

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
Komm. Direktor: Professor Dr. med. Marcin Krawczyk

**Klinisches Spektrum von erwachsenen Patienten mit
Mutationen in den hepatobiliären Transportern *ABCB11* und
*ATP8B1***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023

vorgelegt von
Jeannine Kühnle
Geboren am 10.01.1995
in Homburg (Saar)

Tag der Promotion: 12.03.2024
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: PD Dr. med. Christoph Jüngst
Prof. Dr. Martin van der Laan

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
1.1	Zusammenfassung	6
1.2	Englische Zusammenfassung	8
2	EINLEITUNG	10
2.1	Gallensäurenmetabolismus	10
2.2	Enterohepatischer Kreislauf	10
2.3	Cholestase	11
2.3.1	Definition	11
2.3.2	Cholestatische Lebererkrankungen	12
2.4	Hepatobiliäre Transporter	12
2.4.1	ABCB11	13
2.4.2	ATP8B1	14
2.4.3	ABCB4	15
2.5	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC)	15
2.6	Benigne rezurrenente intrahepatische Cholestase (BRIC)	16
2.7	Genmutationen und deren Auswirkungen	17
2.8	Zielsetzung	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Patientenkohorte	19
3.2	Laborchemische Parameter	19
3.3	Genetische Diagnostik	20
3.3.1	Allelische Diskriminierung	20
3.3.1.1	Geräte und Lösungen	20
3.3.1.2	Reagenzien	21
3.3.1.3	Assays – Primer und Sonden	21
3.3.1.4	Genotypisierung der <i>ABCB11</i> - und <i>ATP8B1</i> -Varianten	22
3.3.1.5	PCR-Prozess	23
3.3.1.6	Analyse	23
3.3.2	Next Generation Sequencing	24
3.4	Charakterisierung der Cholestaseschübe	24
3.5	Histologie	24
3.6	Ermittlung der Leberfibrose	24

3.7	Statistische Analyse	25
4	ERGEBNISSE	25
4.1	Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs	25
4.1.1	Geschlechterverteilung	25
4.1.2	Alter bei Diagnosestellung	26
4.2	Klinische Präsentation	26
4.2.1	Klinische Symptome der Cholestaseschübe	26
4.2.2	Dauer der Cholestaseschübe	27
4.2.3	Auslöser der Cholestaseschübe	27
4.2.4	Häufigkeit von Cholestaseschüben	27
4.2.5	Verlauf der Cholestaseschübe und Hepatopathie	28
4.2.6	Weitere klinische Parameter	29
4.2.7	Extrahepatische Manifestation bei Patienten mit <i>ATP8B1</i> -Mutation	29
4.3	Laborchemische Charakteristika	29
4.3.1	Patienten mit <i>ABCB11</i> -Mutation	29
4.3.2	Patienten mit <i>ATP8B1</i> -Mutation	29
4.3.3	Vergleich der Patientengruppen mit <i>ABCB11</i> - und <i>ATP8B1</i> -Mutationen	30
4.4	Genetische Diagnostik	30
4.4.1	<i>ABCB11</i> -Mutationen	31
4.4.2	<i>ATP8B1</i> -Mutationen	32
4.5	Genotyp-Phänotyp Korrelation	34
4.5.1	<i>ABCB11</i> -Mutationen	34
4.5.1.1	Klinische Charakteristika	34
4.5.1.2	Dauer und Anzahl der Cholestaseschübe	34
4.5.1.3	Laborwerte	35
4.5.2	<i>ATP8B1</i> -Mutationen	36
4.5.2.1	Klinische Charakteristika	36
4.5.2.2	Laborwerte	37
4.5.2.3	Dauer und Anzahl der Cholestaseschübe	40
4.6	Histologie der Leberbiopsie mit Fibrosediagnostik	40
4.6.1	Histologische Ergebnisse der Leberbiopsie	40
4.6.2	Leberfibrose und -zirrhose in Bezug zur <i>ABCB11</i> - und <i>ATP8B1</i> -Mutation	42
4.6.3	Nicht-invasive Fibrosemessung mittels transientser Elastographie	43
4.7	Vergleich der klinischen und laborchemischen Befunde von Patienten mit der <i>ABCB11</i> -Mutation p.D482G oder p.E297G mit der <i>ATP8B1</i> -Mutation p.I661T	44
4.7.1	Geschlecht	45
4.7.2	Alter bei Diagnosestellung	45
4.7.3	Cholestaseschübe	45
4.7.4	Histologische Leberarchitektur	46
4.7.5	Genetik	46
4.8	Therapie	46
4.8.1	Ursodesoxycholsäure (UDCA)	46
4.8.2	Weitere Therapien	46
4.9	Individuelle Übersicht zu klinischen, laborchemischen und genetischen Befunden der gesamten Kohorte	48

5	DISKUSSION	50
5.1	Patientenkohorte	50
5.2	Klinische und genetische Charakteristika von Patienten mit Cholestase und <i>ATP8B1</i> -Mutation	51
5.2.1	Charakterisierung der <i>ATP8B1</i> -Mutation p.N45T	54
5.3	Klinische und genetische Charakteristika von Patienten mit Cholestase und <i>ABCB11</i> -Mutation	55
5.4	Vergleich der Phänotypen von Patienten mit „klassischer“ pathogener Variante im <i>ATP8B1</i> -Gen (p.I661T) und <i>ABCB11</i> - Gen (p.E297G und p.D482G)	58
5.5	Therapie	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	62
I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
III	TABELLENVERZEICHNIS	72
7	DANKSAGUNG	73
8	LEBENS LAUF	74

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Hintergrund

Mutationen der hepatokanalikulären Transporter ATP8B1 und ABCB11 sind Ursache der progressiven familiären Cholestase (PFIC), die häufig bereits im Kindesalter zu einer Leberzirrhose führt. Genvarianten in diesen beiden Transportern sind zudem ursächlich für die sehr seltene benigne rezidivierende intrahepatische Cholestase (BRIC). Diese führt zu Cholestaseschüben, meist ohne Entwicklung einer chronischen Lebererkrankung und kann sich auch erst im Erwachsenenalter manifestieren. Bisher ist die Bedeutung von *ATP8B1*- und *ABCB11*-Mutationen bei Erwachsenen noch unzureichend untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der klinischen Präsentation von erwachsenen Patienten mit *ATP8B1*- und *ABCB11*-Mutation und Ermittlung einer Genotyp-Phänotyp Korrelation, welche Einblicke über die Bedeutung bestimmter Genvarianten für den klinischen Verlauf geben könnte.

Patienten und Methoden

Es wurden alle Patienten untersucht, die zwischen 2009 und 2017 an der Universität des Saarlandes in der Klinik für Inneren Medizin II eine genetische Untersuchung aufgrund einer unklaren Cholestase erhalten hatten. Von den insgesamt 970 Patienten wurden 29 erwachsene Patienten mit pathogener *ABCB11*- oder *ATP8B1*-Mutation unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien in die Untersuchung aufgenommen und anhand der vorliegenden Arztbriefe, Labordaten und Histologien charakterisiert.

Ergebnisse

Bei 8 Patienten (27,6%) wurde eine *ABCB11*-Mutation nachgewiesen, jeweils heterozygot, davon in 5 Fällen (62,5%) die häufige p.E297G Variante. Alle Patienten zeigten klinisch einen Ikterus, und ein deutlich erhöhtes Bilirubin, die Gamma-Glutamyltransferase war nur bei 2 Patienten etwas erhöht. In der Regel lagen klinisch rezidivierende Ikterusschübe im Sinne einer BRIC vor. Bei einem Patienten hatte sich eine Leberzirrhose entwickelt, welche eine Lebertransplantation notwendig machte, auch der Bruder dieses Patienten wies eine Leberzirrhose auf. Von den 21 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation hatten 5 Patienten (23,8%) eine p.I661T Variante, davon 3 in homozygoter Ausprägung, bei 14 Patienten (66,7%) wurde eine p.N45T Variante nachgewiesen, 2 Patienten hatten eine seltene andere Mutation. Die Patienten mit p.I661T Varianten wiesen klinisch einen typischen ikterischen Verlauf einer benignen rezidivierenden intrahepatischen Cholestase auf, vergleichbar den Patienten mit *ABCB11*-Mutation. Die Patienten mit p.N45T Variante hatten klinisch einen deutlich milderen Verlauf der Cholestase, nur 4 Patienten (28,6%) waren ikterisch, das mediane Bilirubin lag im Normbereich. Bei 18 der 29 Patienten (62,1%) erfolgte eine

Leberbiopsie. In der *ABCB11*-Gruppe konnte bei einem Patienten eine Zirrhose nachgewiesen werden, bei einem weiteren konnte klinisch die Diagnose einer Zirrhose gestellt werden. In der *ATP8B1*-Gruppe wurde, unabhängig vom Genotyp, bei 7 von 12 Patienten (58,3%) bei denen eine Histologie vorlag, eine Leberfibrose nachgewiesen, diese war in allen Fällen mild ausgeprägt.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation mit deutlich ausgeprägten klinisch ikterisch verlaufenden Cholestaseschüben für alle Patienten mit den drei nachgewiesenen (heterozygoten) *ABCB11* Mutationen und der häufigen *ATP8B1*-Variante p.I661T. Patienten mit *ATP8B1* p.N45T Variante wiesen hinsichtlich der Schubausprägung einen milderen Verlauf auf. Interessanterweise fand sich bei der Mehrzahl der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation eine Leberfibrose, bei zwei Patienten mit *ABCB11*-Mutation sogar eine Leberzirrhose. Die Entwicklung einer chronischen Hepatopathie ist somit auch bei Patienten mit klinisch nur intermittierend auftretenden Cholestaseschüben möglich, daher sollte eine regelmäßige hepatologische Kontrolle auch nach Erholung von einem Cholestaseschub erfolgen.

1.2 Englische Zusammenfassung

Clinical course of adult patients with mutations in the hepatobiliary transporters *ABCB11* and *ATP8B1*

Background

Mutations in the hepatocanicular transporters *ATP8B1* and *ABCB11* are causative for progressive familial cholestasis (PFIC), which often leads to liver cirrhosis in early childhood. Gene variants in these two transporters also account for the very rare benign recurrent intrahepatic cholestasis (BRIC). BRIC is characterized by episodes of cholestasis, usually without the development of chronic liver disease, and does manifest mostly in adulthood. There are only limited studies on the significance of *ATP8B1*- and *ABCB11*-mutations in adults. Therefore, it was our aim to analyze the clinical presentation of adult patients with *ATP8B1*- and *ABCB11*-mutations and to determine a genotype-phenotype correlation, which could provide insights into the importance of certain gene variants for the clinical course.

Patients and methods

All patients who had undergone genetic testing for unexplained cholestasis in the Department of Medicine II at the Saarland University Medical Center between 2009 and 2017 were examined. From a total of 970 patients, 29 adult patients with pathogenic *ABCB11*- or *ATP8B1*-mutation were included in the study, taking into account the exclusion criteria, and were characterized based on the available doctor's letters, laboratory data and liver biopsies.

Results

An *ABCB11*-mutation was detected in 8 patients (27.6%), each heterozygous. In 5 cases (62.5%) the common p.E297G variant was found. All patients showed clinical jaundice and a significantly increased bilirubin, the gamma glutamyl transferase was slightly increased in only 2 patients and otherwise normal. Clinically recurrent episodes of jaundice as defined by BRIC were present and one patient developed progression to liver cirrhosis, which made a liver transplant necessary. The brother of this patient was also diagnosed with cirrhosis based on clinical findings. Of the 21 patients with an *ATP8B1* mutation, 5 patients (23.8%) had a common p.I661T variant, 3 of which were homozygous. In 14 patients (66.7%) a p.N45T variant was detected, 2 patients had different rare mutations. Patients with p.I661T variants clinically showed a typical icteric course of benign recurrent intrahepatic cholestasis, comparable to patients with *ABCB11* mutations. The patients with the p.N45T variant clinically had a significantly milder course of cholestasis, only 4 patients (28.6%) were icteric, the median bilirubin was within the normal range. A liver biopsy was performed in 18 of the 29 patients (62,1%), and cirrhosis was detected in one patients in the

ABCB11 group. In the *ATP8B1* group, regardless of the genotype, mild liver fibrosis was detected in 7 of 12 patients (58.3%) with a liver biopsy.

The results of this work show a genotype/phenotype correlation with clearly pronounced clinically icteric episodes of cholestasis for all patients with the three (heterozygous) *ABCB11*-mutations and the common *ATP8B1*-variant p.I661T. Patients with the *ATP8B1* p.N45T variant show a milder course of cholestatic episodes. Interestingly, liver fibrosis was found in the majority of patients with *ATP8B1*-mutations and even cirrhosis was present in two patients with an *ABCB11*-mutation. The development of a chronic hepatopathy is therefore also possible in patients with clinically intermittent cholestatic episodes, hence regular hepatological follow ups are recommended also after recovery from a cholestatic episode.

2 Einleitung

2.1 Gallensäurenmetabolismus

Die Galle ist eine komplex zusammengesetzte heterogene Flüssigkeit, die mehrheitlich aus Wasser sowie festen Bestandteilen wie Gallensäuren, Phosphatidylcholin, Cholesterin, Bilirubin und verschiedenen Proteinen besteht (NICOLAOU et al., 2012). Die Synthese der Gallensäuren ist eng mit dem Cholesterinhaushalt des Körpers verknüpft, so stellt die biliäre Ausscheidung des Cholesterins und die Verstoffwechslung zu Gallensäuren dessen Haupteliminationsweg dar (STAELS, FONSECA, 2009). Im Rahmen der Entgiftungsfunktion der Leber werden über die Gallenwege schlecht lösliche Substanzen wie Bilirubin, Cholesterin und Abfallprodukte nach hepatischer Metabolisierung ausgeschieden und dort in Lösung gebracht (MAILLETTE DE BUY WENNIGER, BEUERS, 2010). Außerdem wirken Gallensäuren als Detergenzien für die intestinale Absorption von Nahrungsfetten, Nährstoffen und Vitaminen (CHIANG, 2009).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Aufgaben der Gallensäuren noch vielfältiger sind als bisher beschrieben, unter anderem sind sie Liganden von Transkriptionsfaktoren und dienen somit als wichtige Regulatoren der Genexpression (HANDSCHIN, MEYER, 2005; PERINO et al., 2021).

2.2 Enterohepatischer Kreislauf

Gallensäuren, die in der Leber synthetisiert werden, bezeichnet man als primäre Gallensäuren (LEFEBVRE et al., 2009). Die Leber ist das einzige Organ, das alle 14 Enzyme besitzt, um die zwei wichtigsten primären Gallensäuren herzustellen: Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA). Unter normalen Umständen werden pro Tag 200-600 mg primäre Gallensäuren synthetisiert (RESHETNYAK, 2013). Primäre Gallensäuren werden mit Taurin oder Glycin konjugiert, wodurch sie weniger toxisch werden und gleichzeitig eine bessere Löslichkeit aufweisen. (RESHETNYAK, 2013)

Die Gallensäuren werden an der kanalikulären Membran der Hepatozyten energieabhängig gegen einen aktiven Gradienten in die Gallekanalikululi sezerniert (Abb. 1) und von aeroben Bakterien im terminalen Ileum und Kolon dekonjugiert und dehydroxyliert. Die entstandenen Produkte werden als sekundäre Gallensäuren bezeichnet und zum großen Teil reabsorbiert. Nach Reabsorption werden die Gallensäuren über den Portalvenenkreislauf wieder der Leber zugeführt. Dieser Kreislauf wird als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet. Zusätzlich können die Gallensäuren auch von den Cholangiozyten resorbiert und zu den Hepatozyten transportiert werden, was als cholehepatischer Shunt bezeichnet wird (MEIER, STIEGER, 2002). So kann gewährleistet werden, dass 95% der Gallensäuren resorbiert werden und nur 5% mit den Ausscheidungen verloren gehen (MAILLETTE DE BUY WENNIGER, BEUERS, 2010).

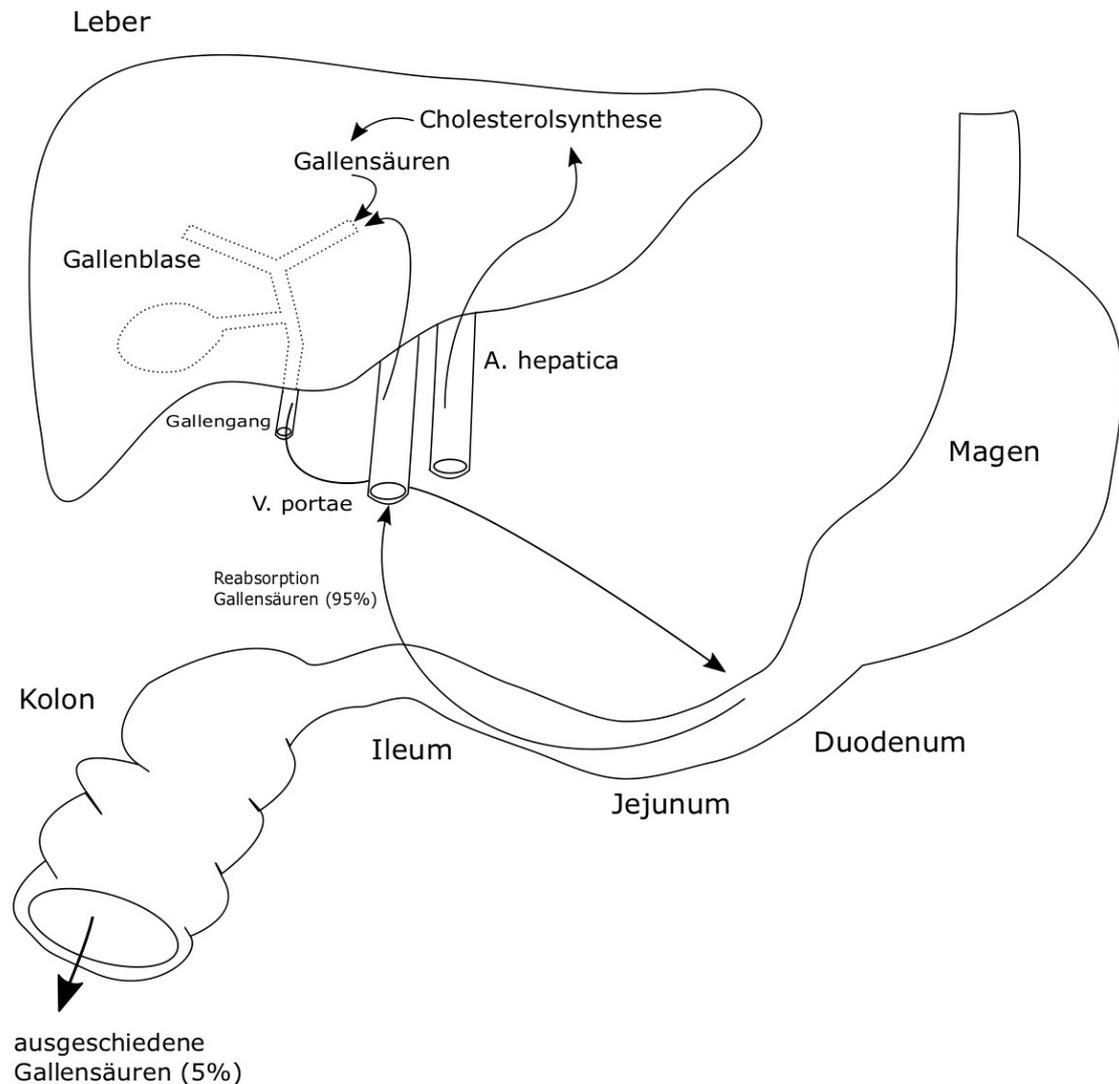


Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf. Etwa 95% der ausgeschiedenen Gallensäuren werden über den enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert. Die De-Novo-Synthese der Gallensäuren ausgehend von der Cholesterolsynthese in der Leber ersetzt die 5% Gallensäuren, die über den Gastrointestinaltrakt verloren gehen (MAILLETTE DE BUY WENNIGER, BEUERS, 2010).

2.3 Cholestase

2.3.1 Definition

Cholestase ist definiert als Verminderung der Gallebildung und/oder des Gallenflusses und kann klinisch mit Müdigkeit, Pruritus und Ikterus auffallen. Man unterteilt in intra- und extrahepatische Cholestase. Laborchemisch findet sich eine Erhöhung der Cholestaseparameter Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und alkalischer Phosphatase (AP) gefolgt von (konjugiertem) Bilirubin. Eine Cholestase wird als chronisch betrachtet, sofern sie länger als 6 Monate besteht (DE VRIES, BEUERS, 2017; EASL, 2009).

Bei Vorliegen einer Cholestase kommt es zu einer Retention der toxischen Gallebestandteile, was

zu Leberzellschäden, Schädigungen der Gallengänge, Fibrose bis hin zur biliären Zirrhose führen kann (DE VRIES, BEUERS, 2017).

2.3.2 Cholestatische Lebererkrankungen

Zur Unterteilung der cholestatischen Lebererkrankungen wird zunächst unterschieden zwischen intra- und extrahepatischer Cholestase. Die extrahepatische Cholestase wird durch mechanische Obstruktion wie durch eine Choledocholithiasis oder einen malignen Tumor verursacht. Die Therapie besteht in der Beseitigung der Obstruktion, beispielsweise durch eine endoskopische Entfernung der Konkreme aus dem Gallengang oder einer Stenteinlage.

Zu den klassischen cholestatischen Lebererkrankungen zählen die primär biliäre Cholangitis (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). Die Ätiologie der PBC ist bis heute nicht restlos geklärt, es kommt durch autoimmune Inflammation zur Entzündung der vornehmlich kleineren intrahepatischen Gallenwege, welche im Verlauf stenosieren und sich verschließen (GULAMHUSEIN, HIRSCHFIELD, 2020). Die Diagnose wird durch Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) vom Subtyp M2 und erhöhten Cholestaseparametern gestellt, in unklaren Fällen wird auch die Leberhistologie mit einbezogen. Der PSC liegt ebenfalls eine autoimmune Inflammation zugrunde, allerdings sind hier vor allem die größeren intra- und auch extrahepatischen Gallengänge betroffen. Die Diagnose wird in Zusammenschau der Labordiagnostik mit erhöhten Cholestaseparametern in Kombination mit einem Cholangiogramm, in der Regel mittels Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) gestellt (DYSON et al., 2018). Auch Medikamente können eine Cholestase verursachen, sodass eine umfassende Anamnese unabdingbar ist. Nach Ausschluss dieser häufigen Ursachen einer Cholestase mittels Anamnese, Klinik, Labordiagnostik, Bildgebung und Leberbiopsie wird in den Leitlinien die Durchführung einer genetischen Diagnostik der hepatobiliären Transporter zur Abklärung des Vorliegens einer genetischen cholestatischen Lebererkrankung empfohlen (EASL, 2009, 2017).

