\*innen der Kliniken in Leipzig und Berlin konnte ich ebenfalls eine Auswertung der Ausgangslaborparameter der PSC-Patient\*innen zum Zeitpunkt der Erstvorstellung vor der Einleitung einer spezifischen Therapie vornehmen.

Die laborchemischen Parameter der Patient\*innen mit PSC bei der Erstvorstellung in der Klinik sind in der nachfolgenden **Tabelle 4** dargestellt.

**Tabelle 4. Ausgangslaborparameter der PSC-Gesamtkohorte**

Charakteristika	n=205		
	Median	± SD	Spannweite
<b>Weiblich n (%)</b>	75 (36.6)		
<b>Alter bei erster Laborauffälligkeit (Jahre)</b>	34	12,61	(6-71)
<b>Albumin (g/l)</b>	4,3	19,1	(25-173)
<b>Quick (%)</b>	100	17,87	(28-130)
<b>Thrombozyten (/nl)</b>	278	149,9	(4-1110)
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	1,1	5,155	(0,2-33,7)
<b>Alkalische Phosphatase (xULN<sup>1</sup>)</b>	3,27	4,591	(0,62-24,4)
<b>γ-Glutamyltransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	4,24	5,909	(0,21-30,5)
<b>Aspartataminotransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	1,0	1,711	(0,28-9,17)
<b>Alaninaminotransferase (xULN<sup>1</sup>)</b>	1,67	2,689	(0,26-14,1)
<b>Immunglobulin G (mg/dl)</b>	1528	523,8	(691-2915)

<sup>1</sup>ULN: oberer Normwert, SD: Standardabweichung,

Der Anteil an Frauen in der Gruppe der PSC-Erkrankten betrug 36,6%. Die Cholestaseparameter waren im Median 3-5-mal im Vergleich zum Normwert erhöht. Die Transaminasen zeigten keinen, beziehungsweise nur einen geringen Anstieg bei der Erstvorstellung. Die Thrombozyten, sowie das Bilirubin der PSC-Patient\*innen waren im Normbereich. In der PSC-Kohorte wurden keine weiteren Subgruppenanalysen durchgeführt, da sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenanalyse der Polymorphismen im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte zeigten.

### ***Einjahresansprechrade auf UDCA***

In der PBC-Kohorte konnte ich bei 229 der insgesamt 306 Patient\*innen mit PBC anhand der in den aktuellen Leitlinien implementierten Kriterien das Ansprechen 12 Monate nach Einleitung der Erstlinientherapie mit UDCA erheben.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der nachfolgenden **Tabelle 5** dargestellt.

**Tabelle 5. Einjahresansprechrage auf UDCA der PBC-Gesamtkohorte**

Charakteristika	n=306		
	Median	± SD	Spannweite
Zeitraum zwischen ersten Laborauffälligkeiten und Therapiebeginn mit UDCA (Jahre)	2	7,1	(0-40)
Alter bei Therapiebeginn (Jahre)	55	11,7	(25-80)
Dosis UDCA (mg/kg Körpergewicht/Tag)	13,3	4,8	(6,4-28,3)
<b>Einjahresansprechrage auf UDCA n (%)</b>			
a) Barcelona Kriterien (Absinken der AP $\geq$ 40% / AP $\leq$ 1xULN <sup>1</sup> )	157/229 (51,3)		
b) Paris-II-Kriterien (AP $\leq$ 1,5xULN <sup>1</sup> / AST $\leq$ 1,5ULN <sup>1</sup> / Bilirubin $\leq$ 1mg/dl)	129/229 (74,8)		
Komplette Normalisierung der AP bei letztem Follow-up	174/228 (74,5)		
Orthotope Lebertransplantation n (%)	33/306 (10,8)		

<sup>1</sup>ULN: oberer Normwert, UDCA: Ursodesoxycholsäure, SD: Standardabweichung

AP: Alkalische Phosphatase, AST: Aspartataminotransferase

Der Zeitraum zwischen den ersten laborchemischen Auffälligkeiten und der Einleitung einer UDCA-Therapie betrug im Median 2 Jahre. Das mediane Alter bei Therapiebeginn betrug 55 Jahre und die verabreichte UDCA Dosis 13,3 mg UDCA/kg Körpergewicht/Tag. Unter Anwendung der Barcelona-Kriterien zeigten 51,3% ein adäquates Ansprechen und 74,8% bei Hinzunahme der Paris-II-Kriterien. Zum letzten Zeitpunkt der Messung zeigten 74,5% der Patient\*innen eine normwertige alkalische Phosphatase.

Um die potentiellen Assoziationen der Allele mit der PBC zu ermitteln, teilte ich hier ebenfalls die PBC-Gesamtkohorte in zwei Untergruppen. Es ergab sich eine Gruppe mit Individuen, welche die potentielle Risikovariante tragen (TT/TG) und eine Gruppe mit Patient\*innen ohne das potentielle Risikoallel (GG). Die Gruppen wurden anschließend miteinander verglichen. In der Gruppe der Risikovarianten betrug die Zeit zwischen den ersten Laborwertauffälligkeiten und der Einleitung einer Therapie mit UDCA 2 Jahre. Das mittlere Patient\*innenalter lag bei 53 Jahren. In der GG-Gruppe betrug das Intervall bis zur Therapieeinleitung im Median 5 Jahre mit einem mittleren Patient\*innenalter von 61 Jahren.

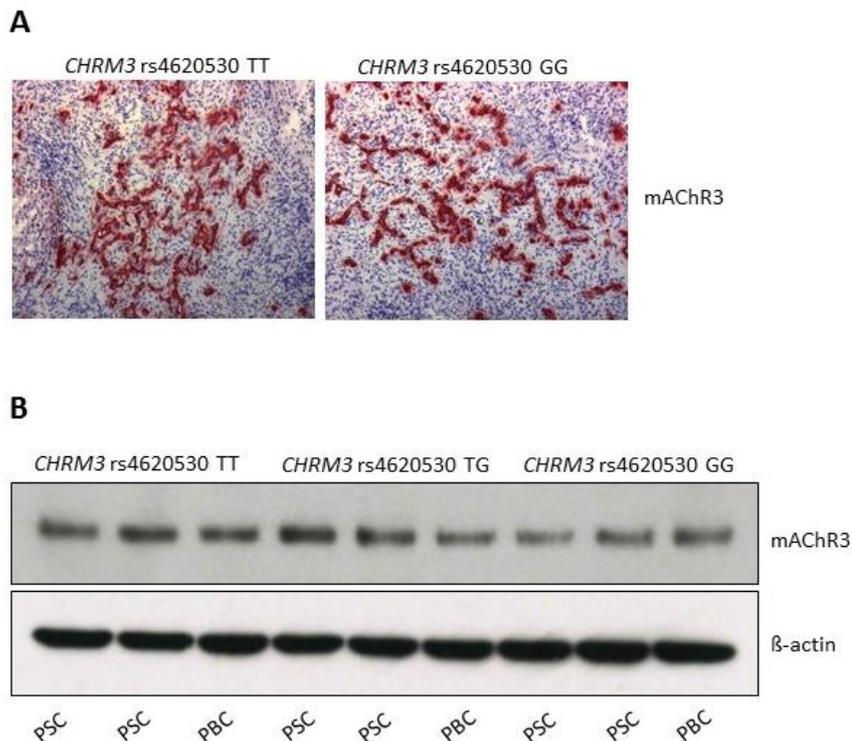
Unter Anwendung von Barcelona bzw. Paris-II-Kriterien zeigten 66,1% bzw. 55,8% der Patient\*innen mit dem TT/TG-Genotyp ein adäquates Ansprechen auf die UDCA-Therapie nach einem Jahr. Im Vergleich dazu zeigten 75% der Patient\*innen mit dem

