

**Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Einsele**

**Die Rolle der Einzelnukleotid-Polymorphismen rs10754558 und
rs35829419 des NLRP3-Inflammasoms bei der nichtalkoholischen
Fettlebererkrankung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Katrin Paukstat
aus Illingen (Württ)**

Würzburg, April 2022



Referent: Prof. Dr. med. Andreas Geier

Korreferentin: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung.....	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Genetik	3
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.3.1 Allgemein.....	3
1.1.3.2 Steatoseentwicklung	3
1.1.3.3 Die Rolle des Mikrobiom	4
1.1.3.4 Fortschreiten der NAFL zur NASH.....	4
1.1.3.5 Rolle der T-Helfer- und regulatorischen T- Zellen in der Entwicklung der NASH.....	5
1.1.4 Symptome und Diagnostik	7
1.1.5 Therapie.....	9
1.2 Immunologische Grundlagen.....	10
1.2.1 NLR Aufbau	11
1.2.2 Das NLRP3-Inflammasom	12
1.2.3 Metabolismus des NLRP3-Inflammasoms	13
1.2.4 NLRP3-Inflammasom und assoziierte Pathologien	15
1.2.5 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	16
1.2.6 SNP rs35829419 aktueller Forschungsstand	16
1.2.7 SNP rs10754558 aktueller Forschungsstand	18
1.2.8 Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der NASH	19
1.3 Fragestellungen der Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	21

2.1 Studiendesign.....	21
2.2 Anamnese und Klinische Untersuchung	21
2.3 Bildgebende Diagnostik	22
2.4 Klinisch-chemische Parameter.....	22
2.5 Leberbiopsieentnahme	23
2.6 Histopathologische Begutachtung.....	24
2.7 Immunologische Auswertung	24
2.8 Genotypisierung.....	25
2.8.1 Probengewinnung, DNA-Extraktion, Ermittlung der DNA-Quantität und - Qualität.....	25
2.8.2 Allelische Diskriminierung mittels TaqMan-PCR	25
2.9 Statistische Analyse	27
2.9.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	27
2.9.2 Statistische Analyse	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs.....	31
3.1.1 Alter und Geschlecht	31
3.1.2 Histologie	31
3.1.3 BMI und bariatrische OP.....	32
3.1.4 Metabolische Erkrankungen und deren Häufigkeit	33
3.2 Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe	33
3.2.1 Alter und Geschlecht	33
3.2.2 BMI und metabolische Erkrankungen	33
3.3 Verteilung der SNP- Genotypen.....	34
3.3.1 Verteilung der SNPs in der gesamten Kohorte.....	34

3.3.2 Verteilung der SNPs unter NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen im Vergleich	34
3.4 Auswertungen bezogen auf die gesamte Studienkohorte	36
3.4.1 SNP rs10754558.....	38
3.4.1.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp	38
3.4.1.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp ..	45
3.4.1.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp	46
3.4.2. SNP rs35829419.....	49
3.4.2.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp	49
3.4.2.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp ..	52
3.4.2.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp	53
3.4.3. Gemeinsame Analyse der beiden SNPs.....	55
3.4.3.1 Assoziation von Laborwerten und dem Vorliegen eines/mehrerer minor Allele	55
3.4.3.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und dem Vorliegen eines/mehrerer minor Allele	58
3.4.3.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und dem Vorliegen eines/mehrerer minor Allele	59
3.5 Auswertungen bezogen auf die NAFLD-Patienten	60
3.5.1 SNP rs10754558.....	62
3.5.1.1 Assoziation von Laborwerterhöhungen und jeweiligem Genotyp.....	62
3.5.1.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp ..	65
3.5.1.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp	73
3.5.1.4 Assoziation intrahepatischer Immunzellen mit jeweiligem Genotyp im Patientenkollektiv.....	74
3.5.2SNP rs35829419	75

3.5.2.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp	75
3.5.2.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp ..	76
3.5.2.3 Assoziation peripherer/intrahepatischer Immunzellen und jeweiligem Genotyp	80
3.6 Allelanalyse bezogen auf die gesamte Kohorte.....	80
3.6.1 SNP rs10754558.....	80
3.6.2 SNP rs35829419.....	81
3.6.3 gemeinsame Analyse der beiden SNPs	82
3.7 Allelanalyse bezogen auf die NAFLD-Patienten.....	83
3.7.1 SNP rs10754558.....	83
3.7.2 SNP rs35829419.....	84
4. Diskussion.....	85
4.1 Hintergrund der Studie	85
4.2 Diskussion von rs10754558 und Zusammenhang mit Laborparametern.....	86
4.3 Diskussion von rs10754558 und Zusammenhang mit histologischen Parametern und Entzündungszellen	90
4.4 Diskussion von Ergebnissen zu rs35829419	93
4.5. Einschränkungen der Studie	97
4.6 Ausblick	98
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis.....	102
Appendix.....	
I. Abkürzungsverzeichnis.....	
II. Abbildungsverzeichnis.....	
III. Tabellenverzeichnis.....	

IV. Auszug aus dem Studienprotokoll der Universtitätsklinik Homburg.....	
V. Danksagung	
VI. Lebenslauf	

1. Einleitung

„Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (nichtalkoholische Fettlebererkrankung, kurz NAFLD) ist die häufigste Lebererkrankung weltweit und wird bald die häufigste Ursache für Lebertransplantationen sein.“ (Perumpail et al., 2017) Die nichtalkoholische Steatohepatitis, kurz NASH, stellt die fortgeschrittene Form der NAFLD dar und kann zur Zirrhose sowie hepatozellulärem Karzinom fortschreiten (Perumpail et al., 2017). Beim Progress der NAFLD zur NASH spielt die gesteigerte Aktivität des NLRP3-Inflammasoms eine essenzielle Rolle, die pathogenetischen Vorgänge sind bisher jedoch nicht gänzlich erforscht (Wan, Xu, Yu, & Li, 2016). Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit soll daher auf der Rolle des NLRP3-Inflammasoms in Bezug auf die NAFLD-Pathogenese liegen: Genauer gesagt werden Träger der Einzelnukleotid-Polymorphismen, rs10754558 und rs35829419, die genetische Varianten des *NLRP3-Gens* sind, bezüglich ihrer Stoffwechsellage, der Aktivität ihrer Immunzellen im peripheren Blut sowie intrahepatisch und den histologischen Merkmalen des Lebergewebes untersucht. Die folgende Einleitung soll einen Überblick über die Erkrankung NAFLD, ihre Pathogenese, Symptome, Diagnostik und Therapie geben sowie die bisher bekannten immunologischen Hintergründe in Bezug auf das NLRP3-Inflammasom erläutern.

1.1 Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (nonalcoholic fatty liver disease, kurz NAFLD) bezeichnet eine Steatose der Leber mit einem Fettanteil von über 5 % (E. Roeb, C. Hellerbrand, & A. Tannapfel, 2015) „oder eine Makrosteatose der Hepatozyten gleichen Ausmaßes, die nicht maßgeblich durch erhöhten Alkoholkonsum (Frauen: ≤ 10 g/d, Männer ≤ 20 g/d) oder sekundäre Gründe bedingt ist“ (Weiss, Rau, & Geier, 2014). Sie reicht von der isolierten blanden Steatosis hepatis (nichtalkoholische Fettleber, nonalcoholic fatty liver (NAFL)) über die nichtalkoholische Fettleberhepatitis (nonalcoholic steatohepatitis (NASH)), bei der eine Entzündung mit Schädigung der Hepatozyten mit oder ohne Fibrose nachweisbar ist, bis hin zur Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom (HCC) (Chalasani et al., 2012; Weiss et al., 2014).

1.1.1 Epidemiologie

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung ist die mittlerweile häufigste diagnostizierte Ursache einer chronischen Lebererkrankung (Blachier, Leleu, Peck-Radosavljevic, Valla, & Roudot-Thoraval, 2013; Zobair M. Younossi et al., 2011). Sie betrifft laut einer Metaanalyse von Younossi et al. 25,24 % der Bevölkerung weltweit (Stand 2016). Die Prävalenz der NASH liegt schätzungsweise bei 1,5-6,5 % (Thandra et al., 2020). Im Gegensatz zur alleinigen Steatose stellt die NASH einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose und letztlich eines hepatozellulären Karzinoms dar (Dowman, Tomlinson, & Newsome, 2010). In den USA schätzt man den Anteil der durch die NASH verursachten HCC-Fälle bereits auf mehr als 13 % (Dowman et al., 2010). Die drei häufigsten Todesursachen bei NAFLD-Patienten sind in abnehmender Reihenfolge Malignome, kardiovaskuläre Erkrankungen und die leberbedingte Mortalität (Adams et al., 2005). Die steigenden Zahlen der NAFLD-Patienten lassen sich vor dem Hintergrund einer immer älter werdenden Bevölkerung am ehesten auf eine Zunahme assoziierter metabolischer Risikofaktoren wie etwa Adipositas- und Diabeteserkrankungen zurückführen (Weiss et al., 2014). Ein höheres Lebensalter stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung einer NAFLD dar, außerdem ein männliches Geschlecht und eine hispanische Herkunft (Clark & J., 2003; Vernon, Baranova, & Younossi, 2011).

Die NAFLD, hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, ist eng mit dem Vorkommen anderer Komponenten des metabolischen Syndroms verknüpft. 30 bis 100 % der NAFL-Patienten sind Studien zufolge adipös, 10 bis 75 % leiden an Diabetes mellitus Typ 2 (Paul Angulo, 2002). Umgekehrt steigern ein hoher BMI und eine viszerale Adipositas das Risiko an einer NAFLD zu erkranken, bei Patienten mit morbidem Adipositas liegt die NAFLD-Prävalenz teilweise über 90 % (Weiss et al., 2014). Ebenso stellt der Typ-2-Diabetes ein hohes Risiko dar, hier wurden NAFLD-Prävalenzen von etwa 70 % beobachtet (Blachier et al., 2013). Zum Abschluss sei zu erwähnen, dass die ermittelten Prävalenzen stark von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängen.

1.1.2 Genetik

Mittlerweile ist bekannt, dass genetische Polymorphismen die Entwicklung und das Fortschreiten einer NAFLD beeinflussen können (Arab, Arrese, & Trauner, 2018). Im Jahre 2008 fanden Romeo et al. in der ersten genome-wide association study (GWAS) bei NAFLD-Patienten und Kontrollen eine Variante des *patatin-like Phospholipase 3* (*PNPLA3*, ebenfalls bekannt als *Adiponutrin-ADPN*) *Gen* (*rs738409 C/G, 1148M*), das stark mit einem erhöhten Risiko für NAFLD und NASH und auch für die Entwicklung eines HCC assoziiert ist, unabhängig vom Alter, Geschlecht, BMI und der Insulinsensitivität. *PNPLA3* gehört zu einer neuen Gruppe von Lipid verstoffwechselnden Enzymen. Die *PNPLA3* Risikovariante (Allel G) ist in lateinamerikanischen Populationen am häufigsten vertreten, welche interessanterweise auch die höchste Prädisposition für eine NAFLD zeigen (Saab, Manne, Nieto, Schwimmer, & Chalasani, 2016). Ein weiteres Risikogen ist eine Variante des *Gen* *TM6SF2* (transmembrane 6 superfamily 2). Dieses kodiert für ein Protein, welches eine Sekretion von VLDL (very low density lipoprotein) fördert und mit einer Leberverfettung, erhöhten Transaminasewerten und einem Fortschreiten der Leberfibrose assoziiert ist (Liu et al., 2014).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

1.1.3.1 Allgemein

Bei der Pathogenese der NAFLD wird von einer Vielzahl an Einflussfaktoren ausgegangen, die parallel und synergistisch in Individuen mit genetischer Prädisposition wirken, man spricht von einer multiple-hit-Hypothese (Buzzetti, Pinzani, & Tsochatzis, 2016). Im Folgenden wird auf die wichtigsten Faktoren eingegangen, die zur Pathogenese der NAFL bzw. daran anschließend der NASH beitragen.

1.1.3.2 Steatoseentwicklung

Der erste Schritt der NAFLD-Pathogenese ist die Ansammlung von Triglyzeriden, die aus einem Ungleichgewicht aus Triglyzeridsynthese und -verbrauch resultiert. Hier spielen fehlerhafte Signalwege des Insulins im Fettgewebe eine maßgebliche Rolle (Anstee, Targher, & Day, 2013). Bei Patienten mit Übergewicht oder Diabetes mellitus Typ 2 führt die zunehmende Insulinresistenz zu einer unkontrollierten Lipolyse im Fettgewebe. Dies

führt zu einer exzessiven Ausschüttung von nicht-veresterten Fettsäuren, die in der Leber von Hepatozyten über spezielle Transportproteine aufgenommen werden. Bei Patienten mit morbidem Adipositas zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression dieser Transportproteine, dem Leberfettgehalt und der Apoptose von Leberzellen. (Berlangu, Guiu-Jurado, Porrás, & Auguet, 2014)

Außerdem tragen zwei weitere Faktoren zur Leberverfettung bei: eine fetthaltige Ernährung und die verstärkte de-novo-Lipogenese, die bei der NAFLD verstärkt ist durch die Hyperinsulinämie und die exzessive Aufnahme einfacher Zucker wie etwa Fruktose. Fruktose dient als stärkster Induktor der hepatischen de-novo-Lipogenese (Lambert, Ramos-Roman, Browning, & Parks, 2014). Zusätzlich zu oben genannten Faktoren kommt es zu Adipozytenstress und einer Rekrutierung und Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe, einer Erhöhung von proinflammatorischen Adipozytokinen und einer Verringerung von protektiven Adipokinen (Xu et al., 2003).

1.1.3.3 Die Rolle des Mikrobioms

Des Weiteren spielt das Mikrobiom im Darm eine entscheidende Rolle in der NAFLD-Entwicklung, genauer die Dysbiose zwischen protektiven und potenziell ungünstigen Darmbakterien (Arab et al., 2018). Die Darmflora trägt zur Verdauung bei, zur Synthese von Vitaminen, Aufnahme von Nährstoffen und regt bei Kontakt mit Pathogenen das gastrointestinale Immunsystem an. Bei NASH-Patienten hingegen wurden qualitative und quantitative Veränderungen des Mikrobioms festgestellt (Bluemel, Williams, Knight, & Schnabl, 2016). Durch diese dysfunktionale intestinale Barriere können bakterielle Pathogene viel leichter die Leber erreichen, proinflammatorische Prozesse in Gang bringen und zu Insulinresistenz, Übergewicht, hepatischer Steatose, Fibrose und letztlich zum Fortschreiten einer NASH führen (Arab et al., 2018).

1.1.3.4 Fortschreiten der NAFL zur NASH

Obwohl die meisten NAFLD-Patienten an einer milden Steatose leiden, entwickeln bis zu einem Drittel eine NASH, die nekroinflammatorische Form der NAFLD (Arab et al., 2018). Eine Entzündung entwickelt sich, wenn bei massivem Einstrom von Fettsäuren in die Leber reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, woraus eine Schädigung der

mitochondrialen DNA (Ghezzi & Zeviani, 2012) sowie eine hepatozelluläre Dysfunktion resultieren können (Hirsova, Ibrahim, Gores, & Malhi, 2016; Trauner, Arrese, & Wagner, 2010). Durch die Schädigung der Leberzellen werden immunologische und apoptotische Pathways aktiviert und es werden sogenannte damage-associated molecular patterns (DAMPs) frei (Land, 2015a). Diese körpereigenen, intrazellulären Moleküle wie etwa ATP, Hitzeschockproteine oder DANN können eine sterile, inflammatorische Immunantwort auslösen (Hirsova & Gores, 2015; Land, 2015a; Neuschwander-Tetri, 2010). Lipotoxizität kann durch den Umbau von Fettsäuren in Triglyzeride umgangen werden und wird über spezielle Enzyme katalysiert. Eine fehlerhafte Aktivität dieser Enzyme resultiert in lobulärer Entzündung und Fibrose (Z. Z. Li, Berk, McIntyre, & Feldstein, 2009; Yamaguchi et al., 2007).

Das angeborene Immunsystem spielt ebenfalls eine große Rolle in der Pathogenese der NASH. Bakterielle Moleküle werden durch das Immunsystem über pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) identifiziert, genau definierte molekulare Muster, die von allen Mikroorganismen einer bestimmten Klasse getragen werden (Shaw, Lamkanfi, & Kanneganti, 2010). Erreichen bakterielle Produkte wie etwa Lipopolysaccharide (LPS) die Leber, werden sie von pattern-recognition Rezeptoren (PRRs) erkannt, wie etwa den membrangebundenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) und den zytoplasmatischen nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (kurz „NLRs“, s. Punkt 2.2.1). TLRs sind transmembranäre Proteine, die meist in Wächterzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert sind. Sie wurden jedoch auch in nichtimmunologischen Zellen der Leber, in Sternzellen und endothelialen Zellen als Reaktion auf PAMPs gefunden (Crispe, 2009; Seki & Brenner, 2008). TLRs und NLRs erkennen PAMPs und aktivieren eine inflammatorische Immunantwort (Schroder & Tschopp, 2010). Außerdem erkennen einige PRRs auch die bereits oben erwähnten DAMPs und lösen damit sterile, inflammatorische Immunantworten aus (Land, 2015).

1.1.3.5 Rolle der T-Helfer- und regulatorischen T- Zellen in der Entwicklung der NASH

Im Folgenden wird auf die Rolle der T-Helfer- und der regulatorischen T-Zellen bei der Pathogenese der NAFLD eingegangen, da immunologische Daten der T- Zellen auch für die Auswertungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich zur

Aktivierung des angeborenen Immunsystems wurden bei der NAFLD auch Veränderungen des erworbenen Immunsystems festgestellt, genauer der T-Lymphozyten (Inzaugarat et al., 2011; Rau et al., 2016; Wree, McGeough, et al., 2014). Die Th1-Zellen sind an der zellulären Immunantwort beteiligt, wohingegen Th2-Zellen für die humorale Immunantwort sorgen (Alberts B, 2002). Th1-Zellen sezernieren Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha, Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ), wodurch Makrophagen aktiviert und differenziert werden (Alberts B, 2002). Th2-Zellen regen mit Hilfe ihrer Zytokine IL-4/5/6 etc. B-Lymphozyten zur Produktion und Ausschüttung von Antikörpern an (Alberts B, 2002). Die im Jahre 2005 entdeckten Th17-Zellen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie etwa IL-17, welches neutrophile Granulozyten aktiviert (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005; C. M. Tato & J. J. O'Shea, 2006). Außerdem sollen Th17-Zellen über die Unterdrückung von Th1-Zellen zur Persistenz von Bakterien oder Antigenen führen und somit zu chronischen Entzündungsprozessen beitragen (Cristina M. Tato & John J. O'Shea, 2006). Reguliert wird die Aktivierung von Th-Zellen von regulatorischen T-Zellen, den Treg-Zellen, die der Entstehung von Autoimmunerkrankungen vorbeugen (Rau et al., 2016). Die Bildung bzw. Differenzierung von Treg- oder Th17-Zellen unterliegt einer gewissen Plastizität, je nach Stimulus können beide Zellreihen ihre Funktion ändern (Chackelevicius, Gambaro, Tiribelli, & Rosso, 2016). NAFL- sowie NASH-Patienten gemeinsam ist laut Rau et al. (2016) ein erhöhtes Vorkommen von CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut, eine verminderte Anzahl von Treg-Zellen sowie eine gesteigerte intrahepatische Immunantwort.

Die folgenden Studienergebnisse unterstreichen die Rolle von Th1-Zellen in der Pathogenese der NASH. In einer Studie von Inzaugarat et al. von 2011 wurde eine erhöhte Anzahl an Th1-Zellen, genauer IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im peripheren Blut von 20 NASH-Patienten nachgewiesen. Neben einer Th1-gesteuerten Immunantwort (Inzaugarat et al., 2011) entdeckte man ebenfalls eine gesteigerte Aktivität von Th17-Zellen bei NASH-Patienten (Rau et al., 2016; Tang et al., 2011). In IL17 knock-out-Mäusen der Studie von Harley et al. wurde die Rolle der Th17-Zellen für die Entstehung der NASH deutlich: besagte IL17-knock-out-Mäuse entwickelten unter

einer stark fetthaltigen Ernährung Übergewicht und eine Ansammlung von Triglyzeriden in der Leber, jedoch keine Steatohepatitis. Diese Hypothese stützend, wurde in der Studie von Rau et al. in der Leber von NASH-Patienten eine höhere Anzahl an Th17-Zellen unter den CD4+ Zellen als bei NAFL-Patienten festgestellt. Bemerkenswerterweise erwies sich diese Entwicklung in der Folgeuntersuchung, die über 12 Monate nach der bariatrischen Operation der adipösen NASH-Patienten erfolgte, als reversibel: es zeigte sich ein mit der signifikanten Gewichtsabnahme einhergehender Rückgang der Th17-Zellen sowie ein Anstieg der zuvor verminderten Treg-Zellen (Rau et al., 2016).