2.4 Hepatobiliäre Transporter

Auf dem Weg von der Leber über den Gastrointestinaltrakt und zurück in die Leber müssen die Gallensäuren verschiedene Membranen passieren. Die in der Leber synthetisierten Gallensäuren werden über den ATP binding cassette transporter sub family B member 11 Transporter (ABCB11), einen Adenosin-Triphosphat (ATP)-abhängigen Transporter, aus dem Hepatozyten in den Gallecanaliculus ausgeschieden (Abb. 2). Weitere bei der Gallesekretion wesentlich beteiligten Transporter sind ATPase phospholipid transporting 8B1 (ATP8B1), dieser sorgt durch Flippaseaktivität für eine gleichmäßige Verteilung von Phosphatidylserin, und ATP binding cassette subfamily B member 4 (ABCB4), welcher Phosphatidylcholin von der inneren an die äußere Membran transportiert. Zusätzlich dazu transportiert der heterodimere Transporter, bestehend aus den beiden Transportern ATP-binding cassette subfamily G member 5 (ABCG5)

und ATP binding cassette subfamily G member 8 (ABCG8), Cholesterol aus den Hepatozyten in den Gallecanaliculus.

Die Reabsorption der Gallensäuren findet hauptsächlich im terminalen Ileum statt und erfolgt durch den apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). Die basolaterale Ausscheidung der Gallensäure aus den Ileocyten in das portalvenöse Blut wird über den ATP binding cassette subfamily C member 3 (ABCC3) Transporter vermittelt. Als letzter Schritt im enterohepatischen Kreislauf erfolgt die Reabsorption der Gallensäuren aus dem portalen Blut in die Hepatozyten. Dieser Transport erfolgt überwiegend durch den natrium taurocholat cotransporting polypeptide (NTCP) Transporter, welcher zur selben Transporterfamilie wie ASBT gehört. Zusätzlich werden Gallensäuren über den organic anion transporting polypeptide (OATP) Transporter aufgenommen. Der heterodimere Transporter organic solute transporter alpha (Ost-alpha) und organic solute transporter beta (OST-beta) vermittelt an der basolateralen Seite, je nach elektrochemischem Gradienten, einen zellulären Efflux oder die Aufnahme von Gallensäuren (BALLATORI et al., 2009; ELFERINK, 2003; KULLAK-UBLICK et al., 2004; NICOLAOU et al., 2012).

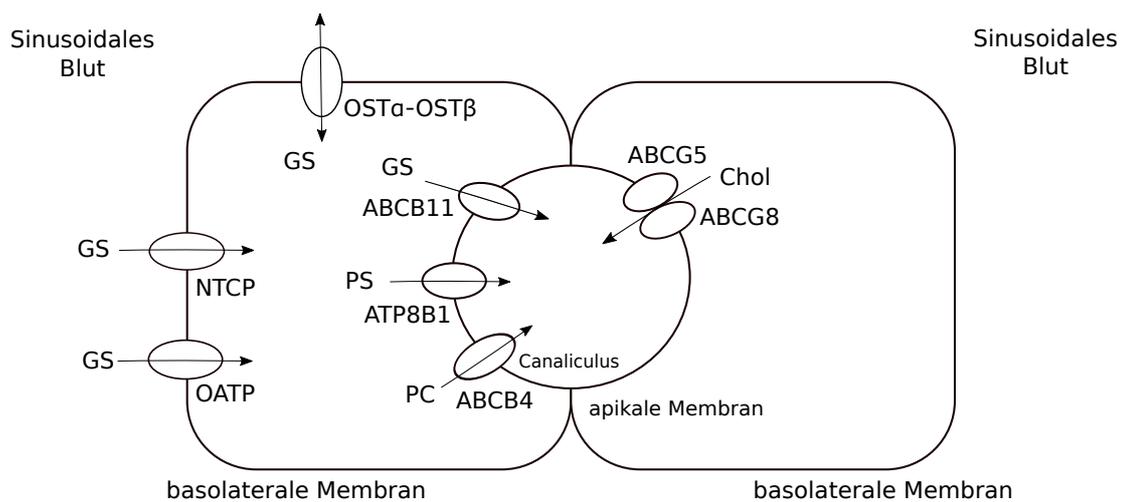


Abbildung 2: Ausgewählte hepatobiliäre Transporter. GS: Gallensäuren; PS: Phosphatidylserin; PC: Phosphatidylcholin; Chol: Cholesterin; ABCB11: ATP binding cassette subfamily B member 11 ; ATP8B1: ATPase phospholipid transporting 8B1; ABCB4: ATP binding cassette subfamily B member 4; OATP: Organic anion transporting polypeptide; NTCP: Natrium taurocholat cotransporting polypeptide; OST α -OST β : Organic solute transporter alpha- Organic solute transporter beta; ABCG5: ATP-binding cassette subfamily G member 5; ABCG8: ATP binding cassette subfamily G member 8

2.4.1 ABCB11

Ein ATP-abhängiger Gallensäuretransporter wurde 1991 erstmals von Nishida et al. beschrieben (NISHIDA et al., 1991). Eine frühere Bezeichnung ist „bile salt export pump“ (BSEP). Das *ABCB11*-Gen liegt auf Chromosom 2q24 und kodiert für diese wichtigste Gallensäuren-Export-

Pumpe der menschlichen Leber. Sie gehört zur Familie der ABC-Transporter, die als gemeinsames Merkmal eine ATP-bindende Einheit besitzen (BYRNE et al., 2009).

ABCB11 befindet sich auf der kanalikulären Membran der Hepatozyten und transportiert konjugierte Gallensäuren gegen einen hohen Gradienten aktiv in die Gallekanalikululi. Mutationen im *ABCB11*-Gen können zu einer progressiv verlaufenden cholestatischen Lebererkrankung bereits im Kindesalter führen, welche als progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC) Typ 2 bezeichnet wird (VAN DER WOERD et al., 2010). Bei Erwachsenen wurden Mutationen im *ABCB11*-Gen als ursächlich für die benignen rezidivierende intrahepatischen Cholestase Typ 2 (BRIC 2) beschrieben (VAN MIL et al., 2004).

2.4.2 ATP8B1

Im Jahr 1998 wurde *ATP8B1* durch positionelle Klonierung von Bull et al. auf dem Chromosom 18q21 identifiziert (BULL et al., 1998; NICOLAOU et al., 2012).

Dieser Transporter zählt zur Gruppe der P4-ATPasen, zu der 14 Transportern gehören und die alle zur korrekten Funktion eine Interaktion mit Mitgliedern der CDC50-Proteinfamilie erfordern (DAWSON, 2010). ATP8B1 ist ein Phospholipidtranslokator, beziehungsweise eine Flippase (NICOLAOU et al., 2012). Phospholipide wie das Phosphatidylserin sind auf der Plasmamembran asymmetrisch angeordnet und diese Asymmetrie wird durch Flippasen aufrecht erhalten (VAN DER WOERD et al., 2017). Phosphatidylserin befindet sich vor allem auf der nach innen gerichteten P-Seite der Plasmamembran (NICOLAOU et al., 2012).

ATP8B1 transportiert Phosphatidylserin von der nach außen gerichteten E-Seite der Plasmamembran zur nach innen gerichteten P-Seite der Plasmamembran (DAWSON, 2010). Die Lokalisation von ATP8B1 konnte vor allem auf der kanalikulären Membran der Hepatozyten nachgewiesen werden, allerdings fand es sich auch auf der apikalen Membran von Epithelzellen des Pankreas, des Verdauungstraktes und des Innenohres (DAWSON, 2010). Zusätzlich konnte der Transporter in Zellen der Blase und der Prostata nachgewiesen werden (NAIK et al., 2015). Defekte in diesem Transporter resultieren in einer ungleichen Verteilung der Phospholipide auf der kanalikulären Membran. Dadurch kommt es in der Leber zur vereinfachten Extraktion von Cholesterol durch hydrophobe Gallensalze, in der Folge wird die Aktivität des zentralen Gallensäuretransporters ABCB11 beeinflusst und es kommt zur Cholestase (NAIK et al., 2015; PAULUSMA et al., 2009).

Defekte im ATP8B1 Transporter führen zu den cholestatischen Lebererkrankungen PFIC Typ 1 und BRIC 1, zudem sind sie mit der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP) assoziiert (BULL, THOMPSON, 2018; BULL et al., 1998; NICOLAOU et al., 2012; PILLARISSETTY, SHARMA, 2022). In älteren Publikationen wird der Transporter auch als FIC1 bezeichnet, in dieser Arbeit soll allerdings einheitlich von ATP8B1 gesprochen werden.

2.4.3 ABCB4

ABCB4 ist ein Lipidtranslokator, welcher Phosphatidylcholin von der inneren in die äußere kanalikuläre Membran des Hepatozyten transportiert. Von dort gelangt es in die Galle und liegt dort zusammen mit den Gallensäuren in gemischten Mizellen vor (SUNDARAM, SOKOL, 2007). Hierdurch reduziert es die Aktivität der Gallensäuren als Detergenz und somit die Toxizität auf die epithelialen Zellen (ANDRESS et al., 2017). Mutationen im *ABCB4*-Gen führen zu einem breiten Spektrum von cholestatischen Lebererkrankungen, welches von einer milden cholestatischen Lebererkrankung über eine fibrosierende Cholestase bis hin zur PFIC3 reicht, die bereits im Kindesalter zu einer Leberzirrhose führen kann (JÜNGST et al., 2022; SCHATZ et al., 2018). Zudem sind Varianten im *ABCB4*-Gen mit der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase und der „low phospholipid associated cholelithiasis“ assoziiert, die durch das Auftreten von Gallensteinen bei Patienten im Alter unter 40 Jahren, einer intrahepatischen Choledocholithiasis und Rezidivbeschwerden nach Cholezystektomie gekennzeichnet ist.

2.5 Progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC)

Die progressive familiäre intrahepatische Cholestase ist eine Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang, die sich durch eine intrahepatische Cholestase schon im Säuglings- oder frühem Kindesalter zeigt. Häufig verläuft sie mit einer raschen Progression zur Leberzirrhose und Tod durch Leberversagen, sofern die Patienten keine Lebertransplantation erhalten (DAVIT-SPRAUL et al., 2009). 1965 wurde sie zum ersten Mal durch Clayton et al. entdeckt, der sie in einer Amish Familie namens Byler beobachtete (CLAYTON et al., 1969). Die genaue Inzidenz der Erkrankung ist nicht bekannt, wird aber auf zwischen 1/50.000 bis 1/100.000 Geburten geschätzt (XIANG et al., 2017). Insgesamt werden sechs verschiedene PFICs unterschieden, basierend auf den Genmutationen, die der Erkrankung zugrunde liegen (VINAYAGAMOORTHY et al., 2021).

Bei Patienten mit PFIC1 (Byler's disease) besteht eine Mutation im *ATP8B1*-Gen, welche eine Phospholipid-Asymmetrie in der kanalikulären Membran der Hepatozyten hervorruft und für eine verminderte Gallensäuresekretion der Leber in die Galle sorgt. Zusätzlich kommen extrahepatische Symptome wie wässrige Diarrhöen, beeinträchtigtes Hörvermögen, Pankreatitis, Wachstumsverzögerungen, verspätete Pubertät oder erhöhte Chloridkonzentration im Schweiß vor, da *ATP8B1* nicht alleinig in der Leber exprimiert wird (AGARWAL et al., 2016; ALAM, LAL, 2022; STICOVA et al., 2018).

Bestimmte Mutationen im *ABCB11*-Gen führen zu PFIC2, früher Byler's syndrome genannt. Hier ist die Proteinfunktion entweder stark eingeschränkt oder fehlt vollständig. Eine verminderte Gallensäuresekretion, gefolgt von einem verminderten Gallenfluss und einer Akkumulation von Gallensäuren in Hepatozyten mit hepatozytärer Schädigung ist die Folge (SRIVASTAVA, 2014).

PFIC3 wird durch eine Mutation im *ABCB4*-Gen charakterisiert, welche zu einer verminderten

Sekretion von Phosphatidylcholin in die Galle führt. Aufgrund der Fähigkeit der Phospholipide, die Detergenzwirkung der hydrophobischen Gallensäuren zu neutralisieren, führt eine Mutation in *ABCB4* zu Schäden im biliären Epithel und der Gallenkanälchen, was letztlich zu Cholestase führt (SRIVASTAVA, 2014). PFIC3 stellt sich klinisch anders als PFIC1 und 2 dar, die Progression zur Zirrhose verläuft eher etwas langsamer und im späteren Kindes-/Jugendalter (CHEN et al., 2018). Die GGT-Konzentration im Blut ist erhöht, im Gegensatz zu den typischerweise meist normalen bis diskret erhöhten Konzentrationen bei PFIC1 und PFIC2. Neuere Untersuchungen zeigen weitere Formen der PFIC, so führen Mutationen im *TJP2*-Gen zur PFIC4 (VITALE et al., 2018). Die beeinträchtigte Funktion des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR) durch Mutationen im *NR1H4*-Gen begünstigen ein Auftreten von PFIC5. Bei PFIC 6 ist das *MYO5B* Gen betroffen, welches für das Motorprotein MYO5B kodiert. MYO5B beeinflusst die Zellpolarität und somit auch die Lokalisation der ATP-abhängigen Gallensäuretransporter (VINAYAGAMOORTHY et al., 2021). Für die PFIC existieren wenige therapeutische Optionen. Die medikamentöse Therapie umfasst vor allem die orale Gabe von Ursodesoxycholsäure (UDCA), wobei der Erfolg von der Genvariante abhängt (FRIDER et al., 2015). Als invasive Möglichkeiten kommen die chirurgische partielle biliäre Diversion, das endoskopische Legen einer nasobiliären Sonde oder eine Lebertransplantation als Ultima Ratio in Frage (SUNDARAM, SOKOL, 2007; VAN DER WOERD et al., 2017). In neueren Arbeiten hat sich gezeigt, dass bei Patienten mit PFIC2 die Prognose und auch das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie, wie die biliäre Diversion, auch vom jeweiligen Genotyp abhängig ist (VAN WESSEL et al., 2020).

2.6 Benigne rezurrenente intrahepatische Cholestase (BRIC)

Erstmals wurde BRIC 1958 von Summerskill und Walshe als Summerskill-Walshe-Tygstrup Syndrom beschrieben (SUMMERSKILL, WALSHE, 1959).

BRIC bezeichnet ein seltenes, familiär gehäuftes Krankheitsbild, das durch rekurrenente Episoden von Cholestase und Juckreiz gekennzeichnet ist. Während dieser Phasen ist die Galleexkretion der Hepatozyten gestört (BYRNE et al., 2009). Während der symptomfreien Intervalle zeigen sich typischerweise keine Zeichen einer chronischen Lebererkrankung (HOLZ et al., 2018). Man unterscheidet zwei Typen: Bei Mutationen des *ATP8B1*-Gens spricht man von BRIC 1, bei *ABCB11* von BRIC 2 (JÜNGST, LAMMERT, 2013). Der Krankheitsbeginn kann in jedem Alter auftreten, meist beginnen die BRIC-Schübe in der ersten Lebensdekade und überwiegend vor dem 20. Lebensjahr (VAN MIL et al., 2004; VITALE et al., 2016). In der Labordiagnostik findet sich während des Schubes zunächst ein Anstieg der retinierten Gallensäuren im Serum, noch bevor das vorwiegend konjugierte Bilirubin dann deutlich ansteigt und klinisch ein Ikterus auffällt. Die GGT ist typischerweise normal oder nur wenig erhöht (NICOLAOU et al., 2012).

Histologisch findet sich meist eine blande Cholestase während des Schubs und in der Regel keine chronischen Leberschäden (KLOMP et al., 2004). Es gibt allerdings Hinweise aus Fallberichten,

welche die Entwicklung einer progressiven chronischen Lebererkrankung möglich erscheinen lassen (VAN OOTEGHEM et al., 2002).

Die Behandlung der Cholestaseschübe ist schwierig, verschiedene empirische medikamentöse Therapien mit u.a. Ursodesoxycholsäure (UDCA), Colestyramin, Kortikosteroide und Rifampicin, sowie Fallberichte zu invasiven Behandlungsmethoden wie Plasmapherese oder endoskopischer Anlage einer nasobiliären Sonde liegen vor (FOLVIK et al., 2012; HOLZ et al., 2018; VAN DER WOERD et al., 2017).

2.7 Genmutationen und deren Auswirkungen

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist Trägerin der vorhandenen Erbinformationen innerhalb einer Zelle und besteht aus unterschiedlichen Desoxyribonukleotiden. Die zwei Polynukleotidketten verlaufen in einer Doppelhelixspirale und sind durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin miteinander verbunden.

Kommt es innerhalb eines Genoms zu einer dauerhaften Veränderung, wird diese als Mutation bezeichnet. Mutationen entstehen durch Fehler während der Replikation oder durch Schäden in der DNA, welche aufgrund einer fehlerhaften Reparatur nicht behoben wurden (ANTONARAKIS et al., 2000; HARRIS, PRITCHARD, 2017).

Verschiedene Arten von Mutationen werden unterschieden. Die Missense-Mutation ist eine Punktmutation bei welcher der Basenaustausch in der DNA zu einem veränderten Codon führt, sodass eine andere Aminosäure in das betreffende Protein eingebaut wird. In Abhängigkeit an welcher Position die Änderung der Aminosäure auftritt, kann die Proteinfunktion beeinflusst werden. Kommt es zu einer wesentlichen Abnahme der Aktivität, wird die Mutation als pathogen oder schwerwiegend bezeichnet. Ebenso schwerwiegend ist eine Mutation, wenn es durch sie zu einem frühzeitigen Proteinabbruch kommt, was man als Nonsense-Mutation bezeichnet (ZHANG et al., 2012). Eine Missense-Mutation kann zudem häufig zu Problemen bei der Proteinfaltung führen und hierdurch ebenfalls die Proteinfunktion beeinträchtigen (WANG, MOULT, 2001).

Ein Allel ist eine Variante eines Gens, welches für die Ausprägung eines Merkmals verantwortlich ist und an korrespondierenden Genloci der Chromosomen vorkommt. Ein menschliches Individuum erbt regelhaft ein Allel eines Gens väterlicherseits und eines mütterlicherseits. Sofern diese Allele genetisch identisch sind, wird dieser Zustand der Allele als homozygot bezeichnet. Sind sie unterschiedlich, wird von Heterozygotie gesprochen. Hinsichtlich der Mutationen innerhalb der Allele werden die Begriffe ebenfalls verwendet, hierbei beeinflussen homozygote Mutationen beide Allele, bei heterozygoten Mutationen ist nur ein Allel betroffen.

Bei autosomal-rezessivem Erbgang kann es bei zwei verschiedenen Allelen desselben Gens zum Auftreten der Erkrankung kommen, diese Konstellation wird Compound-Heterozygotie genannt.

In den meisten Fällen führt das Vorliegen einer homozygoten Mutation, und damit das Betreffen

beider Allele, zu einem klinisch ausgeprägteren Krankheitsverlauf als eine heterozygote Mutation (ZLOTOGORA, 1997). Als Single Nucleotid Polymorphismen (SNP) werden Punktmutationen bezeichnet, die mit einer Häufigkeit > 1% in einer Population vorkommen (BROOKES, 1999).

2.8 Zielsetzung

Die Auswirkungen von genetischen Varianten im *ABCB11*- bzw. *ATP8B1*-Gen bei der Entstehung der PFIC bei Kindern wurde in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden. Klinische und genetische Informationen zur Bedeutung von Genvarianten im *ABCB11*- bzw. *ATP8B1* Gen bei Erwachsenen sind bisher noch weniger untersucht.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist daher, eine (retrospektive) Analyse der erwachsenen Patienten mit unklarer Cholestase, die in der genetischen Diagnostik eine Mutation im *ABCB11* oder *ATP8B1* Gen zeigten, durchzuführen. Hierbei soll das klinische und genetische Spektrum der Patienten untersucht und mögliche Genotyp/Phänotyp-Korrelationen beschrieben und miteinander verglichen werden. Dies könnte Einblicke über die Bedeutung bestimmter Genvarianten für den klinischen Verlauf ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkohorte

Im Zeitraum von Juni 2009 bis März 2017 erfolgte am Universitätsklinikum des Saarlandes in der Klinik für Innere Medizin II bei 970 Patienten mit unklarer Cholestase eine Genotypisierung von hepatokanalikulären Transportergenen.

In das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurden aus dieser Gruppe erwachsenen Patienten eingeschlossen, welche eine pathogene Variante im *ATP8B1*-Gen oder *ABCB11*-Gen aufwiesen und bei denen in der umfangreichen Diagnostik keine weiteren möglichen Ursachen der Cholestase nachgewiesen wurden. Patienten mit einer Mutation im *ABCB4*-Gen wurden außerhalb dieser Arbeit getrennt analysiert (JÜNGST et al., 2022; SCHATZ et al., 2018). Die serologische, bildgebende und zum Teil auch histologische Diagnostik ergab bei diesen Patienten keinen Anhalt für eine PBC, PSC, chronische Virushepatitis (B, C), autoimmune Hepatitis, M. Wilson, Hämochromatose, eine alkoholische oder nicht-alkoholische Fettlebererkrankung. Durch bildgebende Verfahren wie Sonographie, Endosonographie oder Magnetresonanztomographie (MRT) wurde eine obstruktive Galleabflussbehinderung wie eine Choledocholithiasis als Ursache der Cholestase ausgeschlossen. Zur klinischen Charakterisierung der Patienten wurden Arztbriefe, Krankenakten und das elektronische Patientensystem des Universitätsklinikums des Saarlandes analysiert. Die Daten wurden retrospektiv erhoben, wobei nicht alle Variablen für jeden Patienten ermittelt werden konnten.

Neben den allgemeinen Daten wie Alter und Geschlecht wurden folgende Parameter erhoben: Alter bei klinischer und genetischer Diagnosestellung, das Datum der genetischen Diagnostik, Nebendiagnosen, insbesondere das Vorhandensein von anderen Lebererkrankungen, Alkohol- oder Nikotinabusus, Allergien, Vorhandensein von Hepato- oder Splenomegalie.

Zur Charakterisierung der Cholestaseschübe wurde das Vorhandensein von Ikterus, Pruritus und acholischem Stuhl erfasst. Zudem wurden mögliche Auslöser des Cholestaseschubes und die eingesetzte Therapie der Cholestase ermittelt.

Im Rahmen der Datenanalyse wurden zwei Untergruppen gebildet: Patienten mit Mutation im *ATP8B1* und Patienten mit Mutation im *ABCB11*-Gen. Patienten mit Mutationen in beiden Genen wurden der Gruppe mit *ABCB11*-Mutation zugeordnet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (271/11).

3.2 Laborchemische Parameter

Eine Reihe von Parametern der klinischen Chemie und Immundiagnostik wurden analysiert (Tab. 1). Die jeweils höchsten vorhandenen Ergebnisse der jeweiligen Laborparameter wurden für die Analyse verwendet.

Es wurden die Standardeinheiten des Zentrallabors des Universitätsklinikums des Saarlandes

(Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes) verwendet. Externe Befunde wurden in diese Einheiten umgerechnet. Einheiten in $\mu\text{kat/l}$ s wurden mit dem Faktor 60 multipliziert, um U/l zu erhalten, Bilirubin in $\mu\text{mol/l}$ wurde in mg/dl umgerechnet.