GG-Genotyp ein adäquates Ansprechen nach Barcelona-Kriterien und 57,8% nach Paris-II-Kriterien. Insgesamt erhielten 11,4% bzw. 9,0% der jeweiligen Gruppen eine orthotope Lebertransplantation. Die Unterschiede beider Gruppen zeigten diesbezüglich, sowie in Bezug auf Vorhandensein von Autoantikörpern keine statistische Signifikanz. In der Tabelle 4b (Table 4b) meiner Publikation Greverath et al. sind die Einjahresansprechraten auf UDCA im Vergleich der beiden Untergruppen tabellarisch aufgeführt<sup>1</sup>.

### ***Nachweis der mAChR3-Expression im Gallengangsepithel***

Im Anschluss an die Bestimmung der Genotypen bzw. die Identifizierung der Risikovarianten des *CHRM3*-SNPs rs4620530 erfolgten Proteinexpressionsanalysen des mAChR3 in explantiertem Lebergewebe von Patient\*innen mit PBC und PSC durch Prof. Dr. Oren Shibolet des Department of Gastroenterology and Hepatology des Tel Aviv-Sourasky Medical Centers der Sackler Faculty of Medicine in Tel-Aviv. In der Immunfluoreszenzfärbung des Lebergewebes wurde der mAChR3 ausschließlich in den Gallengängen exprimiert. Im restlichen Lebergewebe, wie zum Beispiel den Hepatozyten, konnte keine Expression des mAChR3 nachgewiesen werden. In den verfügbaren Proben der PBC- und PSC-Patient\*innen wurden hinsichtlich der Genotypen des *CHRM3* rs4630530 keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression des mAChR3 in der Immunfluoreszenz erfasst. Die Quantifizierung der Rezeptorexpression in den Immunblots zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen PBC- und PSC-Patient\*innen in Bezug auf die Genotypen des rs4620530.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung und der Immunblots sind in der nachfolgenden **Abbildung 3** aufgeführt.



**Abbildung 3 Expressionsanalysen des mAChR3 in humanem Lebergewebe von Patient\*innen mit PBC und PSC<sup>1</sup>:** A) Immunfluoreszenzfärbung des mAChR3 in explantiertem Lebergewebe von Patient\*innen mit PSC in Abhängigkeit der Genotypen des *CHRM3* rs4620530; B) Immunblots des mAChR3 der isolierten primären Cholangiozyten aus explantiertem Lebergewebe von Patient\*innen mit PBC und PSC in Abhängigkeit des *CHRM3* rs4620530 Genotyps.

## Diskussion und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

### *Interpretation der Ergebnisse*

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Untersuchung des Zusammenhangs von fünf Polymorphismen (rs11578320, rs6690809, rs6429157, rs7548522, rs4620530) des *CHRM3*-Gens mit der PBC, sowie der Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Parametern der in die Studie eingeschlossenen Patient\*innen. Nach ausführlicher Analyse implizierten die Ergebnisse meiner Untersuchungen, dass das T-Allel des *CHRM3* rs4620530 Polymorphismus ein potentielles Risikoallel für die Entstehung einer PBC sein könnte. Die von mir erhobenen Daten belegten ein signifikant häufigeres Vorkommen des T-Allels bei PBC-Patient\*innen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, PSC-Patient\*innen und CHC-Patient\*innen. Träger des T-

Allels des *CHRM3* rs4620530 hatten eine fast zweifach höhere Wahrscheinlichkeit eine PBC zu entwickeln als die Träger des G-Allels. Diese Aussage wurde ebenfalls gestützt durch die Beobachtung, dass sich die Genotypen des *CHRM3* rs4620530 in ihrer Verteilung zwischen PSC, CHC und Gesunden nicht unterschieden. Das T-Allel zeigte nicht nur gegenüber den gesunden Kontrollen eine Assoziation zur PBC (PBC vs. HC), sondern auch eine vergleichbare Assoziation zur PBC gegenüber den PSC-Patient\*innen (PBC vs. PSC). Insgesamt scheint das T-Allel des rs4620530 somit hochspezifisch für die PBC zu sein. Das Vorkommen von insgesamt 17 verschiedenen Haplotypen bei der Haplotypenanalyse der fünf Polymorphismen zeigte eine relativ heterogene Verteilung der Allele. Ein statistisch signifikant häufigeres Vorkommen des TAACT-Haplotyps in der PBC-Kohorte, welcher das potentielle Risikoallel beinhaltet, bestätigt jedoch mit einer signifikanten Assoziation zur PBC und einer OR von 2,37 den Verdacht, das T-Allel des rs4620530 könnte ein Risikoallel für die Entstehung einer PBC sein. Zusammenfassend stützen die Ergebnisse der von mir durchgeführten Genotypenanalyse somit die Hypothese, dass genetische Variabilitäten des mACHR3-Gens die Suszeptibilität für die Entstehung einer PBC erhöhen könnten.

In bisherigen Studien zum Einfluss der Genetik auf die PBC zeigte sich bereits ein vermehrtes Vorkommen der PBC bei Familienangehörigen von Erkrankten, sowie ein deutlich häufigeres Vorkommen der Erkrankung in monozygoten Zwillingspaaren im Vergleich zu dizygoten Zwillinge<sup>24,25</sup>. Dies ließ darauf schließen, dass die PBC zumindest teilweise erblich bedingt sein könnte. Es konnten verschiedene HLA-spezifische und über vierzig verschiedene nicht-HLA-spezifische Risikoallele gefunden werden, welche im Zusammenhang mit der Entstehung einer PBC stehen. Diese potentiellen Risikokonstellationen waren allerdings in der Gesamtheit nicht PBC-spezifisch und könnten ebenfalls im Zusammenhang mit der Entstehung anderer autoimmun-vermittelter Erkrankungen stehen<sup>3,25</sup>. Es wurden bereits genetische Polymorphismen beschrieben, die einen spezifischen Zusammenhang mit dem Schutz der Cholangiozyten vor Gallensäuren zeigen. Ein Beispiel dafür sind Polymorphismen des Anionenaustauschers 2 (Anion-Exchanger 2, AE2), welcher vom SLC4A2-Gen kodiert wird<sup>26</sup>. Die Hypothese, dass genetische Veränderungen des AE2-Proteins die Suszeptibilität für eine chronisch-entzündliche Gallengangserkrankung erhöhen, stünde ebenfalls im Einklang mit dem Modell des biliären *Bikarbonat-Schutzschirmes*, weil das Protein, wie in der vorangegangenen **Abbildung 1** dargestellt, eine wichtige Rolle in der Bikarbonatsekretion spielt. Da nach bisherigem Stand der Forschung den

chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt, sind dies nur einige Beispiele von Arbeiten zur möglichen Pathogenese. Neben der Genetik gibt es zahlreiche weitere Hypothesen zu Einflüssen auf die Entstehung der PBC und PSC, wie zum Beispiel Umweltfaktoren, Epigenetik, bakterielle Infektion und Xenobiotika<sup>24,25,27</sup>.