1.1.4 Symptome und Diagnostik

Die meisten NAFLD-Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beschwerdefrei, es kann zu unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit oder Beschwerden im rechten Oberbauch kommen (Weiss et al., 2014). Die Laborparameter sind häufig normal, es können allerdings pathologische Werte der Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) auffallen, wobei meist nur die ALT erhöht ist (Paul Angulo, 2002). 80 % der NAFLD-Patienten sollen normale ALT-Werte besitzen (Dyson, Anstee, & McPherson, 2014). Transaminasen im Normbereich schließen eine fortgeschrittene Lebererkrankung und Zirrhose demnach nicht aus, was auch an einem Abfall der ALT bei Fortschreiten einer Fibrose zur Zirrhose liegt (Dyson et al., 2014). Außerdem findet sich bei etwa der Hälfte aller Patienten ein erhöhter Ferritin Spiegel sowie bei 6-11 % eine erhöhte Transferrin-Sättigung (Paul Angulo, 2002).

Die beste nichtinvasive Untersuchungsmethode zur Einschätzung der Verfettung ist nach wie vor der Ultraschall (Sensitivität 60–94 %, Spezifität 66–97 %) (Machado & Cortez-Pinto, 2013). Bei geringen Steatosegraden büßt er allerdings an Genauigkeit ein (Machado & Cortez-Pinto, 2013). Zeigt sich im Ultraschall eine Steatosis hepatis, wird entsprechend dem diagnostischen Algorithmus der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (siehe Abbildung 1) zunächst der NAFLD Fibrosis Score (NFS) bestimmt, der aus folgenden Parametern besteht: Alter, BMI, Diabetes, AST, ALT, Thrombozytenzahl und Albuminwert (Angulo P, 2007). Der NFS hat einer Studie von Angulo et al. zufolge einen positiven

Vorhersagewert von 82–90 % und einen negativen Vorhersagewert von 88–93 %. Liegt der NFS über -1,455, was einer mittleren bis hohen Wahrscheinlichkeit einer fortgeschrittenen Fibrose entspricht, ist eine transiente Elastographie indiziert, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Fibroscandiagnostik liefert für die Beurteilung des Leberfibrosestadiums bei chronischen Lebererkrankungen eine gute diagnostische Genauigkeit, für die Diagnose einer fortgeschrittenen Fibrose liegt der positiv prädiktive Wert gar bei 90 % (E. Roeb et al., 2015). Auch bei morbid adipösen Patienten (BMI > 50kg/m²) ist laut Weiss et. al in etwa zwei Dritteln eine Elastographie der Leber mittels einer XL-Sonde durchführbar und erzielt zu etwa 42 % valide Ergebnisse. Je nach Messergebnis in der transienten Elastographie ist zur sicheren Differenzierung einer Fettlebererkrankung (NAFL) von fortgeschrittenen Formen wie der NASH weiterhin eine Leberbiopsie erforderlich, wie in Abbildung 1 dargestellt (E. Roeb et al., 2015). Eine Biopsieentnahme ist jedoch invasiv und bietet das Risiko von seltenen lebensbedrohlichen Komplikationen wie etwa Blutungen (Tannapfel, Dienes, & Lohse, 2012). Die Komplikationsrate liegt bei etwa 1 %, die Letalität unter 0,1 % (Rockey et al., 2009).

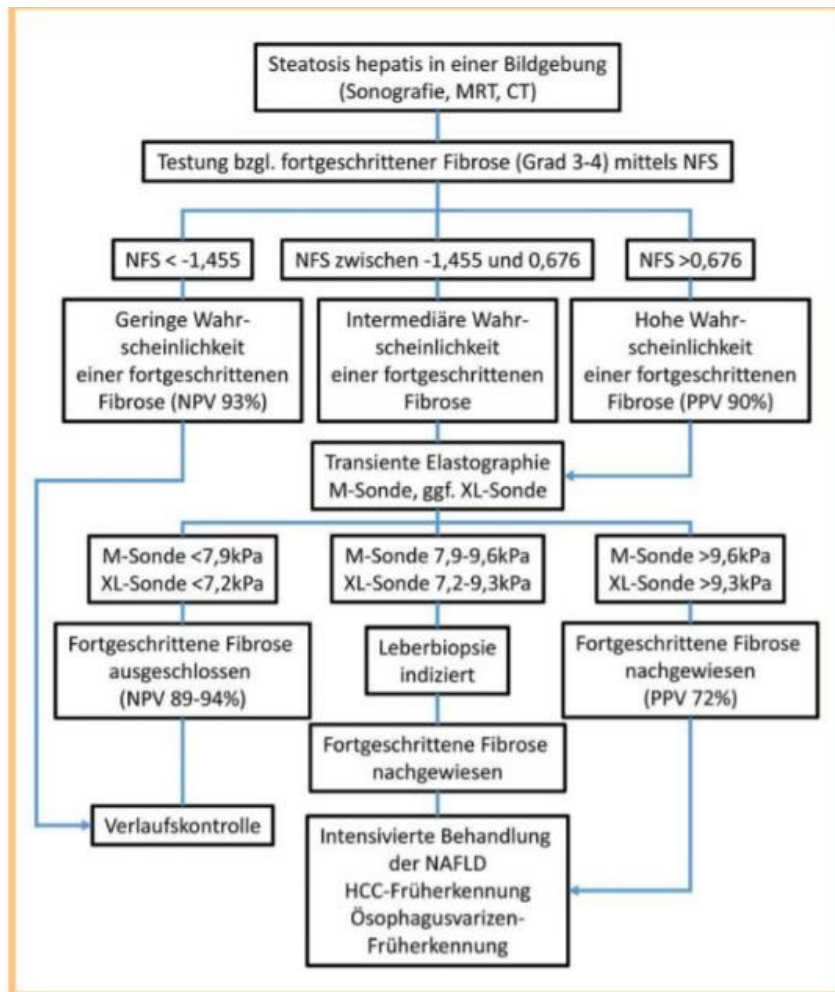


Abbildung 1 Diagnostischer Algorithmus bei NAFLD (E. Roeb et al., 2015); Druckerlaubnis eingeholt. PPV: Positiver prädiktiver Wert; NPV: Negativer prädiktiver Wert.

1.1.5 Therapie

Da die NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms verstanden werden kann, entspricht die Therapie in erster Linie der des metabolischen Syndroms. Die grundlegende Behandlung besteht in einer Lebensstiländerung mit Ernährungsumstellung, vermehrter körperlicher Bewegung und letztlich Gewichtsreduktion (E. Roeb et al., 2015). Außerdem soll insbesondere auf fruktosehaltige gesüßte Speisen und Getränke verzichtet werden (E. Roeb et al., 2015). Dies kann den histologischen Befund, insbesondere Steatose und Nekroinflammation, nachweislich verbessern (Chalasani et al., 2012). Bei einer Gewichtsabnahme von 7-10 % des Körpergewichts kann sich auch die Fibrose reduzieren (Vilar-Gomez et al., 2015).

Laut der Sk2-Leitlinie für nichtalkoholische Fettlebererkrankungen von 2015 gibt es bisher keine für die Indikation NAFLD zugelassenen Medikamente. Darin heißt es, „der Einsatz von anderen Substanzen, z.B. Ursodexocholsäure, Silymarin oder Nahrungsergänzungsmitteln, z.B. Vitamin E kann aufgrund der jetzigen Datenlage nicht empfohlen werden. (starker Konsens) (offene Empfehlung)“ (E. Roeb et al., 2015).

Beim Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 ist der Einsatz von GLP1-Agonisten zu empfehlen, die das kardiovaskuläre Risiko senken und eine histologische Verbesserung der NASH zeigten (Armstrong et al., 2016; Marso et al., 2016). Weitere in den letzten Jahren in Studien untersuchte Medikamente mit unterschiedlichen Angriffspunkten sind der PPAR-Agonist Elafibranor (Ratziu et al., 2016), das Gallensäure-Analogon Obeticholsäure (Neuschwander-Tetri et al., 2015), der Chemokinrezeptor CCR2/CCR5-Hemmer Cenicriviroc (Friedman et al., 2016) und die entzündungshemmende Substanz Selonsertib (Loomba et al., 2017). Allerdings konnte nur für die Obeticholsäure (25mg) ein Erreichen des primären Endpunkts in der Phase 3 Interimsanalyse gezeigt werden (Z. M. Younossi et al., 2019). Daher werden weiterhin neue Ansatzpunkte für eine medikamentöse therapeutische Intervention gesucht.

1.2 Immunologische Grundlagen

Die angeborene Immunabwehr besitzt verschiedene Mechanismen, um Gefahrensignale möglichst früh und effektiv zu bekämpfen. Unter anderem verfügt sie über PRRs, welche einerseits Pathogen-assoziierte molekulare Muster (kurz PAMPs) (Medzhitov & Janeway, 1997), oder andererseits endogene Moleküle, die damage-associated molecular patterns (kurz DAMPs), erkennen können (Land, 2015a). PRRs befinden sich auf phagozytären Zellen wie etwa Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. PAMPs sind spezifische, hoch konservierte, molekulare Strukturen wie etwa LPS, Flagellin, RNA und unmethylierte DNA, welche lediglich in Mikroben vorkommen (Shaw et al., 2010). Als DAMPs wiederum werden endogene Moleküle wie z.B. 5'-Adenosintriphosphat, zytosolische DNA oder Harnsäurekristalle bezeichnet (Land, 2015b; Martinon, Petrilli, Mayor, Tardivel, & Tschopp, 2006). Werden diese

PAMPs oder DAMPs nun erkannt, lösen einige PRRs inflammatorische Immunantworten aus (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006).

Die gegenwärtig bekanntesten Vertreter der PRRs sind die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLRs), die intrazellulären NOD-like Rezeptoren (NLRs), die RIG-1-like Rezeptoren (RLRs) und die C-type Lectin Rezeptoren (CLRs), wobei im Folgenden näher auf die NOD-like Rezeptoren (NLRs) eingegangen wird. NLRs sind intrazelluläre Sensoren von zytoplasmatischen PAMPs und DAMPs. (Schroder & Tschopp, 2010)

1.2.1 NLR Aufbau

Die NLRs gliedern sich, wie die Abbildung unten zeigt, in drei Bestandteile: die C-terminale leucin-rich repeats (LRR) Region zur Erkennung von PAMPs (Kobe & Kajava, 2001), eine Nukleotid-bindende Domäne (NACHT) im Zentrum sowie eine N-terminale Effektorregion. Letztere vermittelt die Protein-Proteininteraktionen und besteht entweder aus einer Caspase recruitment domain (CARD), einer transactivator domain (AD), einer baculoviral inhibitor of apoptosis repeat domain (BIR) oder einer Pyrin-Domäne (PYD) (Schroder & Tschopp, 2010). Anhand der variablen N-terminalen Effektorregion werden vier NLR Subfamilien unterschieden: NLRC, NLRA, NLRB und NLRP (früher „NALPs“). Die Endungen entsprechen jeweils den Anfangsbuchstaben der Effektorregionen CARD, AD, BIR und PYD. (Invivogen, 2012b)

NLR-Subfamilien

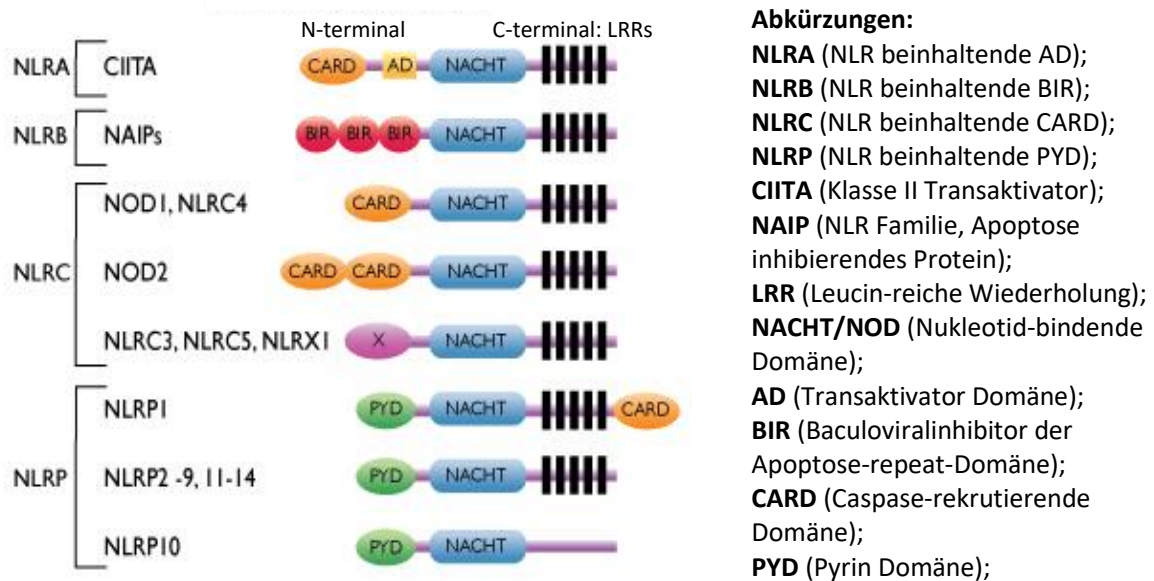


Abbildung 2 Aufbau der NLR Subfamilien aus variierender N-terminaler Effektorregion, zentraler Nucleotide-bindender Domäne sowie C-terminaler Region, die für das Erkennen der PAMPs zuständig ist. Modifiziert nach InvivoGen (2012a); aufgerufen am 18.11.2019, Druckerlaubnis eingeholt.

Einige NLRP (NLR pyrin domain containing) führen zur Bildung von Inflammasomen, die letztlich eine Entzündungsreaktion in Gang setzen (Stutz, Golenbock, & Latz, 2009). Diese wird im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

1.2.2 Das NLRP3-Inflammasom

Inflammasome sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie sind zytosolische Multiproteinkomplexe in Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten, die über verschiedene Stimuli und Gefahrensignale eine Aktivierung von Caspase-1 und damit letztlich die Spaltung proinflammatorischer Zytokine wie Pro-Interleukin-1beta und Pro-Interleukin-18 in ihre aktiven Vorstufen bewirken. Aktives Interleukin-1beta wird von Makrophagen sezerniert und löst eine Entzündungsreaktion aus. Man unterscheidet zwischen dem NLRP1-, NLRP3-, NLRC4- und AIM2-Inflammasom anhand des vorhandenen Sensormoleküls. Das bisher meist untersuchte NLRP3-Inflammasom spielt in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine Rolle, siehe Kapitel 1.2.4. (Elliott & Sutterwala, 2015)

Abbildung 3 beschreibt die Bestandteile des NLRP3-Inflammasoms: Die Pyrimidomäne (PYD) des NLRP3-Inflammasoms ist für die Rekrutierung des Adapterproteins apoptosis-associated speck-like protein (ASC) zuständig. Letzteres wiederum überführt das Zymogen Pro-Caspase-1 über eine CARD-CARD Interaktion in seine aktive Form Caspase-1.

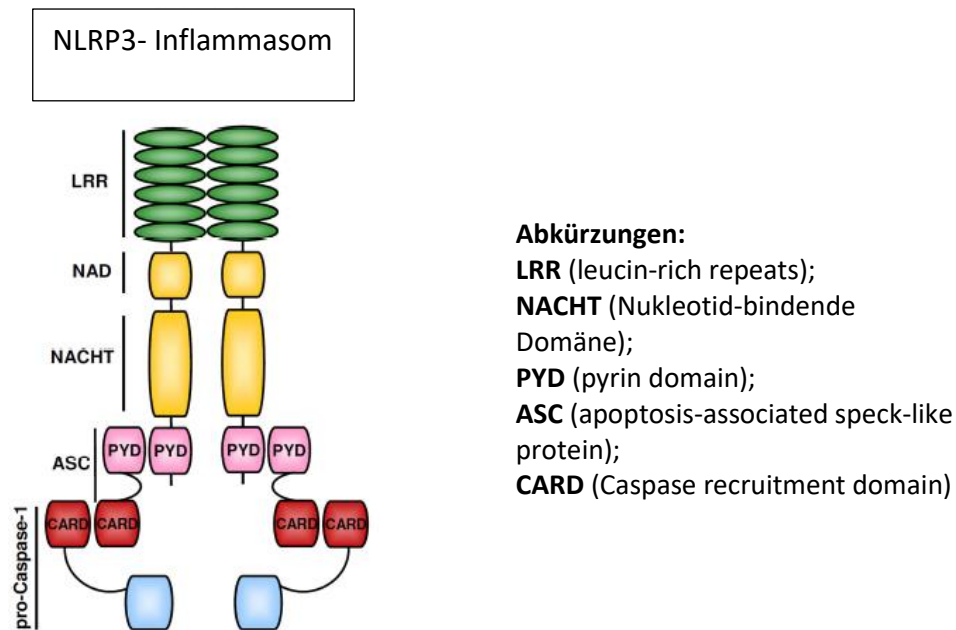


Abbildung 3 Schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasoms

modifiziert nach Eitel (Eitel, Suttorp, & Opitz, 2010); Druckerlaubnis eingeholt. ASC wird über die PYD des NLRP3-Inflammasoms rekrutiert und sorgt für die CARD-CARD Interaktion mit Pro-Caspase-1, welches in die aktive Caspase-1 gespalten wird.

1.2.3 Metabolismus des NLRP3-Inflammasoms

NLRP3 wird durch eine Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen aktiviert (Gross et al., 2009; Kanneganti et al., 2006; Mariathasan et al., 2006; Muruve et al., 2008). Außerdem wird es durch endogene Faktoren zellulären Stresses aktiviert wie etwa extrazellulär freigesetztes ATP, Hyaluronan oder Amyloid-β (Halle et al., 2008; Mariathasan et al., 2006; Yamasaki et al., 2009). Metabolischen Stress auslösende Moleküle stellen weitere mögliche NLRP3-Stimuli dar: Hierzu gehören beispielsweise Harnsäurekristalle und Cholesterinkristalle (Land, 2015b; Martinon et al., 2006) oder Umwelt-Reizstoffe wie UV-B-Strahlung und Asbest (Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Düwell, 2011; Feldmeyer et al., 2007; Hornung et al., 2008). Außerdem aktivieren ROS, die größtenteils

aus Mitochondrien stammen, NLRP3 (Cassel et al., 2008; Cruz et al., 2007; Dostert et al., 2008).

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist wie in Abbildung 4 ersichtlich ein zweischrittiger Prozess: Im Priming wird durch Gefahrenmoleküle letztlich die Expression von pro-IL-1 β und NLRP3 im Zellkern angeregt (Bauernfeind et al., 2009). Im zweiten Schritt entsteht der NLRP3-Inflammasom-Komplex, wobei Caspase-1 gebildet wird, welche daraufhin pro-IL-1 β in seine biologisch aktive Form umwandelt (Bauernfeind et al., 2009). IL-1 β wiederum ist eines der potentesten Pyrogene und Hauptzytokin für inflammatorische Immunreaktionen (Dinarello, 1998).

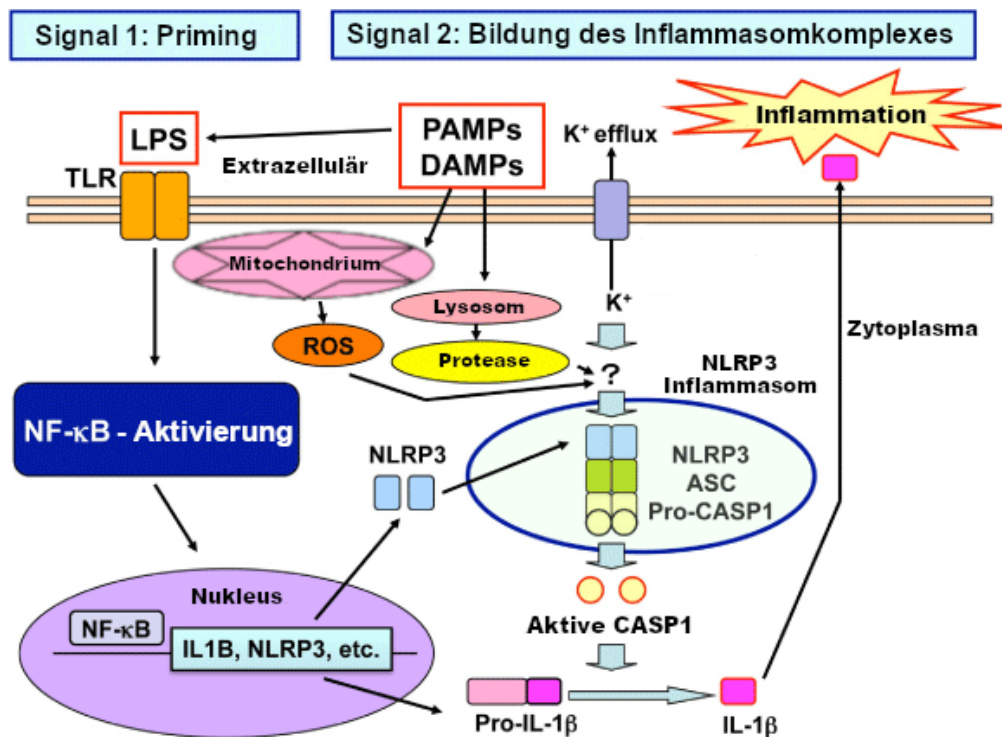


Abbildung 4 Metabolismus des NLRP3-Inflammasoms

Modifiziert nach Natsuki Kawana & Satoh (2014); Druckerlaubnis eingeholt.