Analysegruppen	Parameter
Transaminasen	GOT, GPT
Cholestaseparameter	GGT, Bilirubin gesamt, AP, Gallensäuren im Serum
Lebersynthesemarker	CHE, Quick, INR, Albumin im Serum
Gerinnung	INR
Retentionsparameter	Kreatinin
Enzymdiagnostik	alpha1-Antitrypsin
Eisenstoffwechsel	Ferritin, Transferrin, Transferrinsättigung
Kupferstoffwechsel	Kupfer im Serum, Coeruloplasmin
Immunologische/Virologische Diagnostik	ANA, p-ANCA, c-ANCA, SMA, LKM, SLA, Transglutaminase, Hepatitisserologie (A, B ,C), EBV und CMV-Serologie
Weiteres	Glucose

Tabelle 1: Labordiagnostik: Dargestellt sind die jeweils bestimmten Laborwerte. GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GGT: Gamma-Glutamyl-Transferase, AP: Alkalische Phosphatase, CHE: Cholinesterase, INR: International Normalized Ratio, ANA: Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper, p-ANCA: Perinukleäre Antikörper, c-ANCA: Cytoplasmatische Antikörper, SMA: Glatte-Muskulatur-Antikörper, LKM: Leber-Nieren-Mikrosomen-Antikörper, SLA: Lösliches Leberantigen-Antikörper, EBV: Epstein-Barr-Virus, CMV: Cytomegalievirus

3.3 Genetische Diagnostik

Bei allen Patienten erfolgte eine Genotypisierung bezüglich folgender Varianten im *ATP8B1*- und *ABCB11*-Gen: *ABCB11* p.D482G (c.1571C>T), *ABCB11* p.E297G (c.1330 A>C), *ABCB11* p.R698H (c.2093G>A), *ATP8B1* p.N45T (c.178A>C) und *ATP8B1* p.I661T (c.1982T>C).

Zusätzlich wurde bei einem Teil der Patienten ein Next Generation Sequencing (NGS), welches *ATP8B1* und *ABCB11* beinhaltet, durchgeführt.

Die Durchführung der genetischen Diagnostik erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor von Prof. F. Lammert, ehem. Direktor der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes.

3.3.1 Allelische Diskriminierung

3.3.1.1 Geräte und Lösungen

Geräte	<ul style="list-style-type: none"> TaqMan® Real Time Polymerase Kettenreaktion (PCR) 7500 (Applied)
--------	--

	Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) <ul style="list-style-type: none"> • Tischzentrifuge (Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) • Plattenzentrifuge (Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) • Diverse Kolbenhubpipetten (Eppendorf Research variable, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) • PCR-Platten und Verschlussfolien • Aerosolgeschützte Pipettenspitzen
Reagenzien	<ul style="list-style-type: none"> • TaqMan® GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
Lösungen	<ul style="list-style-type: none"> • Steriles Wasser • Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)- Puffer (Eigenname: Low-TE Puffer) steril filtriert • Primer und Sonden in einer Gebrauchskonzentration von 10µM in Low-TE Puffer angesetzt

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Lösungen

3.3.1.2 Reagenzien

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
2xGenotyping Mastermix	1x	2,5
40xGenotyping Assay	1x	0,125
DNA	20-100ng	1,0
Steriles Wasser		1,375
2xGenotyping Mastermix	1x	2,5
20xGenotyping Assay	1x	0,25
DNA	20-100ng	1,0
Steriles Wasser		1,25

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

3.3.1.3 Assays – Primer und Sonden

Zur Bestimmung der *ATP8B1*- und *ABCB11*-Varianten wurden kommerzielle Primer und Sonden verwendet (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

ABCB11 p.D482G (c.1571C>T), 20x
 Assay ID: C__16182459_10
 rs72549402

Sequenz [VIC/FAM]	GTTAAGAGAGCGAATGTCATGGCCA[C/T]CCAC GGTCACCTAGAGAGCATGGGC
----------------------	---

Allel 1 = VIC = CC = Mutation

Allel 2 = FAM = TT = Wildtyp

ATP8B1 p. I661T (c.1982 T>C), 40x

Assay ID: C__2397663_10

rs28939686

Sequenz [VIC/FAM]	CCATTCTGTAAATTCTTTTTCTTCA[A/G]TTTCCTTG TAGCAAAGGCATAGGGT
----------------------	---

Allel 1 = VIC = TT = Wildtyp

Allel 2 = FAM = CC = Mutation

ATP8B1 p. E429A (c.1330 A>C), 40x

Assay-ID: C__25935753_10

rs34018205

[VIC/FAM]	TCTAGCTTTTGCGGGTGTGTCCTTC[G/T]CAGCATAGTACATTTG CAGGTCCCA
-----------	---

Allel 1 = VIC = AA = Mutation

Allel 2 = FAM = CC = Wildtyp

ATB8B1 p.R952Q (c.2975 G>A), 40x

Assay-ID: C__25936569_10

rs12068116

Sequenz [VIC/FAM]	GGCAAAGTTTTGTAAAAGAAGTAT[C/T]GTAGGA ACTTGACATCCTTATGTA
----------------------	---

Allel 1 = VIC = CC = Wildtyp

Allel 2 = FAM = TT = Risiko-Allel

ATB8B1 p.N45T (c.178A>C), 40x

Assay-ID: C__165087110_10

rs146599962

Sequenz [VIC/FAM]	CTCCTCTGCTTCCTGTTGACTCGG[G/T]TTTGTTCTGGTTCAAC AGCAGACCC
----------------------	--

Allel 1 = VIC = CC = Mutation

Allel 2 = FAM = AA = Wildtyp

3.3.1.4 Genotypisierung der *ABCB11*- und *ATP8B1*-Varianten

Anhand der Methode der allelischen Diskriminierung mittels des TaqMan® Systems (Applied Biosystems) wurde die Genotypisierung der Varianten des *ABCB11*- und *ATP8B1*-Gens durchgeführt. Dafür wurde ein Fragment im Bereich der Mutation mit einem spezifischen Primerpaar mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierfür wurde eine Taq-Polymerase benutzt, welche sich durch ihre Hitzebeständigkeit auszeichnet und während der Phase der Erhitzung der PCR nicht denaturiert (LAWYER et al., 1993). Im Verlauf der PCR wird der PCR-Primer mit der Taq-Polymerase verlängert. Anschließend wird das PCR-Produkt mittels zweier Oligonukleotid-Sonden (VIC/FAM) fluorometrisch nachgewiesen, wobei je eine Sonde spezifisch für ein Allel ist. Die Sonden tragen zwei Fluorochrome, jeweils einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende (VIC oder FAM) und einen non-fluorescent Quencher, welcher die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs unterdrückt, am 3'-Ende. Die Sonde wird während der PCR eingebaut.

Noch während der Polymerisation wurden die Sonden durch die Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten, wodurch der fluoreszierende Farbstoff vom Quencher (MGB®) getrennt

wurde. Durch diese räumliche Trennung kann nun eine farbstoffspezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden. Am Ende der Reaktion wird die Endfluoreszenz gemessen. Über die beiden Sonden lässt sich anhand der amplifizierten Menge feststellen, welches Allel vorlag, respektive welche DNA-Probe beide Allele trug.

3.3.1.5 PCR-Prozess

Schritt	Temperatur/Zeit
Pre Read (Messung der Ausgangsfluoreszenz)	25°C/1min
Aktivierung AmpliTaq Gold	95°C/20sec
Amplifikation	95°C/3sec
Amplifikation 30 Zyklen	60°C/30sec
Post Read (Messung der End-Fluoreszenz)	25°C/1min

Tabelle 4: Ablauf des Prozesses mit Angabe der Einstellungen für Temperatur und Zeit

3.3.1.6 Analyse

Die Analyse erfolgte über die automatische Auswertung der 7500 Fast 2.0.4 Software.

Pro Ansatz wurden 90 Patienten für ein Nukleotid getestet. Zusätzlich wurden pro Genotyp eine Positivkontrolle (insgesamt drei), sowie drei Wasserproben getestet.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Durchlaufs. Diejenigen, bei denen fluometrisch nach Beendigung der Reaktion eine Aktivität der FAM-Sonde gemessen werden konnte, sind blau markiert. Rot markiert sind diejenigen, die eine Aktivität der VIC-Sonde zeigten und mit grün sind

diejenigen Proben markiert, bei denen bei beiden Sonden eine Aktivität feststellbar war (heterozygot). Ob FAM bzw. VIC den Wildtyp oder die Mutante beschreibt, ist für jede Variante unterschiedlich und pro Assay festgelegt.

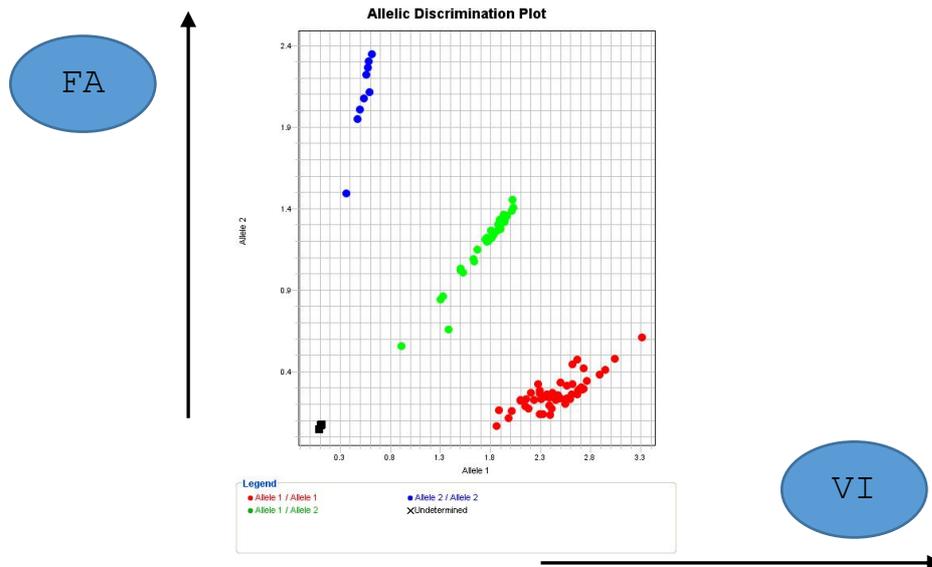


Abbildung 3: Plot einer allelischen Diskriminierung

3.3.2 Next Generation Sequencing

Das Next Generation Sequencing (NGS), welches *ATP8B1* und *ABCB11* beinhaltet, wurde in Kooperation mit dem Genetik Labor Saar und PD Dr. Roman Liebe durchgeführt. Benutzt wurde das Illumina Sure Select^{XT} Target Modell (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA).

3.4 Charakterisierung der Cholestaseschübe

Neben den unter 3.1 beschriebenen klinischen Parametern wurde der zeitliche Verlauf und mögliche Auslöser der Cholestaseschübe und der Verlauf der Laborparameter erfasst.

Das Ende eines Schubes wurde durch eine Normalisierung des Bilirubins definiert. Wenn Patienten bei klinischer Besserung und fallenden laborchemischen Cholestaseparametern extern weiterbetreut wurden, erfolgte die Durchsicht der externen Patientendokumentation, sofern vorhanden, zur Dokumentation des Schubverlaufs-/endes.

3.5 Histologie

Bei einem Teil der untersuchten Patienten wurde mittels Leberblindpunktion ein Leberstanzzyylinder gewonnen. Die Auswertung der Leberbiopsie erfolgte nicht standardisiert durch verschiedene Pathologen.

3.6 Ermittlung der Leberfibrose

Die bei einer cholestatischen Hepatopathie mögliche Fibroseentwicklung wurde bei einem Teil der Patientin im Rahmen der Leberbiopsie ermittelt. Als nicht-invasive Untersuchungsmethode zur Abschätzung der Leberfibrose wurde bei einem Teil des Kollektivs die transiente Elastographie angewandt. Diese Methode ist in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikum des

Saarlandes gut etabliert und erfolgt mittels FibroScan 502 touch (Echosens, Paris) nach Empfehlung des Herstellers und Standardkriterien (EASL, 2015).

3.7 Statistische Analyse

Zur primären Datenerfassung wurde Microsoft Excel 2016 für Mac verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS Statistics (Version 24 für Mac). Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden Mittelwert, Median, Minimum und Maximum erhoben. Die Normalverteilung der Daten wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests in Zusammenschau mit dem Shapiro-Wilk-Test hin überprüft. Hierbei wurde für die Nullhypothese (H_0) angenommen, dass die getestete Variable aus der normalverteilten Grundgesamtheit stammt. Bei $p < 0,05$ wurde H_0 abgelehnt.

Bei normalverteilten Daten wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt.

Bei der Mehrheit der Daten lag jedoch keine Normalverteilung vor, sodass der Mann-Whitney-U-Test angewandt wurde. Die Häufigkeitsunterschiede von Merkmalen wurden mittels Chi-Quadrat-Test untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Bei 39 der 970 Patienten, welche aufgrund eines unklaren Cholestase-Schubes untersucht wurden, konnte in der genetischen Diagnostik eine pathogene Mutation im *ATP8B1*- und/oder *ABCB11*-Gen nachgewiesen werden. Bei zehn dieser Patienten fanden sich in der weiteren Diagnostik zusätzlich eine andere mögliche Ursache der Cholestase (PBC, Autoimmunhepatitis, mechanische Cholestase, akute EBV-Infektion, akutes Leberversagen) oder eine mangelnde Datenlage, sodass diese Patienten nicht in die Kohorte aufgenommen wurden. Insgesamt wurden somit 29 Patienten mit Cholestase-Schub und Nachweis einer Mutation im *ATP8B1*- oder *ABCB11*-Gen in die Kohorte aufgenommen. Es fanden sich acht Patienten mit einer *ABCB11*-Mutation und 21 Patienten mit einer *ATP8B1*-Mutation. Bei zwei Patienten mit *ABCB11*-Mutation lag zusätzlich auch noch eine *ATP8B1*-Mutation vor, diese Patienten wurden in die *ABCB11*-Kohorte eingeschlossen. Bis auf zwei Brüder in der *ABCB11*-Kohorte waren die Patienten nicht miteinander verwandt. Alle Patienten waren kaukasischer Abstammung.

4.1.1 Geschlechterverteilung

In der *ATP8B1*-Subgruppe von insgesamt 21 Patienten fanden sich 16 Frauen (76,2%) und fünf Männer (23,8%). Dagegen fanden sich in der *ABCB11*-Subgruppe sechs Männer (75%) und zwei Frauen (25%).

4.1.2 Alter bei Diagnosestellung

Als Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde der Zeitpunkt der genetischen Diagnostik herangezogen. Das mediane Lebensalter bei Diagnosestellung betrug in der *ATP8B1*-Kohorte 49 Jahre (Spannweite 18 – 85 Jahre), in der *ABCB11*-Kohorte lag es bei 26,5 Jahren (Spannweite 20 – 82 Jahre). Der Unterschied zwischen *ATP8B1*- und *ABCB11*-Kohorte war nicht signifikant ($p=0,158$). Der Zeitrahmen zwischen Auftreten der ersten Symptome und Durchführung der genetischen Diagnostik lag bei der *ATP8B1*-Kohorte im Median bei 19 Wochen (Spannweite 2 – 1329 Wochen) und in der *ABCB11*-Kohorte im Median bei 27 Wochen (Spannweite 4 – 1179 Wochen). Dieser Unterschied zwischen *ATP8B1*- und *ABCB11*-Kohorte war nicht signifikant ($p=0,862$). Hierzu ist anzumerken, dass bei Patienten mit erstmaligem Auftreten der Cholestaseschübe vor längerer Zeit die genetische Diagnostik noch nicht in dem Maße etabliert war wie heutzutage, sodass die Diagnosestellung erst verzögert erfolgte.

4.2 Klinische Präsentation

Die in unsere Kohorte aufgenommenen Patienten stellten sich mit Cholestaseschüben vor, in der Mehrzahl der Fälle gingen diese mit einem klinischen Ikterus und Pruritus einher.

4.2.1 Klinische Symptome der Cholestaseschübe

Patienten mit *ATP8B1*-Mutation

Es stellten sich 11 Patienten mit Ikterus vor (52,4%), davon berichteten sieben Patienten (33,3%) zusätzlich über Pruritus. Ein Patient (4,7%) berichtete von Juckreiz vor allem an Händen und Füßen. Zwei Patienten (9,5%) wiesen acholischen Stuhl auf.

Patienten mit *ABCB11*-Mutationen

Bei allen acht Patienten mit *ABCB11*-Mutation kam es zum Auftreten eines klinischen Ikterus während der Schubsymptomatik. Pruritus kam bei sieben Patienten (87,5%) vor. Im Rahmen des Schubes berichtete ein Patient (12,5%) über acholischen Stuhl.

Vergleich der Symptome von Patienten mit *ATP8B1*- und *ABCB11*-Mutation

Ikterus und Pruritus, sowie die Kombination aus beiden Symptomen kamen bei Patienten mit *ABCB11*-Mutationen häufiger vor als bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutation. Dieser Unterschied war für Ikterus ($p= 0,054$) nicht signifikant. Für Pruritus ($p=0,04$) und die Kombination aus beiden Symptomen ($p= 0,021$) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Unterschiede wurden mittels Chi-Quadrat-Test berechnet.

4.2.2 Dauer der Cholestaseschübe

Bei insgesamt zwölf Patienten konnte das Ende des Schubes und somit die Schubdauer bestimmt werden. Die Dauer der Schübe war variabel und lag zwischen zehn bis 52 Wochen.

Bei den vier Patienten mit *ABCB11*-Mutation bei denen die Schubdauer bestimmt werden konnte, war der Median der Schubdauer 12 Wochen (Spannweite 10 – 13 Wochen) und bei den acht Patienten mit *ATP8B1*-Mutation waren es 15,5 Wochen (Spannweite 10 – 52 Wochen). Ein Patient der *ATP8B1*-Kohorte wies zwei Schübe auf mit 14 bzw. 52 Wochen Dauer.

Bei acht von 12 Patienten mit bekannter Schubdauer (66,7%) dauerte mindestens ein Schub länger als 12 Wochen, davon gehörten sieben (77,8%) zur *ATP8B1*-Kohorte.

Die Daten sind in der Tabelle im Anhang dargestellt.

4.2.3 Auslöser der Cholestaseschübe

Bei insgesamt neun Patienten (31%) konnte ein möglicher Auslöser der Schübe eruiert werden.

In der Gruppe von Patienten mit Mutation im *ABCB11*-Gen konnte bei drei der Patienten (37,5%) ein Auslöser eruiert werden. In einem Fall war es ein androgenes Steroid (M-Drol), welches zum Muskelaufbau von einem „Bodybuilder“ verwendet wurde. Ein Schub wurde durch eine hormonelle in-vitro-Fertilisation-Vorbereitung getriggert. Bei einem weiteren Patienten wurde der Cholestaseschub durch die endoskopische Entfernung eines obstruktiven Gallensteins aus dem Ductus hepaticus communis ausgelöst. Nach endoskopischer Steinextraktion trat ein prolongierter Ikterus auf.

Bei sechs der Patienten (28,6%) mit *ATP8B1*-Mutation konnte ein Auslöser des Schubes festgestellt werden. In einem Fall war es ein orales Kontrazeptivum, in einem weiteren Fall eine Hormonspirale. Bei zwei Patienten war eine Virushepatitis der Auslöser, ein Mal eine Hepatitis A, ein weiteres Mal eine Hepatitis E Infektion. Eine Patientin erlitt einen Schub nach einem Infekt, welcher mit einem penicillinhaltigen Kombinationspräparat behandelt wurde. In einem weiteren Fall konnte eine offene Cholecystektomie mit Einlage einer Gallengangs-/T-Drainage als Triggerfaktor für einen prolongierten Ikterus nach dem Eingriff eruiert werden.

4.2.4 Häufigkeit von Cholestaseschüben

In der *ABCB11*-Kohorte konnte bei sieben Patienten (87,5%) die Anzahl der Schübe bestimmt werden. Dabei traten die Schübe bei fünf Patienten ein einziges Mal auf, ein Patient hatte vier Schübe erlebt und bei einem Patienten waren 16 Schübe aufgetreten. Bei Patienten in der *ATP8B1*-Subgruppe konnte die Anzahl der Schübe bei 14 Patienten (66,7%) bestimmt werden. Hierbei war bei 9 Patienten ein einzelner Schub aufgetreten, bei vier Patienten waren es zwei Schübe und bei einem Patienten fünf Schübe im untersuchten Zeitraum.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p=0,967$).

Bei den Patienten ohne definierte Schubanzahl lagen für diese Bestimmung nicht genügend Daten vor. Bei diesen Patienten wird von mindestens einem Schub ausgegangen, in die Berechnungen wurden diese Patienten nicht aufgenommen.

4.2.5 Verlauf der Cholestaseschübe und Hepatopathie

Hinsichtlich der Dauer und Häufigkeit der Cholestaseschübe wird auch auf Kapitel 4.2.2 bzw. 4.2.4 verwiesen.

Patienten mit *ATP8B1*-Mutation

Bei einem Teil der Patienten der *ATP8B1*-Kohorte wurde ein rezidivierender Schub beschrieben, eine Progression zu einem schwerwiegenden Leberparenchymschaden bis hin zu einer Leberzirrhose im Sinne einer PFIC trat bei keinem Patienten auf.

Patienten mit *ABCB11*-Mutation

Bei 7 von 8 Patienten konnte die Anzahl der Schübe ermittelt werden. Fünf Patienten (62,5%) hatten nur einen Cholestaseschub entwickelt. Bei zwei Patienten (25%) traten mehrere Schübe auf. Bei Patient 4 traten bis zum 3. Lebensjahr jährliche Schübe auf, sistierten zwischen dem 3. und 13. Lebensjahr, um dann wieder jährlich aufzutreten. Dieser Patient entwickelte im Verlauf eine Leberzirrhose, welche im Alter von 25 Jahren eine orthotope Lebertransplantation notwendig machte. Bei seinem Bruder (Patient 3) fiel im Rahmen der U3-Untersuchung ein prolongierter Ikterus auf, allerdings traten erst 12 Jahre später wieder Symptome einer Cholestase auf. Auch bei diesem Patienten wurde ein Leberparenchymschaden beschrieben. Bildgebend zeigte sich in der zuletzt durchgeführten Sonographie ein „hepatomegaler Leberparenchymschaden mit Umbauzeichen“. Die Lebersteifigkeitsmessung mittels transientser Elastographie (Fibroscan©) ergab einen deutlich erhöhten Wert (22,3 kPa), welcher mit dem Vorliegen einer Leberzirrhose vereinbar wäre. Eine Leberbiopsie wurde bisher nicht durchgeführt. Aufgrund der Entwicklung eines relevanten Leberparenchymschadens kann bei den beiden Brüdern eine sich im Verlauf entwickelnde PFIC beschrieben werden, nachdem initial nur das klinische Bild einer BRIC vorlag.

Vergleich der Patientengruppen mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation

In beiden Kohorten zeigte der Großteil der Patienten nur einen singulären Schub. Zwei Patienten (Brüder) mit rezidivierenden Schüben in der *ABCB11*-Kohorte entwickelten eine Leberzirrhose, bei einem dieser Patienten erfolgte eine Lebertransplantation. Bei den Patienten mit *ATP8B1*-Mutation wurde in keinem Fall, auch nicht bei rezidivierenden Schüben, eine Leberzirrhose beobachtet.

4.2.6 Weitere klinische Parameter

Hepatomegalie

Bei fünf der insgesamt 29 Patienten (17,2%) ließ sich eine Hepatomegalie feststellen. Davon war bei vier Patienten eine Mutation im *ATP8B1*-Gen festzustellen, bei einem Patienten eine Mutation im *ABCB11*-Gen.