Bei der Betrachtung der klinischen und paraklinischen Eigenschaften der PBC Patient\*innen zeigte sich ein überwiegend repräsentatives Bild einer PBC-Kohorte. Der Anteil an weiblichen Patienten war mit 92% erwartungsgemäß sehr hoch und in Einklang mit der bekannten Prädominanz des weiblichen Geschlechts bei der PBC<sup>5,28</sup>. Ebenso typisch für die PBC ist das Auftreten erster laborchemischer Auffälligkeiten im mittleren Alter, welches in unserer Kohorte bei durchschnittlich 51 Jahren lag<sup>5,28</sup>. Die isolierte moderate Erhöhung der Cholestaseparameter mit Transaminasen, Bilirubin und Thrombozyten im Normbereich ist typisch für die Erstvorstellung von Patient\*innen mit Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Gallengangserkrankung<sup>2,4,6</sup>. Es fanden sich mit 21,6% untypisch viele AMA-negative Patient\*innen in unserer PBC-Kohorte. In den meisten Studien liegt der Anteil an AMA-positiven Erkrankten bei über 90%<sup>3</sup>. In einigen vergleichbaren Studien konnten jedoch bereits ähnlich hohe Raten an AMA-negativen Patient\*innen von bis zu 20% beschrieben werden<sup>29</sup>. Nach der Subgruppenanalyse der PBC-Kohorte mit der Einteilung nach Genotypen des rs4620530 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untergruppen. Die Cholestaseparameter waren in beiden Gruppen moderat erhöht auf das ca. 2-3-fache des Normwertes und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Das lässt darauf schließen, dass das potentielle Risikoallel zwar spezifisch für die PBC zu sein scheint, jedoch keine Assoziation zur laborchemischen Präsentation der Patient\*innen zum Zeitpunkt der Erstvorstellung hat.

Die von mir akquirierten Informationen zur PSC-Kohorte bezüglich klinischer und laborchemischer Präsentation fügten sich ebenfalls in die vorhandene Literatur. Es zeigte sich eine vermehrte Präsenz des männlichen Geschlechts, sowie deutlich höhere Leberzirrhose- und Transplantationsraten bei den PSC-Patient\*innen im Vergleich zu den PBC-Patient\*innen<sup>2</sup>. Eine Studie an einer PSC-Kohorte mit Patient\*innen aus Schweden und Deutschland von Benito de Valle et al. beschreibt ein Vorkommen des männlichen Geschlechts von 65-71% und eine Transplantationsrate von 18-23%<sup>30</sup>. Innerhalb der Laborwerte zeigte sich auch in der PSC-Kohorte ein initial isolierter Anstieg der cholestatischen Parameter. Die

Transaminasen, sowie auch das Bilirubin waren wie typischerweise bei der Erstvorstellung nicht oder nur diskret erhöht<sup>2</sup>. Das häufige, in unserer Kohorte 49,8%ige konkordante Vorkommen von PSC und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist ebenfalls bekannt und wurde bereits mit bis zu 60-80% beschrieben<sup>2,12,30</sup>. Desweiteren hervorzuheben ist hier die erhöhte Rate von cholangiozellulären Karzinomen (CCC) von 2,4% in der vorliegenden PSC-Kohorte. In der Kohorte von Benito de Valle et al. zeigte sich ein noch häufigeres Vorkommen der CCC von 9%. Das Auftreten eines CCC bei PSC-Erkrankten wird in der Literatur sogar mit bis zu 10-20% beschrieben<sup>12</sup>.

Die Auswertung der Therapieregime der PBC-Patient\*innen unserer Studienpopulation ergab eine Tagesdosis von 13,3 mg/kg KG, welche sich mit den aktuellen Richtlinien der medizinischen Leitlinien der europäischen sowie der deutschen Fachgesellschaften von 13-15mg/kg KG UDCA pro Tag vereinbaren lässt<sup>2,6</sup>. Das Therapieansprechen nach einem Jahr Erstlinientherapie mit Ursodesoxycholsäure zeigte sich mit 51,3% bzw. 74,8% geringer als zunächst vermutet, jedoch ähnlich zu vorbeschrieben Daten<sup>31,32</sup>. In einer skandinavischen Studie von Ornlöfsson et al. zum Therapieansprechen auf UDCA bei 222 PBC Patient\*innen konnte ein Einjahresansprechen von 54% nach Barcelona-Kriterien und von 46% nach Paris-II-Kriterien erhoben werden<sup>31</sup>. In einer kürzlich durchgeführten multizentrischen Studie von Wilde et al. in Deutschland sprachen 61,3% (Barcelona-Kriterien), sowie 71,3% (Paris-II-Kriterien) der Patient\*innen adäquat auf eine Therapie mit UDCA an<sup>32</sup>. In einer ebenfalls in Deutschland durchgeführten Studie mit 140 PBC-Patient\*innen zeigte sich ein Therapieansprechen nach einem Jahr von 74% gemäß Paris-II-Kriterien und 73% gemäß Barcelona-Kriterien<sup>28</sup>. Die aktuellen medizinischen Leitlinien zur Therapie der PBC empfehlen den Einsatz von 5mg Obeticholsäure (OCA) pro Tag als Zweitlinientherapie bei nicht-adäquatem Therapieansprechen auf UDCA. Die Dosis kann im Verlauf auf 10mg/d gesteigert werden und gegebenenfalls als Kombinationstherapie eingesetzt werden<sup>2,4,6</sup>.

Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen von Prof. Oren Shibolet, zeigten die spezifische Expression des mAChR3 in den intrahepatischen Gallengängen. Im Einklang mit früheren Berichten zur Expression des mAChR3 an gesundem und krankem Lebergewebe zeigte sich in unseren Untersuchungen ebenfalls eine exklusive Expression des Rezeptors in den Gallengängen, jedoch nicht im umliegenden Lebergewebe, wie zum Beispiel den Hepatozyten<sup>18</sup>. Diese Ergebnisse

könnten erklären, warum die chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen die den Cholangiozyten angrenzende Hepatozyten nicht affektieren. Im Gewebe der Leberexplantate der PBC- und PSC-Patient\*innen zeigte der *CHRM3* rs4620530-Genotyp keinen signifikanten Einfluss auf das Verteilungsmuster des mAChR3 in der Immunfluoreszenzfärbung und auf die Quantifizierung der Proteinexpression in den Immunblots. In unserer Arbeit wurde neben der Identifizierung einer potentiellen Risikovariante im *CHRM3*-Gen für die Entwicklung einer PBC bereits der Einfluss der unterschiedlichen Allele auf Proteinexpressionsebene untersucht. Die untersuchten SNPs befinden sich alle in regulatorischen Bereichen des Introns auf Chromosom 1. In einer kürzlich veröffentlichten taiwanesischen Studie zeigten spezifische Haplotypen von *CHRM3*-SNPs, welche sich ebenfalls im Intron von Chromosom 1 befanden, einen Einfluss auf die mRNA-Expression des mAChR3<sup>33</sup>. Dies geht möglicherweise mit einer veränderten Rezeptorfunktion einher. Weitere Untersuchungen zur Funktion des in dieser Studie identifizierten Risikoallels erscheinen somit sinnvoll.

### ***Limitationen und Stärken der Arbeit***

Die Limitationen der Arbeit bestehen hauptsächlich im retrospektiven Charakter der Datenerhebung bezüglich der Patienteninformationen. Der Diagnosezeitpunkt, der klinische Verlauf und Komorbiditäten wurden retrospektiv von mir aus dem Patientenverwaltungssystem der Kliniken erhoben. Es konnten in der PBC Kohorte nur drei Patient\*innen mit einem gesicherten SS identifiziert werden. Diese geringe Anzahl reichte nicht aus, um statistische Signifikanzen bezüglich der Häufigkeiten verschiedener *CHRM3*-Genotypen im Vergleich der Gruppen zu berechnen. Da die Sicca-Symptomatik häufig bei Patient\*innen mit PBC zu finden ist, sollte sie in Zukunft aktiv und systematisch vom Untersucher erfragt werden<sup>2</sup>. Für die leitliniengerechte Diagnose des SS sollte zusätzlich zu dieser Symptomatik die Bestimmung spezifischer Auto-Antikörper (SS-A/SS-B) erfolgen, ein pathologischer Schirmer-Test vorliegen oder eine Speicheldrüsenbiopsie durchgeführt werden<sup>7</sup>. Da diese Untersuchungen im Regelfall nicht zur klinischen Routine gehören, konnte in vielen Fällen die Diagnose des SS nicht leitliniengerecht gestellt werden. Das aktive Erfragen der Symptome, sowie die Bestimmung der Auto-AK sollte in weiterführenden prospektiven Studien berücksichtigt werden. Desweiteren ist anzumerken, dass die Patient\*innen der Kohorten aus Berlin und Leipzig aus universitären Versorgungsstrukturen rekrutiert wurden und demnach mutmaßlich schwerere Krankheitsverläufe und höhere

Leberzirrhose- bzw. Lebertransplantationsraten aufwiesen als Patient\*innen anderer Versorgungszentren. Ebenso erwähnenswert ist der vergleichbar geringe Anteil an AMA-positiven Patient\*innen von 78,4% der PBC-Kohorte. Auch diese Beobachtung ließe sich unter anderem auf eine mögliche Verzerrung durch erweiterte diagnostische Möglichkeiten an universitären Versorgungszentren zurückführen, obgleich es wie bereits erwähnt neuere Daten zur PBC in Polen gibt, in denen ebenfalls ein Anteil von knapp 20% AMA-negativen Patient\*innen beschrieben wird<sup>29</sup>.

Trotz der genannten Limitationen konnte in meiner Arbeit erstmals eine potentielle Risikovariante innerhalb des *CHRM3*-Gens bei Patient\*innen mit chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen identifiziert werden. Die bedeutendste Stärke der vorliegenden Studie liegt in der Größe der Studienpopulation der PBC-, als auch der PSC-Kohorte. Da die PBC eine seltene Erkrankung darstellt, ist die von mir ins Patient\*innenkollektiv eingeschlossene Anzahl von 306 PBC-Patient\*innen durchaus eine repräsentative Populationsgröße. Desweiteren habe ich Patient\*innen an zwei verschiedenen Standorten in Deutschland rekrutiert, wodurch eine ortsspezifische bzw. zentrumsspezifische Verzerrung minimiert wurde. Ebenfalls erwähnenswert ist neben den Kohorten der chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen (PBC und PSC) die vergleichbar große Anzahl an Patient\*innen mit CHC, welche in diesem Fall als erkrankte Kontrollgruppe anderer Ätiologie dienen, sowie die 240 gesunden Blutspender, die die gesunden Kontrollen der Studie darstellen.

### ***Mögliche klinische Anwendungen des *mACHR3* rs4620530 Risikoallels***

In der vorliegenden Studie war das T-Allel des rs4620530 Polymorphismus im *CHRM3*-Gen eine potentielle Risikovariante für eine PBC. Eine Bestätigung der Ergebnisse in weiteren Arbeiten mit einer größeren unabhängigen Studienpopulation erscheint notwendig, um die Bestimmung des Genotyps des Polymorphismus in Patient\*innen mit Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Gallengangserkrankung als mögliche neue praxisrelevante Anwendung zu etablieren. Da sich die PBC und die PSC in der klinischen Praxis initial ähnlich präsentieren, könnte durch die Bestimmung des Genotyps des *CHRM3* rs4620530 eine Unterscheidung der beiden Gallengangserkrankungen erleichtert werden. Das Risikoallel zeigte eine eindeutige Spezifität gegenüber der PBC und unterschied sich deutlich in der Prävalenz im Vergleich zur PSC. Ein Beispiel für die klinische Anwendung von Polymorphismen bei

chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen erscheint in der Leitlinie zum Management der autoimmunen Lebererkrankungen der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)<sup>2</sup>. Bei der Behandlung von PSC-Patient\*innen erwähnt die Leitlinie die Option auf die Bestimmung der Genotypen verschiedener Polymorphismen (SXR, MMP-2, MMP-3, IL-6, NKG2D, FUT2, PNPLA3) zurückzugreifen, um eine Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes zu erleichtern<sup>2</sup>. Ein solche klinische Anwendung erscheint aktuell jedoch für das potentielle Risikoallel des rs4620530 nicht zielführend. Das T-Allel zeigte in den Untersuchungen keinen Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf, den Laborparametern, dem Auftreten einer Leberzirrhose oder der Notwendigkeit einer Lebertransplantation. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnte zudem bisher noch kein größerer Zusammenhang zwischen dem SNP des *CHRM3*-Gens und der PBC gefunden werden<sup>3,34</sup>.