Im ersten Schritt, dem Priming, werden Gefahrenmoleküle wie PAMPs oder DAMPs mit Hilfe von PRRs erkannt und die Expression von pro-IL-1 β und NLRP3 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) ausgelöst (Bauernfeind et al., 2009). Im zweiten Schritt bildet sich der NLRP3-Inflammasom-Komplex, wobei die Caspase-1 entsteht, die daraufhin pro-IL-1 β in seine biologisch aktive Form überführt (Bauernfeind et al., 2009). IL-1 β ist eines der potentesten Pyrogene und Hauptzytokin für inflammatorische Immunreaktionen (Dinarello, 1998).

1.2.4 NLRP3-Inflammasom und assoziierte Pathologien

Während einer Infektion kann die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms protektiv sein. Seine unkontrollierte Aktivierung als Antwort auf nicht pathogene endogene oder exogene Stimuli kann jedoch pathologisch wirken.

Mutationen im *NLRP3-Gen*

Bei den gain-of-function Mutationen des *NLRP3-Gens* *CIAS1*, die für das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS) verantwortlich sind, kommt es zu periodisch auftretenden Fieber- und Entzündungsschüben wie etwa beim Muckle-Wells Syndrom oder dem familiären autoinflammatorischen Kältesyndrom (Hoffman, Mueller, Broide, Wanderer, & Kolodner, 2001).

SNP-assoziierte Pathologien

Zusätzlich zu den Keimbahnmutationen gibt es einige Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, kurz „SNPs“, s. 2.2.5, 2.2.6) in den Genen, welche für das NLRP3-Inflammasom oder seine regulatorischen Einheiten kodieren und mit einer Reihe weiterer Erkrankungen assoziiert sind (Paramel, Sirsjo, & Fransen, 2015):

Zahlreiche metabolische Erkrankungen wie Adipositas, Arteriosklerose und Diabetes stehen mit einer erhöhten NLRP3-Aktivierung in Zusammenhang (Elliott & Sutterwala, 2015). Bei Diabetes mellitus Typ 2 wurden erhöhte IL-1 β -Spiegel gemessen (Spranger et al., 2003). Letztere bewirken eine Insulinresistenz, eine Zerstörung insulinproduzierender β -Inselzellen und somit eine Hyperglykämie (Maedler, Dharmadhikari, Schumann, & Stirling, 2009).

Außerhalb des metabolischen Syndroms sind weitere Erkrankungen bekannt, die Rückschlüsse auf eine verstärkte NLRP3-Inflammasom-aktivierung zulassen: Gicht und Pseudogicht (Martinon et al., 2006), rheumatoide Arthritis (Mathews et al., 2014), die Kontakthypersensitivität (Elliott & Sutterwala, 2015; Mathews et al., 2014), chronische Entzündungsprozesse in der Lunge verursacht durch Inhalation von Schadstoffen (Dostert et al., 2008; Doz et al., 2008) und Morbus Alzheimer (Griffin et al., 1989; Simard, Soulet, Gowing, Julien, & Rivest, 2006).

1.2.5 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Das Gen *CIAS1* auf Chromosom 1q44, siehe Abbildung 5, das für NLRP3-Inflammasom transkribiert (Lamkanfi & Kanneganti, 2010), besitzt in etwa 60 Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphisms, kurz „SNPs“) (Q. Zhang, Fan, Zhang, Wang, & Xing, 2015). SNPs sind genetische Variationen, die den Austausch einer einzelnen Base im DNA-Strang bezeichnen. Tragen mehr als 1 % der Bevölkerung diese Variation, kann sie als SNP bezeichnet werden. SNPs können entweder „stumm“ sein, wenn sie nicht im kodierenden Bereich der DNA liegen oder sie werden kodiert und haben einen vorteilhaften, negativen oder auch neutralen Effekt (National Library of Medicine, 2020). Heutzutage existieren dank internationaler Forschungsvorhaben wie z.B. dem 1000-Genome-Projekt oder HapMap umfangreiche Datenbanken über SNPs des menschlichen Genoms. Im Folgenden werden die NLRP3-Polymorphismen rs35829419 und rs10754558 genauer beleuchtet.

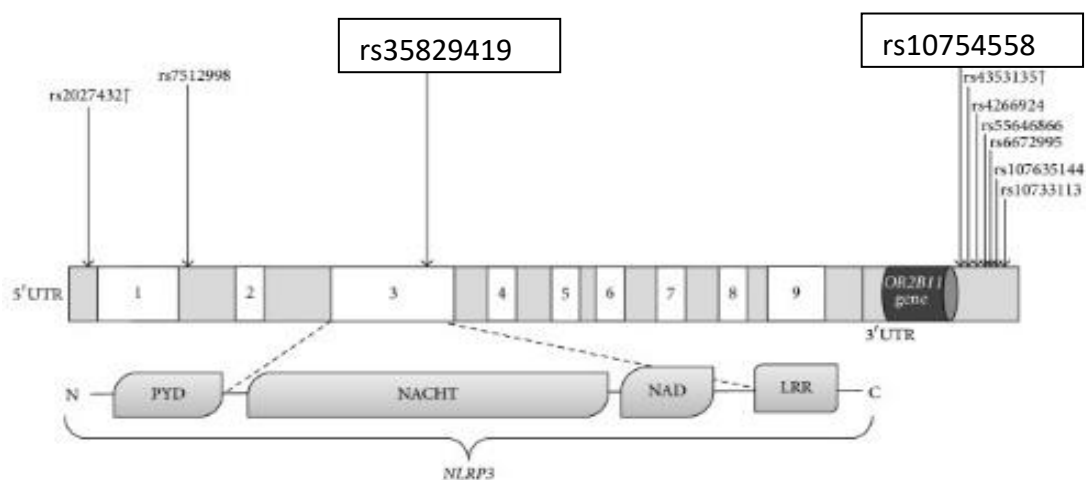


Abbildung 5 Das *NLRP3*-Gen mit seinen bisher untersuchten SNPs (Paramel et al., 2015); Druckerlaubnis eingeholt.

1.2.6 SNP rs35829419 aktueller Forschungsstand

Laut der NCBI-Datenbank handelt es sich beim SNP rs35829419 um eine missense Mutation in einem Protein-codierenden Bereich des *NLRP3*-Gens, bei der die Substitution des Nukleotids C durch A zu einer veränderten Transkription sowie

Translation führt, sodass statt Glutamin Lysin entsteht (N. C. f. B. I. National Library of Medicine, 2020). Die MAF (minor allele frequency) von rs35829419 wird mit A=0,03768 auf der Website des amerikanischen Forschungsprojekts ALFA (Allele Frequency Aggregation) angegeben (2021b). ALFA ist eine Datenbank des NCBI, welches die MAF zahlreicher genetischer Varianten öffentlich zugänglich macht.

Der NLRP3-Genpolymorphismus rs35829419 (C=Major-Allel, A= Minor-Allel, auch bekannt unter „Q705K“) ist eine gain-of-function Variante, die zu hyperaktiven Inflammasomen und damit zu exzessiver IL-1 β -Produktion führt (Verma et al., 2012). Entzündliche Erkrankungen sind für eine exzessive IL-1 β -Produktion bekannt. Die Metaanalyse von Q. Zhang et al. ergab ein signifikant erhöhtes Risiko für das Tragen des Minor-Allels von rs35829419 an Lepra, kolorektalem Karzinom, HIV, rheumatoider Arthritis, abdominalen Aortenaneurysmen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Colitis ulcerosa und atopischer Dermatitis zu erkranken. Nach einer Studie von Klen, Goricar, Janez, & Dolzan (2015) kommt an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Trägern von einem oder zwei A Allelen ein erhöhtes Risiko für makrovaskuläre Komplikationen zu.

Es gibt jedoch auch Studien, die dem NLRP3-Genpolymorphismus keine signifikante oder gar eine protektive Rolle zuschreiben. Die bereits erwähnte Metaanalyse von Bae beispielsweise hat sich ebenso mit dem NLRP3-Polymorphismus rs35829419 beschäftigt und keinen signifikanten Zusammenhang mit autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen (Gicht, systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis, Zöliakie und Morbus Crohn) festgestellt. Des Weiteren wurde für das Minor-Allel von rs35829419 eine protektive Rolle bei der spät einsetzenden Alzheimer-Demenz (Tan et al., 2013) sowie bei Zöliakie festgestellt (Pontillo, Vendramin, Catamo, Fabris, & Crovella, 2011). Außerdem schien Q705K für Frauen in Bezug auf einen Myokardinfarkt risikosenkend, bei Männern ließen sich dagegen erhöhte CRP-Werte feststellen (Varghese et al., 2013).

1.2.7 SNP rs10754558 aktueller Forschungsstand

Laut der NCBI-Datenbank ist der SNP rs10754558 ein gutartiger Polymorphismus im UTR 3 (untranslatierten Bereich) eines Exons des NLRP3 Gens, der zur Substitution des Nukleotids C durch G führt (N. C. f. B. I. National Library of Medicine, 2020). Die durchschnittliche MAF von rs10754558 wird auf der Website des amerikanischen Forschungsprojekts ALFA (Allele Frequency Aggregation) mit $G=0,384913$ angegeben (2021a). In der Studie von Hitomi et al. ergaben sich Hinweise dafür, dass rs10754558 die Stabilität der mRNA beeinflusst. Außerdem soll das Vorhandensein des G Allels über jene veränderte mRNA-Stabilität zu einer 1,4-fach höheren NLRP3-Expression führen (Hitomi et al., 2009). Laut Pontillo et al. soll das G-Allel im Vergleich zum C-Allel für mehr Stabilität der mRNA sorgen. Jedoch bleibt bisher unklar, inwiefern diese stabilere mRNA die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms und folglich die IL-1 β -Sekretion beeinflusst.

Der NLRP3-Polymorphismus rs10754558 (C=Major-Allel, G=Minor-Allel) beeinflusst laut einer Studie von Zhou et al. (2016) das Risiko für Atherosklerose und damit für die Erkrankung an einer koronaren Herzkrankheit. Die Studie fand heraus, dass Patienten mit dem NLRP3 rs10754558 Genotyp GG anfälliger für eine KHK sind und nach einer perkutanen koronaren Intervention eine schlechtere Prognose haben. Außerdem wurden bei Trägern des G-Allels höhere IL-1 β -Spiegel festgestellt als bei Trägern des C-Allels. Nach einer Studie von Wang, Fang, Jin, Wang, & Zheng (2015) ist für Träger des G-Allels das Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 signifikant erhöht. Für den Genotyp GG ergab sich in einer anderen Studie ein signifikant erhöhtes Risiko an Colitis ulcerosa zu erkranken (Hanaei et al., 2018).

Im Gegensatz dazu lieferte eine Metaanalyse von Bae² (2016), die in 30 Studien den Zusammenhang zwischen dem NLRP3-Polymorphismus rs10754558 und autoimmunen und inflammatorischen Krankheiten mittels Allel-Kontrast-Untersuchung, rezessivem, dominantem und co-dominantem Model untersucht hat, keine Assoziation mit den Erkrankungen Gicht, systemischer Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis, Zöliakie und Morbus Crohn. In einer genaueren Auswertung nach Ethnie stellte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen oben genannten Erkrankungen und

dem C-Allel, dem Major-Allel, innerhalb der lateinamerikanischen Bevölkerung heraus. Die weitere Unterteilung nach Krankheitsbild zeigte dann eine signifikante Assoziation mit systemischem Lupus erythematodes und dem C-Allel in der lateinamerikanischen Bevölkerung. Derselbe Zusammenhang wurde für das C-Allel im rezessiven Modell festgestellt. Außerdem wurde in einer Studie von Hitomi et al. (2009) in einem Kollektiv aus pädiatrischen japanischen Patienten für das Minor-Allel ein häufigeres Auftreten von Anaphylaxie und durch Aspirin induziertes Asthma festgestellt.

Auch die Meta-Analyse von Wu et al. des Jahres 2021 schreibt dem G-Allel von rs10754558 eine protektive Rolle zu, hier im Kontext mit Autoimmunerkrankungen. Dieser Zusammenhang trete laut Wu et al. jedoch in den einzelnen Ethnien in unterschiedlicher Ausprägung auf, da auch die MAF innerhalb der einzelnen Ethnien differiere.

1.2.8 Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der NASH

Mittlerweile wurde in einigen Studien das Vorhandensein sowie die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Kupffer-Zellen der Leber, neutrophilen und dendritischen Zellen, sowie in nicht immunen Zellen wie Hepatozyten, hepatischen Sternzellen, endothelialen Zellen und Myofibroblasten bestätigt (Ganz & Szabo, 2013; Szabo & Csak, 2012). Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist hauptsächlich mit der Entwicklung einer NASH, nicht aber einer Steatose assoziiert. Somit zeigte sich in der Leber von an NASH erkrankten Mäusen eine signifikant erhöhte Genexpression von NLRP3-Inflammasom-Komponenten, pro-IL-18 und pro-IL-1 β (Csak et al., 2011; Wree, McGeough, et al., 2014). NLRP3-knock-out Mäuse waren demnach vor einer durch CDAА-Diät (choline-deficient, defined amino acid) induzierten Steatohepatitis und Fibrose geschützt, wohingegen ein NLRP3 knock-in zu einer frühen und schweren Entwicklung einer NASH führte (Wree, McGeough, et al., 2014). Bei Mäusen mit NASH, die durch eine methionin-cholin-defiziente Diät induziert wurde, wurde in den Hepatozyten eine erhöhte Expression von NLRP3, ASC, procaspase-1 und pro-IL-1 β -mRNA gefunden. Bei Mäusen mit isolierter Steatose konnte jedoch keine Inflammasomaktivität festgestellt werden (Csak et al., 2011). Die pro-IL1 β -mRNA Level in den NASH-Mausmodellen korrelierten mit der Expression von COL1A1, einem

fibrosefördernden Gen in NASH, womit die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die Fibroseentwicklung deutlich wird (Wree, McGeough, et al., 2014). Die Rolle einer fettreichen Ernährung bei der NLRP3-Inflammasomaktivierung und damit der Entwicklung einer NASH unterstreicht die Studie von Pan et al. (2018). Hierbei wurde in Mausmodellen eine NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in Kupffer-Zellen unter Gabe von Palmitinsäure beobachtet, welche die Ausschüttung mitochondrialer DNA triggert und ein Aktivator für das NLRP3-Inflammasom darstellt. In der Verhinderung der Wirkung von Palmitinsäure läge demnach eine Möglichkeit, die Entwicklung einer NASH zu stoppen.

1.3 Fragestellungen der Arbeit

Dass die gesteigerte Aktivität des NLRP3-Inflammasoms bei der Entwicklung einer NASH eine relevante Rolle spielt, hat sich bereits in mehreren Studien gezeigt (Csak et al., 2011; Wree, McGeough, et al., 2014). In der folgenden Arbeit geht es nun um die Frage, ob die unter 2.2.5/2.2.6 näher beschriebenen NLRP3-Polymorphismen rs10754558 und rs35829419 mit dem Erkrankungsstadium (NAFL und/oder NASH) assoziiert sind. Genauer soll der Zusammenhang mit den histologischen Merkmalen der NASH, d.h. Steatose, Inflammation und Ballooning untersucht werden. Wie bereits in einigen Studien gezeigt, kommt es bei der NAFLD neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch zur Anregung des erworbenen Immunsystems wie etwa der Th1- und Th17-Zellen (Tang et al., 2011). Die folgende Arbeit untersucht genauer, ob und inwiefern die genetischen NLRP3-Polymorphismen eine Auswirkung auf die Anzahl der peripheren und intrahepatischen Immunzellen (Th1-/Th2-/Th17-/rTreg-/aTreg-Zellen) haben.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Vor der Probenentnahme wurde jeder Teilnehmer über die NAFLD-Studie, ihren Sinn und Zweck und mögliche Risiken informiert und unterzeichnete eine entsprechende Einverständniserklärung. Die Studie wurde von der Ethikkommission mit dem Aktenzeichen AZ138/16 (und Vorgängerstudie AZ96/12) genehmigt. Die Studienkohorte der vorliegenden Arbeit umfasst insgesamt 202 Teilnehmer, 43 für die Studie rekrutierte, gesunde Kontrollen und 159 NAFLD-Patienten, die im Rahmen der Fettlebersprechstunde an der Universitätsklinik Würzburg behandelt und im Zeitraum Dezember 2012 bis Februar 2015 in die Studie eingeschlossen wurden. Voraussetzung für die Aufnahme in das Patientenkollektiv war eine sonographisch oder bioptisch nachgewiesene nichtalkoholische Fettlebererkrankung, sekundäre Ursachen einer Fettleber oder andere Lebererkrankungen waren Ausschlusskriterien. 135 der NAFLD-Patienten unterzogen sich einer bariatrischen Operation ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$), während der insgesamt 87 Patienten eine Leberbiopsie entnommen wurde. Auch 10 NAFLD-Patienten, die keine bariatrische OP erhielten, bekamen perkutan eine Leberbiopsie entnommen. Die Leberbiopsie sowie eine Blutprobe, die die Patienten im Rahmen der Routineblutentnahme der Fettlebersprechstunde der Uniklinik Würzburg abgaben, wurden laborchemisch, immunologisch und genetisch ausgewertet. Die Laboranalysen fanden im hepatologischen Labor der Universitätsklinik Würzburg sowie dem immunologischen Institut Würzburg statt, die Genotypisierung hingegen wurde im Labor der Universitätsklinik Homburg durchgeführt.

2.2 Anamnese und Klinische Untersuchung

Es erfolgte eine Anamnese zu Begleiterkrankungen, Begleitmedikation sowie zu Hinweisen für leberspezifische Beschwerden. Außerdem wurde jeder Patient mittels Fragebogen nach Gewicht, Größe, Alkohol- und Kaffeekonsum, körperlicher Aktivität im Alltag (in Stunden pro Woche) befragt. In der klinischen Untersuchung erfolgte die Palpation der Leber und eine Beurteilung ihrer Konsistenz und Oberflächenstruktur.

2.3 Bildgebende Diagnostik

Die Ultraschalluntersuchung diente der Bestimmung von Kontur und Echogenität der Leber zur genaueren Beurteilung der Steatose und einer signifikanten Fibrosierung. Dabei wurde auf Hinweise wie Aszites sowie auf Zeichen einer portalen Hypertension wie etwa portokavale Kollateralkreisläufe geachtet. Außerdem wurden die Gallenblase, Gallenwege, Leber- und Portalvenen auf Veränderungen/Raumforderungen hin untersucht.

Sonographische Einteilung der Fettleber/Steatosis

Diagnostiziert wurde eine NAFLD mithilfe des sonographischen NASH-Score (Saadeh et al.). Neben der Vergrößerung und einer konvexen Leberkontur fiel sonographisch eine homogen verdichtete Echostruktur („weiße Leber“) mit ausgeprägter Schallabschwächung auf.

Fibroscan

Die Patienten erhielten eine Elastographie zur Bestimmung der Lebersteifigkeit. Als erfolgreich wurde eine Untersuchung mit 10 gültigen Messungen (bei maximal 20 Messungen) und einer Erfolgsrate $\geq 60\%$ gewertet. Außerdem durfte der Interquartilenbereich, kurz IQR, nicht mehr als 30 % der gemessenen Lebersteifigkeit betragen.

2.4 Klinisch-chemische Parameter

Klinisch-chemische Parameter wurden von allen NAFLD-Patienten im Rahmen der Fettlebersprechstunde der Universitätsklinik Würzburg erhoben. Folgende Blutparameter wurden erhoben:

Tabelle 1 Bei Studienteilnehmern erhobene Laborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	
		Männer	Frauen
AST	U/l	bis 50	bis 35
ALT	U/l	bis 50	bis 35
GGT	U/l	bis 60	bis 42
Alkalische Phosphatase	U/l	40-129	35-104
Ferritin	µg/l	30-300	10-200
HbA1c	%	4-6	
Vitamin D	ng/ml	mind. 20	
CRP	mg/dl	0,5	
Gesamtcholesterin	mg/dl	<190	mind. 48
- LDL		<115	
- HDL		mind. 40	
Triglyzeride	mg/dl	<150	

Anhand der Cholesterin- und Triglyzeridwerte sowie der Medikation wurde das Vorliegen einer Dyslipidämie untersucht. Ferner wurde der HbA1c-Wert ermittelt, um das Vorliegen eines Diabetes mellitus zu prüfen. Aus den Parametern Alter, Körpergröße, -gewicht, Diabetes mellitus, dem AST- und ALT-Wert, der Thrombozytenzahl und dem Albuminwert wurde für jeden Patienten der NAFLD Fibrosis Score nach P. Angulo et al. (2007) berechnet. Außerdem wurden die Patienten nach dem Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung, eines bereits diagnostizierten Diabetes mellitus oder eines Bluthochdrucks befragt. Des Weiteren wurde eine Hepatitisserologie (HBs-Antigen, Anti-HBc, Anti-HCV-Antikörper und antinukleäre Antikörper für die Autoimmunhepatitis) abgenommen, um eine zugrundeliegende Hepatopathie auszuschließen.

2.5 Leberbiopsieentnahme

Bei 87 adipösen NAFLD-Patienten wurde während der bariatrischen OP subkapsulär eine Leberbiopsie entnommen. Bei 10 weiteren Patienten ohne bariatrische OP wurde die Leber perkutan unter sonographischer Kontrolle punktiert. Anschließend wurde die Probe in die pathologische Abteilung der Universitätsklinik Würzburg gesendet.