Splenomegalie

Bei sieben der 29 Patienten (24,1%) fiel bildmorphologisch eine Splenomegalie auf. Davon waren vier Patienten mit *ABCB11*-Mutationen und drei Patienten mit *ATP8B1*-Mutationen betroffen.

4.2.7 Extrahepatische Manifestation bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutation

Bei den Patienten mit Cholestaseschub und *ATP8B1*-Mutation fanden sich keine der extrahepatischen Manifestationen wie Malabsorption, Taubheit oder Pankreatitis, welche bei Patienten mit PFIC1 in der Literatur beschrieben wurden.

4.3 Laborchemische Charakteristika

Die Einzelwerte der Patienten sind in Tabelle 20 und 21 aufgeführt.

4.3.1 Patienten mit *ABCB11*-Mutation

Im Rahmen eines Cholestaseschubes war bei allen acht Patienten mit *ABCB11*-Mutation das Bilirubin und die AP erhöht, die GPT und GOT bei jeweils sieben Patienten (87,5%).

Erhöhte GGT-Werte fanden sich nur bei einem Patienten (12,5%). Die maximale mediane GGT lag bei 27 U/l (Spannweite 9 – 109 U/l). Das maximale mediane Bilirubin lag deutlich erhöht bei 24,6 mg/dl (Spannweite 10,1 – 54 mg/dl). Die maximale mediane AP lag bei 267 U/l (Spannweite 109 – 409 U/l). Die maximale mediane GPT wurde mit 130 U/l (Spannweite 14 – 300 U/l) und die maximale mediane GOT mit 109 U/l (Spannweite 30 – 446 U/l) gemessen.

Die Lebersyntheseparameter Quick und Albumin lagen bei allen Patienten im Normbereich.

4.3.2 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation

In der *ATP8B1*-Kohorte mit 21 Patienten konnte eine maximale mediane GPT von 118 U/l (Spannweite 28 - 1361 U/l) und eine maximale mediane GOT von 74 U/l (Spannweite 25 – 593 U/l) gemessen werden. Die maximale mediane GGT lag bei 93 U/l (Spannweite 11 – 985 U/l). Das maximale mediane Bilirubin lag bei 3,4 mg/dl (Spannweite 0,3 – 35,3 mg/dl) und die maximale mediane AP bei 199 U/l (Spannweite 75 – 572 U/l). Bei 11 Patienten (52,4%) mit *ATP8B1*-Mutation war das Bilirubin (52,4%) im Schub erhöht, bei neun Patienten fanden sich Werte innerhalb des Normbereichs (42,9%), bei einem Patienten lagen keine Bilirubin Werte vor. Bei 15

Patienten (71,4%) war die AP während des Cholestaseschubs erhöht, bei 12 Patienten (57,1%) war die Erhöhung der AP > 1,5 ULN der geschlechtsspezifischen Normwerte. Bezüglich der Leberenzyme war die GPT bei 19 Patienten (90,5%) im Schub erhöht, eine relevante Erhöhung > 1,5 ULN fand sich bei 17 Patienten (80,9%). Eine allzeit normwertige GGT fand sich bei drei Patienten (14,3%).

4.3.3 Vergleich der Patientengruppen mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutationen

Bei allen Patienten mit *ABCB11*-Mutation war das Bilirubin erhöht, allerdings nur bei 11 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation (52,4%).

Im Vergleich der Patienten mit *ABCB11*-Mutation mit Patienten mit *ATP8B1*-Mutation war die maximal gemessene GGT in der *ATP8B1*-Kohorte signifikant höher (p=0,001). Das gemessene maximale Bilirubin war in der *ABCB11*-Kohorte statistisch signifikant höher (p=0,008).

Sowohl die Maximalwerte für GOT und GPT waren bei der *ABCB11*-Kohorte höher als bei der *ATP8B1*-Gruppe, dies war statistisch nicht signifikant. Ebenso lagen die Werte für die maximale AP in der *ABCB11*-Kohorte höher als in der *ATP8B1*-Kohorte, wenn auch statistisch nicht signifikant.

Die Laborwerte für beide Gruppen sind in Tabelle 5 dargestellt.

	<i>ABCB11</i> N=8 Median (Spannweite)	<i>ATP8B1</i> N=21 Median (Spannweite)	p-Wert
GOT (U/l)	109 (30 – 446) N=8	74 (25 – 593) N=20	0,258
GPT (U/l)	130 (14 – 300) N=8	118 (28 – 1361) N=21	0,981
GGT (U/l)	27 (9 – 109) N=8	93 (11 – 985) N=21	0,001
Bilirubin (mg/dl)	24,6 (10,1 – 54) N=8	3,46 (0,3 – 35,3) N=20	0,008
AP (U/l)	267 (109 – 409) N=8	199 (75 – 572) N=21	0,139

Tabelle 5: Vergleich der Leberparameter (jeweils Maximalwerte) zwischen Patienten mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10-50 U/l (Männer), GOT 10-35 U/l (Frauen), GOT 10-50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35-104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

4.4 Genetische Diagnostik

Bei der genetischen Untersuchung des *ABCB11*- und *ATP8B1*-Gens wurden verschiedene Mutationen detektiert. Im Falle des *ABCB11*-Gens handelte es sich um die Varianten p.E297G in fünf Fällen, um p.D482G in einem Fall, sowie p.R698H in zwei Fällen (Tab. 6). Bezüglich *ATP8B1* konnten die Varianten p.N45T in 14 Fällen, p.I661T in fünf Fällen, p.D70N in einem Fall und p.K72Qfs*17 in einem Fall festgestellt werden (Tab. 7). Die Variante p.N45T wurde auch bei zwei Patienten mit *ABCB11*-Mutation gefunden, diese beiden Patienten wurden zur *ABCB11*-

Gruppe gezählt, da die *ABCB11*-Variante als pathogener eingeschätzt wurde.

4.4.1 *ABCB11*-Mutationen

Variante p.E297G (c.1330A>C)

In dem untersuchten Kollektiv von acht Patienten mit *ABCB11*-Mutation lag diese Variante in fünf Fällen (62,5%) vor, jeweils heterozygot. Bei zwei dieser fünf Patienten wurde zusätzlich die Mutation p.N45T im *ATP8B1*-Gen festgestellt. Innerhalb der Gruppe mit Variante p.E297G waren zwei Brüder vertreten.

Die Variante p.E297G führt zu einem Austausch der Glutaminsäure (E) an Position 297 durch Glycin (G). Hierdurch kommt es zu einer defekten Faltung und einem Verbleiben des *ABCB11* Proteins im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Dadurch nimmt das Protein nicht an der Golgi vermittelten Glykosylierung teil und wird weniger auf der Plasmamembran exprimiert (MISAWA et al., 2012). Die Funktion von *ABCB11* bleibt per se erhalten (HAYASHI, SUGIYAMA, 2007).

Variante p.D482G (c.1571C>T)

Diese Variante wurde bei einem Patienten in heterozygoter Ausprägung beobachtet.

Asparaginsäure (D) an Position 482 wird durch Glycin (G) ersetzt. Die Funktion bleibt erhalten, allerdings wird es aufgrund eines gestörten Transports von *ABCB11* weniger auf der Zelloberfläche exprimiert, gefolgt von proteosomalem Abbau (HAYASHI, SUGIYAMA, 2007).

Variante p.R698H (c.2093G>A)

In zwei Fällen wurde die Variante p.R698H beobachtet. Diese Patienten sind nicht miteinander verwandt. Durch die Mutation wird im Protein die Aminosäure Arginin (R) an Position 698 durch Histidin (H) ersetzt. Die Krankheitsrelevanz der Mutation ist bisher nicht endgültig geklärt. (DROGE et al., 2017)

Patient	<i>ABCB11</i>-Variante			
	Nukleotidänderung	Proteinänderung	Status	Typ
1	c.1445A>G	p.D482G	Het	Missense
2*	c.890A>G	p.E297G	Het	Missense
3	c.890A>G	p.E297G	Het	Missense
4	c.890A>G	p.E297G	Het	Missense
5	c.890A>G	p.E297G	Het	Missense

6	c.2093G>A	p.R698H	Het	Missense
7	c.2093G>A	p.R698H	Het	Missense
8*	c.890A>G	p.E297G	Het	Missense

Tabelle 6: Patienten mit Mutationen im *ABCB11*-Gen. ABCB11, adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 11; Het: Heterozygot. *: Patienten mit zusätzlicher Variante p.N45T im *ATP8B1*-Gen.

4.4.2 *ATP8B1*-Mutationen

Bei insgesamt 23 Patienten wurden *ATP8B1*-Mutationen gefunden. Die zwei Patienten (Patienten 2 und 8) die zusätzlich eine *ABCB11*-Mutation aufwiesen, wurden der *ABCB11*-Kohorte zugerechnet. Diese beiden Patienten wiesen die p.N45T Mutation im *ATP8B1*-Gen auf. Der *ATP8B1*-Gruppe wurden somit 21 Patienten zugerechnet. Bei den 21 Patienten fanden sich bei 14 Patienten (66,7%) eine p.N45T Mutation und bei fünf Patienten (23,8%) eine p.I661T Mutation (Tab. 7). Im Rahmen der NGS-Diagnostik fanden sich zwei weitere Patienten mit heterozygoter *ATP8B1*-Mutation, wobei ein Patient die Mutation p.D70N aufwies (4,8%) und ein anderer Patient (4,8%) die p.K72Qfs*17-Mutation.

Variante p.N45T (c.178A>C)

Bei untersuchten Individuen konnte in 14 Fällen die Variante p.N45T festgestellt werden, bei 13 Patienten heterozygot, bei einem Patienten homozygot. Hierbei entsteht ein Austausch des Asparagins (N) an Position 45 durch Threonin (T). Die Variante p.N45T wurde bereits im Zusammenhang mit intrahepatischer Schwangerschaftscholestase (intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) beschrieben (PAINTER et al., 2005).

Variante p.I661T (c.1982T>C)

In fünf Fällen (23,8%) konnte diese Mutation nachgewiesen werden, wobei drei homozygot und zwei heterozygot waren. Bei dieser Variante wird das Isoleucin (I) an Position 661 durch Threonin (T) ersetzt. Dadurch ist die Faltung des Proteins beeinträchtigt, sodass der Austritt aus dem Endoplasmatischen Retikulum erschwert wird und das Protein die kanalikuläre Plasmamembran nicht erreichen kann (VAN DER WOERD et al., 2016).

Variante c.208G>A (p.D70N)

Bei einem Fall konnte eine p.D70N Variante gefunden werden. Hierbei wird die Aminosäure Asparaginsäure (D) an Position 70 durch Asparagin (N) ersetzt. Um eine Aussage über den Unterschied der biochemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren treffen zu können, erfolgt eine Bewertung durch den Grantham Score. Der Score bewertet diese Unterschiede mit einem Wert

zwischen 0 und 215. Ein niedriges Score-Ergebnis zeigt an, dass die ursprüngliche Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wurde, die ähnliche biochemische Eigenschaften aufweist. Es wird davon ausgegangen, dass ähnliche Aminosäuren, basierend auf den Eigenschaften wie Zusammensetzung, Polarität und Molekylvolumen, besser toleriert werden als grundsätzlich verschiedene Aminosäuren (SCHULZ et al., 2015).

Bei der Variante p.D70N ist der Grantham Score 23, demnach ist der Unterschied gering.

Eine weitere Möglichkeit, um eine Aussage über die Mutation zu treffen, liegt in der PolyPhen2 Vorhersage (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Sie benutzt Sequenzalignment und strukturelle Vorhersagen, sofern diese vorhanden sind, und berechnet anhand eines lernenden Algorithmus eine Prognose. Die PolyPhen2 Vorhersage bezeichnet die Variante p.D70N als „wahrscheinlich schädigend“ (DROGE et al., 2017; SCHULZ et al., 2015).

Variante p.K72Qfs*17 (Exon3 x.213 dupC)

Bei einem Patienten konnte eine p.K72Qfs*17 Mutation nachgewiesen werden. Diese Mutation führt zu einem Ersatz von Lysin (K) durch Glutamin (Q) an Position 72. Dadurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung ab Aminosäure Nummer 72 und einem Kettenabbruch 17 Aminosäuren weiter. Diese Veränderung führt zum kompletten Ausfall einer Kopie und voraussichtlich zur Haploinsuffizienz von *ATP8B1*.

Patient	<i>ATP8B1</i>-Variante			
	Nukleotidänderung	Proteinänderung	Status	Typ
9	c.1982T>C	p.I661T	Hom	Missense
10	c.1982T>C	p.I661T	Hom	Missense
11	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
12	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
13	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
14	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
15	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
16	c.1982T>C	p.I661T	Hom	Missense
17	c.208G>A	p.D70N	Het	Missense
18	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
19	c.1982T>C	p.I661T	Het	Missense

20	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
21	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
22	Exon3 x.213 dupC	p.K72Qfs*17	Het	Frameshift
23	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
24	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
25	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
26	c.1982T>C	p.I661T	Het	Missense
27	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
28	c.134A>C	p.N45T	Het	Missense
29	c.134A>C	p.N45T	Hom	Missense

Tabelle 7: Patienten mit Mutationen im *ATP8B1*-Gen. *ATP8B1*: ATPase Phospholipid Transporting 8B1; Hom: Homozygot; Het: Heterozygot

4.5 Genotyp-Phänotyp Korrelation

4.5.1 *ABCB11*-Mutationen

4.5.1.1 Klinische Charakteristika

Bei allen Patienten mit *ABCB11*-Mutation trat ein Ikterus im Rahmen eines Schubes auf. Pruritus war bei Patienten mit p.E297G- und p.D428G-Mutation ebenfalls in allen Fällen nachzuweisen, bei der p.R698H-Mutation nur bei einem von zwei Patienten (Tab. 8).

<i>ABCB11</i> -Mutation			
Symptomatik	p.E297G N=5	p.D428G N=1	p.R698H N=2
Ikterus	5 (100%)	1 (100%)	2 (100%)
Pruritus	5 (100%)	1 (100%)	1 (50%)

Tabelle 8: Symptomatik der Cholestaseschübe bei *ABCB11*-Mutationen.

4.5.1.2 Dauer und Anzahl der Cholestaseschübe

Der Patient mit p.D482-Mutation innerhalb des *ABCB11*-Gens wies einen Schub mit 10 Wochen auf. Von den beiden Patienten mit p.R698H-Mutation waren nur Informationen zu einem Patienten vorhanden, dieser hatte einen Schub von 12 Wochen Dauer. Bei den fünf Patienten mit p.E297G-Mutation wiesen drei Patienten (60%) nur einen Schub auf, welche in ihrer Dauer nicht bestimmt werden konnten. Ein Patient erlebte vier Schübe mit einer medianen Dauer von 13 Wochen und bei

einem Patienten konnten 16 Schübe gefunden werden mit einer medianen Dauer von 12 Wochen. Die zwei Patienten mit zusätzlicher Mutation im *ATP8B1*-Gen wiesen jeweils einen Schub auf. Bei der Anzahl und Dauer der Schübe zeigte sich keine Assoziation zu einem bestimmten Genotyp.

Insgesamt zeigten alle 8 Patienten mit *ABCB11*-Mutation einen ikterischen Schubverlauf und es konnten keine klinischen oder laborchemischen Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Genotypen im Schub ermittelt werden. Die Patientenzahl in der Gruppe mit p.D482G und p.R698H Mutation ist allerdings klein, sodass die Aussagekraft hinsichtlich eines Vergleichs der Gruppen limitiert ist.

4.5.1.3 Laborwerte

Im Vergleich der drei detektierten *ABCB11*-Mutationen lag das Bilirubin bei der p.D482G-Mutation am höchsten, wobei sich in dieser Gruppe nur ein Patient befand (Tab. 9 und 10). Zwischen den anderen beiden Varianten p.E297G und p.R698H bestand kein relevanter Unterschied. Die GPT-Werte waren am höchsten bei der p.R698H-Variante. Bei der Verteilung der GGT-Werte zeigte die p.E297G-Mutation die höchsten Werte, ebenso mit der größten Spannweite. Bei den AP-Werten waren die höchsten gemessenen Werte bei der p.D482-Mutation zu finden, gefolgt von der p.E297G-Mutation.

Da sich in zwei Gruppen nur ein bzw. zwei Patienten befanden sind diesbezüglich nur eingeschränkte Aussagen möglich und ein statistischer Vergleich nicht sinnvoll.

Laborwerte (höchster gemessener Wert)				
Patient	Bilirubin [mg/dl]	GPT [U/l]	GGT [U/l]	AP [U/l]
p.D482G				
1	39,5	104	21	287
p.E297G				
2	20,2	14	31	220
3	22,1	258	109	298
4	27,1	157	47	247
5	54	300	36	409
8	10,1	61	10	230
p.R698H				
6	30,5	253	22	403
7	13,4	85	9	109

Tabelle 9: Einzelne Laborparameter der Patienten mit *ABCB11*-Mutation nach Mutation aufgeteilt, angegeben ist der jeweils höchste gemessene Wert. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35

U/l (Frauen), GPT 10–50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 (Männer)

<i>ABCB11</i>-Mutation			
	p.D482G N=1	p.E297G N=5	p.R698H N=2
Bilirubin [mg/dl]	39,5	22,1 (10,1 – 54)	22 (13,4 – 30,5)
GPT [U/l]	104	157 (14 – 300)	169 (85 – 253)
GGT [U/l]	21	36 (10 – 109)	16 (9 – 22)
AP [U/l]	287	247 (220 – 409)	256 (109 – 403)

Tabelle 10: Laborparameter der Patienten mit *ABCB11*-Mutation, nach Mutationen aufgeteilt. Dargestellt sind der Median und Spannweite der höchsten gemessenen Werte. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10–50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 /l (Männer)

Die zwei Patienten, die zusätzlich zu ihrer p.E297G-Mutation im *ABCB11*-Gen eine p.N45T-Mutation im *ATP8B1*-Gen aufwiesen, wurden noch auch als Untergruppe untersucht (Tab. 11).

p.E297G (<i>ABCB11</i>) und p.N45T (<i>ATP8B1</i>) N=2	
Bilirubin [mg/dl]	15,2 (10,1 – 20,2)
GPT [U/l]	38 (14 – 61)
GGT [U/l]	21 (10 – 31)
AP [U/l]	225 (220 – 230)

Tabelle 11: Laborparameter der beiden Patienten mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation, nach Mutationen aufgeteilt. Dargestellt sind der Median und Spannweite der höchsten gemessenen Werte. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10 – 50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

4.5.2 *ATP8B1*-Mutationen

4.5.2.1 Klinische Charakteristika

Bei dem Vergleich der klinischen Symptomatik fanden sich unterschiedliche Ausprägungen, wenn die Patienten nach vorliegender *ATP8B1*-Mutation verglichen wurden (Tab. 12). Während bei allen Patienten (100%) der p.I661T-Mutation ein Ikterus auftrat und bei vier Patienten (80%) Pruritus, war ein Ikterus bei der p.N45T Mutation mit vier Patienten (28,6%) erheblich weniger vorhanden. Die beiden Mutationen p.D70N und p.K72Qfs*17 betrafen nur jeweils einen Patienten, beide wiesen Ikterus und Pruritus auf.

<i>ATP8BI</i> -Mutation				
Symptomatik	p.N45T N=14	p.I661T N=5	p.D70N N=1	p.K72Qfs*17 N=1
Ikterus	4 (28,6%)	5 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Pruritus	2 (14,3%)	4 (80%)	1 (100%)	1 (100%)
Acholischer Stuhl	2 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)

Tabelle 12: Symptomatik der Cholestaseschübe bei Patienten mit *ATP8BI*-Mutationen

Hinsichtlich der Altersverteilung zeigte sich bei p.I661T Mutation ein Median von 42 Jahren (Spannweite 18 – 60 Jahre) zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik, Im Median dauerte es 450 Wochen von Symptombeginn bis zur genetischen Diagnose (Spannweite 39,3 – 1329 Wochen). Bei der p.N45T Mutation zeigt sich ein Altersmedian von 56,4 Jahren (Spannweite 21 – 85 Jahre) zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik. Im Median war die Dauer von Symptombeginn bis zur genetischen Diagnose 19,1 Wochen (2,0 – 630,9 Wochen).

4.5.2.2 Laborwerte

Die Laborparameter für die einzelnen Patienten mit *ATP8BI*-Mutation sind in Tabelle 13 und gruppiert nach vorliegender Genvariante in Tabelle 14 dargestellt.

Laborwerte				
Patient	Bilirubin [mg/dl]	GPT [U/l]	GGT [U/l]	AP [U/l]
p.N45T				
11	0,4	96	69	116
12	0,6	39	66	116
13	16,9	1361	605	199
14	29,9	118	137	353
15	0,4	47	109	75
18	0,3	170	985	114
20	0,5	28	83	76
21	6,9	165	93	242
23	0,4	204	578	233
24	0,5	87	34	77
25	0,6	74	403	154
27	3,8	126	375	454
28		63	181	94

29	0,3	34	137	100
p.I661T				
9	23,4	150	11	281
10	33,8	114	57	572
16	21,5	72	227	336
19	3,1	120	80	260
26	35,3	637	85	213
p.D70N				
17	12,4	317	25	182
p.K72Qfs*17				
22	15,7	301	73	274

Tabelle 13: Individuelle Laborparameter der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation nach Mutation aufgeteilt. Der höchste ermittelte Wert wird angegeben. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10 – 50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

<i>ATP8B1</i>-Mutation				
	p.N45T N=14	p.I661T N=5	p.D70N N=1	p.K72Qfs*17 N=1
Bilirubin [mg/dl]	0,5 (0,3 – 29,9)	23,4 (3,1 – 35,3)	12,4	15,7
GPT [U/l]	92(28 – 1361)	120 (72 – 637)	317	301
GGT [U/l]	137 (34 – 985)	80 (11 – 227)	25	73
AP [U/l]	116 (75 – 454)	281 (213 – 572)	182	274

Tabelle 14: Laborparameter der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation, nach Mutationen gruppiert. Dargestellt sind der Median und Spannweite der höchsten gemessenen Werte. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10 – 50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

Im Vergleich fiel auf, dass Patienten mit p.N45T Mutation mit einem Median von 0,5 mg/dl (Spannweite 0,3 – 29,9 mg/dl) den niedrigsten Bilirubinwert von allen betrachteten Mutationen aufwiesen. Der höchste mediane Bilirubinwert ließ sich bei Patienten mit p.I661T Mutation finden mit 23,4 mg/dl (Spannweite 3,1 – 35,3 mg/dl). Dieser Unterschied des gemessenen Bilirubins zwischen Patienten mit p.N45T- und p.I661T-Mutation war signifikant ($p=0,007$). Patienten mit p.D70N- und p.K72Qfs*17-Mutation lagen zwischen diesen Werten, wobei in jeder Gruppe nur ein Patient war.

Die GPT-Werte waren bei dem Patienten mit p.D70N-Mutation mit 317 U/l am höchsten, gefolgt von dem Patienten mit p.K72Qfs*17-Mutation. Innerhalb der Gruppen mit mehreren Patienten war die GPT bei der p.I661T-Gruppe mit einem Median von 120 U/l (Spannweite 62 – 637 U/l) höher als bei den Patienten innerhalb der p.N45T-Gruppe mit einem Median von 92 U/l (28 – 1361 U/l). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,391$).