### **Weiterführende wissenschaftliche Fragestellung**

Sowohl in dieser Arbeit als auch in vorangegangenen Arbeiten konnte bestätigt werden, dass der mAChR3 nicht nur in exokrinen Speicheldrüsen, sondern auch hochspezifisch in den Gallengängen bzw. in der Zellmembran der Cholangiozyten exprimiert wird<sup>18</sup>. Auto-Antikörper gegen den mAChR3 (mAChR3-AK) wurden erstmals in Patient\*innen mit SS gefunden<sup>35</sup>. In funktionellen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass diese speziellen Antikörper einen inhibitorischen Einfluss auf den Rezeptor haben<sup>36</sup>, sowie zu einer Depletion der intrazellulären Antwort und einer verminderten sekretorischen Funktion führen. mAChR3-AK wurden gleichermaßen in SS-Patienten und in PBC-Patienten gefunden. In ersten Studien wurde eine 33%-ige Ko-Lokalisation von mAChR3-AK und PBC-spezifischen AMAs erfasst<sup>37</sup>. Eine japanische Studie zeigte ebenfalls, dass es Auto-Antikörper in Seren von PBC-Erkrankten gibt, die gegen den mAChR3 gerichtet sind. In dieser Studie betrug die Prävalenz der Antikörper fast 94%, was dem Vorkommen von krankheitsspezifischen AMAs gleicht<sup>38</sup>.

In den weiterführenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde, unter Anwendung der Methodik von Preuss et al. zur Funktionalität von mAChR3-AK, gezeigt, dass die Auto-Antikörper auch in PBC-Patient\*innen einen inhibitorischen Effekt auf den Rezeptor haben<sup>39</sup>. Die intrazelluläre Calciumkonzentration war erniedrigt und ließ auf eine herabgesetzte luminale Bikarbonatsekretion schließen. Durch die vorangegangenen

Studien von Berg et al.<sup>37</sup> und Tsuboi et al.<sup>38</sup>, sowie den Ergebnissen unserer Studie bestätigt sich der Verdacht, dass dysfunktionale mAChR3-vermittelte Signalwege (entweder durch genetische Veränderungen oder inhibitorische Antikörper) an der Pathogenese der PBC beteiligt sein könnten. Diese unterschiedlichen Aspekte tragen dazu bei, dass diesem Rezeptor eine größere Bedeutung in der Pathogenese der chronischen Gallengangserkrankung zugeschrieben werden kann.

Um den Einfluss des rs4620530 des *CHRM3*-Gens auf den mAChR3 und die Bedeutung für die PBC schlussendlich zu klären, sind funktionelle Untersuchungen essentiell. Dazu könnte, ähnlich wie in der Methodik von Preuss et al. beschrieben, ein Biolumineszenz-basiertes Assay zur Untersuchung der Funktionalität des Risikoallels genutzt werden<sup>36</sup>. Durch mAChR3-Plasmide kann das *CHRM3*-Gen mit den unterschiedlichen Genotypen des rs4620530 in immortalisierten Zell-Linien (zum Beispiel *Chinese hamster ovary* (CHO) -K1) transfiziert und somit überexprimiert werden. Anschließend erfolgt die Hinzugabe von calciumhaltigem Medium zu den Zellen. Durch die Injektion von Carbachol, ein Struktur analogon von Acetylcholin, können die Rezeptoren der Zellen aktiviert werden. Der an eine Lichtreaktion gekoppelte Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts (durch Auslösung der intrazellulären Signalkaskade) kann im Anschluss mithilfe eines Luminometers gemessen werden. Mit diesem Assay könnte die Hypothese, dass der Einfluss des potentiellen Risikoallels auf die Entstehung der PBC in einer veränderten Funktionalität des mAChR3 begründet liegt, untersucht werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass dies die erste Studie zum Einfluss von genetischen Veränderungen des mAChR3-Gens auf die PBC ist. Ich konnte in dieser Studie anhand der vorliegenden Daten zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der Genotypen des rs4620530 des *CHRM3* zwischen PBC-Patient\*innen und gesunden Individuen gibt. Ebenso hervorzuheben ist der deutliche Unterschied der Prävalenzen zur PSC, eine der häufigsten Differentialdiagnosen der PBC, sowie zur CHC, eine unabhängige erkrankte Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische Assoziation des potentiellen Risikoallels des rs4620530 mit der PBC. Meine Arbeit leistet somit einen Beitrag zum Verständnis der möglichen Relevanz der mAChR3 in der Pathogenese der PBC.

## Literaturverzeichnis

- 1 Greverath, L. M., Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, doi:10.1111/hepr.13455 (2019).
- 2 [Practice guideline autoimmune liver diseases - AWMF-Reg. No. 021-27]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **55**, 1135-1226, doi:10.1055/s-0043-120199 (2017).
- 3 Lleo, A., Marzorati, S., Anaya, J. M. & Gershwin, M. E. Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview. *Hepatology international* **11**, 485-499, doi:10.1007/s12072-017-9830-1 (2017).
- 4 Lindor, K. D., Bowlus, C. L., Boyer, J., Levy, C. & Mayo, M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, doi:10.1002/hep.30145 (2018).
- 5 Carey, E. J., Ali, A. H. & Lindor, K. D. Primary biliary cirrhosis. *Lancet (London, England)* **386**, 1565-1575, doi:10.1016/S0140-6736(15)00154-3 (2015).
- 6 EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *Journal of hepatology* **67**, 145-172, doi:10.1016/j.jhep.2017.03.022 (2017).
- 7 Selmi, C. & Gershwin, M. E. Chronic Autoimmune Epithelitis in Sjogren's Syndrome and Primary Biliary Cholangitis: A Comprehensive Review. *Rheumatology and therapy* **4**, 263-279, doi:10.1007/s40744-017-0074-2 (2017).
- 8 Inamura, K., Tsuji, H., Nakamoto, Y., Suzuki, M. & Kaneko, S. Transgenic mice aberrantly expressing pyruvate dehydrogenase complex E2 component on biliary epithelial cells do not show primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **145**, 93-100, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03090.x (2006).

- 9 Jones, D. E., Palmer, J. M., Kirby, J. A., De Cruz, D. J., McCaughan, G. W., Sedgwick, J. D., Yeaman, S. J., Burt, A. D. & Bassendine, M. F. Experimental autoimmune cholangitis: a mouse model of immune-mediated cholangiopathy. *Liver* **20**, 351-356 (2000).
- 10 Ali, A. H., Carey, E. J. & Lindor, K. D. Diagnosis and management of primary biliary cirrhosis. *Expert review of clinical immunology* **10**, 1667-1678, doi:10.1586/1744666x.2014.979792 (2014).
- 11 Role of endoscopy in primary sclerosing cholangitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Association for the Study of the Liver (EASL) Clinical Guideline. *Journal of hepatology* **66**, 1265-1281, doi:10.1016/j.jhep.2017.02.013 (2017).
- 12 Dyson, J. K., Beuers, U., Jones, D. E. J., Lohse, A. W. & Hudson, M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet (London, England)* **391**, 2547-2559, doi:10.1016/s0140-6736(18)30300-3 (2018).
- 13 Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, L. J., Kremer, A. E., Jansen, P. L. & Elferink, R. P. The biliary HCO<sub>3</sub>(-) umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **52**, 1489-1496, doi:10.1002/hep.23810 (2010).
- 14 Hohenester, S., Wenniger, L. M., Paulusma, C. C., van Vliet, S. J., Jefferson, D. M., Elferink, R. P. & Beuers, U. A biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **55**, 173-183, doi:10.1002/hep.24691 (2012).
- 15 Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Hirota, T., Asashima, H. & Matsumoto, I. The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjogren's syndrome: a critical review. *Journal of autoimmunity* **51**, 44-50, doi:10.1016/j.jaut.2013.12.012 (2014).
- 16 Yu, X., Riemekasten, G. & Petersen, F. Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor M3 in Sjogren's syndrome and corresponding mouse models. *Front Biosci (Landmark Ed)* **23**, 2053-2064 (2018).
- 17 Berg, P. A. The role of the innate immune recognition system in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a conceptual view. *Liver international*