2.6 Histopathologische Begutachtung

Die Leberbiopsien wurden auf Zeichen einer NAFL oder NASH und Hinweise auf eine Zirrhose oder Fibrose untersucht und der Fibrosegrad genauer quantifiziert. Außerdem wurde anhand des histopathologischen Ergebnisses der NAFLD activity Score (NAS) ermittelt (Kleiner et al., 2005). In der Kategorie Steatose konnten 0–3 Punkte, in der Kategorie lobuläre Inflammation ebenfalls 0–3 Punkte und bei der Hepatozytenschwellung 0–2 Punkte erzielt werden.

2.7 Immunologische Auswertung

Die Daten aus der Immunzellanalyse stammen aus einem bereits abgeschlossenen Projekt der Universitätsklinik Würzburg, werden in dieser Arbeit für die Analyse verwendet und daher im Folgenden nur grob zusammengefasst. Die immunologischen Untersuchungen sind detailliert in der Publikation von Rau et al. (2016) nachzulesen. Diese werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

Die Lymphozyten sowie peripheren mononukleären Zellen wurden mit Hilfe des Lymphozyten-Separationsmediums PAA isoliert, mit Trypanblau angefärbt und gezählt. Mit den intrahepatischen mononukleären Zellen wurde ebenso verfahren, nachdem die Leberbiopsien unmittelbar nach der bariatrischen Operation bei Raumtemperatur in Zentrifugationsröhrchen mit RPMI 1640 Medium gelagert wurden, in 1-2mm Stücke geschnitten und vorsichtig durch ein Zellsieb geleitet wurden. Hiernach wurden die erwähnten Immunzellen mit folgenden Zytokinen stimuliert: PMA (Calbiochem), Ionomycin (Sigma-Aldrich) und Brefeldin A (BioLegend), genauer nachzulesen in Rau et al. (2016). Nach der Zentrifugation erfolgte die FACS Analyse (fluorescence activated cell sorting), zu Deutsch Durchflusszytometrie. Hierunter versteht man ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulärer Zytokinproduktion von Immunzellen. Hierbei reagieren Fluoreszenzfarbstoff-markierte spezifische Antikörper mit dem jeweiligen Antigen. Es wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper der Firma BioLegend entsprechend der Herstelleranweisungen verwendet. Die FACS-Analysen wurden mithilfe eines LSR II Durchflusszytometers

(Becton Dickinson, San Diego, CA) und die Datenanalyse unter Einsatz der FLOWJO Software (TreeStar, Ashland, OR) durchgeführt.

Die FACS-Analyse wurde sowohl mit den Leberbiopsiepräparaten der NAFLD-Patienten als auch mit den Blutproben aller Studienteilnehmer durchgeführt. Die Blutproben wurden auf Th1-, Th2-, Th-17-, aTreg-, und rTreg-Zellen hin untersucht. Analog wurden die Leberbiopsien auf Leber-Th1-, Leber-Th2-, Leber-Th17-, Leber-aTreg- und Leber-rTreg-Zellen untersucht.

Das Apoptose-assoziierte Neoepitop CK-18 wurde unter Verwendung des M30-Apoptosense ELISA gemessen, anhand der Herstelleranweisungen (Peviva, Bromma, Sweden) und wie beschrieben in Rau et al (2016).

2.8 Genotypisierung

2.8.1 Probengewinnung, DNA-Extraktion, Ermittlung der DNA-Quantität und -Qualität

Initial wurde allen Teilnehmern der Studie nach entsprechendem Einverständnis für genetische Untersuchungen eine EDTA-Monovette Blut für die Genotypisierung abgenommen. Diese wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gekühlt gelagert. Die weitere Verarbeitung erfolgte schließlich im Labor der Universitätsklinik Homburg und wird im Folgenden nur zusammengefasst dargestellt. Es erfolgte die DNA-Extraktion mithilfe des DNA Blood Mini Kits der Firma Qiagen und die weitere Verarbeitung der DANN. Die hierfür verwendeten Geräte und Reagenzien werden im Anhang dieser Arbeit in einem Auszug des Studienprotokolls der Universitätsklinik Homburg aufgeführt. Durch Einsatz des NanoDrop ND-1000 Spektralphotometers konnten direkt im Anschluss an deren Gewinnung Reinheit und Konzentration der Patienten-DNA ermittelt werden.

2.8.2 Allelische Diskriminierung mittels TaqMan-PCR

Zur genetischen Diagnostik wurde die Patienten-DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, vervielfältigt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein

temperaturgesteuertes, enzymatisch katalysiertes Verfahren zur selektiven Vermehrung bestimmter DNA-Abschnitte. Hierfür werden eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide, eine DNA-Matrize sowie Oligonukleotide (Primer) benötigt werden. Letztere müssen eine Sequenz besitzen, die zum 5'- und 3'-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Strangs komplementär ist. Die PCR besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung und Elongation.

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird auf 95°C erhitzt und in ihre Einzelstränge gespalten.

Anlagerung: Die Temperatur wird (primerabhängig) auf 50-60°C gesenkt, an die einzelsträngige Matrizen-DNA lagern sich nun die Primer komplementär an.

Elongation: Mithilfe der hitzestabilen DNA-Polymerase werden die hybridisierten Primer komplementär zum Matrizen-Strang bei 72°C verlängert.

Die TaqMan-PCR ist in der Lage, zusätzlich zur herkömmlichen PCR, SNPs durch fluoreszenzbasierte Echtzeitanalyse zu erfassen. Neben den Primern für die PCR sind speziell markierte Sonden nötig, die zum entsprechenden SNP-Abschnitt komplementär sind. Sie bestehen am 5'-Ende aus einem fluoreszierenden Detektorfarbstoff (D) und am 3'-Ende aus dem sogenannten Quencher (Q). Letzterer absorbiert die vom Detektorfarbstoff freigesetzte Energie und verhindert somit ein vorzeitiges Fluoreszenzsignal. Die Sonde wird während der PCR durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zerlegt, bis eine messbare Fluoreszenz entsteht, da der Quencher nicht mehr in der Nähe des Fluoreszenzfarbstoffs ist. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Größe des entstehenden PCR-Produkts. Um mutierte von Wildtyp-Allelen unterscheiden zu können, wurden VIC-Fluoreszenzfarbstoff der Firma ABI (VIC) sowie 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) als mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden genutzt.

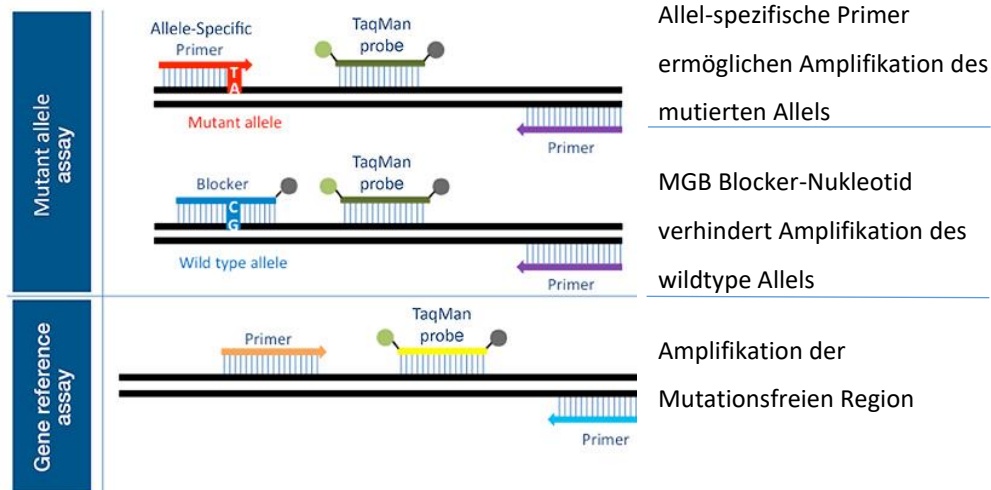


Abbildung 6 Mutationsnachweis mithilfe der TaqMan-PCR

(modifiziert nach www.thermofisher.com, aufgerufen am 27.1.2021, Druckerlaubnis eingeholt.)

Mit Hilfe der oben erklärten TaqMan-PCR wurde in der Universitätsklinik Homburg nun die extrahierte DNA der Studienteilnehmer auf die beiden SNPs rs35829419 und rs10754558 im *NLRP3-Gen* untersucht. Die verwendeten SNP Assays inklusive Sonden und Primer wurden bei der Firma Thermo Fisher Scientific gekauft.

Die Ergebnisse der allelischen Diskriminierung wurden anschließend mit Hilfe der SDS Software (Applied Biosystems, Version 2.0.6) analysiert. Die verwendeten Geräte und Reagenzien sind dem Auszug des Studienprotokolls des Labors der Universitätsklinik Homburg im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

2.9 Statistische Analyse

2.9.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Unter dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWG) versteht man ein Anfang des 20. Jahrhunderts von Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg erarbeitetes populationsgenetisches Modell, das den Zusammenhang von Genotyp- und Allelfrequenzen genauer beschreibt. Als Grundvoraussetzung dient eine fiktive, ideale Population, in der die Häufigkeiten von Allelen und Genotypen aufgrund eines modellierten Gleichgewichts konstant bleiben. Die ideale Population wird durch fünf Annahmen charakterisiert:

1. Es gibt keine Zu- oder Abwanderung (Migration), die die Allelhäufigkeit verändert.
2. Uneingeschränkte Panmixie (Jedes Individuum paart sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit jedem Individuum des anderen Geschlechts).
3. Selektion ist ausgeschlossen, damit bestehen keinerlei Selektionsvor- oder -nachteile für die Träger bestimmter Gene.
4. Es finden keine Mutationen statt.
5. Die Population ist so groß, dass sich der Verlust einzelner Individuen quasi nicht auf die Allelfrequenz auswirkt.

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium lässt sich für den Fall lediglich zwei verschiedener Allele A und a mittels folgender Gleichung ausdrücken:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

wobei p für Frequenz des Allels A, q hingegen für die Frequenz des Allels a steht.

Im Hardy-Weinberg-Äquilibrium wird durch p^2 und q^2 die Häufigkeit der Homozygoten mit Merkmal A bzw. a dargestellt, $2pq$ bezeichnet die Frequenz der Heterozygoten (also Aa).

Sind nun die Häufigkeiten der Genotypen bekannt, kann man mithilfe obiger Formel die Häufigkeit eines Allels in einer Population berechnen, bzw. andersherum lassen sich Genotypfrequenzen ermitteln, wenn eine Allelfrequenz bekannt ist.

Mit dem χ^2 -Test wurde nun für beide in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs geprüft, ob Abweichungen vom HWG vorlagen. Abweichungen können beispielsweise durch Fehler bei der Genotypisierung entstehen oder wenn eine der oben genannten 5 Annahmen nicht zutrifft (Populationsgröße zu gering, Auftreten von Mutationen). In der vorliegenden Studie wurden die Allelhäufigkeiten der beiden SNPs in der Gruppe der NAFLD-Patienten und in der Gruppe der gesunden Kontrollen getestet. Für beide SNPs war das Hardy-Weinberg-Equilibrium erfüllt ($p > 0,05$). Die nachfolgende Tabelle zeigt dessen Überprüfung beispielhaft am SNP rs10754558 mittels des Court Lab HW

Calculator von Michael H. Court aus dem Internet, aufgerufen am 27.1.2021 (Court, 2005-2008).

A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium

Genotypes	Observed	Expected
Homozygote reference:	67	66,1
Heterozygote:	96	97,8
Homozygote variant:	37	36,1
<hr/>		
Var allele freq:	0,43	

$X^2 = 0,064102145$

X^2 test P value = 0,800126 with 1 degree of freedom.

1. If $P < 0.05$ - not consistent with HWE.
 2. Not accurate if <5 individuals in any genotype group.

Michael H. Court
(2005-2008)

2.9.2 Statistische Analyse

Unterschiede von Allel- und Genotyp- Häufigkeiten zwischen NAFLD Patienten und Kontrollen, sowie zwischen NAFL- und NASH-Patienten wurden ermittelt und mittels des Pearson-Chi-Quadrat-Test oder des exakten Fisher Test untersucht, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen histologischem Ergebnis und SNP-Trägerschaft besteht. Der exakte Fischer-Test wurde nur bei einer erwarteten Häufigkeit <5 angewendet. Außerdem wurden mittels des Pearson-Chi-Quadrat-Tests oder des exakten Fisher Tests untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen SNP-Trägerschaft und ordinalen Variablen wie etwa Laborwerterhöhungen (ja/nein) besteht. Des Weiteren wurde eine Assoziation von metrischen Variablen wie z.B. der Anzahl peripherer Immunzellen, Laborwerte (Transaminasen etc.) oder dem NFS oder NAS mit dem SNP-Vorkommen untersucht. Diese metrischen abhängigen Variablen wurde zu Beginn auf Normalverteilung geprüft. Bei nicht normalverteilten abhängigen Variablen diente entweder der Mann-Whitney-

U-Test (bei unabhängiger Variable mit 2 Gruppen) oder der Kruskal-Wallis-Test (bei unabhängiger Variable mit mehr als 2 Gruppen) der Berechnung. Bei normalverteilter abhängiger Variable und unabhängiger Variable mit 2 Gruppen wurde ein T-Test, bei mehr als 2 Gruppen, eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Bei einer normalverteilten abhängigen Variablen mit heterogener Varianz jedoch, die auf einen Zusammenhang mit einer unabhängigen Variable geprüft werden sollte, die aus drei oder mehr Gruppen bestand, wurde ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Eine multifaktorielle ANOVA wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung nicht durchgeführt, stattdessen wurde für entsprechende Analysen eine stratifizierte Subgruppenanalyse verwendet. Quantitative Parameter wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.

Da die bisher bekannte MAF von rs35829419 (laut ALFA, (2021b): $MAF=0,03768$) ziemlich gering ist und somit absehbar war, dass die vorliegende Studie mit einer Fallzahl von 202 entsprechend niedrig gepowert sein wird, wurde auf eine prospektive Poweranalyse verzichtet.

Die statistische Analyse der Daten wurde mittels IBM SPSS Statistics 23 durchgeführt. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als signifikant betrachtet, unter 0,01 als hoch signifikant und unter 0,001 als höchstsignifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

3.1.1 Alter und Geschlecht

Insgesamt nahmen 202 Probanden an der Studie teil, darunter 159 NAFLD-Patienten. Das Alter der NAFLD-Patienten lag zwischen 16 und 87 Jahren und betrug durchschnittlich 45,4 (\pm 12,4) Jahre (Median 46 Jahre). Das Patientenkollektiv setzte sich aus 47 Männern (29,6 %) und 112 Frauen (70,4 %) zusammen. Bei den Männern entsprach das Durchschnittsalter 44,2 (\pm 12,5) Jahren (Median 43 Jahre), der jüngste Patient war 22 Jahre alt, der älteste 77. Bei den Frauen lag das Alter zwischen 16 und 87 Jahren (Durchschnittsalter 46 [\pm 12,5] Jahre, Median 46 Jahre).

3.1.2 Histologie

33 Patienten (34 %) hatten eine bioptisch gesicherte NAFL, 64 (entsprechend 66 %) eine NASH. Bei den restlichen 62 Patienten wurde die NAFLD sonographisch diagnostiziert. Sowohl bei den NAFL-Patienten als auch bei den NASH-Patienten und NAFLD-Patienten ohne Histologie stellten die Frauen die Mehrheit dar. 26 (78,8 %) aller NAFL-Patienten, 48 (75 %) aller NASH-Patienten und 38 (61,3 %) der NAFLD-Patienten ohne Biopsie waren Frauen, bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv also 70,4 %. 87 Patienten wurde eine Leberbiopsie während der bariatrischen OP entnommen, die restlichen 10 wurden perkutan biopsiert.

Vier der 64 NASH-Patienten hatten eine Leberzirrhose (6,3 %). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Häufigkeit der Fibrose bzw. des jeweiligen Fibrosegrads unter NAFL- sowie NASH-Patienten:

Tabelle 2 Häufigkeit der Fibrose unter NAFL- und NASH-Patienten

Fibrosegrad	Häufigkeit bei NAFL-Patienten n=31*	Häufigkeit bei NASH-Patienten n=62*
0	16 (48,5 %)	25 (39,1 %)
1	15 (45,5 %)	25 (39,1 %)
2		6 (6 %)
3		1 (1 %)
4		5 (5 %)

*Unter den NAFL- sowie den NASH-Patienten gab es je zwei fehlende Werte.

3.1.3 BMI und bariatrische OP

Das Kollektiv der NAFLD-Patienten wurde in der Fettlebersprechstunde der Universitätsklinik Würzburg rekrutiert. Viele der hier rekrutierten Patienten standen kurz der bariatrischen OP. Hierdurch lässt sich der äußerst hohe durchschnittliche BMI des Kollektivs der NAFLD-Patienten erklären. Er lag bei $49,3 \pm 10,3 \text{ kg/m}^2$.

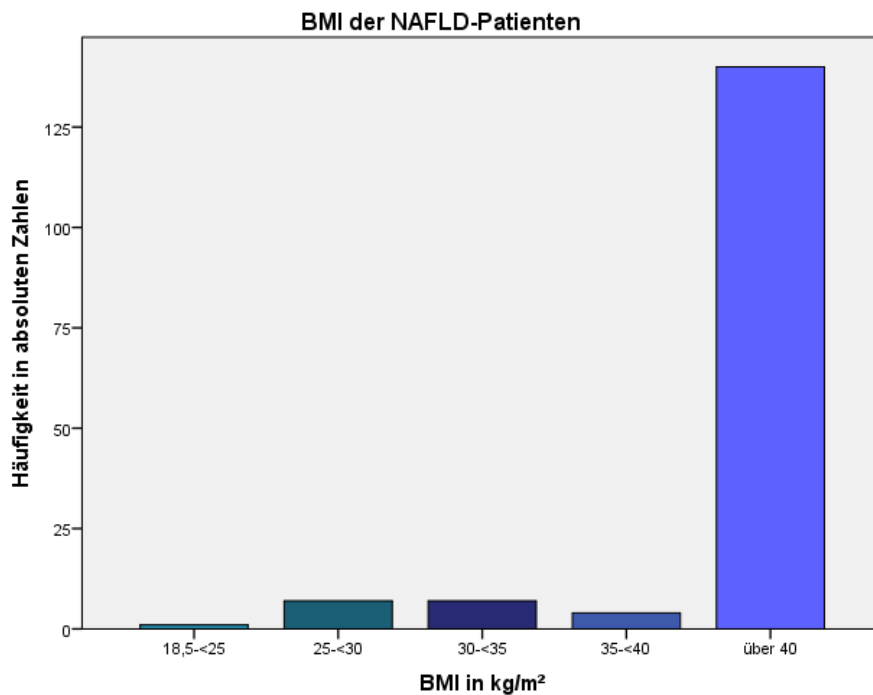


Abbildung 7 Verteilung der BMI-Werte unter den NAFLD-Patienten, BMI-Werte in Gruppen zusammengefasst. 140 der insgesamt 159 NAFLD-Patienten hatten einen BMI > 40kg/m².

Unter den NAFL- und NASH- Patienten gab es keine großen Unterschiede bezüglich des BMI, der BMI der Kontrollgruppe war dagegen im Normbereich. 135 Patienten mit einem BMI ≥ 40 kg/m² unterzogen sich einer bariatrischen OP.

3.1.4 Metabolische Erkrankungen und deren Häufigkeit

Der Großteil der NAFLD-Patienten waren adipös, gut zwei Drittel hatten eine arterielle Hypertonie und etwa ein Drittel einen Diabetes mellitus Typ 2 und eine Dyslipidämie. Folgende Tabelle gibt einen genaueren Überblick über das Vorkommen metabolischer Erkrankungen im Patientenkollektiv.

Tabelle 3 Vorkommen metabolischer Erkrankungen im Patientenkollektiv

Metabolisches Syndrom	Absolute Häufigkeit n=159	Relative Häufigkeit in %
-Adipositas (BMI \geq 30 kg/m ²)	151	95,0
-Diabetes mellitus Typ 2	56	35,2
-Hypertonus	110	69,2
-Dyslipidämie	63	39,6
Außerdem untersucht: KHK	16	10,1

3.2 Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe

3.2.1 Alter und Geschlecht

Das Alter der gesunden Kontrollen war deutlich jünger (Durchschnittsalter: 26,1 [\pm 4,1] Jahre, Median 25 Jahre). Dieser Altersunterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Prävalenz der NAFLD, wie auch die des eng damit verknüpften metabolischen Syndroms, im Alter zunehmen. 32 aller Kontrollprobanden (74,4 %) waren Frauen, was etwa dem prozentualen Anteil im Patientenkollektiv (70,4 %) entspricht.

3.2.2 BMI und metabolische Erkrankungen

Die Kontrollgruppe war normgewichtig. Der BMI der Kontrollpatienten lag im Durchschnitt bei $21,7 \pm 2,8$ kg/m². Zwei Patienten litten an einer arteriellen Hypertonie. Außerdem wurde zum Ausschluss einer Steatosis hepatis eine Sonographie durchgeführt sowie der ALT- und AST-Wert bestimmt.

3.3 Verteilung der SNP- Genotypen

3.3.1 Verteilung der SNPs in der gesamten Kohorte

Der SNP rs35829419 kam nur als Wildtyp (WT) oder heterozygot vor, der SNP 10754558 kam als Wildtyp, hetero- und homozygot vor. Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der einzelnen Genotypen im Studienkollektiv.