Bei der GGT waren die höchsten medianen Werte innerhalb der p.N45T-Gruppe mit 137 U/l (Spannweite 34 – 985 U/l) zu finden, gefolgt von der p.I661T-Gruppe mit einem Median von 80 U/l (Spannweite 11 – 227 U/l). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,107$).

Der Patient mit p.K72Qfs*17-Mutation wies einen diskret erhöhten GGT-Wert von 73 U/l auf, bei dem Patienten mit p.D70N-Mutation war eine normwertige GGT von 25 U/l festzustellen. Eine normwertige GGT wurde bei drei Patienten festgestellt, jeweils ein Mal innerhalb der p.N45T-, p.I661T- und p.D70N-Gruppe.

Die AP war in der p.I66T-Gruppe mit einem Median von 281 U/l (Spannweite 213 – 572 U/l) höher als in der p.N45T-Gruppe mit einem Median 116 U/l (Spannweite 75 – 454 U/l), dieser Unterschied war signifikant ($p= 0,019$).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Patienten mit p.I661T-Mutation im Vergleich zur p.N45T-Gruppe signifikant höhere Bilirubinwerte aufwiesen ($p= 0,007$), das Bilirubin war bei allen 5 Patienten mit p.I661T-Mutation erhöht, in der p.N45T-Gruppe nur bei 4 von 13 Patienten (30,8%) mit vorhandenen Daten.

Bei allen Patienten mit p.I661T-Mutation war die AP erhöht, wohingegen dies nur bei 8 von 14 Patienten (57,1%) der p.N45T-Gruppe der Fall war. Die Patienten mit p.I661T Mutation zeigten signifikant höhere AP-Werte als die Patienten mit p.N45T Mutation ($p=0,019$).

Bei den übrigen Laborparametern gab es zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$). In der p.D70N- und p.K72Qfs*17-Gruppe waren jeweils nur ein Patient, sodass keine statistische Auswertung erfolgte. In beiden Fällen bestand allerdings ein deutlich erhöhtes Bilirubin.

Zusätzlich wurde für die p.N45T-Gruppe untersucht, wie viele Patienten folgende Cholestasekriterien erfüllten: AP und oder GGT > 1,5 über der oberen Norm (ULN). Hierbei wurden die geschlechtsspezifischen Standardwerte des hiesigen Labors angenommen (AP Norm Männer 20 -129 U/l, Norm Frauen 35 – 104 U/l; GGT Norm Männer < 60 U/l, Norm Frauen < 40 U/l). Es zeigte sich bei 13 der 14 Patienten (92,9%) mit p.N45T Mutation eine Erhöhung der GGT über das 1,5-fache des Normwerts. Hinsichtlich der AP zeigte sich bei 5 der 14 Patienten (35,7%) eine Erhöhung über das 1,5fache des Normwerts. Alle Patienten mit AP > 1,5 ULN zeigten gleichzeitig auch eine Erhöhung der GGT > 1,5 ULN.

In der p.I661T-Gruppe lagen alle Patienten über dem 1,5 fachen des Normwerts der AP, allerdings zeigten nur 2 der 5 Patienten (40%) eine Erhöhung der GGT > 1,5 ULN.

Bei den Patienten mit p.I661T-Mutation konnten drei mit homozygoter Mutation und zwei Patienten mit heterozygoter Mutation beobachtet werden. Die Laborwerte waren nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 15).

	p.I661T homozygot N=3	p.I661T heterozygot N=2	p-Wert
Bilirubin [mg/dl]	23,4 (21,5 – 33,8)	19,2 (3,1 – 35,3)	1,0
GPT [U/l]	114 (72 – 150)	378,5 (120 – 637)	0,4
GGT [U/l]	57 (11 – 227)	83 (80 – 85)	1,0
AP [U/l]	336 (281 – 572)	449 (260 – 637)	0,2

Tabelle 15: Laborparameter der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation p.I661T. Dargestellt sind der Median und die Spannweite der höchsten gemessenen Werte. Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10–50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

4.5.2.3 Dauer und Anzahl der Cholestaseschübe

Im Vergleich der Patienten mit p.N45T- und p.I661T-Mutation zeigte sich, dass die Anzahl der Schübe bei Patienten mit p.N45T-Mutation mit einem Median von einem Schub pro Patient geringer war als bei Patienten mit p.I661T-Mutation mit zwei Schüben pro Patient. Zudem war die Schubdauer mit 13,5 Wochen bei p.N45T-Mutation kürzer als bei p.I661T-Mutation mit 16 Wochen (Tab. 16).

	<i>ATP8B1</i>-Mutation			
	p.N45T N=14	p.I661T N=5	p.D70N N=1	p.K72Qfs*17 N=1
Anzahl der Schübe	1 (1 – 2)	2 (1 – 5)	1	1
Schubdauer in Wochen	13,5 (10 – 22)	16 (14 – 52)	22	10

Tabelle 16: Vergleich der Charakteristika der Cholestaseschübe bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutationen. Angegeben ist der Median sowie der Minimal- und Maximalwert

4.6 Histologie der Leberbiopsie mit Fibrosediagnostik

4.6.1 Histologische Ergebnisse der Leberbiopsie

Von den acht Patienten mit *ABCB11*-Mutation waren die Ergebnisse von sechs (75%) Leberstanzbiopsien mit anschließender histologischer Untersuchung vorhanden. Von den 21 Patienten in der *ATP8B1*-Gruppe lagen bei 12 Patienten (57,1%) Leberstanzbiopsien vor. Die Auswertung erfolgte nicht standardisiert durch verschiedene Pathologen.

Cholestase

Die Patienten in der *ABCB11*-Gruppe wiesen in allen Fällen eine histologisch nachweisbare Cholestase auf (6/6) auf und somit häufiger als die Patienten in der *ATP8B1*-Gruppe, bei welchen in 58,3% der Fälle (7/12) histologische eine Cholestase gefunden wurde.

Fibrose

Bei keinem der biopsierten Patienten der *ABCB11*-Gruppe wurde eine alleinige Fibrose gefunden, ein Patient zeigte Zeichen einer gering bis mäßig floriden Leberzirrhose. Bei einem weiteren Patienten ließ sich klinisch die Diagnose einer Leberzirrhose stellen, hier lag allerdings keine Histologie vor.

Im Gegensatz dazu waren in der *ATP8B1*-Gruppe sieben Patienten (58,3%), die Merkmale einer Fibrose aufwiesen. Von den letzteren Patienten zeigten fünf Patienten (5/7, 71,1%) Zeichen einer portalen Fibrose, welche in allen Fällen als gering oder mild bezeichnet wurde. Ein Patient zeigte eine geringgradige perivenuläre/Zone-3-betonte Fibrose, ein weiterer Patient eine minimale septale Fibrose. Die Fibrose bei den Patienten der *ATP8B1*-Gruppe wurde als „leicht“, „geringgradig“ oder „minimal“ beschrieben. Eine fortgeschrittene Fibrose lag in keinem Fall vor.

Zirrhose

Eine Zirrhose wurde histopathologisch bei einem Patienten mit *ABCB11*-Mutation gefunden, bei einem weiteren Patienten ließ sich die klinische Diagnose stellen aufgrund von Sonographie- und Fibroscanbefunden. In der *ATP8B1*-Gruppe wurde histologisch bei keinem Patienten eine Zirrhose nachgewiesen.

Befundung der Leberarchitektur

In der *ABCB11*-Gruppe wurde bei vier Patienten (4/6, 66,7%) eine erhaltene Leberarchitektur beschrieben, bei einem Patienten lag eine gering bis mäßig floride Leberzirrhose vor. Bei einem weiteren Patienten war ein leichter bis mäßiger nicht näher klassifizierter Parenchymschaden zu erkennen.

In der *ATP8B1*-Gruppe wurde bei fünf (5/12, 41,7%) der 12 Biopsien eine erhaltene Leberarchitektur beschrieben. Hinsichtlich der Leberarchitektur wurden jedoch nur die Patienten in die Kohorte aufgenommen, bei denen der Pathologe dieses Merkmal explizit im Befund erwähnt hatte. Dies schließt nicht aus, dass auch noch mehr Fälle mit erhaltener Architektur vorliegen, dies aber im Befundbericht nicht erwähnt wurde.

Gallengangsläsionen

Bezüglich Veränderungen der Gallengänge wurden in der *ABCB11*-Gruppe bei einem Patienten herdförmige Gallengangsproliferate und bei einem weiteren Patienten eine reichliche Regeneration von cholangiozellulären Elementen in der Cytokeratin-7 (CK7)-Färbung beschrieben. Die CK7-

Expression ist hierbei ein sensitiver Marker für Verletzungen des Gallengangsystems und korreliert positiv mit den laborchemischen Cholestaseparametern (BARAKAUSKIENE et al., 2011).

In einem weiteren Fall konnten kleine Galleninfarkte mit diskreten Zeichen aktueller sowie vorangegangener Regenerationsschübe gefunden werden.

In der *ATP8B1*-Gruppe wurden bei einem Patienten chronische cholangitische Veränderungen, in einem Fall eine eosinophile Pericholangitis, und in einem weiteren Fall Proliferationen der Ductuli gefunden.

Entzündliches Infiltrat

Ein entzündliches Infiltrat wurde bei der *ABCB11*-Gruppe bei zwei Patienten (33%) gefunden, in der *ATP8B1*-Gruppe waren es drei Patienten (25%). In der *ABCB11*-Gruppe wurde dabei in zwei Fällen eine portale Entzündung, bei einem dieser Fälle zusätzlich auch periportal entzündliche Infiltrate beschrieben. In der *ATP8B1*-Gruppe waren die entzündlichen Infiltrate bei zwei Patienten portal lokalisiert, bei einem anderen Patienten war die Entzündung unspezifisch verteilt.

4.6.2 Leberfibrose und -zirrhose in Bezug zur *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation

Unter den 6 biopsierten Patienten mit *ABCB11*-Mutation zeigte sich ein Patient, der histologisch eine Zirrhose aufwies. Dieser hatte eine p.E297G Mutation. Bei einem weiteren Patienten ließ sich diese Diagnose klinisch stellen, eine Histologie lag hier jedoch nicht vor, sodass insgesamt zwei Patienten mit p.E297G Mutation mit Zirrhose in unserer Kohorte vorlagen. Diese beiden Patienten sind Brüder.

Innerhalb der Gruppe mit *ATP8B1*-Mutation lagen von den 14 Patienten mit p.N45T-Mutation bei sechs (42,9%) Leberstanzbiopsien vor. Hiervon wiesen drei Patienten (3/6,50%) Fibrosezeichen auf, bei zwei Patienten portal, und bei einem Patienten perizentral septal.

Bei der p.I661T-Mutation lagen bei vier von fünf Patienten (80%) Leberstanzbiopsien vor. Davon zeigten drei Patienten (75%) Zeichen einer Leberfibrose - bei zwei Patienten waren sie portal lokalisiert, bei einem Patienten perivenulär. Der Patient mit p.D70N-Mutation wies weder Zirrhose noch Fibrose auf. Bei der Patientin mit p.K72Qfs*17-Mutation wurde eine geringe portale Fibrose ohne Brückenbildung nachgewiesen. Im Vergleich war in der Gesamtgruppe mit p.N45T-Mutation bei drei von 14 Patienten (21,4%) histologisch eine Fibrose nachweisbar, in der p.I661T-Gruppe bei drei von fünf Patienten (60%). Aufgrund der niedrigen Fallzahl und dem Umstand dass nur bei 42,9% der Patienten mit p.N45T-Mutation eine Leberbiopsie vorlag, hingegen bei 80% der Patienten mit p.I661T-Mutation, erfolgte diesbezüglich keine statistische Testung. Bei keinem der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation wurde eine Leberzirrhose nachgewiesen.

<i>ATP8B1</i> -Mutation				
	p.N45T N=6	p.I661T N=4	p.D70N N=1	p.K72Qfs*17 N=1
Zirrhose	0	0	0	0
Fibrose	3 (50%)	3 (75%)	0	1 (100%)
Portal	2 (33,3 %)	2 (50%)		1 (100%)
Perizentral	0	0		
Perivenulär	0	1 (25%)		
Septal	1 (16,7%)	0		

Tabelle 17: Histologischer Nachweis von Fibrose und Zirrhose bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutation und vorhandener Biopsie

4.6.3 Nicht-invasive Fibrosemessung mittels transienter Elastographie

Bei zwei Patienten der *ABCB11*-Gruppe erfolgte eine nicht-invasive Fibrosemessung mittels transienter Elastographie. Diese ergab jeweils deutlich erhöhte Ergebnisse (22,3 bzw. 22,8 kPa), vereinbar mit einer fortgeschrittenen Zirrhose. Diese beiden Patienten sind Brüder und wiesen eine p.E297G Mutation auf. Bei einem der Brüder wurde histologisch eine Leberzirrhose nachgewiesen und es erfolgte im Verlauf eine orthotope Lebertransplantation. Der gemessene Fibroscan-Wert von 22,8 kPa in diesem Fall fand 3 Jahre vor Transplantation statt und korreliert somit gut mit der nachgewiesenen Zirrhose.

Bei dem zweiten Bruder ist keine Leberhistologie vorhanden, es zeigt sich sonographisch ein hepatomegaler Leberparenchymschaden mit Umbauzeichen. Der deutlich erhöhte Fibroscan-Wert weist auf eine fortgeschrittene Zirrhose hin, sodass der Patient in diese Gruppe zugeteilt wurde.

In der *ATP8B1*-Gruppe waren bei neun Patienten Messergebnisse der transienten Elastographie vorhanden und es zeigte sich ein Median von 6 kPa (Spannweite 3,8 – 17,5 kPa). Innerhalb der *ATP8B1*-Gruppe lag der Median des Fibroscans bei der p.I661T-Mutation bei 4,8 kPa (Spannweite 3,8 – 5,8 kPa) und bei der p.N45T-Mutation bei 6,2 kPa (Spannweite 4,4 – 17,5 kPa). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,222$).

Bei zwei Patienten mit histologisch nachgewiesener Fibrose lagen die Werte des Fibroscans vor. Dabei wurde nicht standardisiert ausgewertet. Bei Patient 21 lag histologisch eine geringe portale Fibrose vor und es wurde ein Wert von 6,5 kPa gemessen. Hierbei war nicht zu eruieren, ob der Wert im Schub bestimmt worden war. Bei Patient 23 war histologisch eine minimal septale Fibrose beschrieben, die Fibroscanmessung ergab einen Wert von 4,5 kPa während eines cholestatischen Schubs. Nur das Ergebnis von Patient 28 wäre mit einer fortgeschrittenen Fibrose vereinbar, allerdings wurde dieser Wert im cholestatischen Schub bestimmt. Daher ist dieser Wert schwer zu interpretieren, da eine Cholestase per se zu erhöhten Ergebnissen der transienten Elastographie führen kann und dann nicht zwingend Ausdruck einer Fibrose ist.

Patient	Gen	Mutation	Fibroscan-Wert [kPa]
3	ABCB11	p.E297G	22,3
4	ABCB11	p.E297G	22,8
9	ATP8B1	p.I661T	3,8
11	ATP8B1	p.N45T	6,0
14	ATP8B1	p.N45T	6,3
15	ATP8B1	p.N45T	6,2
16	ATP8B1	p.I661T	5,8
20	ATP8B1	p.N45T	4,4
21	ATP8B1	p.N45T	6,5
23	ATP8B1	p.N45T	4,5
28	ATP8B1	p.N45T	17,5

Tabelle 18: Fibroscan-Werte der Patienten mit Mutation im *ABCB11*- bzw. *ATP8B1*-Gen

4.7 Vergleich der klinischen und laborchemischen Befunde von Patienten mit der *ABCB11*- Mutation p.D482G oder p.E297G mit der *ATP8B1*-Mutation p.I661T

Die Mutationen p.D482G und p.E297G im *ABCB11*-Gen treten bei über 50% der europäischen Familien mit *ABCB11*-Mangel auf (VAN DER WOERD et al., 2010) und gelten daher als klassische Mutation für PFIC2/BRIC2. Die Mutation p.I661T im *ATP8B1*-Gen stellt eine typische Mutation einer PFIC1/BRIC1 dar, sie wird bei etwa 45% der europäischen Patienten mit einer BRIC1 nachgewiesen (REICHERT et al., 2016). Wir möchten diese daher nachfolgend bezüglich der klinischen und laborchemischen Parameter vergleichen.

Bei sechs Patienten lag eine dieser beiden *ABCB11*-Mutation vor, davon hatten fünf Patienten die p.E297G Mutation. Die p.I661T Mutation wurde bei fünf Patienten der *ATP8B1*-Gruppe nachgewiesen. Auf eine statistische Auswertung wurde bei der niedrigen Anzahl der Patienten pro Gruppe verzichtet.

	<i>ABCB11</i> p.D482G oder p.E297G n= 6	<i>ATP8B1</i> p.I661T p=5
Männlich	83,3% (5)	40% (2)
Weiblich	16,6% (1)	60% (3)
Alter	25,5 Jahre (20 – 82 Jahre)	42 Jahre (18-60 Jahre)
Dauer Cholestaseschübe	12 Wochen (10 – 13 Wochen)	22 Wochen (14 – 52 Wochen)
Häufigkeit Cholestaseschübe	1 (1 – 16)	2 (1 – 5)

Ikterus	6/6 (100%)	5/5 (100%)
Pruritus	6/6 (100%)	4/5 (80%)
Bilirubin [mg/dl]	25 (10 – 54)	23,4 (3,1 – 35,3)
GPT [U/l]	130 (14 – 300)	120 (72 – 637)
GGT [U/l]	34 (10 – 109)	80 (11 – 227)
AP [U/l]	267 (219 – 409)	281 (213 – 572)
Zirrhose	2	0
Fibrose	0	3

Tabelle 19: Vergleich der klinischen und laborchemischen Befunde von Patienten mit der *ABCB11* p.D482G oder p.E297G Mutation oder *ATP8B1* p.I661T Mutation, Normwerte: Bilirubin <1,2 mg/dl, GPT 10-35 U/l (Frauen), GPT 10 – 50 U/l (Männer), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 40 U/l (Frauen), GGT < 60 U/l (Männer), AP 35–104 U/l (Frauen), AP 40 – 129 U/l (Männer)

4.7.1 Geschlecht

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung fiel auf, dass innerhalb der Patienten mit *ABCB11*-Mutationen die Mehrheit männlichen Geschlechts war (83,3%), während in der *ATP8B1*-Gruppe die Frauen die größere Gruppe darstellten (3/5) (Tab.19).

4.7.2 Alter bei Diagnosestellung

Innerhalb der Patientenkohorte mit p.D482G oder p.E297G Mutation wurde ein medianes Alter bei Diagnosestellung von 25,5 Jahren festgestellt (20 – 82 Jahre).

Bei den Patienten mit p.I661T-Mutation war das mediane Alter mit 42 Jahren höher (18 – 60 Jahre) (Tab. 19).

4.7.3 Cholestaseschübe

Im Schub zeigten alle Patienten ein deutlich erhöhtes Bilirubin, dies war zwischen den beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Die GGT war in der *ABCB11*-Gruppe niedriger und lag bei fünf der sechs Patienten im Normbereich, wohingegen dies nur bei einer von fünf Patienten mit *ATP8B1* p.I661T Mutation der Fall war. GPT und AP waren nicht wesentlich unterschiedlich.

Klinisch präsentierten sich alle Patienten mit p.D482G oder p.E297G Mutation innerhalb des *ABCB11*-Gens mit Ikterus und Pruritus. Bei den Patienten mit p.I661T-Mutation wiesen ebenfalls alle Patienten einen Ikterus auf und bei vier Patienten (80%) trat ein Pruritus auf.

Die Daten bezüglich der Dauer der Schübe konnten bei den Patienten mit *ABCB11*-Mutation in der Hälfte der Fälle ermittelt werden. Hierbei lag der Median bei einem Cholestaseschub von 12 Wochen (10 – 13 Wochen). Innerhalb der *ATP8B1* p.I661T Kohorte konnten bei vier Patienten Daten bezüglich der Dauer der Schübe erhoben werden, diese lagen im Median bei 22 Wochen (14 – 52 Wochen).

Die Häufigkeit der Cholestaseschübe lag bei den Patienten mit p.D482G oder p.E297G Mutation im Median bei einem Schub pro Patient (1 – 16 Schübe). Bei Patienten mit der *ATP8B1* p.I661T Mutation lag der Median bei zwei Schüben pro Patient (1 – 5 Schübe) (Tab. 19).

4.7.4 Histologische Leberarchitektur

In der Gruppe mit *ABCB11* p.D482G oder p.E297G Mutation waren die Histologien von vier Patienten vorhanden. Es zeigte sich bei einem Patienten eine Zirrhose und bei keinem Patienten eine Fibrose, bei einem weiteren Patienten konnte die Diagnose einer Zirrhose klinisch gestellt werden.

Innerhalb der p.I661T Kohorte waren vier Histologien der Leber vorhanden, es zeigten sich bei drei Patienten Zeichen einer Fibrose. Die Fibrose war bei zwei Patienten portal anzusiedeln und bei einem Patienten perivenulär. Zeichen der Zirrhose fanden sich hier nicht (Tab. 19).

4.7.5 Genetik

Die untersuchten Mutationen innerhalb des *ABCB11*-Gens, sowohl p.D482G als auch p.E297G lagen in allen Fällen (100%) in einer heterozygoten Variante vor. Die *ATP8B1*-Variante p.I661T lag bei drei Patienten (60%) homozygot vor, bei zwei Patienten wurde eine heterozygote Variante gefunden.

4.8 Therapie

Die meisten Patienten wurden mit UDCA behandelt, zudem wurden verschiedene weitere Medikamente eingesetzt. Aufgrund von inkompletten Verlaufsdaten ist ein Therapieansprechen nicht für alle Fälle zu dokumentieren.

4.8.1 Ursodesoxycholsäure (UDCA)

Insgesamt erhielten 18 von 29 Patienten (62,1%) UDCA in unterschiedlichen Dosierungen, hierbei lag der Median bei 1000mg/Tag (Spannweite 1000 – 1500 mg/Tag). Bei elf dieser 18 Patienten (61%) wurden 1000mg verabreicht, 1500 mg bei fünf Patienten (27,8%). Bei jeweils zwei Patienten (11,1%) wurden 500mg verabreicht. Die alleinige Therapie mit UDCA kam in neun der 18 Fälle (50%) vor und stellte die häufigste Therapieform dar.

4.8.2 Weitere Therapien

Colestyramin

Vier Patienten (13,8%) erhielten Colestyramin. Zwei Patienten nahmen es in Form von Kautabletten ein mit einer Dosis bis zu 4g täglich. Ein Patient nahm morgens 4g Colestyramin ein, bei dem letzten Patienten lagen zur Dosis keine Daten vor.

4-Natriumphenylbutyrat

In einem Fall kam Natriumphenylbutyrat zur Anwendung im Sinne eines „Off-Label-Use“. Hierbei wirkt Natriumphenylbutyrat als chemischer Chaperon, welches für die korrekte Faltung der Proteine sorgt (GONZALES et al., 2015). Der Verlauf unter Therapie konnte nicht dokumentiert werden.