- : official journal of the International Association for the Study of the Liver **31**, 920-931, doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02457.x (2011).
- 18 Cassiman, D., Libbrecht, L., Sinelli, N., Desmet, V., Deneff, C. & Roskams, T. The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *The American journal of pathology* **161**, 521-530, doi:10.1016/s0002-9440(10)64208-3 (2002).
  - 19 Durchschein, F., Krones, E., Pollheimer, M. J., Zollner, G., Wagner, M., Raufman, J. P. & Fickert, P. Genetic loss of the muscarinic M3 receptor markedly alters bile formation and cholestatic liver injury in mice. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **48**, E68-e77, doi:10.1111/hepr.12928 (2018).
  - 20 Appel, S., Le Hellard, S., Bruland, O., Brun, J. G., Omdal, R., Kristjansdottir, G., Theander, E., Nordmark, G., Kvarnstrom, M., Eriksson, P., Ronnblom, L., Wahren-Herlenius, M. & Jonsson, R. Potential association of muscarinic receptor 3 gene variants with primary Sjogren's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases* **70**, 1327-1329, doi:10.1136/ard.2010.138966 (2011).
  - 21 Mueller, T., Terada, T., Rosenberg, I. M., Shibolet, O. & Podolsky, D. K. Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 5805-5814 (2006).
  - 22 Mueller, T., Beutler, C., Pico, A. H., Shibolet, O., Pratt, D. S., Pascher, A., Neuhaus, P., Wiedenmann, B., Berg, T. & Podolsky, D. K. Enhanced innate immune responsiveness and intolerance to intestinal endotoxins in human biliary epithelial cells contributes to chronic cholangitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **31**, 1574-1588, doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02635.x (2011).
  - 23 Marzioni, M., Saccomanno, S., Agostinelli, L., Rychlicki, C., De Minicis, S., Pierantonelli, I., Trauner, M., Fickert, P., Muller, T., Shanmukhappa, K., Trozzi, L., Candelaresi, C., Baroni, G. S. & Benedetti, A. PDX-1/Hes-1 interactions determine cholangiocyte proliferative response to injury in rodents: possible implications for sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology* **58**, 750-756, doi:10.1016/j.jhep.2012.11.033 (2013).

- 24 Selmi, C., Mayo, M. J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R. G., Gordon, S. C., Wright, H. I., Zweiban, B., Podda, M. & Gershwin, M. E. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* **127**, 485-492, doi:10.1053/j.gastro.2004.05.005 (2004).
- 25 Tanaka, A., Leung, P. S. C. & Gershwin, M. E. The Genetics and Epigenetics of Primary Biliary Cholangitis. *Clinics in liver disease* **22**, 443-455, doi:10.1016/j.cld.2018.03.002 (2018).
- 26 Aiba, Y., Nakamura, M., Joshita, S., Inamine, T., Komori, A., Yoshizawa, K., Umemura, T., Horie, H., Migita, K., Yatsushashi, H., Nakamuta, M., Fukushima, N., Saoshiro, T., Hayashi, S., Kouno, H., Ota, H., Muro, T., Watanabe, Y., Nakamura, Y., Komeda, T., Shimada, M., Masaki, N., Komatsu, T., Yagura, M., Sugi, K., Koga, M., Tsukamoto, K., Tanaka, E. & Ishibashi, H. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Gastroenterol* **46**, 1203-1212, doi:10.1007/s00535-011-0417-7 (2011).
- 27 Tanaka, A., Leung, P. S. & Gershwin, M. E. Environmental basis of primary biliary cholangitis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **243**, 184-189, doi:10.1177/1535370217748893 (2018).
- 28 Kaps, L., Grambihler, A., Yemane, B., Nagel, M., Labenz, C., Ploch, P., Michel, M., Galle, P. R., Worns, M. A. & Schattenberg, J. M. Symptom Burden and Treatment Response in Patients with Primary Biliary Cholangitis (PBC). *Dig Dis Sci*, doi:10.1007/s10620-019-06009-3 (2019).
- 29 Raszeja-Wyszomirska, J., Wunsch, E., Krawczyk, M., Rigopoulou, E. I., Kostrzewa, K., Norman, G. L., Bogdanos, D. P. & Milkiewicz, P. Assessment of health related quality of life in polish patients with primary biliary cirrhosis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* **40**, 471-479, doi:10.1016/j.clinre.2015.10.006 (2016).
- 30 Benito de Valle, M., Muller, T., Bjornsson, E., Otten, M., Volkmann, M., Guckelberger, O., Wiedenmann, B., Sadik, R., Schott, E., Andersson, M., Berg, T. & Lindkvist, B. The impact of elevated serum IgG4 levels in patients with primary sclerosing cholangitis. *Digestive and liver disease : official journal of the*

- Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **46**, 903-908, doi:10.1016/j.dld.2014.06.010 (2014).
- 31 Ornlolfsson, K. T., Lund, S. H., Olafsson, S., Bergmann, O. M. & Bjornsson, E. S. Biochemical response to ursodeoxycholic acid among PBC patients: a nationwide population-based study. *Scandinavian journal of gastroenterology* **54**, 609-616, doi:10.1080/00365521.2019.1606931 (2019).
- 32 Wilde A., L. E., Greverath L. M., Petersen, J., Hofmann W. P., Hinrichsen H., Heyne R., Berg T., Wiedenmann B., Müller T. . Diagnosis, Treatment and Response to Ursodeoxycholic Acid Therapy in a Large Cohort of Patients with Primary Biliary Cholangitis in Germany: Real-World-Data from Four Hepatological Centers. . *Hepatology (Baltimore, Md.)* **68(S1)**, doi:10.1002/hep.30257 (2018).
- 33 Wang, C. T., Chen, T. M., Mei, C. T., Chang, C. F., Liu, L. L., Chiu, K. H., Wu, T. M., Lan, Y. C., Liu, W. S., Chen, Y. H. & Lin, Y. J. The Functional Haplotypes of CHRM3 Modulate mRNA Expression and Associate with Bladder Cancer among a Chinese Han Population in Kaohsiung City. *BioMed research international* **2016**, 4052846, doi:10.1155/2016/4052846 (2016).
- 34 Im, C., Sapkota, Y., Moon, W., Kawashima, M., Nakamura, M., Tokunaga, K. & Yasui, Y. Genome-wide haplotype association analysis of primary biliary cholangitis risk in Japanese. *Scientific reports* **8**, 7806, doi:10.1038/s41598-018-26112-1 (2018).
- 35 Tsuboi, H., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Nakamura, Y., Iizuka, M., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S. & Sumida, T. New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clinical and experimental immunology* **162**, 53-61, doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04188.x (2010).
- 36 Preuss, B., Tunaru, S., Henes, J., Offermanns, S. & Klein, R. A novel luminescence-based method for the detection of functionally active antibodies to muscarinic acetylcholine receptors of the M3 type (mAChR3) in patients' sera. *Clinical and experimental immunology* **177**, 179-189, doi:10.1111/cei.12324 (2014).