Tabelle 4: Verteilung der Genotypen der beiden SNPs in der gesamten Studienkohorte

SNP	Genotyp	absolute Häufigkeit n=202	relative Häufigkeit in %
rs35829419	CC	176	89,3
	CA	21	10,7
	AA	0	0
	Gesamt	197	100
rs10754558	CC	67	33,5
	CG	96	48
	GG	37	18,5
	Gesamt	200	100
rs10754558 Dominantes Modell	CC	67	33,5
	CG_GG	133	66,5
	Gesamt	200	100
rs10754558 Rezessives Modell	CC_CG	163	80,7
	GG	37	18,3
	Gesamt	200	100
rs35829419 und rs10754558 zusammengefasst	Wildtyp	67	33,2
	Träger von Minor-Allel A in rs35829419 und/oder Minor-Allel G in rs10754558	135	66,8
	Gesamt	202	100

3.3.2 Verteilung der SNPs unter NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen im Vergleich

Der SNP rs35829419 kam bei den NAFLD-Patienten nur als Wildtyp (WT) oder heterozygot vor, bei den gesunden Kontrollen fand sich ausschließlich der Wildtyp (s.

Tabelle). Das Minor-Allel A kam demnach in der gesunden Kontrollgruppe überhaupt nicht vor. Der heterozygote Genotyp CA, somit auch das Minor-Allel A, traten signifikant häufiger, nämlich ausschließlich unter den NAFLD-Patienten auf (p-Wert=0,009). Die Genotypen des SNP rs10754558 kamen bei NAFLD-Patienten als auch gesunden Kontrollen in etwa denselben prozentualen Anteilen als Wildtyp, hetero- oder homozygot vor (p-Wert=0,989). Die Allele C und G lagen bei NAFLD-Patienten und Gesunden ebenso in ähnlicher Verteilung vor. Bezogen auf die Gruppe der G-Allelträger ergab sich ein p-Wert von 0,883, bezogen auf C-Allelträger ein p-Wert von 0,984. Auch Träger eines oder beider Minor-Allele von rs35829419 und rs10754558 zusammengefasst kamen in der Gruppe der gesunden Kontrollen sowie der NAFLD-Patienten in etwa gleich häufig vor (p-Wert=0,924). Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der einzelnen Genotypen bei NAFLD-Patienten und Gesunden im Vergleich.

Tabelle 5: Verteilung der Genotypen unter NAFLD-Patienten versus Gesunden

		NAFLD-Patienten n=159		Gesunde Kontrollen n=43		
SNP	Genotyp	absolute Häufigkeit n=159	Relative Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit n=43	Relative Häufigkeit in %	p- Wert:
rs35829419	CC	133	86,4	43	100	0,009
	CA	21	13,6	0	0	
	AA	0	0	0	0	
	Gesamt	154	100	43	100	
rs10754558	CC	53	33,8	14	32,6	0,989
	CG	75	47,8	21	48,8	
	GG	29	18,2	8	18,6	
	Gesamt	157	100	42	100	
rs10754558 Betrachtung Allel G	CC	53	33,8	14	32,6	0,883
	CG_GG	104	66,2	29	67,4	
	Gesamt	157	100	43	100	
rs10754558 Betrachtung Allel C	CC_CG	128	81,5	35	81,4	0,984
	GG	29	18,5	8	18,6	
	Gesamt	157	100	43	100	

rs35829419 und rs10754558 zusammengefasst	Wildtyp	53	33,3	14	32,6	0,924
	Träger von	106	66,7	29	67,4	
	Minor-Allel A in rs35829419 und/oder					
	Minor- Allel G in rs10754558					
	Gesamt	159	100	43	100	

3.4 Auswertungen bezogen auf die gesamte Studienkohorte

Einführend soll die nachfolgende Tabelle einen Überblick über die ermittelten Ergebnisse in der Studienkohorte liefern. Es erfolgte die Analyse der beiden SNPs rs10754558 sowie rs35829419 in Bezug auf Laborparameter, die in der Pathogenese der NAFLD eine Rolle spielen (siehe unten), histologische Merkmale und periphere Immunzellen. Folgende Laborparameter wurden hinsichtlich einer Assoziation mit den einzelnen Genotypen der SNPs untersucht.

- Die Transaminasen ALT, AST und GGT. Für den ALT- und AST-Wert wurde für hochnormale Werte der obersten Quintile je eine weitere Variable „ALT_08“ und „AST_08“ ausgewertet, die bedeutet, dass Werte in den letzten 20 % unterhalb des oberen Normwertes bereits als erhöht gewertet werden. Außerdem wurde mit den nominalen Variablen „ALT_er“ und „AST_er“ untersucht, ob der jeweilige Wert erhöht ist oder nicht.
- Die alkalische Phosphatase (AP), die nominale Variable „AP_er“.
- Die weiteren Laborparameter Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3 sowie der NAFLD-Score.

Ferner wurde bei SNP10754558 die Gruppe der Minor-Allelträger (CG_GG) sowie die Gruppe der Major-Allelträger (CC_CG) im dominanten Modell genauer ausgewertet. Abschließend wurden beide SNPs gemeinsam auf Zusammenhänge zu unten aufgeführten Parametern untersucht. Die jeweils signifikanten p-Werte wurden fett

hinterlegt. Nach der Tabelle folgen eine genauere Darstellung und Visualisierung der Ergebnisse anhand von Diagrammen.

Tabelle 6: Auswertungen bezogen auf die gesamte Studienkohorte

Laborparameter	p-Werte aus Analyse mit:				
	rs 10754558	CC versus CG_GG (rs 10754558)	CC_CG versus GG (rs 10754558)	rs 35829419	beiden SNPs zusammen- gefasst
ALT	0,133	0,113	0,882	0,381	0,108
ALT_08	0,049	0,02	0,948	0,921	0,021
AST	0,05	0,018	0,835	0,757	0,014
AST_08	0,137	0,058	0,951	0,83	0,03
Restliche Parameter (GGT, AP, AP_er, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score)	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Histologische Merkmale					
Histologische Diagnose (NASH/NAFL/HC)	0,998	0,987	0,953	0,052	0,977
Periphere Immunzellen					
Th1-Zellen	0,007	0,003	0,038	0,26	0,006
Th2-Zellen	0,528	0,526	0,275	0,024	0,71
Th17-Zellen	0,935	0,868	0,718	0,894	0,785
aTreg-Zellen	0,341	0,591	0,143	0,362	0,726
rTreg-Zellen	0,367	0,176	0,402	0,063	0,265
Th17_rTregratio	0,803	0,64	0,772	0,263	0,808

Ferner wurde der Zusammenhang der histologischen Diagnose sowie der Genotypen von rs10754558 und rs35829419 in Kombination mit der Risikovariante des *PNPLA3*-Gens mit Hilfe einer stratifizierten Subgruppenanalyse untersucht. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens einer NAFL/NASH zwischen den einzelnen Genotypen.

3.4.1 SNP rs10754558

3.4.1.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp

Im Folgenden wurde die Assoziation des SNP rs10754558 in der gesamten Kohorte mit untenstehenden Laborparametern untersucht, die im Rahmen der Pathogenese der NAFLD sowie dem damit assoziierten metabolischen Syndrom eine Rolle spielen. Erhöhte Leberwerte, ein erhöhter NAFLD-Score, ein erhöhtes C-reaktives Protein (Yeniova Ao Fau - Küçükazman et al.) als auch eine Variante des *PNPLA3* Gens (Romeo et al., 2008) gelten als prädiktive Marker in der Entwicklung der NAFLD. Ferner kann ein erhöhter Spiegel von CK-18-Fragmenten einen Hinweis auf das Vorliegen einer NAFLD liefern (Mandelia et al., 2016). Zytokeratin 18 ist das bedeutendste Intermediärfilament-Protein der Leber und wird während der Apoptose von beschädigten Hepatozyten in die Blutbahn freigesetzt (Mandelia et al., 2016).

Assoziation von Transaminasewerten und jeweiligem Genotyp

ALT

Die Untersuchung der Höhe der ALT-Werte in Bezug auf den jeweiligen Genotyp ergab im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (p -Wert= 0,113). Der folgende Boxplot zeigt die Verteilung der ALT-Werte je nach Genotyp.

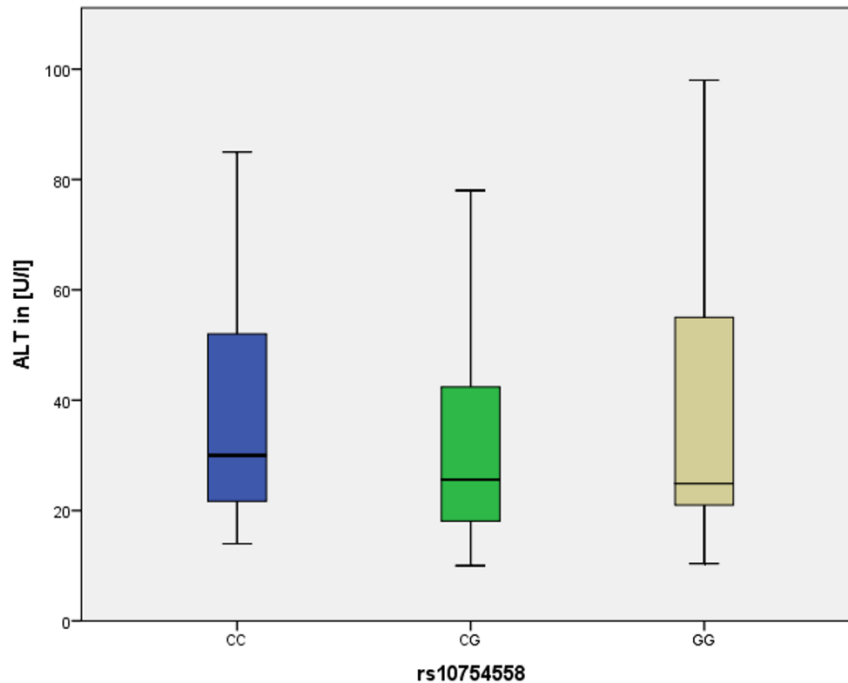


Abbildung 8 Zusammenhang von Genotyp CC versus CG versus GG für rs10754558 und der Höhe des ALT-Wertes. Im obigen Boxplot zeigt sich ein lediglich gering höherer Median des ALT-Wertes für den Wildtyp CC (30 U/l) im Vergleich zum ALT-Median von CG (25,6 U/l) und GG (24,9 U/l). Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen p-Wert von 0,113. Median und Interquartilabstand sind jeweils als waagrechte Linien sichtbar.

ALT_08

Im Chi-Quadrat-Test wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen CC, CG und GG und der Variable ALT_08 festgestellt (p-Wert=0,049). Wildtypen haben prozentual am häufigsten hochnormale ALT-Werte (55,2 %) im Vergleich zu Genotyp CG (35,8 %) und Genotyp GG (43,2 %), wie das untere Balkendiagramm verdeutlicht.

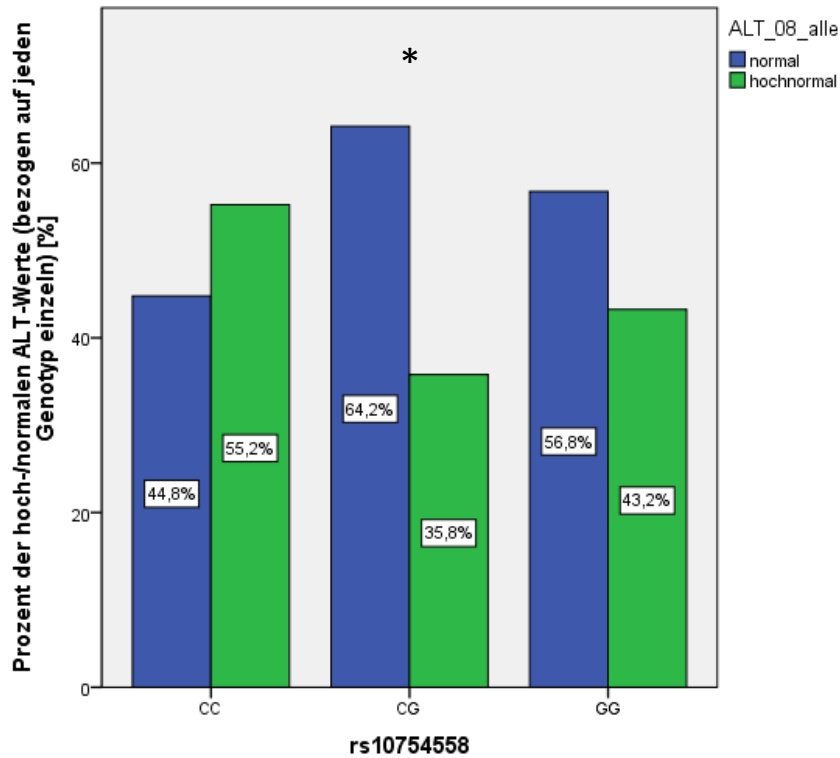


Abbildung 9 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs10754558 und Vorkommen hochnormaler ALT-Werte. Gruppieretes Balkendiagramm: Die Grafik zeigt, dass Wildtypen prozentual am häufigsten hochnormale ALT-Werte (55,2 %) haben im Vergleich zu Genotyp CG (35,8 %) und Genotyp GG (43,2 %). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,049.

Die Rolle von Allel G in Bezug auf die ALT_08-Werte wurde in der folgenden Analyse genauer geprüft. Dabei wurden die Genotypen CG und GG zusammengefasst. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen signifikanten p-Wert von 0,02. Bei Genotyp CC sind prozentual am meisten ALT-Erhöhungen (55,2 %) im Vergleich zu Genotyp CG oder GG (insgesamt nur 37,9 %). Das folgende Balkendiagramm zeigt die Anzahl der ALT-Erhöhungen bei Wildtyp CC und Trägern des Minor-Allels (Genotyp CG und GG).

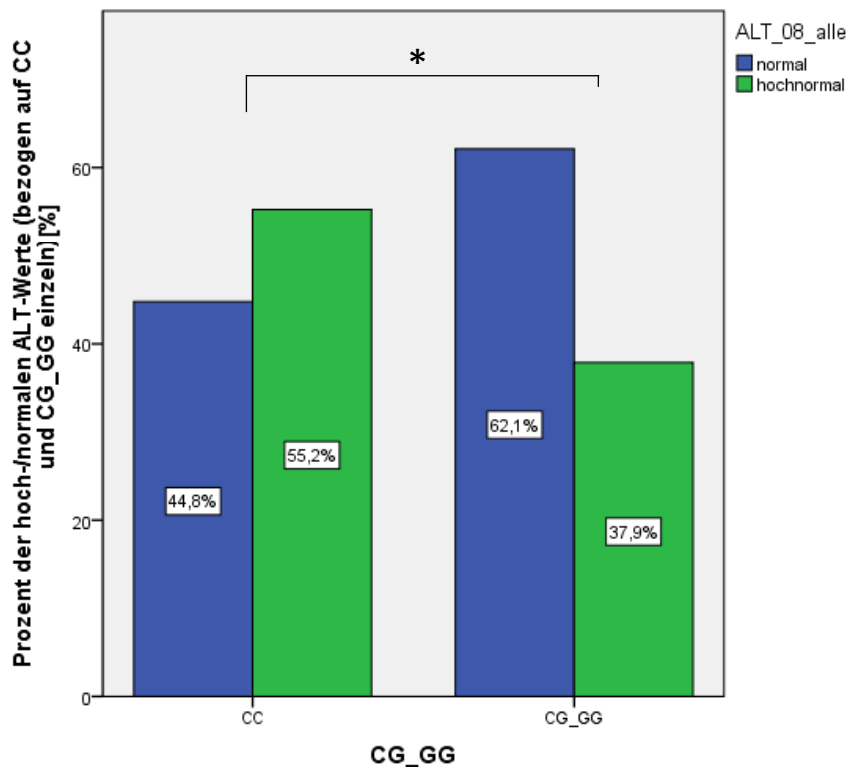


Abbildung 10 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG/GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte. Gruppirtes Balkendiagramm: Bei Genotyp CC wurden signifikant häufiger hochnormale ALT-Werte festgestellt (55,2 % aller Träger von CC) im Vergleich mit den Genotypen CG und GG (insgesamt nur 37,9 % aller Minor-Allelträger). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von $p=0,02$.

AST

Schließlich ergab der Kruskal-Wallis-Test einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Genotypen des SNP rs10754558 und dem AST-Wert (p-Wert=0,05). Die weitere Analyse bestätigt eine signifikante Assoziation von der Höhe des AST-Werts und der Trägerschaft des Minor-Allels im Mann-Whitney-U-Test (p=0,018). Ein Vergleich der beiden Mediane (siehe folgenden Boxplot) deutet darauf hin, dass Träger des Allels G in diesem Kollektiv signifikant niedrigere AST-Werte haben als C-Allel-Träger.

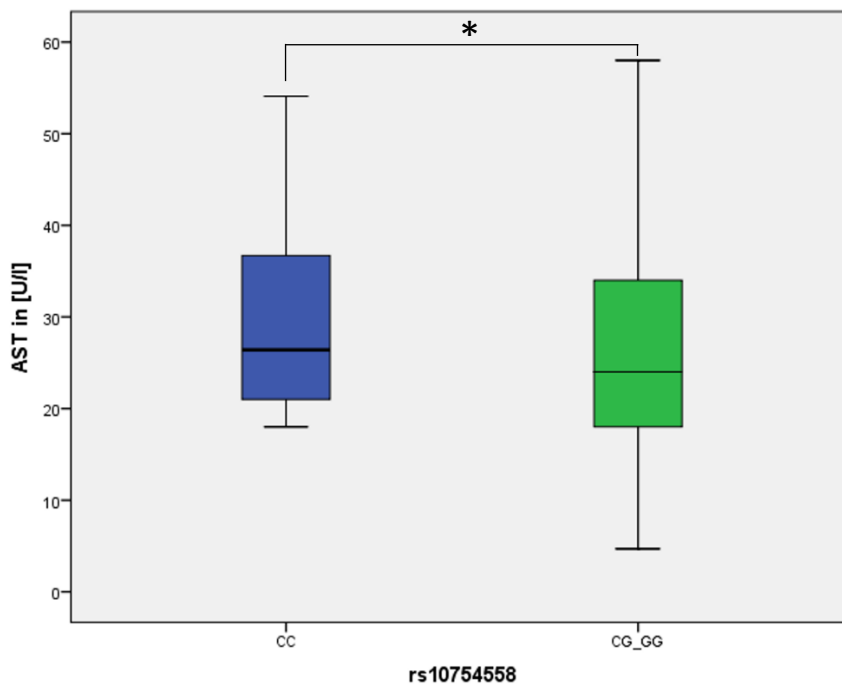


Abbildung 11 Zusammenhang von CC versus CG/GG Genotyp für rs10754558 und der Höhe des AST-Werts. Im obigen Boxplot zeigt sich ein höherer Median des AST-Wertes für den Wildtyp CC (26,40 U/l, 1.Quartil=21 U/l, 3.Quartil=38 U/l) im Vergleich zum AST-Median der Minor-Allelträger (24 U/l, 1.Quartil=18 U/l, 3.Quartil=34 U/l). Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten p-Wert von 0,018.

AST_08

Hinsichtlich des AST-08-Werts zeigte sich eine ähnliche Verteilung von Patienten mit normalen und erhöhten AST-Werten in den Genotypen CC, CG und GG. Der Chi-Quadrat-Test lieferte einen nicht signifikanten p-Wert von 0,137. Für die absolute Verteilung der normalen/erhöhten AST-Werte in den einzelnen Gruppen siehe folgendes Balkendiagramm:

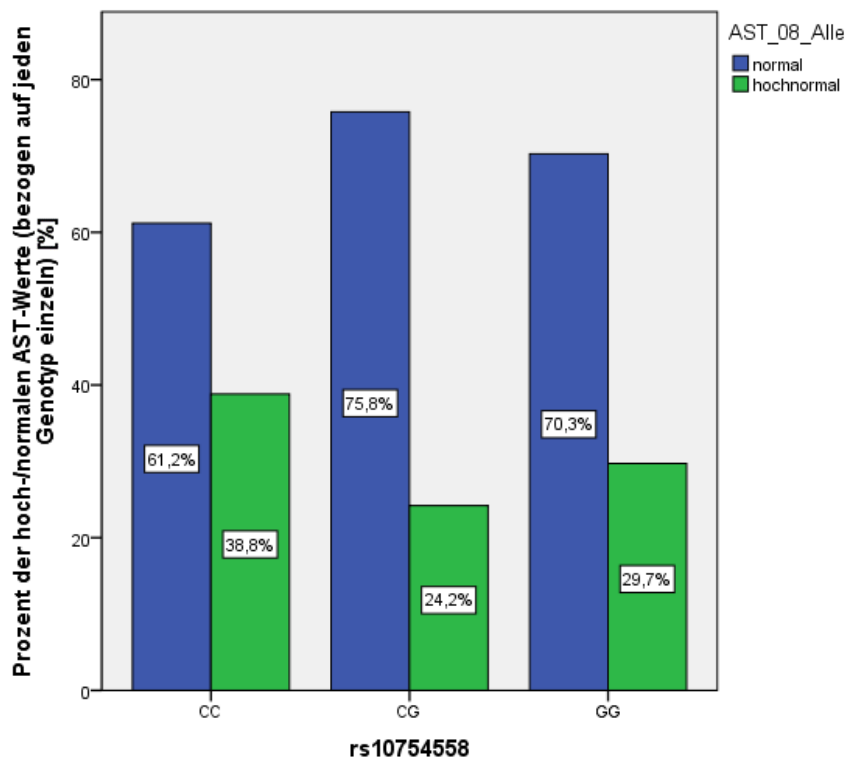


Abbildung 12 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen normaler/hochnormaler AST-Werte. Gruppierendes Balkendiagramm: Bei Genotyp CC sind prozentual am meisten hochnormale AST-Werte (38,8 %) im Vergleich zu Genotyp CG (24,2 %) und GG (29,7 %). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,137.