Molecular adsorbens recirculating system (MARS)

Eine Patientin wurde zwei Mal mittels MARS behandelt. MARS stellt ein Leberersatzverfahren dar, bei dem albumingebundene Toxine extrakorporal eliminiert werden können. Das System besteht aus drei Flüssigkeitskomponenten: Ein Blutkreislauf, welcher durch eine spezielle MARS-Membran von einem Albuminkreislauf (600 ml 20%iges Humanalbumin) getrennt wird. Das Albumin nimmt die Toxine auf und kann durch einen Aktivkohle-Filter und einen Ionenaustauscher gereinigt werden, sodass eine gleichmäßige Dialyse gewährleistet wird. Zu den Indikationen von MARS zählt persistierender Pruritus bei Cholestase (SALIBA, 2006). Über die genaue Indikation und das Therapieansprechen lagen keine Daten vor.

Rifampicin

In der untersuchten Kohorte wurde ein Patient mit Rifampicin behandelt, in einer Kombination mit UDCA. Die genaue Dosis und das Ansprechen war nicht zu ermitteln.

Steroide

Bei drei Patienten wurde zusätzlich zur UDCA-Gabe ein Glukocortikoid eingesetzt. In zwei Fällen handelte es sich dabei um Budesonid (Dosis 9mg/d), ein Patient wurde mit Prednison behandelt. Ein Therapieansprechen konnte aufgrund lückenhafter Verlaufsdaten nicht erhoben werden.

Antihistaminika

Zur Therapie des Juckreizes kamen auch Antihistaminika in systemischer (sechs Patienten) und topischer Form (ein Patient) zur Anwendung. Diese umfassten Cetirizin und Dimetinden (jeweils 2 Fälle), Clemastin, und in einem Fall ein nicht weiter bezeichnetes Präparat. Ein Patient erhielt eine topischen Applikation von Dimetinden als Salbe. Das Therapieansprechen wurde nicht systematisch ausgewertet.

4.9 Individuelle Übersicht zu klinischen, laborchemischen und genetischen Befunden der gesamten Kohorte

Die nachfolgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung wichtiger klinischer, laborchemischer und genetischer Befunde für jeden individuellen Patienten der Kohorte.

Pat.	Mutation	Sex	Alter bei Diagnose (Jahre)	Alter bei Erstmanifestation	Ikterus	Pruritus	Anzahl der Schübe	Dauer der Schübe (Median/Range in Wochen)	Trigger	Max. Bilirubin (mg/dl)	Max. GGT (U/l)	Max. AP (U/l)	Letzte Histologie
1	p.D482G	M	25	25	Ja	Ja	1	10	Anaboles Steroid: M-Drol	39,5	21	287	Kanalikuläre Cholestase
2	p.E297G	M	82	82	Ja	Ja	1	n.b.	n.b.	20,2	31	220	Nicht vorhanden
3	p.E297G	M	20	Kurz nach Geburt	Ja	Ja	4	13	n.b.	22,1	109	298	Nicht vorhanden
4	p.E297G	M	22	Kurz nach Geburt	Ja	Ja	16	12 (8 – 16)	n.b.	27,1	47	247	Hepatozytäre Cholestase Geringe bis mäßige Zirrhose
5	p.E297G	M	61	61	Ja	Ja	1	n.b.	Prolongierter Ikterus nach obstruktiver Cholestase durch Stein	54	36	409	Zytoplasmatische und kanalikuläre Cholestase
6	p.R698H	M	48	n.b.	Ja	n.b.	Mind.1	n.b.	n.b.	30,5	22	403	Hepatozytäre Cholestase
7	p.R698H	F	27	27	Ja	Ja	1	12	IVF-Vorbereitung	13,4	9	109	Kanalikuläre Cholestase
8	p.E297G	F	26	25	Ja	Ja	1	n.b.	n.b.	10,1	10	230	Kanalikuläre Cholestase

Tabelle 20: Klinische Charakteristika von Patienten mit *ABCB11* Mutation. Mit n.b. werden die Daten bezeichnet, die nicht bekannt waren. Pat. Patient. Max. Maximalwert. Mind.1: Mindestens ein Cholestaseschub, genaue Schubanzahl nicht eruierbar.

Pat.	Mutation	Sex	Alter bei Diagnose (Jahre)	Alter bei Erstmanifestation	Ikterus	Pruritus	Anzahl der Schübe	Dauer der Schübe (Median/Range in Wochen)	Trigger	Max. Bilirubin (mg/dl)	Max. gGT (U/l)	Max. AP (U/l)	Letzte Histologie
9	p.I661T	F	42	18	Ja	Ja	2	33 (14 – 52)	Orale Kontrazeptiva	23,4	11	281	Portale, lobuläre Hepatitis Cholestase
10	p.I661T	F	18	12	Ja	Ja	2	16	n.b.	33,8	57	572	Intrahepatische Cholestase Geringgradige portale Fibrose Leichte perisinusoidale Fibrose
11	p.N45T	F	29	26	Ja	Ja	2	n.b.	n.b.	0,4	69	116	Chronische cholangitische Veränderungen Portale und periportale Faservermehrung
12	p.N45T	F	21	21	n.b.	n.b.	Mind.1	n.b.	n.b.	0,6	66	116	Nicht vorhanden
13	p.N45T	F	65	65	Ja	Nein	1	n.b.	Hepatitis A	16,9	605	199	Nicht vorhanden
14	p.N45T	M	59	n.b.	Ja	Ja	1	14	Hepatitis E	29,9	137	353	Kanalikuläre Cholestase
15	p.N45T	F	50	n.b.	Nein	Nein	1	n.b.	Hormonspirale	0,4	109	75	Nicht vorhanden
16	p.I661T	M	51	n.b.	Ja	Ja	5	22	n.b.	21,5	227	336	Deutliche Cholestase Geringe portale Fibrose
17	p.D70N	F	29	29	Ja	Ja	1	22	n.b.	12,4	25	182	Hepatozytäre Cholestase
18	p.N45T	M	56	n.b.	Nein	Nein	Mind.1	n.b.	n.b.	0,3	985	114	geringer portale Entzündungsreaktion
19	p.I661T	M	31	31	Ja		1	15	n.b.	3,1	80	260	Kanalikuläre Cholestase Perivikuläre Fibrose
20	p.N45T	F	50	49	Nein	Nein	Mind.1	n.b.	n.b.	0,5	83	76	Nicht vorhanden
21	p.N45T	F	53	n.b.	Ja		1	13	n.b.	6,9	93	242	Gering portale Fibrose Entzündungsinfiltrat
22	p.K72Qfs*17	F	36	36	Ja	Ja	1	10	Infekt/ Penicillinhaltiges Kombinationspräparat	15,7	73	274	Hepatozytäre Cholestase Geringe portale Fibrose Portales Infiltrat
23	p.N45T	F	57	n.b.	n.b.	n.b.	2	n.b.	n.b.	0,4	578	233	Minimal septale Fibrose
24	p.N45T	F	58	58	Nein	Nein	Mind.1	n.b.	n.b.	0,5	34	77	Nicht vorhanden
25	p.N45T	F	85	85	Nein	Nein	Mind.1	n.b.	n.b.	0,6	403	154	Nicht vorhanden
26	p.I661T	F	60	60	Ja	Ja	Mind.1	n.b.	Offene CHE mit Einlage einer Gallengangs-/T-Drainage	35,3	85	213	Nicht vorhanden
27	p.N45T	M	29	29	n.b.	n.b.	1	n.b.	n.b.	3,8	375	454	Ductulus-Proliferationen Milde portale Fibrose
28	p.N45T	F	74	74	Nein	n.b.	Mind.1	n.b.	n.b.	n.b.	181	94	Nicht vorhanden
29	p.N45T	F	68	68	n.b.	n.b.	1	n.b.	n.b.	0,3	137	100	Nicht vorhanden

Tabelle 21: Klinische Charakteristika von Patienten mit *ATP8B1* Mutation. Mit n.b. werden die Daten bezeichnet, die nicht bekannt waren. Pat.: Patient. Max.: Maximalwert. Mind.1: Mindestens ein Cholestaseschub, genaue Schubanzahl nicht eruierbar.

5 Diskussion

Mutationen der hepatokanalikulären Transporter *ATP8B1* und *ABCB11* sind als Ursache der chronischen und meist rasch progredienten cholestatischen Lebererkrankung PFIC bei Kindern gut etabliert. Bereits im frühen Kindesalter führt diese häufig zur Leberzirrhose und der Notwendigkeit einer Lebertransplantation. Bei Erwachsenen wurden *ATP8B1*- und *ABCB11*-Genvarianten als Hintergrund des Cholestasesyndroms BRIC beschrieben, klinische und genetische Informationen sind in dieser Patientengruppe allerdings nur eingeschränkt vorhanden. In der vorliegenden Arbeit haben wir daher eine retrospektive Analyse von erwachsenen Patienten mit unklarer Cholestase, die in der genetischen Diagnostik eine pathogene Mutation im *ABCB11* oder *ATP8B1* Gen aufwiesen, durchgeführt.

5.1 Patientenkohorte

Durch die Genotypisierung von 970 erwachsenen Patienten mit unklarer Cholestase wurden 29 Patienten identifiziert, davon 21 mit *ATP8B1*-Mutation und acht mit *ABCB11*-Mutation, die in unsere Kohorte eingeschlossen wurden. Die Patienten waren, bis auf zwei Brüder mit *ABCB11*-Mutation, nicht miteinander verwandt. Bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutation fanden sich mehr Frauen (76,2%), bei *ABCB11*-Mutation mehr Männer (75%). Die Patienten mit *ATP8B1*-Mutation wurden in höherem Lebensalter diagnostiziert (Median 51 Jahre) als Patienten mit *ABCB11*-Mutation (Median 26,5 Jahre), wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war.

Bei Erwachsenen sind Cholestasesyndrome aufgrund von Mutationen im *ATP8B1*- oder *ABCB11*-Gen nur in Fallberichten und wenigen Kohorten beschrieben. In einer ersten größeren Serie, in der Familien mit PFIC und BRIC hinsichtlich pathogener *ATP8B1*-Mutationen untersucht wurden, fanden sich bei 20 von 50 Familien mit klinischem Auftreten von BRIC, Mutationen im *ATP8B1* Gen, insbesondere die Variante p.I661T (KLOMP et al., 2004). In einer Folgearbeit an 20 Familien mit BRIC und Ausschluss einer *ATP8B1*-Mutation konnten 8 unterschiedliche *ABCB11*-Mutationen bei 11 Patienten aus insgesamt 8 Familien nachgewiesen werden (VAN MIL et al., 2004). Aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes wurde vorgeschlagen, bei Nachweis einer *ABCB11*-Mutation von BRIC Typ 2 zu sprechen und bei *ATP8B1*-Mutation von BRIC Typ 1 (VAN MIL et al., 2004)(VAN MIL et al., 2004).

Dröge et al. untersuchten 427 Patienten, welche sich mit Cholestase unterschiedlicher Ausprägung vorgestellt hatten und bei denen ein Verdacht auf eine genetisch bedingte Ursache bestand. Die Patienten wurden hinsichtlich der *ATP8B1*-, *ABCB11*- und *ABCB4*-Gene sequenziert und, sofern vorhanden, wurden die erstgradigen Verwandten ebenfalls genetisch untersucht. In der Analyse der 427 Patienten ließen sich 154 verschiedene genetische Varianten bei 149 Patienten finden. Die

Mehrheit (82,6%) der Patienten war bei Beginn der Symptome weniger als 18 Jahre alt, 6 Patienten mit *ATP8B1*- und 16 Patienten mit *ABCB11*-Mutation waren erwachsen (DROGE et al., 2017).

In einer Arbeit von Nayagam et al. wurden 356 erwachsene Patienten mit Lebererkrankungen bei *ABCB4*-, *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutationen untersucht, davon wiesen 101 Patienten eine Mutation in einem der genannten Gene auf. Insgesamt konnten 35 Patienten mit *ABCB11*-Mutation und 28 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation identifiziert werden, allerdings wurden Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen untersucht und es erfolgte kein dezidierter Ausschluss wie in dieser Arbeit (NAYAGAM et al., 2022).

In einer Arbeit von Vitale et al. wurden insgesamt 108 Patienten zwischen Mai 2013 und November 2016 im Alter über 6 Jahre mit unklarer Cholestase untersucht und davon 48 genetisch analysiert. Bei zehn Patienten konnten insgesamt 13 pathogene Mutationen gefunden werden, zwei im *ATP8B1*-Gen, sechs im *ABCB11*-Gen, zwei im *ABCB4*-Gen, drei im *TJP2*-Gen.

Zusätzlich zu diesen Kohortenuntersuchungen existieren eine Reihe von Fallbeschreibungen von Erwachsenen mit BRIC, wie von Ermis et al. (ERMIS et al., 2010), Folvik et al. (FOLVIK et al., 2012), Piazzolla et al. (PIAZZOLLA et al., 2020), Lorio et al. (ARTHUR LORIO et al., 2020). Aktuellere Fallberichte existieren von Bing et al. (BING et al., 2022), Suzuki et al. (SUZUKI et al., 2022) und Miura et al. (MIURA et al., 2022).

In Anbetracht der Seltenheit der Erkrankung und eingeschränkten Datenlage, kann durch unsere Kohortengröße ein relevanter Beitrag zur weiteren Charakterisierung geleistet werden. Nachfolgend werden klinische und genetische Befunde zunächst gesondert für die *ATP8B1*- und *ABCB11*-Gruppe diskutiert und im Anschluss noch die Phänotypen von Patienten mit einer der häufigen pathogenen Variante im *ATP8B1*-Gen (p.I661T) und *ABCB11*-Gen (p.E297G und p.D482G) verglichen.

5.2 Klinische und genetische Charakteristika von Patienten mit Cholestase und *ATP8B1*-Mutation

Von den 21 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation hatten 16 die p.N45T Variante, 5 die p.I661T Variante, und jeweils ein Patient die p.D70N oder p.K72Qfs*17 Variante. In der Gesamtgruppe berichteten nur 11 von 21 Patienten von einem Ikterus (52,4%), davon hatten sieben Patienten auch einen Pruritus.

Wenn man die Gruppen gesondert nach den hauptsächlichen Mutationen betrachtet, ergibt sich ein differenziertes Bild: Bei p.I661T trat bei allen 5 Patienten ein Ikterus und bei vier Patienten zudem ein Pruritus auf. Bei den Patienten mit p.N45T Mutation waren es mit 4 von 14 Patienten (28,6%) mit Ikterus und 2 von 14 Patienten mit Pruritus (14,3%) erheblich weniger.

Auch bei den Laborparametern zeigten sich Unterschiede: Bei den Patienten mit p.I661T Mutation war das maximale Bilirubin mit einem Median von 23,4 mg/dl signifikant höher als bei den

Patienten mit p.N45T Mutation. Eine normwertige GGT wurde nur bei drei Patienten festgestellt, jeweils ein Mal innerhalb der p.N45T-, p.I661T- und p.D70N-Gruppe.

Innerhalb der Gruppe mit p.I661T-Mutation zeigten sich drei Patienten mit homozygoter Mutation und zwei Patienten mit heterozygoter Mutation, hier waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Laborparameter festzustellen. Innerhalb der Gruppe mit p.N45T Mutation waren 13 Patienten heterozygot, ein Patient homozygot.

Insgesamt tritt in unserem Kollektiv eine klinisch klassische BRIC Symptomatik mit Ikterus bei allen Patienten mit einer p.I661T Variante und nur bei 4 von 14 Patienten mit p.N45T Mutation auf.

Auch von Klomp et al. wurde die p.I661T Variante als bei weitem häufigste Ursache bei BRIC1 Patienten beschrieben. Bei Erstdiagnose im Erwachsenenalter kann diese Mutation im *ATP8B1*-Gen sowohl heterozygot als auch homozygot vorliegen (KLOMP et al., 2004). Bei Vitale et al. lagen alle untersuchten *ATP8B1*-Varianten in heterozygoter Ausprägung vor. Es wurden die Varianten p.D1219H, p.R952Q, p.F305I, p.N45T, p.K203E und p.P23L gefunden (VITALE et al., 2018). In der Untersuchung von Dröge et al. stellten sich die Mutationen im *ATP8B1*-Gen bei Patienten über 18 Jahren sowohl heterozygot als auch homozygot dar (DROGE et al., 2017). Die Varianten Mutationen p.I661T und p.N45T wurden bei Dröge et al. nicht untersucht.

Eine homozygote Mutation der häufigen Mutation p.I661T kann somit in Übereinstimmung mit unseren Daten auch erst im Erwachsenenalter manifest werden und führt nicht zwangsläufig zu einer PFIC im Kindesalter. Bei Klomp et al. wurden zudem 4 homozygote Träger der p.I661T Mutation beschrieben, welche ihr gesamtes Leben keine Cholestasesymptomatik zeigten – einer der vier Patienten war der Vater dreier an BRIC erkrankten Kinder (KLOMP et al., 2004). Bei drei Patienten der Fallserie mit erwachsenen Patienten mit BRIC von Folvik et al. konnte wiederum eine homozygote p.I661T Variante als Ursache für ihre Erkrankung eruiert werden (FOLVIK et al., 2012). Insgesamt besteht eine hohe Variabilität der klinischen Phänotypen bei *ATP8B1*-Mutationen, von milder intermittierender nicht progressiver Cholestase bis hin zur PFIC1. Auch bei Vorliegen derselben Variante können unterschiedliche Phänotypen auftreten. Bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung werden eher Nonsense- und Frameshift-Mutationen nachgewiesen, die Proteinexpression oder Proteinfunktion stark beeinflussen. Bei mildereren Verläufen werden eher Missense Mutationen nachgewiesen, möglicherweise aufgrund einer Restaktivität von ATP8B1 (VAN DER WOERD et al., 2010). Die p.I661I Variante ist eine Missense Mutation, mutiertes Protein verbleibt mit variablen Anteil im endoplasmatischen Retikulum und wird daher vermindert auf der Zellmembran exprimiert (VAN DER VELDEN et al., 2010).

Die Schubdauer konnte bei acht Patienten mit *ATP8B1*-Mutation ermittelt werden und lag im Median bei 15,5 Wochen, bei 7 dieser Patienten war sie länger als 12 Wochen. Die Dauer der Cholestaseschübe ist in der Literatur unzureichend beschrieben. In einer retrospektiven Analyse zeigte Halawi et al. eine mittlere Schubdauer des längsten Schubes bei BRIC Patienten von 32 Wochen (HALAWI et al., 2021). Bei Ermis et al. zeigte der Patient mit *ATP8B1*-Mutation anamnestisch zwei Schübe, deren Dauer bei jeweils 2 Monaten lag (ERMIS et al., 2010). In einer Untersuchung von Bing et al. dauerte der Cholestaseschub 16 Wochen (BING et al., 2022).

Mögliche Trigger der Cholestaseschübe konnten in sechs Fällen eruiert werden, hierunter waren orale Kontrazeptiva sowie eine Hormonspirale, dies wurde auch bei de Pagter et al. beobachtet (DE PAGTER et al., 1976). Bei zwei Patienten war eine akute Virushepatitis Auslöser für einen Schub, diese beiden Fälle mit akuter Hepatitis A bzw. Hepatitis E Infektion aus unserer Kohorte wurden bereits als Fallberichte publiziert (KRAWCZYK et al., 2012; ZIMMER et al., 2018). In einem weiteren Fall zeigte sich ein penicillinhaltiges Kombinationspräparat als Auslöser, bisher beschrieben wurde Amoxicillin/Clavulansäure als möglicher Trigger (HALAWI et al., 2021). Noch nicht beschrieben war eine offene Cholecystektomie mit Einlage einer Gallengangs-T-Drainage als Triggerfaktor, welche bei einem Patienten der Auslöser des Cholestaseschubs war. In einer kürzlich publizierten Übersichtsarbeit, welche insgesamt 35 Patienten aus 22 Primärarbeiten einschloss und nach Triggerfaktoren einer BRIC untersuchte, fanden sich in 54,3% Infektionen, gefolgt von hormonalen Ursachen (30%) und Medikamenten (10%) als Auslöser (HALAWI et al., 2021).

Bei 14 Patienten mit *ATP8B1*-Mutation konnte die Häufigkeit der Schübe bestimmt werden, bei 9 Patienten trat nur ein Schub auf, bei vier Patienten waren es zwei Schübe und bei einem Patienten fünf Schübe im untersuchten Zeitraum. Zur Häufigkeit der Cholestaseschübe finden sich in den vorhandenen Literaturdaten nur wenige Informationen. In den älteren Fallserien konnte aufgrund der nicht vorhandenen technischen Gegebenheiten keine Unterscheidung zwischen *ATP8B1*- und *ABCB11*-Mutationen vorgenommen werden. In einer Arbeit von Halawi et al. konnte bei BRIC Patienten im Mittel $5,31 \pm 3,42$ Schübe festgestellt werden, eine Unterscheidung von BRIC 1 und BRIC 2 war hier nicht getroffen worden (HALAWI et al., 2021).

Bei 18 der 29 Patienten (62,1%) erfolgte eine Leberstanzbiopsie, bei sechs Patienten lag eine *ABCB11*-Mutation und bei 12 Patienten eine *ATP8B1*-Mutation vor. Interessanterweise wiesen 7 der 12 (58,3%) untersuchten Leberstanzbiopsien von Patienten mit *ATP8B1*-Mutation Zeichen von Fibrose auf. Die Fibrose wurde als mild beschrieben, in keinem Fall lag eine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose vor. Eine Leberfibrose wurde sowohl bei der p.I661T Variante (3 von 5 Patienten, 60%) als auch bei der p.N45T-Mutation (3 von 14 Patienten, 21,4%) nachgewiesen.

Dieses Ergebnis zeigt das Potenzial der Entwicklung eines chronischen Leberparenchymschadens bei Vorliegen dieser *ATP8B1*-Mutationen im Sinne einer Leberfibrose. Auch in einer Arbeit von van Oothenhem et al. wurde bei 3 von den berichteten 4 Patienten eine Leberfibrose im Verlauf der BRIC-Erkrankung beschrieben (VAN OOTEGHEM et al., 2002). Ebenso kam es bei einer untersuchten Patientin bei Sohn et al. mit *ABCB11*-Mutation p.R1121K zur periportalen Fibrose (SOHN et al., 2019). Bei Van Mil. Et al werden ebenfalls Fälle von milder Fibrose beschrieben, hier lagen die Mutationen *ABCB11* p.R1128H, p.E297G, p.A570T, p.R1050C, p.E186G vor (VAN MIL et al., 2004).

Extrahepatische Symptome, welche bei Patienten mit *PFIC1* beschrieben sind, ließen sich in der Gruppe der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation nicht eruieren.

5.2.1 Charakterisierung der *ATP8B1*-Mutation p.N45T

Die *ATP8B1* p.N45T Variante, die zu einem Austausch des Asparagins (N) an Position 45 durch Threonin (T) führt, ist bisher in der Literatur noch wenig beschrieben. Painter et al. zeigten eine Assoziation zur intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (PAINTER et al., 2005). In der Arbeit von Vitale et al. fand sich eine Patientin mit einer compound Heterozygotie für p.N45T und p.K203E im *ATP8B1*-Gen (VITALE et al., 2018), klinisch wies diese Patientin einen cholestatischen Schub mit normalen GGT-Werten und erhöhten Gallensäuren im Serum auf. Zusätzlich war bei dieser Patientin ein neonataler Ikterus aufgetreten, sowie eine low-phospholipid-associated Cholelithiasis und eine intrahepatische Schwangerschaftscholestase.