- 37 Berg, C. P., Blume, K., Lauber, K., Gregor, M., Berg, P. A., Wesselborg, S. & Stein, G. M. Autoantibodies to muscarinic acetylcholine receptors found in patients with primary biliary cirrhosis. *BMC gastroenterology* **10**, 120, doi:10.1186/1471-230x-10-120 (2010).
- 38 Tsuboi, H., Ohira, H., Asashima, H., Tsuzuki, S., Iizuka, M., Matsuo, N., Kondo, Y., Matsumoto, I. & Sumida, T. Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **44**, E471-479, doi:10.1111/hepr.12346 (2014).
- 39 Wald de Chamorro, N., Steinhagen, L. M., Greverath L. M., Leicht, E., Wilde, A. B., Tacke, F., Berg, T., Preuss, B., Klein R., R., Müller, T. 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. . *Hepatology (Baltimore, Md.)* **70**, 771A (2019).

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lena Maria Greverath, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Untersuchung zur Bedeutung genetischer Polymorphismen des muskarinergen Acetylcholinrezeptors Typ 3 bei chronisch-entzündlichen Gallengangserkrankungen, Investigation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Type 3 Gene Polymorphisms in chronic inflammatory bile duct diseases** 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Lena Maria Greverath hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Greverath, L. M., Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. **Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis.** *Hepatology Research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, doi:10.1111/hepr.13455 (2019).

### Beitrag im Einzelnen:

Eigenständige Durchführung der DNA Extraktion der PBC und PSC Patient\*innen aus den Universitätskliniken Berlin und Leipzig, sowie der gesunden Kontrollen, eigenständige Durchführung der PCR und Schmelzkurvenanalyse aller PBC und PSC Patient\*innen und gesunden Kontrollen im Labor des Bereichs Hepatologie der Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Leipzig, eigenhändige Sichtung der Arztbriefe und Laborwerte im Patientenverwaltungsprogramm der PBC und PSC Patient\*innen des Universitätsklinikums Leipzig, Überprüfung der Diagnosekriterien nach aktuellen Leitlinien von allen PBC und PSC Patient\*innen, Zusammenstellung und Organisation eines einheitlichen Datensatzes, statistische Auswertung des gesamten Datensatzes mithilfe des Programms SPSS, Erstellung der Tabellen 1, 2, 3, 4a, 4b, sowie die Tabellen 1, 2 und 3 des Supplements, Literaturrecherche, Verfassen des Manuskriptes und Einreichen des Papers, Beantwortung und Diskussion der Fragen der Reviewer, Revision des Datensatzes und des Manuskriptes, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung

---

Unterschrift der Doktorandin

## Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"GASTROENTEROLOGY and HEPATOLOGY"**  
 Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 80 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	GASTROENTEROLOGY	73,198	20.773	0.120200
2	GUT	42,750	17.016	0.071930
3	Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology	6,686	16.990	0.024170
4	JOURNAL OF HEPATOLOGY	37,108	14.911	0.087330
5	HEPATOLOGY	63,302	14.079	0.103360
6	AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	33,483	10.231	0.050130
7	Clinical Gastroenterology and Hepatology	15,735	7.683	0.042080
8	ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	20,128	7.357	0.035700
9	GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY	22,214	7.204	0.029970
10	Journal of Crohns & Colitis	6,643	6.637	0.023630
11	ENDOSCOPY	10,185	6.629	0.017400
12	JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	7,217	5.561	0.011490
13	Gastric Cancer	4,290	5.045	0.006460
14	Clinics in Liver Disease	2,076	4.771	0.004710
15	Clinical and Translational Gastroenterology	763	4.621	0.003410
16	LIVER INTERNATIONAL	8,584	4.500	0.020930
17	INFLAMMATORY BOWEL DISEASES	14,823	4.347	0.033880
18	JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS	4,846	4.237	0.010070
19	Therapeutic Advances in Gastroenterology	1,238	4.168	0.003570
20	SEMINARS IN LIVER DISEASE	3,693	4.167	0.004680
21	HELICOBACTER	2,862	4.123	0.004320
22	Hepatology International	2,009	4.117	0.005320
23	NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY	7,401	3.842	0.014960
24	LIVER TRANSPLANTATION	9,930	3.752	0.013900
25	BEST PRACTICE & RESEARCH IN CLINICAL GASTROENTEROLOGY	3,382	3.632	0.005260
26	DISEASES OF THE COLON & RECTUM	14,063	3.616	0.013470
27	JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY	12,495	3.483	0.019170
28	United European Gastroenterology Journal	954	3.477	0.003980
29	HEPATOBIILIARY SURGERY AND NUTRITION	605	3.451	0.001980

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
30	Journal of Neurogastroenterology and Motility	1,207	3.438	0.002930
31	HEPATOLOGY RESEARCH	4,026	3.415	0.007010
32	CURRENT OPINION IN GASTROENTEROLOGY	2,632	3.414	0.005350
33	Digestive Endoscopy	2,241	3.375	0.005690
34	Endoscopic Ultrasound	553	3.323	0.001670
35	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	38,294	3.300	0.074030
36	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY	14,321	3.293	0.018460
37	DIGESTIVE AND LIVER DISEASE	5,818	3.287	0.012140
38	GASTROENTEROLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA	2,073	3.265	0.003330
39	World Journal of Gastrointestinal Oncology	1,069	3.140	0.002520
40	HPB	3,936	3.131	0.009110
41	JOURNAL OF CLINICAL GASTROENTEROLOGY	7,826	2.968	0.010910
42	Expert Review of Gastroenterology & Hepatology	1,681	2.963	0.004430
43	PANCREAS	7,128	2.958	0.011490
44	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	3,600	2.877	0.007130
45	Gut and Liver	1,771	2.849	0.004550
46	DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES	15,448	2.819	0.022940
47	JOURNAL OF GASTROINTESTINAL SURGERY	10,087	2.813	0.018600
48	Gut Pathogens	864	2.809	0.001930
49	Colorectal Disease	6,282	2.778	0.013190
50	PANCREATOLOGY	3,066	2.763	0.007270
51	JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION	11,417	2.752	0.018600
52	BMC GASTROENTEROLOGY	4,331	2.731	0.010540
53	DISEASES OF THE ESOPHAGUS	2,927	2.702	0.005220
54	Gastroenterology Report	461	2.688	0.001620
55	SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	8,972	2.629	0.010330
56	Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology	1,446	2.623	0.004460
57	INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE	5,592	2.533	0.009430
58	ABDOMINAL IMAGING	3,203	2.443	0.005940