Auch die genauere Untersuchung von G-Allelträgern versus Wildtypen lieferte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Patientenzahl mit normalen und erhöhten AST-Werten. Allerdings zeigte sich mit einem p-Wert von 0,058 zumindest eine Tendenz, dass G-Allelträger eher normale/niedrigere AST-Werte aufweisen, wie im unteren Diagramm veranschaulicht wird.

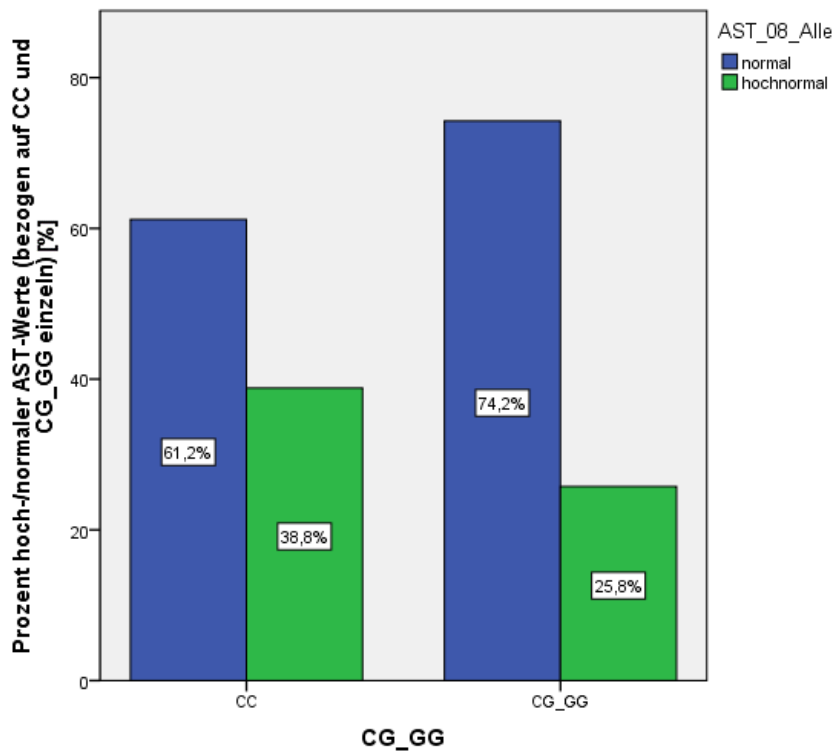


Abbildung 13 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und G-Allelträgern für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte. Gruppieretes Balkendiagramm: Bei Genotyp CC waren prozentual am meisten AST-Erhöhungen (38,8 %) zu finden, im Vergleich zu G-Allelträgern (25,8 %). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,058.

Zu den übrigen Laborparametern GGT, AP, AP_er, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3 und dem NAFLD-Score fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen CC, CG und GG des SNP rs10754558.

3.4.1.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp

Zwischen dem histologischen Ergebnis und den einzelnen Genotypen von rs10754558 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert=0,998), d.h. die Verteilung NAFL/NASH und HC war unter den Genotypen in etwa gleich. Um einen genauen Überblick über die Ergebnisse zu gewähren, sind nachfolgend eine Tabelle sowie das dazugehörige Diagramm dargestellt.

Tabelle 7 Verteilung der Genotypen von rs10754558 bezogen auf die histologische Diagnose

			Histo			Gesamt
			NAFL	NASH	HC	
rs10754558	CC	Anzahl	11	20	14	45
		Anteil innerhalb von rs10754558 in %	24,4	44,4	31,1	100,0
	CG	Anzahl	15	30	21	66
		Anteil innerhalb von rs10754558 in %	22,7	45,5	31,8	100,0
	GG	Anzahl	7	13	8	28
		Anteil innerhalb von rs10754558 in %	25,0	46,4	28,6	100,0
Gesamt	Anzahl	33	63	43	139	
	Anteil innerhalb von rs10754558 in %	23,7	45,3	30,9	100,0	

Im folgenden Diagramm zeigt sich eine ähnliche Verteilung von NAFL, NASH oder gesunden Kontrollen unter den einzelnen Genotypen.

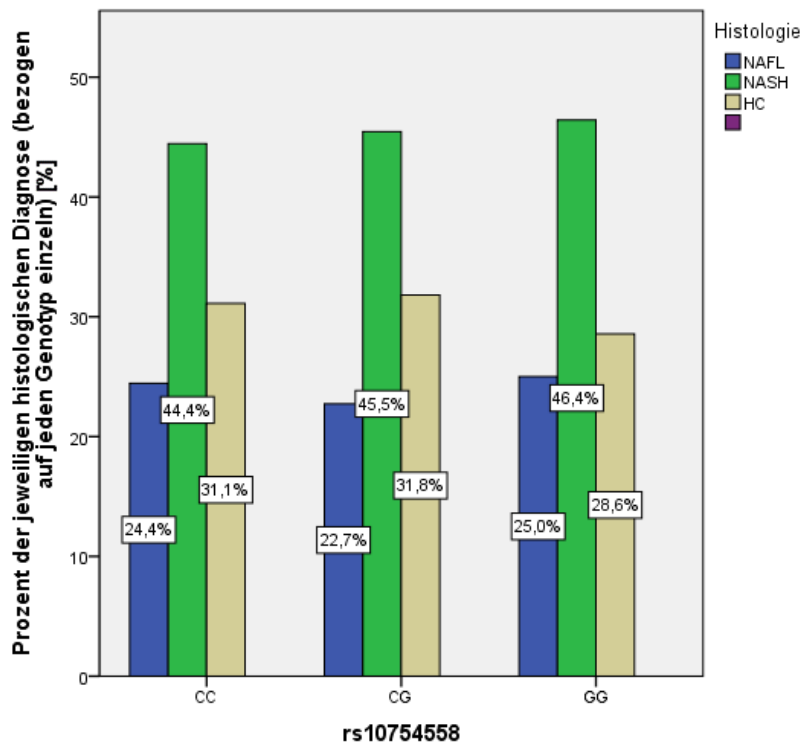


Abbildung 14 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC (Healthy Control). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,998.

3.4.1.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp

Im Folgenden wurde die Assoziation der Genotypen des SNP rs10754558 sowie seiner Allele C und G mit dem Vorkommen peripherer Immunzellen im Blut untersucht. Es wurden Th-1-Zellen, Th-2-Zellen, Th-17-Zellen, aTreg-Zellen, rTreg-Zellen und das Verhältnis aus Th-17- und rTreg-Zellen (Th-17_rTregratio) mit in die Testungen einbezogen.

Mit der Anzahl der Th1-Zellen ließ sich eine nennenswerte Assoziation feststellen. Der folgende Kruskal-Wallis-Test ergab einen signifikanten p-Wert von 0,007. Daraufhin wurden die einzelnen Gruppen paarweise verglichen. Zwischen Genotyp CC und CG sowie CC und GG besteht ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Th1-Zellen, wie der folgende Boxplot sowie das Schema darunter verdeutlichen. Minor-Allelträger

hatten ein signifikant höheres Auftreten von Th1-Zellen im peripheren Blut als Wildtypen.

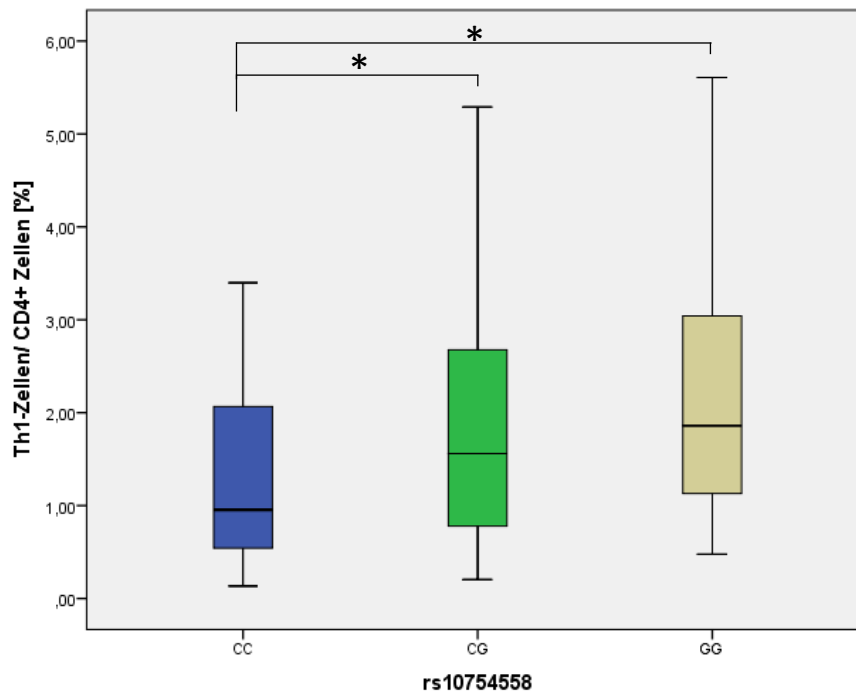


Abbildung 15 Zusammenhang von jeweiligem Genotyp (rs10754558) und der Häufigkeit der Th1-Zellen. Boxplot: Für den WT zeigt sich der niedrigste Median für die Häufigkeit der Th1-Zellen (bezogen auf die CD4+ Zellen). Der Kruskal-Wallis-Test lieferte einen hoch signifikanten p-Wert von 0,007.

Tabelle 8 Im paarweisen Vergleich der verschiedenen Genotypen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Minor-Allelträgern. Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Zwischen Wildtyp und heterozygotem Genotyp ergibt sich ein p-Wert von 0,05, in der Analyse von Wildtyp und Genotyp GG ein hoch signifikanter p-Wert von 0,008.

Stichprobe1 - Stichprobe2	Angepasste Signifikanz
CC-CG	0,050
CC-GG	0,008
CG-GG	0,721

Die genauere Analyse hinsichtlich des Allels G im Mann-Whitney-U-Test verstärkt die obige Aussage, die Genotypen in der Studienkohorte mit einem oder zwei Minor-Allelen weisen signifikant mehr Th1-Zellen als der Genotyp CC auf ($p=0,003$), wie der untere Boxplot verdeutlicht.

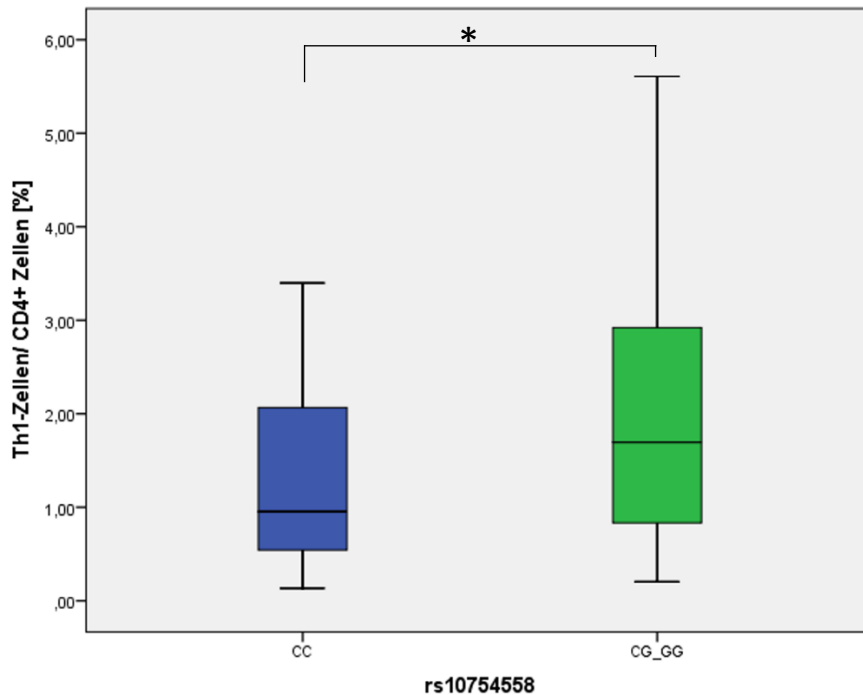


Abbildung 16 Zusammenhang von G-Allelträgerschaft und Häufigkeit der Th1-Zellen. Der obige Boxplot zeigt die unterschiedlichen Mediane der TH1-Zellen für die Allel G-Träger (Median 1,7) und den Genotypen CC (Median 0,95). Der Mann-Whitney-U-Test lieferte einen hochsignifikanten p-Wert von 0,003.

Die Testung mit den restlichen T-Zellen lieferte keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an jeweiligen Immunzellen zwischen den einzelnen Genotypen, genauere Ergebnisse siehe Tabelle.

Tabelle 9 Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests mit den einzelnen Genotypen für rs10754558 und den getesteten Immunzellen

	Th2	Th17	aTreg	rTreg	Th17_rTregratio
p-Wert	0,528	0,935	0,341	0,367	0,803

3.4.2. SNP rs35829419

3.4.2.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp

An dieser Stelle soll genauer auf die Ergebnisse in Bezug auf die Transaminasen eingegangen werden, um Unterschiede zum oben dargestellten SNP herauszuarbeiten.

Im Mann-Whitney-U-Test wurden ähnliche ALT-Werte bei WT und heterozygotem Genotyp festgestellt (p-Wert=0,381). Die Verteilung der ALT-Werte in den beiden Gruppen ist im anschließenden Boxplot dargestellt.

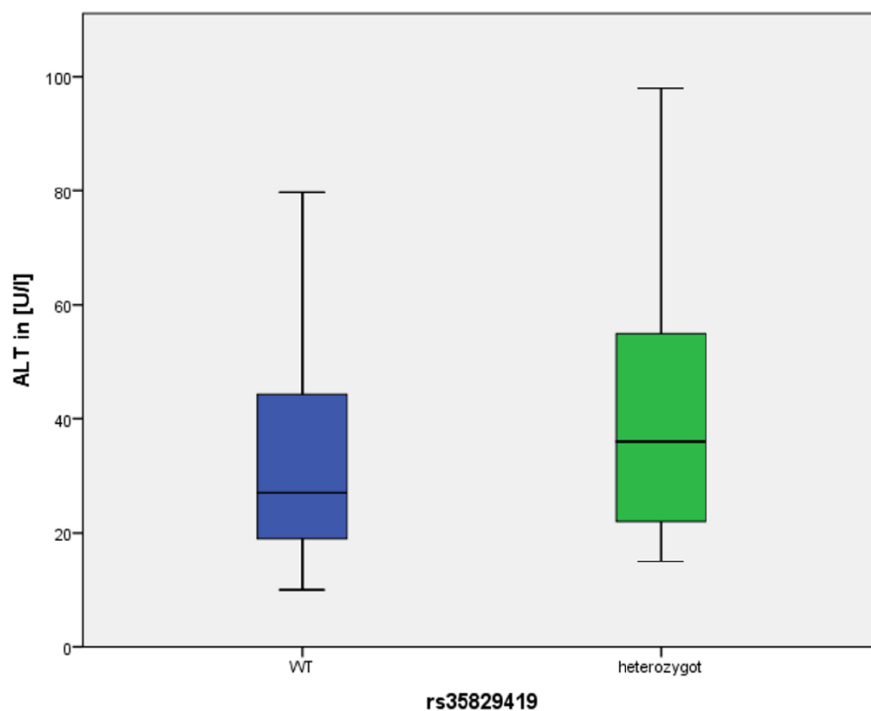


Abbildung 17 Zusammenhang von WT versus heterozygoten Genotyp für rs35829419 und der Höhe des ALT-Werts. Im obigen Boxplot zeigt sich ein niedrigerer Median des ALT-Wertes für den Wildtyp (27 U/l) im Vergleich zum ALT-Median der Minor-Allelträger (36 U/l). Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,381.

Im Chi-Quadrat-Test bezüglich der Variable ALT_08 zeigte sich prozentual eine annähernd gleichmäßige Verteilung normaler und hochnormaler ALT-Werte bei den einzelnen Genotypen (p-Wert=0,921), sichtbar im folgenden Balkendiagramm mit den absoluten Zahlenwerten.

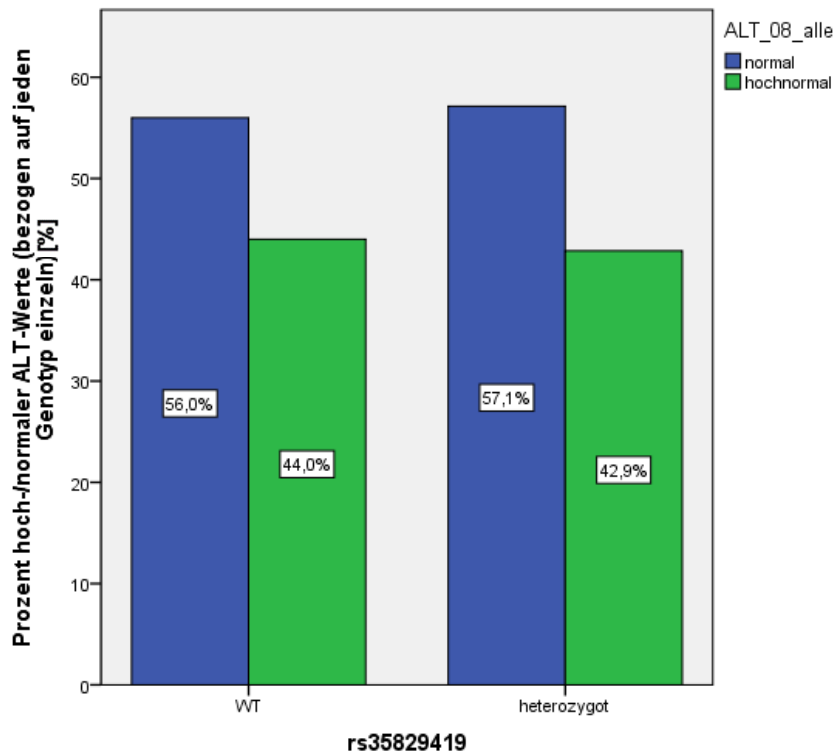


Abbildung 18 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs35829419 und Vorkommen hochnormaler ALT-Werte. Gruppierendes Balkendiagramm: Die Grafik zeigt, dass Wildtypen ähnlich häufig hochnormale ALT-Werte (44,0 % der Wildtypen) haben wie Träger des heterozygoten Genotyps (42,9 % der Heterozygoten). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,921.

Im Mann-Whitney-U-Test bezüglich der Höhe der AST-Werte zeigten sich bei den einzelnen Genotypen ähnlich hohe AST-Werte (p -Wert=0,757), was im folgenden Boxplot veranschaulicht wird.

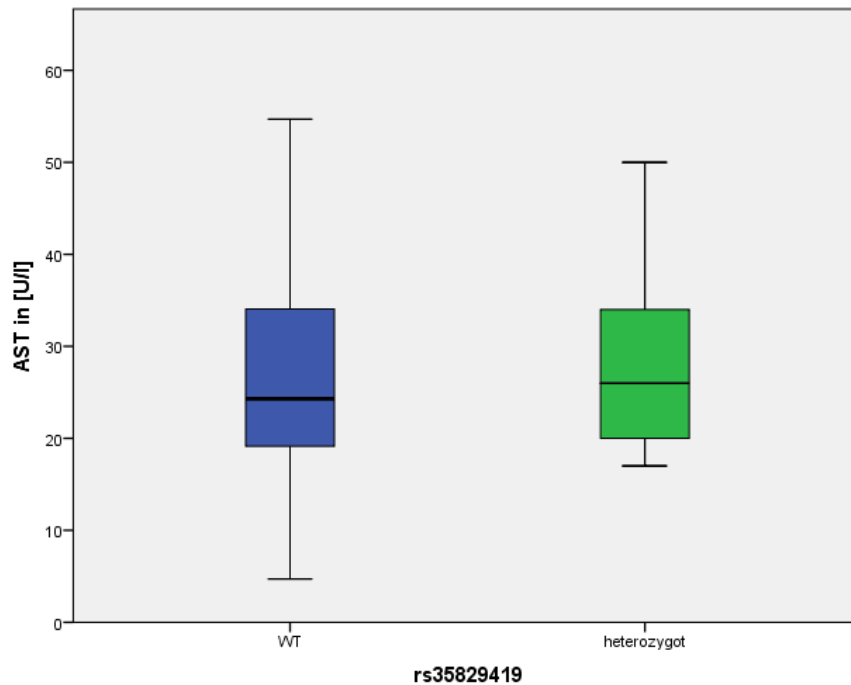


Abbildung 19 Zusammenhang von WT versus heterozygoten Genotyp für rs35829419 und der Höhe des AST-Wertes. Im obigen Boxplot zeigt sich ein niedrigerer Median des AST-Wertes für den Wildtyp (24,3 U/l) im Vergleich zum AST-Median der Minor-Allelträger (26 U/l). Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich ein p -Wert von 0,757.