In der Arbeit von Matte et al. werden zwei Patienten mit unklarer Cholestase und p.N45T Variante beschrieben, davon ein Kind und ein 26-jähriger Patient. Der Erwachsene wies zusätzlich eine p.I1050K Mutation im *ATP8B1*-Gen auf, laborchemisch zeigte er eine normwertige GGT (MATTE et al., 2010).

In unserer Arbeit wurde die *ATP8B1* p.N45T Variante bei 14 Patienten (66,7%) der *ATP8B1*-Untergruppe nachgewiesen, somit stellt unsere Kohorte die bisher umfangreichste Untersuchung zu dieser Variante dar. Bei der überwiegenden Zahl der Patienten (92,9%) lag diese heterozygot vor. Ein klinischer Ikterus fand sich lediglich bei vier Patienten (28,6%), und auch nur 4 Patienten wiesen ein erhöhtes Bilirubin auf. Dieser geringe Anteil an ikterischen Verläufen zeigt, dass diese Variante in heterozygoter Form meist nicht zu einer klassischen BRIC Symptomatik führt. Die GGT, AP und ALT unterschieden sich im Median nicht von der Gruppe mit p.I661T Mutation, welche einen klassisch ikterischen BRIC-Verlauf zeigte, wobei die GGT nur bei einem von 14 Patienten im Normbereich lag. Die AP war bei 5 von 14 Patienten über der Norm, bei den Patienten mit p.I661T Variante war dies bei allen 5 Patienten der Fall. Bei 6 Patienten mit p.N45T Mutation lagen histologische Ergebnisse der Leberbiopsie vor. Interessanterweise fand sich bei 5 dieser Patienten eine Leberfibrose, diese war meist gering ausgeprägt, eine fortgeschrittene Fibrose

oder Zirrhose fand sich nicht. Auch in der Arbeit von Matte et al. wies ein erwachsener Patient mit p.N45T Mutation in der Leberbiopsie eine portale Fibrose auf (MATTE et al., 2010).

In der nicht-invasiven Fibrosediagnostik mittels Fibroscan fanden sich bei 7 der 8 untersuchten Patienten Ergebnisse ohne Hinweis auf eine fortgeschrittene Fibrose, lediglich bei einem Patienten lag ein deutlich erhöhter Wert vor. Dieser wurde allerdings im Cholestase-Schub ermittelt, sodass nicht geklärt werden kann, ob die Cholestase per se zu diesem erhöhten Wert geführt hat oder tatsächlich eine fortgeschrittene Fibrose vorliegt. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die p.N45T Mutation bei Manifestation der Cholestase im Erwachsenenalter in der Regel in heterozygoter Form nachweisbar ist, meist eine mildere Klinik hervorruft und seltener zu einem ikterischen BRIC Schub führt. Allerdings ist die Entwicklung einer Leberfibrose möglich, sodass die Patienten auch nach Abklingen des cholestatischen Schubes weiter hinsichtlich der Entwicklung eines fortgeschrittenen Leberparenchymschadens eine regelmäßige Nachsorge erhalten sollten.

5.3 Klinische und genetische Charakteristika von Patienten mit Cholestase und *ABCB11*-Mutation

Bei allen 8 untersuchten Patienten mit *ABCB11*-Mutation kam es zu einem Ikterus während des Schubes, welcher meist auch mit Pruritus einherging. Dieses Ergebnis bestätigt diese Varianten als Auslöser einer klassischen BRIC im Erwachsenenalter. Bei 5 Patienten wurde die p.E297G Mutation, einmal p.D482G und zweimal die p.R698H Variante nachgewiesen, jeweils in heterozygoter Form. Die p.D482G oder p.E297G Varianten wurden bei den BRIC Patienten bei Pawlikowska et al. am häufigsten gefunden. (PAWLIKOWSKA et al., 2010). Bei Strautnieks et al. waren p.E297G und/oder p.482G die häufigsten nachgewiesenen Mutationen, sie lagen bei 58% der untersuchten europäischen Familien mit intrahepatischer Cholestase vor (STRAUTNIEKS et al., 2008). Im Vergleich hierzu scheint die Variante p.D482G in unserer Kohorte unterrepräsentiert, allerdings ist die Patientenzahl zu gering, um eine statistische Aussage zu treffen.

Das Alter bei Diagnosestellung lag im Median bei 26,5 Jahren, die Spannweite war aber groß und der älteste Patient wurde im Alter von 82 Jahren diagnostiziert. Auch in der Literatur wird ein Auftreten meist in jüngerem Erwachsenenalter beschrieben, allerdings sind auch Spätmanifestation bekannt (ERMIS et al., 2010). Die Diagnosestellung in dieser Arbeit wurde zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik definiert, diese ist aber nicht unbedingt der Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation. Die Dauer von Auftreten der ersten Symptome und Durchführung der genetischen Diagnostik lag bei der *ATP8B1*-Gruppe im Median bei 19 Wochen (Spannweite 2 – 1329 Wochen) und in der *ABCB11*-Gruppe im Median bei 27 Wochen (Spannweite 4 – 1179) Wochen, die Spannweiten war bei beiden Kohorten groß.

Bei allen Patienten mit *ABCB11*-Mutation lagen deutlich erhöhte Bilirubinwerte vor, auch die AP und ALT waren bei sieben der acht Patienten relevant erhöht (über dem 1,5-fachen der Norm), wohingegen die GGT bei 75% der Patienten im Normbereich lag. Diese Daten sind gut vereinbar mit der in der Literatur für BRIC2 Patienten beschriebenen „low GGT“ Cholestase (FOLVIK et al., 2012).

Die Schubdauer der Patienten mit *ABCB11*-Mutation konnte bei einem Teil der Patienten bestimmt werden und lag im Median bei 12 Wochen. Generell ist die Schubdauer wenig beschrieben, bei Vitale et al. wird die Dauer der Schübe bei einer Patientin mit wenigen Wochen und 20 Tagen angegeben (VITALE et al., 2016), allgemein wird in der Literatur eine Dauer der Episoden von Wochen bis Monaten angegeben. (SRIVASTAVA, 2014), sodass unserer Ergebnisse vergleichbar sind. Halawi et al. fasst in einer Übersichtsarbeit Daten zur Schubdauer zusammen, hier lag die mittlere Schubdauer des längsten Cholestaseschubes bei 32,37 Wochen (3 Monate – 2 Jahre), allerdings wurde hier keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Mutationen getroffen (HALAWI et al., 2021).

Bei den meisten Patienten kam es nur zu einem Cholestaseschub, ein Patient wies zwei Schübe auf und ein Patient hatte 16 Schübe durchlebt. Bei Van Mil et al. werden bei Patienten mit *ABCB11*-Mutation und BRIC 4 – 24 Schüben pro Patient angegeben, sodass möglicherweise bei längerer Nachbeobachtung auch in unserer Kohorte noch Schübe auftreten könnten.

Innerhalb der *ABCB11*-Gruppe ließen sich bei drei Patienten (37,5%) jeweils ein Trigger eruieren. In einem Fall war er im Rahmen der Vorbereitungen zur in-vitro-Fertilisation aufgetreten, wobei die genaue Medikation nicht zu eruieren war. Hormontherapien wie orale Kontrazeptiva sind als Trigger vorbeschrieben. (VITALE et al., 2016). Auch anabole Steroide, wie bei einem unserer Patienten, sind bekannte Auslöser (EL SHERRIF et al., 2013). Noch nicht vorbeschrieben war eine Cholecystektomie als Trigger eines darauffolgenden Cholestaseschubes.

Eine Histologie der Leberstanzbiopsie lag bei 75% der Patienten mit *ABCB11*-Mutation vor. Alle sechs Patienten wiesen Zeichen der Cholestase auf, bei einem Patienten fand sich eine Zirrhose, bei einem weiteren Patienten ließ sich klinisch die Diagnose einer Zirrhose stellen. In der Kohorte von van Mil et al. zeigte sich bei drei Patienten mit *ABCB11*-Mutationen eine milde Fibrose in der Histologie, diese Patienten wiesen die *ABCB11*-Varianten p.R1128H, p.E297G und p.A570T auf (VAN MIL et al., 2004). Vitale et al. (2016) haben eine Patientin mit *ABCB11*-Mutation beobachtet, die mit 20 Jahren den ersten Cholestaseschub erlitten hatte und mit 23 Jahren histologisch eine Fibrose aufwies (VITALE et al., 2016). Ebenso fand sich in der Histologie einer untersuchten Patientin mit *ABCB11*-Mutation bei Sohn et al. Zeichen einer periportalen Fibrose (SOHN et al., 2019). Das Vorhandensein einer Leberfibrose bei Biopsie im Schub ist zwar nicht typisch für eine BRIC2, aber doch in einigen Fällen möglich. Interessant wäre es, den weiteren

Verlauf bei diesen Patienten zu beobachten, da bei zwei weiteren Patienten unserer Kohorte mit heterozygoter p.E297G Mutation bereits eine Zirrhose nachgewiesen wurde. Ein Patient ist einer der beiden eingeschlossenen Brüder bei dem im frühen Lebensalter und dann wieder ab dem 13. Lebensjahr multiple BRIC-Schübe auftraten. Im Verlauf entwickelte sich eine Leberzirrhose, welche im Alter von 25 Jahren eine orthotope Lebertransplantation notwendig machte. Auch bei seinem Bruder wurde wenige Wochen nach Geburt eine Cholestase festgestellt, nach diesem ersten Schub traten erst wieder ab dem 12. Lebensjahr weitere Schübe auf. Bei diesem Patienten liegt keine Histologie vor, in der nicht-invasiven Fibrosediagnostik mittels transientser Elastographie und Sonographie bestehen allerdings Hinweis auf eine Zirrhose. In der Kohorte von van Mil et al. wird ein Patient mit *ABCB11* p.E297G Mutation beschrieben, welcher mit 25 Jahren eine biliäre Fibrose entwickelte (VAN MIL et al., 2004). Auch in der Arbeit von Nayagam et al. wurde bei einem Patienten mit *ABCB11*-Mutation eine fortgeschrittene Leberfibrose festgestellt (NAYAGAM et al., 2022).

Bei den beiden Brüdern unserer Kohorte kann somit die Entwicklung einer PFIC beschrieben werden, nachdem initial nur eine rezidivierende BRIC Symptomatik vorlag. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass eine klare Genotyp-Phänotyp-Zuordnung bei Patienten mit heterozygoter p.E297G Mutation nicht möglich ist. Es finden sich in unserer Untersuchung Patienten, bei denen bei Vorliegen dieser Mutation lediglich ein ikterischer BRIC-Schub aufgetreten ist, auf der anderen Seite ist sogar der Übergang zu PFIC möglich. Auch Davit-Spraul et al. konnten zeigen, dass die Progression von einer BRIC in eine PFIC möglich ist und ein und derselbe Genotyp zu unterschiedlichen Phänotypen führen kann. Bei einem Geschwisterpaar war die Schwester an BRIC2 und der Bruder an PFIC2 erkrankt war, bei beiden lagen die Mutationen *ABCB11* p.M1V und *ABCB11* p.R387H vor (DAVIT-SPRAUL et al., 2010). Van Oothegem et al. beschreiben vier Fälle, bei denen ein Übergang von BRIC in PFIC beobachtet wurde. Zwei der vier beobachteten Patienten wiesen eine *ATP8B1*-Mutation auf, die anderen beiden wurden nicht genetisch untersucht. In den beiden Fällen lag eine Splicing-Mutation auf beiden Chromosomen vor, welche zum Überspringen („skipping“) von Exon 24 führte. Bei den Patienten mit unbekannter Mutation lag histologisch zu Beginn der Erkrankung eine normale Leberarchitektur vor, die spätere Leberbiopsie (nach 27 bzw. 35 Jahren) ergab eine porto-portale Fibrose bei einer Patientin und eine beginnende Ausbildung von porto-portalen Septen bei dem zweiten Patienten (VAN OOTEGHEM et al., 2002). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass weitere Faktoren den klinischen Verlauf beeinflussen können, wie Mutationen in anderen mit cholestatischen Lebererkrankungen assoziierten Genen wie *ABCB4*, *MYO5B*, *NR1H4*, *TJP2* und *ABCC12* und/oder Umweltfaktoren eine Rolle spielen (PHAM et al., 2021). Bisher sind die Ursachen der unterschiedlichen Phänotypentwicklung noch wenig untersucht, sodass weitere Studien notwendig sind.

Die p.D482G Variante im *ABCB11*-Gen wurde in unserer Kohorte bei einem Patienten festgestellt. Der erste und bisher einzige Schub trat im Alter von 25 Jahren nach anabolen Steroiden auf und manifestierte sich mit einem Ikterus, histologisch wurde eine Cholestase nachgewiesen ohne Parenchymbau. Pawlikowska et al. hat Kinder mit *ABCB11*-Mutationen untersucht und sie zur Auswertung in eine Gruppe mit p.D482G-Mutation und eine Gruppe mit den restlichen Mutationen unterteilt (PAWLIKOWSKA et al., 2010). Dabei wurde ein Ikterus bei den PFIC2 Patienten mit p.D482G-Mutation in 48% der Fälle beschrieben. Das mediane Alter der Patienten lag hier bei 3 Monaten. Eingeschlossen waren Patienten die sowohl homo- als auch heterozygot waren für p.D482G. Insgesamt beobachteten Pawlikowska et al. einen etwas langsamer verlaufenden Progress von PFIC2 bei p.D482G-Mutation, basierend auf vorher beschriebenen Untersuchungen, die für die p.D482G-Mutation eine teilweise erhaltene Funktion des ABCB11-Proteins zeigen (WANG et al., 2002).

5.4 Vergleich der Phänotypen von Patienten mit „klassischer“ pathogener Variante im *ATP8B1*-Gen (p.I661T) und *ABCB11*-Gen (p.E297G und p.D482G)

Die *ATP8B1* Mutation p.I661T und die *ABCB11* Mutationen p.E297G und p.D482G gelten aufgrund ihrer Häufigkeit als „klassische“ Genvarianten, die ikterischen Schüben einer BRIC zugrunde liegen (KLOMP et al., 2004; VAN MIL et al., 2004). So fand sich bei etwa 45% der untersuchten westeuropäischen Familien mit BRIC eine p.I661T Mutation (KLOMP et al., 2004). In über der Hälfte der europäischen Familien mit ABCB11-Mangel liegen die Varianten p.E297G und/oder p.D482G vor (VAN DER WOERD et al., 2010), in der relativ großen Kohorte von BRIC2 Patienten von van Mil et al. wurde bei zwei Patienten innerhalb von 20 untersuchten Familien eine p.E297G Variante nachgewiesen. In unserer Kohorte wiesen fünf von 21 Patienten mit *ATP8B1* Mutation die p.I661T Variante auf, bei allen Patienten trat ein Ikterus auf. Bei den Patienten mit *ABCB11*-Mutation lag am häufigsten (fünf von acht Patienten) die p.E297G Mutation vor, ein Patient hatte die p.D482G Variante. Klinisch präsentierten sich beide Patientengruppen ähnlich mit einem deutlichen Ikterus, zudem Pruritus und einen über viele Wochen anhaltenden Cholestaseschub. Die Erstmanifestation des BRIC Schubes war mit im Median 26,5 Jahren bei der *ABCB11*-Gruppe früher als bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutation (Median 49 Jahre), dieser Unterschied war nicht signifikant. Die laborchemischen Leberparameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, allerdings lag bei 5 der 6 Patienten mit einer *ABCB11*-Mutation eine normale GGT vor, dagegen war diese nur bei einem der 5 Patienten mit *ATP8B1* p.I661T Mutation im Normbereich, bei den anderen 4 Patienten fand sie sich leicht erhöht, insgesamt war dies passend für eine „low GGT Cholestase“.

Die p.I661T Mutation lag bei drei Patienten homozygot vor, bei zwei Patienten heterozygot. Diese Patienten unterschieden sich in der klinischen Präsentation nicht. Dies zeigt, dass eine klinische

Manifestation in Form einer BRIC auch bei zugrundeliegender Homozygotie erst im Erwachsenenalter auftreten kann. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Klomp et al., die ebenfalls homozygote und heterozygote p.I661T Mutationen beobachtet hatten (KLOMP et al., 2004).

Bei den Patienten mit *ABCB11*-Mutation lag diese in dieser Arbeit jeweils heterozygot vor. In einer Arbeit von van Mil et al. fanden sich bei 20 Familien mit BRIC 7 Patienten aus 5 Familien mit homozygoten *ABCB11*-Mutationen, 3 Patienten aus 2 Familien waren compound heterozygot und nur ein Patient zeigte eine heterozygote *ABCB11*-Mutation (VAN MIL et al., 2004). Bei 2 Patienten lagen homozygote p.E297G Mutationen vor, die anderen Mutationen unterschieden sich von den in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen.

Bei homozygoten p.E297G Mutationen werden in der Literatur sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe beschrieben, sodass hier die Einwirkung der Umwelt und des genetischen Hintergrunds ebenfalls eine Rolle spielen mag (STRAUTNIEKS et al., 2008).

Bei homozygoter Ausprägung wurde das Auftreten der Erkrankung eher im Kindesalter beobachtet (IMAGAWA et al., 2018; WANG et al., 2002). Bei 109 untersuchten Familien bei Strautnieks et al. war die Ausprägung der Erkrankung bei homozygoter Mutation schwerwiegender (STRAUTNIEKS et al., 2008).

Bei diesen drei häufigen *ATP8B1*- und *ABCB11*-Mutationen handelt es sich jeweils um Missense-Mutationen, die zu einer verminderten Proteinfunktion führen, diese ist allerdings nicht komplett aufgehoben (STAPELBROEK et al., 2010). Das Vorliegen von homozygoten Mutationen bei der p.I661T Variante bei Erstmanifestation im Erwachsenenalter könnte dafür sprechen, dass die funktionelle Folge hinsichtlich einer Cholestaseentwicklung weniger stark ist als durch die Mutationen p.E297G und p.D482G im *ABCB11*-Gen, da diese nur heterozygot vorlagen. Allerdings war auch nur ein Patient mit p.D482G Variante eingeschlossen und wie bereits angeführt, sind auch Fälle mit BRIC2 im Erwachsenenalter und homozygoter p.E297G Mutation beschrieben.

Bei drei von vier Patienten mit p.I661T Mutation und vorhandener Leberbiopsie wurde eine milde Fibrose nachgewiesen, einer fortgeschrittenen Fibrose oder gar Leberzirrhose lag bei keinem Patienten vor. Zu dem Zusammenhang einer p.I661T Mutation und dem Auftreten von Leberzirrhose gibt es bisher keine Untersuchungen. Eine Entstehung von PFIC durch die p.I661T Mutation wird in der Literatur nicht ausgeschlossen, häufig wird diese Mutation allerdings im Zusammenhang mit der Entstehung von BRIC beschrieben (FOLMER et al., 2009).

Bei den vier der sechs Patienten mit *ABCB11* p.E297G oder p.D482G Mutation mit vorhandener Leberbiopsie war in keinem Fall eine Fibrose nachweisbar, einer dieser Patienten wies eine Leberzirrhose auf, welche sich im Verlauf bei rezidivierenden BRIC Schüben entwickelt hatte. Ebenso entwickelte der Bruder des Patienten klinisch eine Leberzirrhose, auch wenn diese nicht histologisch gesichert wurde. Die Entwicklung einer Zirrhose bei rezidivierenden BRIC-Schüben war somit innerhalb der *ABCB11*-Gruppe möglich, nicht jedoch bei den Patienten mit *ATP8B1*-Mutation.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die häufige *ATP8B1*-Variante p.I661T zu klinisch vergleichbaren BRIC Schüben wie die häufigen *ABCB11*-Varianten p.E297G und p.D482G führt, die *ATP8B1* Patienten bei Erstmanifestation allerdings älter waren. Laborchemisch lassen sich diese beiden Patientengruppen in unserem Kollektiv nicht unterscheiden, eine normwertige GGT fand sich allerdings deutlich häufiger bei den Patienten mit *ABCB11*-Mutation. Die p.I661T Variante kann hierbei auch homozygot vorliegen ohne dass eine fortgeschrittene Fibrose oder gar Zirrhose beobachtet wurde, wohingegen die beiden *ABCB11*-Mutationen nur heterozygot nachgewiesen wurden und bei zwei Brüdern eine Zirrhose auftrat. Da bei einigen Patienten mit *ATP8B1*-Variante p.I661T und auch p.N45T eine milde Fibrose nachgewiesen werden konnte, sollte auch nach überstandem BRIC Schub bei den Patienten mit *ABCB11*- und auch *ATP8B1*-Mutation eine hepatologische Nachsorge hinsichtlich der Entwicklung eines chronischen Parenchymschadens erfolgen.

5.5 Therapie

Therapeutisch wurde in unserer Kohorte hauptsächlich UDCA eingesetzt, 18 der insgesamt 29 Patienten der Gesamtkohorte erhielten diese Therapie, und bei 6 Patienten war der Verlauf hierunter zu ermitteln. Die mediane Schubdauer war hierbei nicht unterschiedlich zu den Patienten ohne Therapie. Zudem wurde noch in wenigen Fällen Colestyramin, Rifampicin, und Steroide verabreicht oder eine MARS Therapie durchgeführt, dies insbesondere zur Therapie des Pruritus. Insgesamt ist die Datenanalyse bezüglich eines Therapieansprechens limitiert bei niedriger Fallzahl und geringer Datenlage hinsichtlich des Verlaufs unter Therapie. In der Literatur wird ein Ansprechen hinsichtlich Pruritus und sogar ein mögliches erfolgreiches Unterbrechen des Cholestaseschubes für Rifampicin beschrieben, wohingegen UDCA nur selten effektiv war (STAPELBROEK et al., 2010; VAN DER WOERD et al., 2017). Es existieren Fallberichte zu einer erfolgreichen Behandlung lange andauernder Cholestaseschübe mittels endoskopische Anlage einer nasobiliären Sonde, wobei hier mögliche Komplikationen im Rahmen der endoskopischen retrograden Cholangiographie in Betracht zu ziehen sind (VAN DER WOERD et al., 2017). Neue Therapieansätze beziehen die Folgen des spezifischen genetischen Defekts mit ein. Im Falle von Mutationen die zu einer gestörten Proteinfaltung und resultierenden Retention im

endoplasmatischen Retikulum führen, wie bei der *ATP8B1* p.I661T, *ABCB11* p.E297G und p.D482G Variante, konnte die Gabe von 4-Natriumphénylbutyrat die Expression des Proteins auf der Zellmembran wieder verstärken (VAN DER WOERD et al., 2017). In einer Fallbeschreibung führte die Gabe von 4-Natriumphénylbutyrat zu einer Unterbrechung eines ikterischen Schubes bei einem Patienten mit BRIC2 (HAYASHI, SUGIYAMA, 2007; SOHAIL et al., 2021). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung, Vielzahl unterschiedlicher Genotypen, und variablen Verlauf der Cholestaseschübe, wird auch in Zukunft ein allgemeines Therapieansprechen auf eine Substanz schwierig zu ermitteln sein, eine personalisierte Therapie wird mutmaßlich zunehmend in den Vordergrund rücken (VAN DER WOERD et al., 2017). Für die schwere Form der Gendefekte welche in einer progressiven familiären Cholestase münden, werden auch gentherapeutische Ansätze diskutiert (BOSMA et al., 2020).