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
59	Techniques in Coloproctology	1,787	2.378	0.003780
60	DIGESTION	2,681	2.037	0.003060
61	DIGESTIVE SURGERY	1,823	2.031	0.002590
62	EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY	6,271	2.014	0.009260
63	Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases	1,404	1.964	0.002390
64	Gastroenterology Research and Practice	2,255	1.859	0.006840
65	Hepatitis Monthly	1,347	1.810	0.003030
66	REVISTA ESPANOLA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS	1,374	1.632	0.001740
67	Journal of Digestive Diseases	1,314	1.623	0.003300
68	Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology	2,202	1.622	0.003700
69	ZEITSCHRIFT FUR GASTROENTEROLOGIE	1,424	1.612	0.001530
70	Annals of Hepatology	1,492	1.576	0.003520
71	Saudi Journal of Gastroenterology	809	1.520	0.001480
72	Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International	1,547	1.500	0.002520
73	Journal of Gastric Cancer	532	1.400	0.001180
74	Clinics in Colon and Rectal Surgery	909	1.316	0.001200
75	Gastroenterologia y Hepatologia	602	1.078	0.000650
76	Esophagus	331	0.991	0.000480
77	Turkish Journal of Gastroenterology	801	0.869	0.001390
78	Arab Journal of Gastroenterology	251	0.843	0.000530
79	ACTA GASTRO-ENTEROLOGICA BELGICA	528	0.630	0.000710
80	Gastroenterology Nursing	387	0.577	0.000480

Copyright © 2018 Clarivate Analytics

## **Sonderdruck der Publikation**

Greverath, L. M., Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. *Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. Hepatology Research: the official journal of the Japan Society of Hepatology (2019)*

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

<https://doi.org/10.1111/hepr.13455>

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

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

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

## Vollständige Publikationsliste

**Greverath, L. M.**, Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology Research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, doi:10.1111/hepr.13455 (2019).

(Impact Factor: 3,415 im Jahr 2017)

Wilde, A. B., Lieb, C., Leicht, E., **Greverath, L. M.**, Steinhagen, L. M., Wald de Chamorro, N., Petersen, J. P., Hofmann, W. P., Hinrichsen, H., Heyne, R., Berg, T., Naumann, U., Schwenzer, J., Vermehren, J., Geier, A., Tacke, F., Muller, T. Real world clinical management of patients with primary biliary cholangitis - a retrospective multicenter study from Germany. *Hepatology*, 72 (S1) doi:10.1002/hep.31580 (2020)

(Impact Factor: 14,079 im Jahr 2017)

Abstract im Rahmen eines Beitrags zur Postersession der Jahrestagung der American Association for the study of liver diseases (AASLD) 2020.

**Greverath, L. M.**, Leicht, E., Wald de Chamorro, N., Wilde, A. B., Steinhagen, L. M., Lieb, C., Schmelzle, M., Chopra, S., Shibolet, O., Fischer, J., Berg, T., Tacke, F. & Muller, T. Assoziation des rs4620530 Single Nucleotide Polymorphismus im muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ3 Gen mit der primär biliären Cholangitis – eine retrospektive Analyse aus zwei universitären Zentren. *Z Gastroenterol*; 57(09): e238, doi: 10.1055/s-0039-1695246 (2019)

(Impact Factor: 1,612 im Jahr 2017)

Abstract im Rahmen eines Kurzvortrags zur 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2019.

Wald de Chamorro, N., Steinhagen, L. M., **Greverath L. M.**, Leicht, E., Wilde, A. B., Tacke, F., Berg, T., Preuss, B., Klein R., R., Müller, T. 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. *Hepatology*, 70(S1), 771A, doi: 10.1002/hep.30941 (2019)

(Impact Factor: 14,079 im Jahr 2017)

Abstract im Rahmen eines Beitrags zur Postersession (Poster of Distinction) der Jahrestagung der American Association for the study of liver diseases (AASLD) 2019.

Wald de Chamorro, N., Steinhagen, L. M., **Greverath L. M.**, Leicht, E., Wilde, A. B., Tacke, F., Berg, T., Preuss, B., Klein R., R., Müller, T. 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. *Z Gastroenterol*; 57(09): e238-e239, doi: 10.1055/s-0039-1695247 (2019)

*(Impact Factor: 1,612 im Jahr 2017)*

*Abstract im Rahmen eines Kurzvortrags zur 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2019.*

Wilde A., Leicht E., **Greverath L. M.**, Petersen, J. Hofmann W. P., Hinrichsen H., Heyne R., Berg T., Wiedenmann B., Müller T. Diagnostik, Therapie und Ansprechen nach 1-jähriger Behandlung mit Ursodeoxycholsäure bei Patienten mit primär biliärer Cholangitis: Real-World-Daten aus vier großen hepatologischen Zentren in Deutschland, *Z Gastroenterol*; 56(08): e278-e279, doi: 10.1055/s-0038-1668860 (2018)

*(Impact Factor: 1,612 im Jahr 2017)*

*Abstract im Rahmen eines Kurzvortrags zur 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2018*

Wilde A., Leicht E., **Greverath L. M.**, Petersen, J., Hofmann W. P., Hinrichsen H., Heyne R., Berg T., Wiedenmann B., Müller T. Diagnosis, Treatment and Response to Ursodeoxycholic Acid Therapy in a Large Cohort of Patients with Primary Biliary Cholangitis in Germany: Real-World-Data from Four Hepatological Centers. *Hepatology*, 68(S1), doi: 10.1002/hep.30257 (2018)

*(Impact Factor: 14,079 im Jahr 2017)*

*Abstract im Rahmen eines Beitrags zur Postersession der Jahrestagung der American Association for the study of liver diseases (AASLD) 2018.*

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Tobias Müller für die Überlassung des Themas, die intensive Unterstützung, wunderbare und unkomplizierte Betreuung, die fortwährende wissenschaftliche Förderung und die stetige konstruktive Kritik zu meinem Projekt.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Janett Fischer für die umfangreiche und gelungene Einführung in die Laborarbeit und Methodik, für die Geduld bei all meinen Fragen, die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und der Statistik, sowie die konstruktive Kritik. Ein großes Dankeschön für die Hilfe bei der Genotypenbestimmung der CHC Kohorte, als ich bereits mit der Vorbereitung für das Staatsexamen beschäftigt war.

Ich danke ebenfalls Prof. Dr. med. Thomas Berg für die unkomplizierte Kooperation mit dem Universitätsklinikum Leipzig, sowie der ganzen Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Leipzig für die freundliche Aufnahme in das Team und die Bereitstellung der Laborräume.

Außerdem danke ich unserem Kooperationspartner Prof. Oren Shibolet für die Durchführung der Expressionsanalysen und Färbungen, sowie die unkomplizierte Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Moritz Schmelzle und PD Dr. med. Sascha Chopra der chirurgischen Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, für die Bereitstellung der Gewebeproben aus explantiertem Lebergewebe.