Im Chi-Quadrat-Test lieferte die Analyse aus AST_08 und den beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede, was die Anzahl an normalen und erhöhten AST-Werten betrifft (p -Wert=0,83). Die untere Graphik zeigt, dass prozentual betrachtet, in etwa gleich viele AST-Erhöhungen bei Wildtypen und Heterozygoten vorkommen.

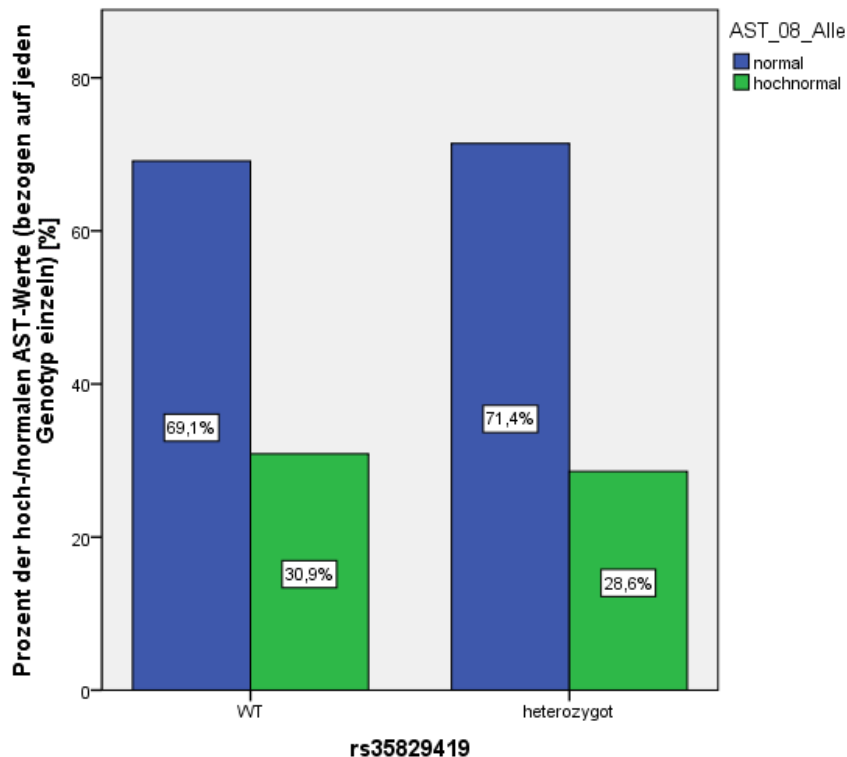


Abbildung 20 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs35829419 und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte. Gruppiertes Balkendiagramm: Die Grafik veranschaulicht, dass bei Wildtypen ähnlich häufig hochnormale AST-Werte auftreten (30,9 % der Wildtypen) wie bei Heterozygoten (28,6 %). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,83.

In der statistischen Analyse ergaben sich ähnliche Werte unter den bereits unter 4.4.1.1 genannten Laborparametern (ALT, ALT_08, ALT_er, AST, AST_08, AST_er, GGT, AP, AP_er, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score) bezogen auf die einzelnen Genotypen.

3.4.2.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp

Hier ergaben sich keine Unterschiede, d.h. die Verteilung von NAFL/NASH und HC war bei Wildtyp und heterozygotem Genotyp ähnlich. Der Chi-Quadrat-Test für die Kategorien NAFL/NASH und HC bezogen auf den Genotyp lieferte einen knapp nicht signifikanten p-Wert von 0,052. Hier sei allerdings zu erwähnen, dass in der Gruppe der heterozygoten Studienteilnehmer kein gesunder Proband (HC) vorhanden war. Die Verteilung der histologischen Diagnosen wird in der folgenden Graphik ersichtlich.

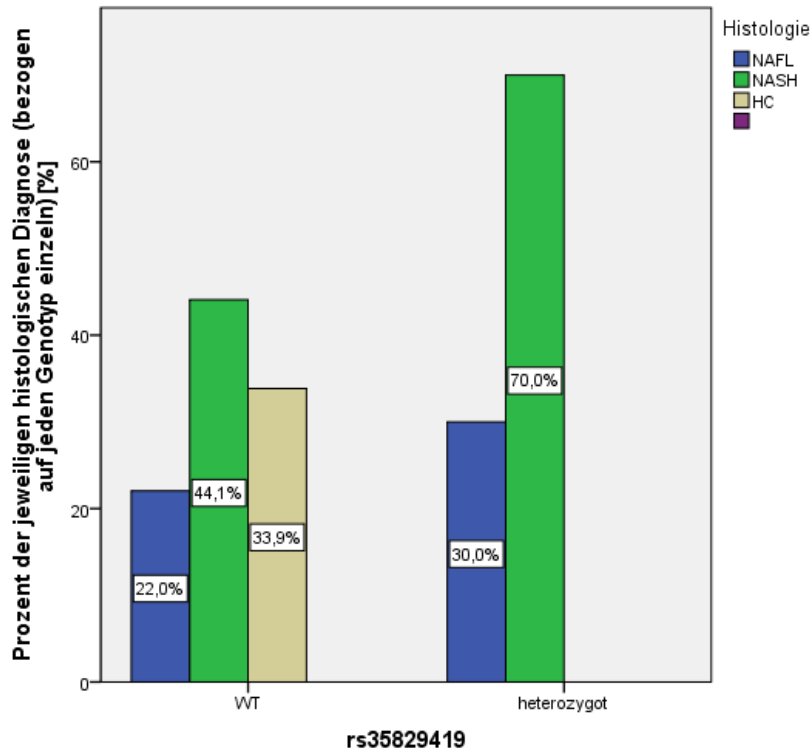


Abbildung 21 Zusammenhang zwischen den einzelnen Genotypen des SNP rs35829419 und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC (Healthy Control). Prozentual treten NAFL und NASH bei Wildtyp und Heterozygoten ähnlich häufig auf, etwa doppelt so häufig NASH wie NAFL. Bei circa einem Drittel aller Studienteilnehmer mit Genotyp WT (rs35829419), die eine Leberhistologie und damit eine histologische Diagnose erhalten haben, findet sich eine blande histologische Diagnose. Beim heterozygoten Genotyp dagegen existieren keine gesunden Kontrollprobanden (HC). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,052.

3.4.2.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp

Analog zu den in 4.4.1.3 untersuchten Immunzellen (Th-1-Zellen, Th-2-Zellen, Th-17-Zellen, aTreg-Zellen, rTreg-Zellen, Th-17_rTregratio) wurden entsprechende Analysen mit dem SNP rs35829419 durchgeführt. Hier ergaben sich für Heterozygote signifikant höhere Frequenzen von Th-2-Zellen im Mann-Whitney-U-Test (p-Wert=0,024), wie im folgenden Boxplot zu erkennen ist.

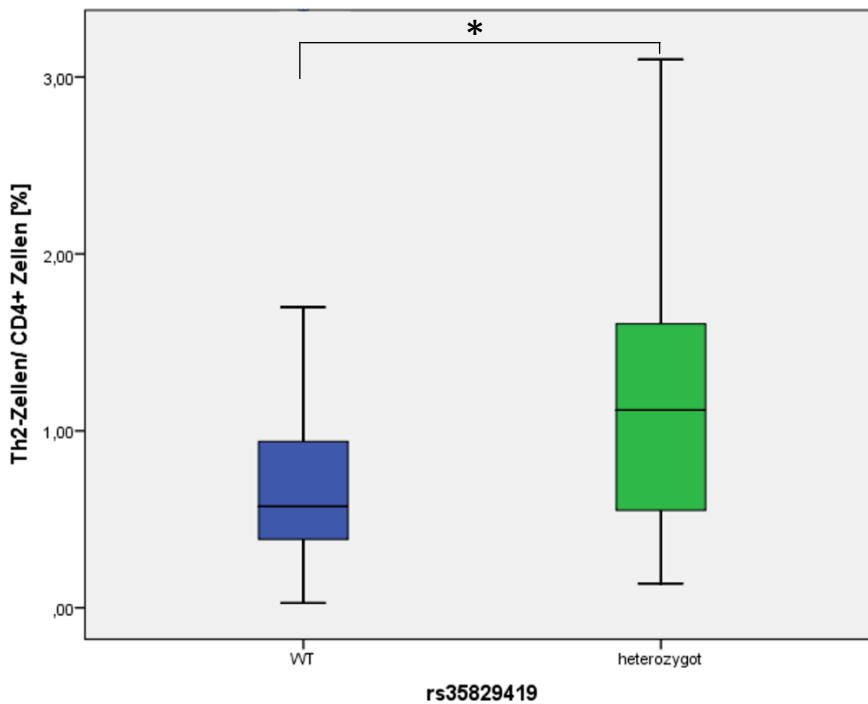


Abbildung 22 Zusammenhang von Genotyp und Häufigkeit der Th2-Zellen für den SNP rs35829419. Im obigen Boxplot sieht man den weitaus kleineren Median für die Häufigkeit an Th2-Zellen bezogen auf CD4+ Zellen für den Wildtyp (0,57 %) im Vergleich zum Median der heterozygoten Allel A-Trägern (1,12 %). Träger des Minor-Allels weisen in dieser Studienkohorte mit einem schwachen Effekt nach Cohen (Effektstärke $r=0,18$) ein höheres Vorkommen von Th2-Zellen auf bezogen auf die CD4+ Zellen. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,024.

Die Testung mit den restlichen T-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der T-Zell-Frequenz bei WT oder heterozygotem Genotyp, wie in der anschließenden Tabelle ersichtlich:

Tabelle 10 Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests mit den einzelnen Genotypen für rs35829419 und den getesteten Immunzellen

	Th1	Th17	aTreg	rTreg	Th17_rTregratio
p-Wert	0,260	0,894	0,362	0,063	0,263

3.4.3. Gemeinsame Analyse der beiden SNPs zusammengefasst

3.4.3.1 Assoziation von Laborwerten und dem Vorliegen eines/mehrerer Minor-Allele

Es dienten dieselben Parameter wie in 4.4.1.1 beschrieben der Analyse mit den beiden SNPs (ALT, ALT_08, ALT_er, AST, AST_08, AST_er, GGT, AP, AP_er, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score).

Es ergaben sich signifikante Zusammenhänge mit der Variable ALT_08, AST_08 sowie AST.

ALT

Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich ähnliche ALT-Werte beim WT sowie bei Minor-Allelträgern beider SNPs zusammengefasst (p-Wert=0,108), die Verteilung wird in folgender Graphik ersichtlich:

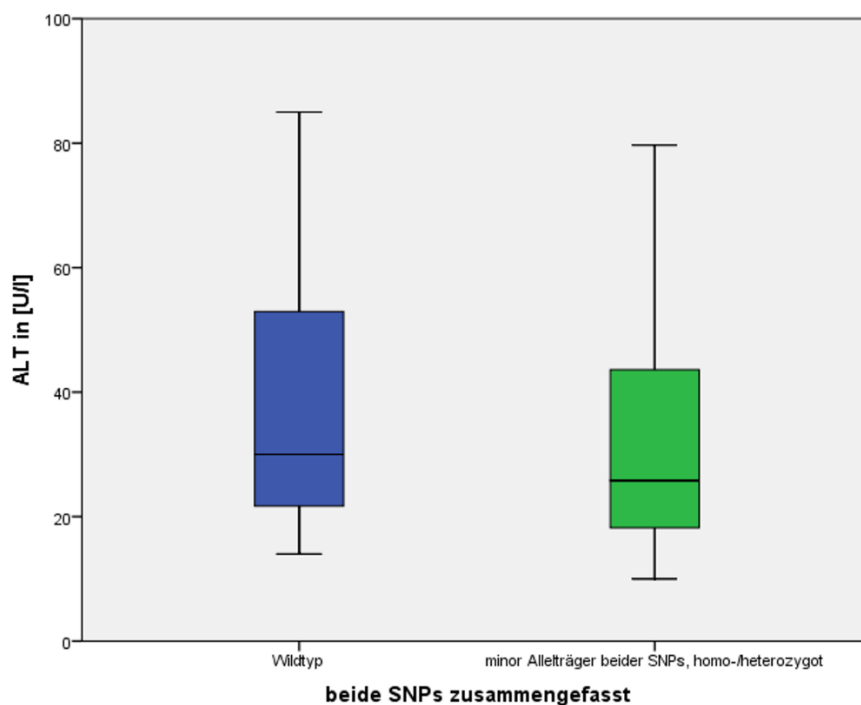


Abbildung 23 Zusammenhang zwischen WT Genotyp beider SNPs und der Höhe des ALT-Werts. Im Boxplot ist für den ALT-Wert des Wildtyps ein höherer Median, (30,0 (U/l)) ersichtlich verglichen mit dem Median der Minor-Allelträger beider SNPs (25,8 (U/l)). Wildtypen haben in der vorliegenden Kohorte höhere AST-Werte als Minor-Allelträger. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,108.

ALT_08

Der Chi-Quadrat-Test bezüglich der Variable ALT_08 lieferte signifikant häufiger hochnormale ALT-Werte bei Wildtypen als bei Trägern eines oder zweier Minor-Allele der beiden SNPs ($p=0,021$), was in absoluten Zahlen in der untenstehenden Graphik verdeutlicht wird.

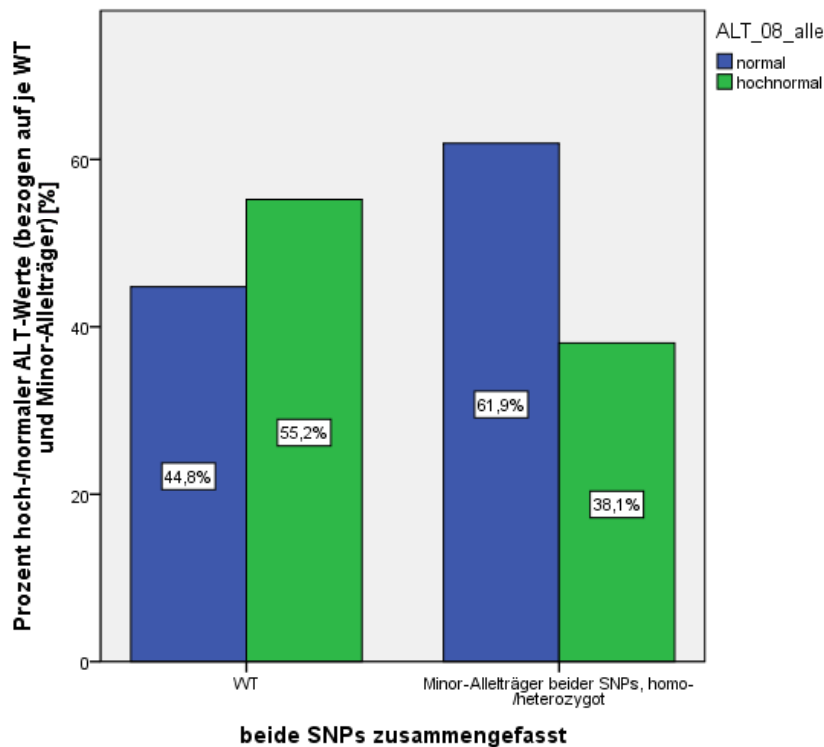


Abbildung 24 Zusammenhang zwischen Genotyp beider SNPs und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte. Gruppierendes Balkendiagramm: Die Grafik zeigt, dass Wildtypen beider SNPs signifikant häufiger hochnormale ALT-Werte (55,2 % aller Wildtypen) aufweisen als Studienteilnehmer mit homo- und heterozygotem Genotyp (38,1 % der Minor-Allelträger). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,021.

AST

Bezogen auf beide SNPs zusammen zeigten sich im Mann-Whitney-U-Test signifikant höhere AST-Werte für den Genotyp WT verglichen mit Minor-Allelträgern (p -Wert=0,014). Derselbe Zusammenhang hatte sich bereits weiter oben bei der alleinigen Analyse von SNPrs10754558 für den Wildtyp ergeben (p =0,018). Ein Vergleich der beiden Mediane im folgenden Boxplot gibt bereits einen Hinweis hierfür:

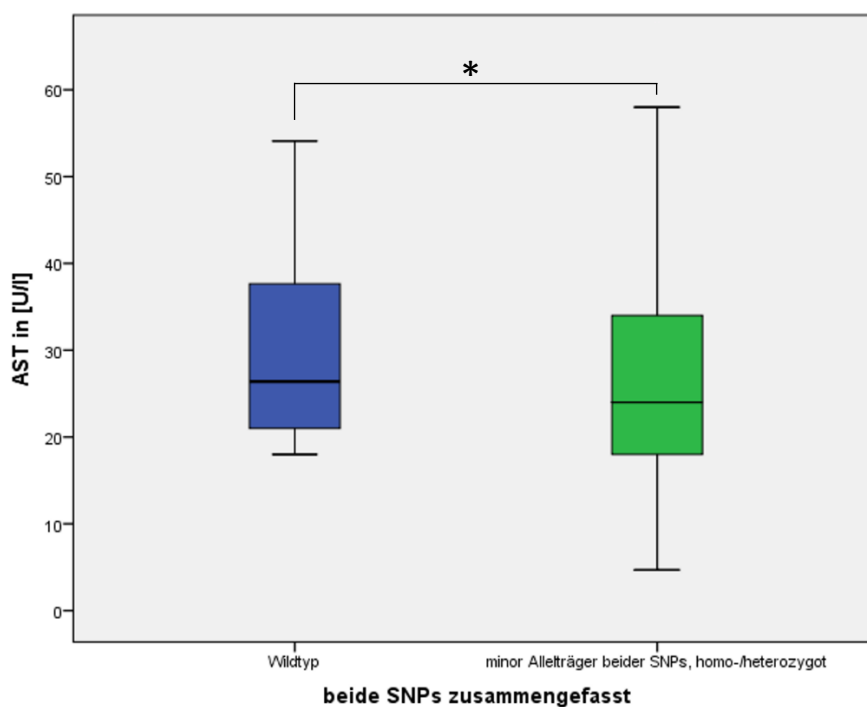


Abbildung 25 Zusammenhang zwischen WT Genotyp beider SNPs und der Höhe des AST-Werts. Im Boxplot ist für den AST-Wert des Wildtyps ein höherer Median (26,4) ersichtlich verglichen mit dem Median der Minor-Allelträger beider SNPs (24,0). Wildtypen haben in der vorliegenden Kohorte höhere AST-Werte als Minor-Allelträger, mit einem schwachen Effekt (Effektstärke $r=0,17$). Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich ein signifikanter p -Wert von 0,014.

AST_08

Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests zeigte sich, dass WT-Genotypen signifikant häufiger hochnormale AST-Werte aufweisen als Minor-Allelträger (beider SNPs), p-Wert=0,03. Die genaue Anzahl in absoluten Zahlen sind dem folgenden Diagramm zu entnehmen.

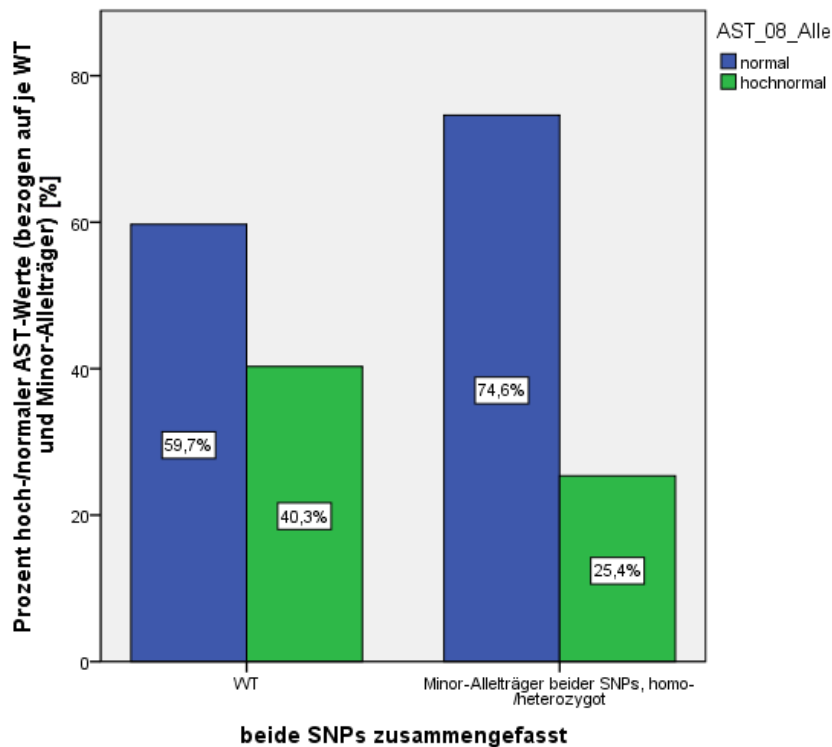


Abbildung 26 Zusammenhang zwischen Genotyp beider SNPs und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte. Im Balkendiagramm sieht man, dass signifikant häufiger Wildtyp-Genotypen (40,3 % aller WT) einen hochnormalen AST-Wert aufweisen. Hetero- und homozygote Genotypen beider SNPs sind hingegen weniger betroffen (25,4 % aller Minor-Allelträger beider SNPs). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen signifikanten p-Wert von 0,03.

3.4.3.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und dem Vorliegen eines/mehrerer Minor-Allele

Die Analyse von Minor-Allelträgern (homo -oder heterozygot) für beide SNPs und der histologischen Diagnose ergab kein signifikantes Ergebnis ($P=0,977$), d. h. das Vorkommen von NAFL/NASH und HC waren unter den Wildtypen und Minor-Allelträgern beider SNPs zusammengefasst in etwa gleich, wie folgende Abbildung zeigt.