6 Literaturverzeichnis

1. Agarwal S, Lal BB, Rawat D, Rastogi A, Bharathy KG, Alam S (2016) Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC) in Indian Children: Clinical Spectrum and Outcome. *J Clin Exp Hepatol* 6:203-208
2. Alam S, Lal BB (2022) Recent updates on progressive familial intrahepatic cholestasis types 1, 2 and 3: Outcome and therapeutic strategies. *World J Hepatol* 14:98-118
3. Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN (2000) Disease-causing mutations in the human genome. *European Journal of Pediatrics* 159:S173-S178
4. Arthur Lorio E, Valadez D, Alkhouri N, Loo N (2020) Cholestasis in Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis 2. *ACG Case Rep J* 7:e00412
5. Barauskiene A, Speiciene D, Liakina V, Semuchiniene T, Valantinas J (2011) Expression of cytokeratin 7 as a histological marker of cholestasis and stages of primary biliary cirrhosis. *Medicina (Kaunas)* 47:31-38
6. Bing H, Li YL, Li D, Zhang C, Chang B (2022) Case Report: A Rare Heterozygous ATP8B1 Mutation in a BRIC1 Patient: Haploinsufficiency? *Front Med (Lausanne)* 9:897108
7. Bosma PJ, Wits M, Oude-Elferink RP (2020) Gene Therapy for Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis: Current Progress and Future Prospects. *Int J Mol Sci* 22
8. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186
9. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH, Freimer NB (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18:219-224
10. Bull LN, Thompson RJ (2018) Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis* 22:657-669
11. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, Mieli-Vergani G, Thompson RJ (2009) Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology* 49:553-567
12. Chen HL, Wu SH, Hsu SH, Liou BY, Chen HL, Chang MH (2018) Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *J Biomed Sci* 25:75
13. Chiang JY (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50:1955-1966
14. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA (1969) Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *Am J Dis Child* 117:112-124
15. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E (2009) Progressive familial

- intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 4:1
16. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, Jacquemin E (2010) ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 51:1645-1655
 17. Dawson PA (2010) Liver disease without flipping: new functions of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1. *Hepatology* 51:1885-1887
 18. de Pagter AG, van Berge Henegouwen GP, ten Bokkel Huinink JA, Brandt KH (1976) Familial benign recurrent intrahepatic cholestasis. Interrelation with intrahepatic cholestasis of pregnancy and from oral contraceptives? *Gastroenterology* 71:202-207
 19. de Vries E, Beuers U (2017) Management of cholestatic disease in 2017. *Liver Int* 37 Suppl 1:123-129
 20. Droge C, Bonus M, Baumann U, Klindt C, Lainka E, Kathemann S, Brinkert F, Grabhorn E, Pfister ED, Wenning D, Fichtner A, Gotthardt DN, Weiss KH, McKiernan P, Puri RD, Verma IC, Kluge S, Gohlke H, Schmitt L, Kubitz R, Haussinger D, Keitel V (2017) Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol* 67:1253-1264
 21. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M (2018) Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 391:2547-2559
 22. EASL (2009) EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51:237-267
 23. EASL (2015) EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 63:237-264
 24. EASL (2017) Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 67:145-172
 25. El Sherrif Y, Potts JR, Howard MR, Barnardo A, Cairns S, Knisely AS, Verma S (2013) Hepatotoxicity from anabolic androgenic steroids marketed as dietary supplements: contribution from ATP8B1/ABCB11 mutations? *Liver Int* 33:1266-1270
 26. Ermis F, Oncu K, Ozel M, Yazgan Y, Gurbuz AK, Demirturk L, Demirci H, Akyol T, Hahoglu A (2010) Benign recurrent intrahepatic cholestasis: late initial diagnosis in adulthood. *Ann Hepatol* 9:207-210
 27. Folmer DE, van der Mark VA, Ho-Mok KS, Oude Elferink RP, Paulusma CC (2009) Differential effects of progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 and benign recurrent intrahepatic cholestasis type 1 mutations on canalicular localization of ATP8B1. *Hepatology* 50:1597-1605
 28. Folvik G, Hilde O, Helge GO (2012) Benign recurrent intrahepatic cholestasis: review and long-term follow-up of five cases. *Scand J Gastroenterol* 47:482-488

29. Frider B, Castillo A, Gordo-Gilart R, Bruno A, Amante M, Alvarez L, Mathet V (2015) Reversal of advanced fibrosis after long-term ursodeoxycholic acid therapy in a patient with residual expression of MDR3. *Ann Hepatol* 14:745-751
30. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, Cassio D, Jacquemin E (2015) Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 62:558-566
31. Gulamhusein AF, Hirschfield GM (2020) Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17:93-110
32. Halawi A, Ibrahim N, Bitar R (2021) Triggers of benign recurrent intrahepatic cholestasis and its pathophysiology: a review of literature. *Acta Gastroenterol Belg* 84:477-486
33. Handschin C, Meyer UA (2005) Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch Biochem Biophys* 433:387-396
34. Harris K, Pritchard JK (2017) Rapid evolution of the human mutation spectrum. *Elife* 6
35. Hayashi H, Sugiyama Y (2007) 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* 45:1506-1516
36. Holz R, Kremer AE, Lutjohann D, Wasmuth HE, Lammert F, Krawczyk M (2018) Can genetic testing guide the therapy of cholestatic pruritus? A case of benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 with severe nasobiliary drainage-refractory itch. *Hepatol Commun* 2:152-154
37. Imagawa K, Hayashi H, Sabu Y, Tanikawa K, Fujishiro J, Kajikawa D, Wada H, Kudo T, Kage M, Kusuhara H, Sumazaki R (2018) Clinical phenotype and molecular analysis of a homozygous ABCB11 mutation responsible for progressive infantile cholestasis. *J Hum Genet* 63:569-577
38. Jüngst C, Lammert F (2013) Cholestatic liver disease. *Dig Dis* 31:152-154
39. Jüngst C, Justinger C, Fischer J, Berg T, Lammert F (2022) Common ABCB4 and ABCB11 Genotypes Are Associated with Idiopathic Chronic Cholestasis in Adults. *Dig Dis* 40:489-496
40. Klomp LW, Vargas JC, van Mil SW, Pawlikowska L, Strautnieks SS, van Eijk MJ, Juijn JA, Pabon-Pena C, Smith LB, DeYoung JA, Byrne JA, Gombert J, van der Brugge G, Berger R, Jankowska I, Pawlowska J, Villa E, Knisely AS, Thompson RJ, Freimer NB, Houwen RH, Bull LN (2004) Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology* 40:27-38
41. Krawczyk M, Grunhage F, Langhirt M, Bohle RM, Lammert F (2012) Prolonged cholestasis triggered by hepatitis A virus infection and variants of the hepatocanalicular phospholipid and bile salt transporters. *Ann Hepatol* 11:710-714

42. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 2:275-287
43. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89:147-191
44. Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U (2010) Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 42:409-418
45. Matte U, Mourya R, Miethke A, Liu C, Kauffmann G, Moyer K, Zhang K, Bezerra JA (2010) Analysis of gene mutations in children with cholestasis of undefined etiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51:488-493
46. Meier PJ, Stieger B (2002) Bile Salt Transporters. *Annual Review of Physiology* 64:635-661
47. Misawa T, Hayashi H, Sugiyama Y, Hashimoto Y (2012) Discovery and structural development of small molecules that enhance transport activity of bile salt export pump mutant associated with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Bioorg Med Chem* 20:2940-2949
48. Miura R, Kawaoka T, Imamura M, Kosaka M, Johira Y, Shirane Y, Murakami S, Yano S, Amioka K, Naruto K, Ando Y, Kosaka Y, Kodama K, Uchikawa S, Fujino H, Ono A, Nakahara T, Murakami E, Yamauchi M, Hinoi T, Aikata H (2022) Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis Type 1 with Novel Nonsense Mutations in the ATP8B1 Gene. *Case Rep Gastroenterol* 16:110-115
49. Naik J, de Waart DR, Utsunomiya K, Duijst S, Mok KH, Oude Elferink RP, Bosma PJ, Paulusma CC (2015) ATP8B1 and ATP11C: Two Lipid Flippases Important for Hepatocyte Function. *Dig Dis* 33:314-318
50. Nayagam JS, Foskett P, Strautnieks S, Agarwal K, Miquel R, Joshi D, Thompson RJ (2022) Clinical phenotype of adult-onset liver disease in patients with variants in ABCB4, ABCB11, and ATP8B1. *Hepatology* 6:2654-2664
51. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ (2012) Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol* 226:300-315
52. Nishida T, Gatmaitan Z, Che M, Arias IM (1991) Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6590-6594
53. Painter JN, Savander M, Ropponen A, Nupponen N, Riikonen S, Ylikorkala O, Lehesjoki AE, Aittomaki K (2005) Sequence variation in the ATP8B1 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur J Hum Genet* 13:435-439
54. Paulusma CC, de Waart DR, Kunne C, Mok KS, Elferink RP (2009) Activity of the bile

- salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J Biol Chem* 284:9947-9954
55. Pawlikowska L, Strautnieks S, Jankowska I, Czubkowski P, Emerick K, Antoniou A, Wanty C, Fischler B, Jacquemin E, Wali S, Blanchard S, Nielsen IM, Bourke B, McQuaid S, Lacaille F, Byrne JA, van Eerde AM, Kolho KL, Klomp L, Houwen R, Bacchetti P, Lobritto S, Hupertz V, McClean P, Mieli-Vergani G, Shneider B, Nemeth A, Sokal E, Freimer NB, Knisely AS, Rosenthal P, Whittington PF, Pawlowska J, Thompson RJ, Bull LN (2010) Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 53:170-178
 56. Perino A, Demagny H, Velazquez-Villegas L, Schoonjans K (2021) Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. *Physiological Reviews* 101:683-731
 57. Pham DH, Kudira R, Xu L, Valencia CA, Ellis JL, Shi T, Evason KJ, Osuji I, Matuschek N, Pfuhrer L, Mullen M, Mohanty SK, Husami A, Bull LN, Zhang K, Wali S, Yin C, Miethke A (2021) Deleterious Variants in ABCC12 are Detected in Idiopathic Chronic Cholestasis and Cause Intrahepatic Bile Duct Loss in Model Organisms. *Gastroenterology* 161:287-300.e216
 58. Piazzolla M, Castellaneta N, Novelli A, Agolini E, Cocciadiferro D, Resta L, Duda L, Barone M, Ierardi E, Di Leo A (2020) Nonsense variant of ATP8B1 gene in heterozygosis and benign recurrent intrahepatic cholestasis: A case report and review of literature. *World J Hepatol* 12:64-71
 59. Pillarisetty LS, Sharma A (2022). Pregnancy Intrahepatic Cholestasis. In *StatPearls* (Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.).
 60. Reichert MC, Lammert F, J, ngst C (2016) Klinische Genetik der Gallenwegserkrankungen. *Der Gastroenterologe* 12:7-15
 61. Reshetnyak VI (2013) Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* 19:7341-7360
 62. Saliba F (2006) The Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) in the intensive care unit: a rescue therapy for patients with hepatic failure. *Crit Care* 10:118
 63. Schatz SB, Jüngst C, Keitel-Anselmo V, Kubitz R, Becker C, Gerner P, Pfister ED, Goldschmidt I, Junge N, Wenning D, Gehring S, Arens S, Bretschneider D, Grothues D, Engelmann G, Lammert F, Baumann U (2018) Phenotypic spectrum and diagnostic pitfalls of ABCB4 deficiency depending on age of onset. *Hepatol Commun* 2:504-514
 64. Schulz WL, Tormey CA, Torres R (2015) Computational Approach to Annotating Variants of Unknown Significance in Clinical Next Generation Sequencing. *Lab Med* 46:285-289
 65. Sohail MI, Dönmez-Cakil Y, Szöllösi D, Stockner T, Chiba P (2021) The Bile Salt Export Pump: Molecular Structure, Study Models and Small-Molecule Drugs for the Treatment of

- Inherited BSEP Deficiencies. *International Journal of Molecular Sciences* 22
66. Sohn MJ, Woo MH, Seong MW, Park SS, Kang GH, Moon JS, Ko JS (2019) Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis Type 2 in Siblings with Novel ABCB11 Mutations. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 22:201-206
 67. Srivastava A (2014) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Clin Exp Hepatol* 4:25-36
 68. Staels B, Fonseca VA (2009) Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 32 Suppl 2:S237-245
 69. Stapelbroek JM, van Erpecum KJ, Klomp LW, Houwen RH (2010) Liver disease associated with canalicular transport defects: current and future therapies. *J Hepatol* 52:258-271
 70. Sticova E, Jirsa M, Pawlowska J (2018) New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018:2313675
 71. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerova D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, Antoniou A, Stieger B, Arnell H, Ozcay F, Al-Hussaini HF, Bassas AF, Verkade HJ, Fischler B, Nemeth A, Kotalova R, Shneider BL, Cielecka-Kuszyk J, McClean P, Whittington PF, Sokal E, Jirsa M, Wali SH, Jankowska I, Pawlowska J, Mieli-Vergani G, Knisely AS, Bull LN, Thompson RJ (2008) Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 134:1203-1214
 72. Summerskill WH, Walshe JM (1959) Benign recurrent intrahepatic "obstructive" jaundice. *Lancet* 2:686-690
 73. Sundaram SS, Sokol RJ (2007) The Multiple Facets of ABCB4 (MDR3) Deficiency. *Curr Treat Options Gastroenterol* 10:495-503
 74. Suzuki H, Arinaga-Hino T, Sano T, Mihara Y, Kusano H, Mizuochi T, Togawa T, Ito S, Ide T, Kuwahara R, Amano K, Kawaguchi T, Yano H, Kage M, Koga H, Torimura T (2022) Case Report: A Rare Case of Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis-Type 1 With a Novel Heterozygous Pathogenic Variant of ATP8B1. *Front Med (Lausanne)* 9:891659
 75. van der Velden LM, Stapelbroek JM, Krieger E, van den Berghe PV, Berger R, Verhulst PM, Holthuis JC, Houwen RH, Klomp LW, van de Graaf SF (2010) Folding defects in P-type ATP 8B1 associated with hereditary cholestasis are ameliorated by 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 51:286-296
 76. van der Woerd WL, van Mil SW, Stapelbroek JM, Klomp LW, van de Graaf SF, Houwen RH (2010) Familial cholestasis: progressive familial intrahepatic cholestasis, benign recurrent intrahepatic cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24:541-553

77. van der Woerd WL, Wichers CG, Vestergaard AL, Andersen JP, Paulusma CC, Houwen RH, van de Graaf SF (2016) Rescue of defective ATP8B1 trafficking by CFTR correctors as a therapeutic strategy for familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 64:1339-1347
78. van der Woerd WL, Houwen RH, van de Graaf SF (2017) Current and future therapies for inherited cholestatic liver diseases. *World J Gastroenterol* 23:763-775
79. van Mil SW, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, van den Berg IE, Berger R, Houwen RH, Klomp LW (2004) Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* 127:379-384
80. van Ooteghem NA, Klomp LW, van Berge-Henegouwen GP, Houwen RH (2002) Benign recurrent intrahepatic cholestasis progressing to progressive familial intrahepatic cholestasis: low GGT cholestasis is a clinical continuum. *J Hepatol* 36:439-443
81. van Wessel DBE, Thompson RJ, Gonzales E, Jankowska I, Sokal E, Grammatikopoulos T, Kadaristiana A, Jacquemin E, Spraul A, Lipiński P, Czubkowski P, Rock N, Shagrani M, Broering D, Algoufi T, Mazhar N, Nicastro E, Kelly DA, Nebbia G, Arnell H, Björn F, Hulscher JBF, Serranti D, Arikan C, Polat E, Debray D, Lacaille F, Goncalves C, Hierro L, Muñoz Bartolo G, Mozer-Glassberg Y, Azaz A, Brecelj J, Dezsöfi A, Calvo PL, Grabhorn E, Sturm E, van der Woerd WJ, Kamath BM, Wang JS, Li L, Durmaz Ö, Onal Z, Bunt TMG, Hansen BE, Verkade HJ (2020) Genotype correlates with the natural history of severe bile salt export pump deficiency. *J Hepatol* 73:84-93
82. Vinayagamoorthy V, Srivastava A, Sarma MS (2021) Newer variants of progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Hepatol* 13:2024-2038
83. Vitale G, Pirillo M, Mantovani V, Marasco E, Aquilano A, Gamal N, Francalanci P, Conti F, Andreone P (2016) Bile salt export pump deficiency disease: two novel, late onset, ABCB11 mutations identified by next generation sequencing. *Ann Hepatol* 15:795-800
84. Vitale G, Gitto S, Raimondi F, Mattiaccio A, Mantovani V, Vukotic R, D'Errico A, Seri M, Russell RB, Andreone P (2018) Cryptogenic cholestasis in young and adults: ATP8B1, ABCB11, ABCB4, and TJP2 gene variants analysis by high-throughput sequencing. *J Gastroenterol* 53:945-958
85. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL (2002) The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 110:965-972
86. Wang Z, Moulton J (2001) SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat* 17:263-270
87. Xiang D, He J, Wang H, Xiong F, Cheng H, Ai J, Shan R, Wan R, Zhang L, Shi J (2017) Liver transplantation for decompensated liver cirrhosis caused by progressive familial intrahepatic cholestasis type 3: A case report. *Medicine (Baltimore)* 96:e9158
88. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E (2012) Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med* 2012:805827
89. Zimmer V, Bohle RM, Weber SN, Lammert F, Jungst C (2018) Benign recurrent

- intrahepatic cholestasis (BRIC)-like episode associated with ATP8B1 variation underlying protracted cholestatic course of acute hepatitis E virus infection. *Dig Liver Dis* 50:206-207
90. Zlotogora J (1997) Dominance and homozygosity. *American Journal of Medical Genetics* 68:412-416

I Abkürzungsverzeichnis

Nomenklatur

Entsprechend den Vorgaben des „Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee“ werden in der vorgelegten Arbeit Proteine mit Großbuchstaben bezeichnet (z.B. ABCB11). Die dazugehörigen Gene werden in kursiver Schrift aufgeführt (z.B. *ABCB11*).

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Adenosine 5'-triphosphate (ATP) – binding cassette
ABCB4	ATP binding cassette subfamily B member 4
ABCB11	ATP binding cassette transporter, sub-family B, member 11
ABCC3	ATP binding cassette subfamily C member 3 Transporter
ABCG5	ATPbinding cassette subfamily G member 5
ABCG8	ATPbinding cassette subfamily G member 8
ANA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ASBT	Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATP8B1	ATPase phospholipid transporting 8B1
Bili	Bilirubin
BRIC	Benigne rezurrente intrahepatische Cholestase
BSEP	Bile Salt Export Pump
CA	Cholsäure
C-ANCA	Cytoplasmatische Antikörper
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CHE	Cholesterinesterase
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
DCA	Desoxycholsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat Oxalat Transaminase

GPT	Glutamat Pyruvat Transaminase
HDL	High Density Lipoprotein
LCA	Lithocholsäure
LDL	Low Density Lipoprotein
LKM	Leber-Nieren-Mikrosomen-Antikörper
MDR3	Multidrug resistance class III
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NGS	Next Generation Sequencing
NTCP	Natrium Taurocholat Cotransporting Polypeptide Transporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide Transporter
Ost-alpha	Organic solute transporter alpha
Ost-beta	Organic solute transporter beta
P-ANCA	Perinukleäre Antikörper
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFIC	Progressiv familiäre intrahepatische Cholestase
SMA	Glatte-Muskulatur-Antikörper
SLA	Lösliches-Leberantigen-Antikörper
SNP	Single nucleotide Polymorphism
UDCA	Ursodesoxycholsäure

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Enterohepatischer Kreislauf

Abb. 2: Wichtige hepatobiliäre Transporter

Abb. 3: Plot einer allelischen Diskriminierung

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Labordiagnostik

Tab. 2: Verwendete Geräte und Lösung

Tab. 3: Verwendete Reagenzien

Tab. 4: Ablauf des Prozesses mit Angabe der Einstellungen für Temperatur und Zeit

Tab. 5: Vergleich der Leberparameter zwischen Patienten mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation

Tab. 6: Patienten mit Mutationen im *ABCB11*-Gen

Tab. 7: Patienten mit Mutationen im *ATP8B1*-Gen

Tab. 8: Symptomatik der Cholestaseschübe bei *ABCB11*-Mutationen

Tab. 9: Einzelne Laborparameter von Patienten mit *ABCB11*-Mutation

Tab. 10: Laborparameter der Patienten mit *ABCB11*-Mutation, nach Mutationen aufgeteilt

Tab. 11: Laborparameter der beiden Patienten mit *ABCB11*- und *ATP8B1*-Mutation

Tab. 12: Symptomatik der Cholestaseschübe bei Patienten mit *ATP8B1*-Mutationen

Tab. 13: Individuelle Laborparameter der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation

Tab. 14: Laborparameter der Patienten mit *ATP8B1*-Mutation, nach Mutationen aufgeteilt

Tab. 15: Laborparameter der Patienten mit *ABCB11*-Mutation p.I661T

Tab. 16: Vergleich der Charakteristika der Cholestaseschübe bei Patienten mit *ATP8B1* Mutation

Tab. 17: Histologischer Nachweis von Fibrose und Zirrhose bei Patienten mit *ATP8B1* Mutation und vorhandener Biopsie

Tab. 18: Fibroscan-Werte der Patienten mit Mutationen im *ABCB11*- bzw. *ATP8B1*-Gen

Tab. 19: Vergleich der klinischen und laborchemischen Befunde von Patienten mit *ABCB11* p.D482G oder p.297G oder *ATP8B1* p.I661T Mutation

Tab. 20: Klinische Charakteristika von Patienten mit *ABCB11* Mutation

Tab. 21: Klinische Charakteristika von Patienten mit *ATP8B1* Mutation

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn PD Dr. med. C. Jüngst, für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit und seine motivierende und intensive Betreuung. Meinen herzlichsten Dank!

Die vorgelegte Dissertationsschrift wurde an der Klinik für die Innere Medizin II – Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin an der Universität des Saarlandes durchgeführt – ich danke Herrn Prof. Dr. Marcin Krawczyk für die Möglichkeit der Promotion in dieser Klinik.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Labors in der Inneren Medizin II der Universitätsklinik Homburg, die stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Mosig aus Leipzig für die Bereitstellung der externen Patientendaten.

Ebenso gilt ein besonderer Dank Frau Dr. med. Renate Heyne, die mich in Berlin freundlich empfing.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Alexander Christmann für seine Unterstützung.

Ganz besonders danke ich der Firma Haus & Gross it.services für die Datenrettung meiner Dissertation. Wir alle kennen jemanden, der seine sonst ungespeicherte Arbeit durch Leichtsinn (und ein Glas Wasser) verloren hat.

Weiterhin danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation – ohne euch wäre das alles in dieser Form so nicht möglich gewesen. Danke!

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.