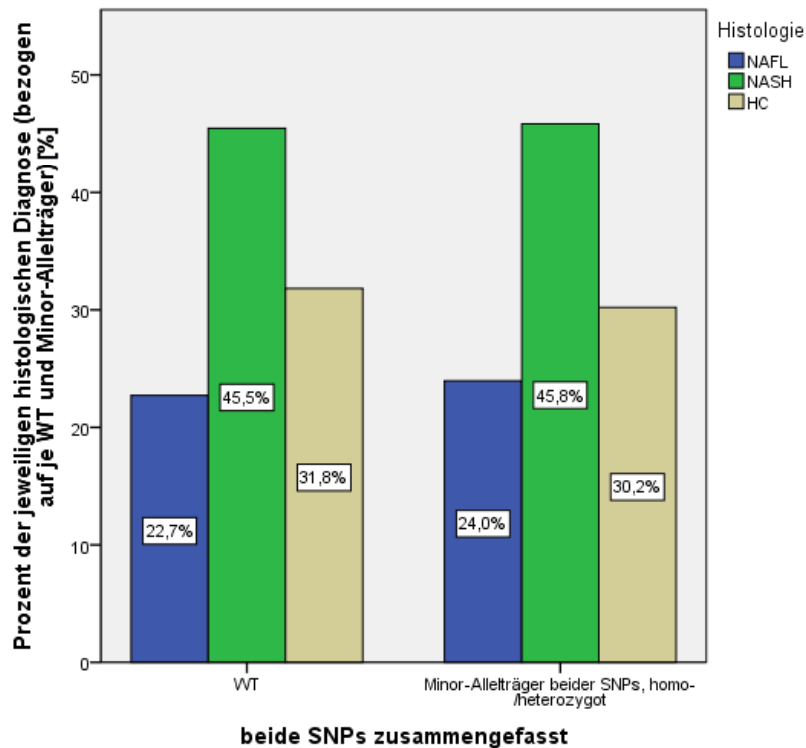


Abbildung 27 Zusammenhang zwischen Trägerschaft eines oder mehrerer Minor-Allele und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC (Healthy Control). Der Chi-Quadrat-Test lieferte einen p-Wert von 0,977.

3.4.3.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und dem Vorliegen eines/mehrerer Minor-Allele

Es erfolgte die statistische Auswertung mit den bereits unter 4.4.1.3 erwähnten Immunzellen (Th-1-Zellen, Th-2-Zellen, Th-17-Zellen, aTreg-Zellen, rTreg-Zellen, Th-17_rTregratio), allerdings bezogen auf beide SNPs zusammengefasst. Hierbei ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang, Minor-Allelträger beider SNPs zeigten vermehrt TH1-Zellen im peripheren Blut ($p=0,006$), wie auch im folgenden Boxplot gut zu sehen ist:

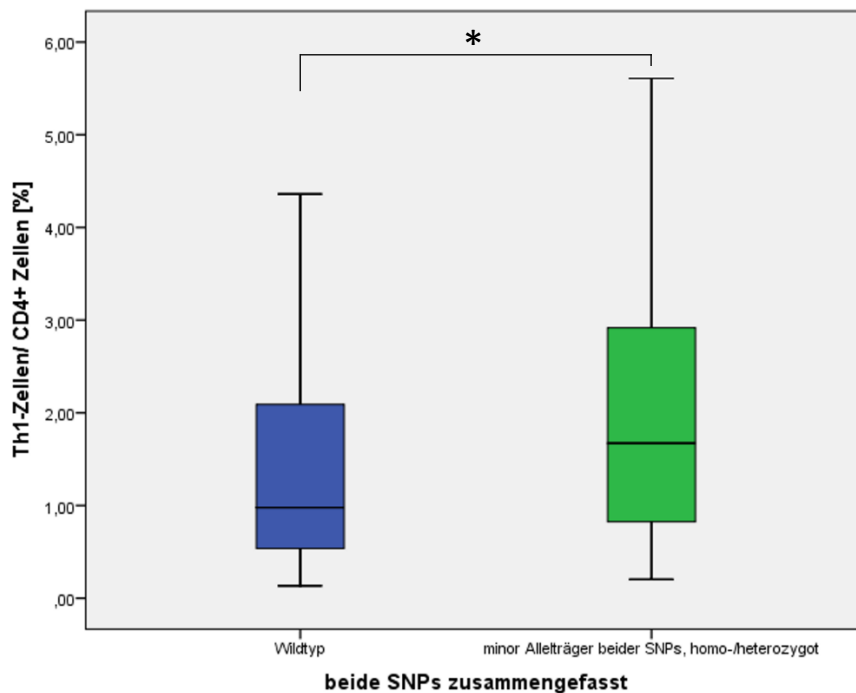


Abbildung 28 Zusammenhang zwischen Minor-Allelträgerschaft und häufigerem Vorkommen von Th1-Zellen. In der genaueren Untersuchung der Mediane der TH1-Zellen, für den Wildtyp 0,98 %, für Träger eines/mehrerer Minor-Allele eines/beider SNPs 1,67 %, zeigte sich ein häufigeres Vorkommen von Th1-Zellen bezogen auf CD4+ Zellen für Minor-Allelträger. Der Mann-Whitney-U-Test lieferte einen hochsignifikanten p-Wert ($p=0,006$).

3.5 Auswertungen bezogen auf die NAFLD-Patienten

Einführend soll anhand nachfolgender Tabelle ein Überblick über die ermittelten Ergebnisse in der NAFLD-Kohorte gegeben werden. Es erfolgte die Analyse der beiden SNPs rs10754558 sowie rs35829419 in Bezug auf Laborparameter (ALT, AST, GGT, AP, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score), histologische Merkmale, periphere sowie intrahepatische Immunzellen. Ferner wurde bei SNP10754558 die Gruppe der Minor-Allelträger (CG_GG) sowie die Gruppe der major-Allelträger (CC_CG) im dominanten Modell genauer ausgewertet. Abschließend wurden beide SNPs gemeinsam auf Zusammenhänge zu unten aufgeführten Parametern untersucht. Die jeweils signifikanten p-Werte wurden fett hinterlegt. Nach der Tabelle folgen eine genauere Darstellung und Visualisierung der Ergebnisse anhand von Diagrammen.

Tabelle 11: Auswertungen bezogen auf die NAFLD-Patienten

Laborparameter	p-Werte aus Analyse mit:				
	rs 10754558	CC versus CG_GG (rs 10754558)	CC_CG versus GG (rs 10754558)	rs 35829419	beiden SNPs zusammen- gefasst
ALT	0,322	0,429	0,349	0,626	0,435
ALT_08	0,108	0,056	0,842	0,275	0,056
AST	0,201	0,236	0,389	0,404	0,229
AST_08	0,165	0,077	0,965	0,323	0,037
AP_er	0,032	0,009	0,53	0,077	0,003
Restliche Parameter (GGT, AP, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score)	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Histologische Merkmale					
Histologische Diagnose	0,979	0,874	0,947	1,0	0,924
Fibrose	0,812	0,73	0,725	0,231	0,701
Zirrhose	0,544	0,592	1,0	1,0	0,585
NAS-Score	0,044	0,834	0,008	0,516	0,864 Im t-test: 0,597
gruppiertes NAS-Score	0,728	0,675	0,799	1,0	0,743
Steatose	0,261	0,061	0,731	1,0	0,074
Inflammation	0,646	0,949	0,275	0,376	0,981
Ballonierung	0,439	0,876	0,273	0,219	0,853
Periphere Immunzellen					
Th1-Zellen	0,007	0,002	0,071	0,436	0,004
Th2-Zellen	0,46	0,231	0,476	0,079	0,37

Th17-Zellen	0,467	0,417	0,54	0,945	0,481
aTreg-Zellen	0,681	0,877	0,386	0,247	0,789
rTreg-Zellen	0,251	0,111	0,333	0,478	0,197
Th17_rTregratio	0,341	0,241	0,652	0,671	0,381
Intrahepatische Immunzellen: Leber-					
Th1-Zellen	0,726	0,664	0,438	0,853	0,952
Th2-Zellen	0,031	0,031	0,56	0,628	0,051
Th17-Zellen	0,405	0,337	0,541	0,512	0,546
aTreg-Zellen	0,919	0,683	0,931	0,093	0,785
rTreg-Zellen	0,656	0,453	0,777	0,677	0,575
Th17_rTregratio	0,736	0,692	0,596	0,116	0,714

Ferner wurde der Zusammenhang der histologischen Diagnose sowie der Genotypen von rs10754558 und rs35829419 in Kombination mit der Risikovariante des *PNPLA3*-Gens mit Hilfe einer stratifizierten Subgruppenanalyse untersucht. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens einer NAFL/NASH zwischen den einzelnen Genotypen.

Anschließend folgt nun die Auswertung der beiden SNPs, beginnend mit rs10754558, ausschließlich in Bezug auf die NAFLD-Patienten.

3.5.1 SNP rs10754558

3.5.1.1 Assoziation von Laborwerterhöhungen und jeweiligem Genotyp

Folgend wurden der Zusammenhang der einzelnen Genotypen des SNP rs10754558 mit den Parameter ALT, ALT_08, AST, AST_08 untersucht.

ALT

Die Analyse bezüglich der Höhe der ALT-Werte erbrachte ähnliche Ergebnisse bei den einzelnen Genotypen von rs10754558 in der Gruppe der NAFLD-Patienten ($p=0,322$). Die Mediane der AST-Werte für die drei Genotypen unterschieden sich demnach kaum. (ALT-Mediane für CC: 32U/l, CG: 30,5U/l sowie für GG: 38,77U/l)

ALT_08

In der gesamten Studienkohorte hatte die Berechnung der ALT-Erhöhungen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen ergeben, Genotypen des Wildtyps hatten signifikant mehr ALT-Erhöhungen als Minor-Allelträger. Innerhalb der NAFLD-Kohorte zeigte sich dieser Zusammenhang nicht mehr ($p=0,108$).

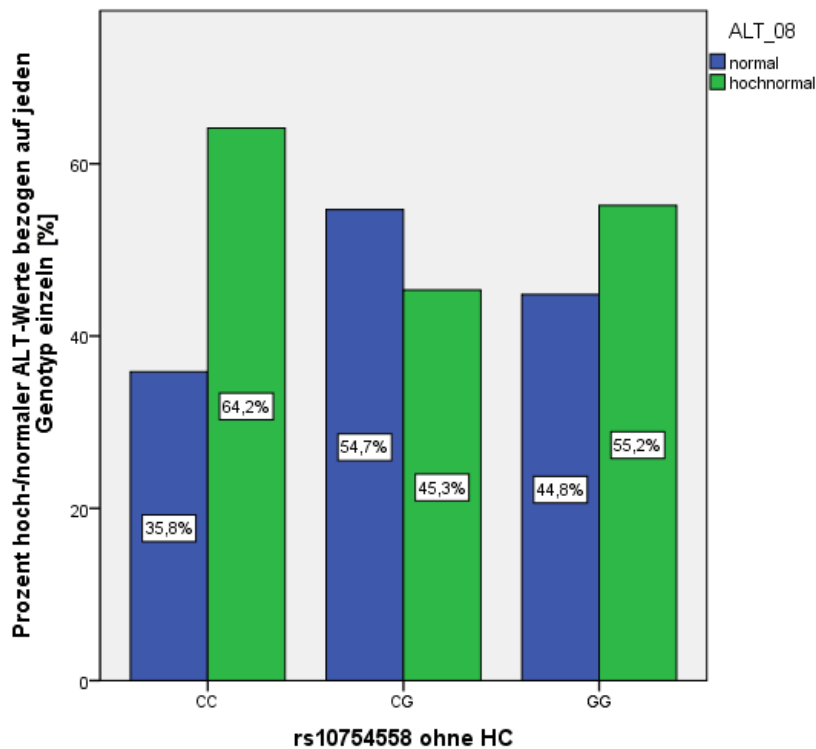


Abbildung 29 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte. Gruppierendes Balkendiagramm: Bei Genotyp CC sind prozentual am meisten hochnormale ALT-Werte im Vergleich zu Genotyp CG oder GG. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,108.

AST

Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Höhe der AST-Werte zwischen den einzelnen Genotypen (p -Wert=0,201) innerhalb der NAFLD-Kohorte (s. unteren Boxplot), in der gesamten Studienkohorte hingegen ergaben sich für Träger des Genotyps CC signifikant höhere AST-Werte als für Minor-Allelträger.

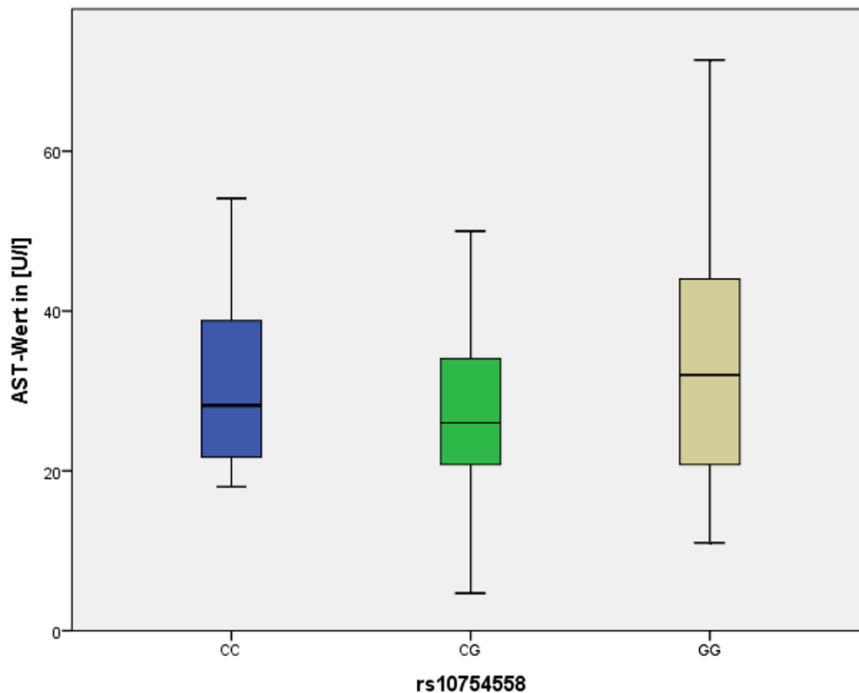


Abbildung 30 Zusammenhang von CC versus CG und GG Genotyp für rs10754558 und der Höhe des AST-Werts. Im obigen Boxplot zeigt sich ein etwas höherer Median des AST-Wertes für den Genotyp GG (AST-Median 31,67U/l) als für CC (28U/l) und CG (26U/l). Der Kruskal-Wallis-Test lieferte einen p-Wert von 0,201.

AST_08

Im Chi-Quadrat-Test zur Analyse von AST-Erhöhungen zeigten sich zwischen den drei Genotypen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung normaler und erhöhter AST-Werte ($p=0,165$).

Die Analyse mit der Variablen AP_er und den einzelnen Genotypen von rs10754558 ergab im exakten Test nach Fisher signifikante Unterschiede in der Verteilung der erhöhten AP-Werte ($p=0,032$). In der genauen Analyse der G-Allelträger versus Wildtypen zeigte sich, dass etwa ein Fünftel aller Wildtypen (20,8 %) in der NAFLD-Kohorte erhöhte AP-Werte haben, im Vergleich zu G-Allelträgern mit nur 6,7 % erhöhten AP-Werten ($p=0,009$).

Tests mit den restlichen Laborparametern (ALT_er, AST_er, GGT, AP, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

3.5.1.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp

Im Folgenden wurde die Assoziation der Genotypen des SNP rs10754558 sowie seiner Allele C und G mit dem Vorliegen einer histologisch gesicherten NAFL oder NASH geprüft. Außerdem wurde ein Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Zirrhose, Fibrose und den histologischen Parametern Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung sowie dem NAFLD activity score untersucht.

Zwischen dem histologischen Ergebnis und den einzelnen Genotypen von rs10754558 zeigte sich eine ähnliche Verteilung von NAFL und NASH im Chi-Quadrat-Test (p-Wert=0,979), wie folgende Abbildung verdeutlicht.

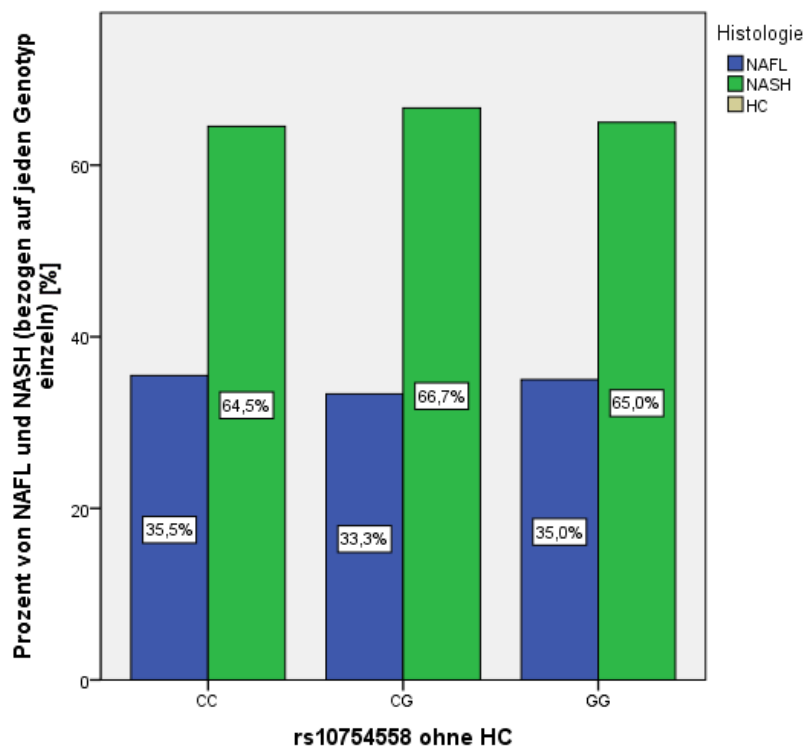


Abbildung 31 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer NAFL oder NASH im Patientenkollektiv. Gruppierendes Balkendiagramm: Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung von NAFL und NASH in den einzelnen Kollektiven. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,979.

Ferner wurde das Verhältnis von NAFL zu NASH je nach Genotyp ermittelt: Hierbei ergaben sich ähnliche Werte und somit kein signifikanter Unterschied ($p=0,979$):

Genotyp CC: 11 Pat. NAFL / 20 NASH = 0,55

Genotyp CG: 15 Pat. NAFL / 30 NASH = 0,5

Genotyp GG: 7 Pat. NAFL / 13 NASH = 0,54

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Vorkommen einer Fibrose und einem bestimmten Genotyp ergab ebenfalls eine ähnliche Verteilung des Fibroseausmaßes zwischen den einzelnen Genotypen (p -Wert=0,812), Vorkommen der Fibrose in absoluten Zahlen siehe Graphik. Prozentual fanden sich beim Wildtyp am häufigsten höhergradige Fibrosen.

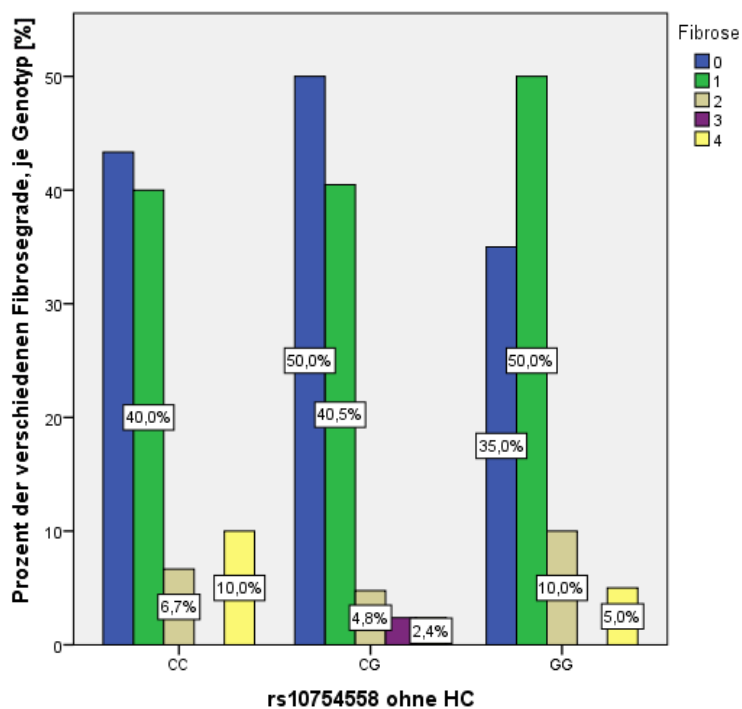


Abbildung 32 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Fibrosegrad in der NAFLD-Kohorte. Gruppirtes Balkendiagramm: annähernd gleichmäßige Verteilung der Fibrose-Prävalenz unter den drei Genotypen. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p -Wert von 0,812.

Ebenso wenig ergab die Analyse bezüglich des Vorkommens einer Zirrhose signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen von rs10754558 in der NAFLD-Gruppe ($p=0,544$), was im folgenden Balkendiagramm veranschaulicht wird.

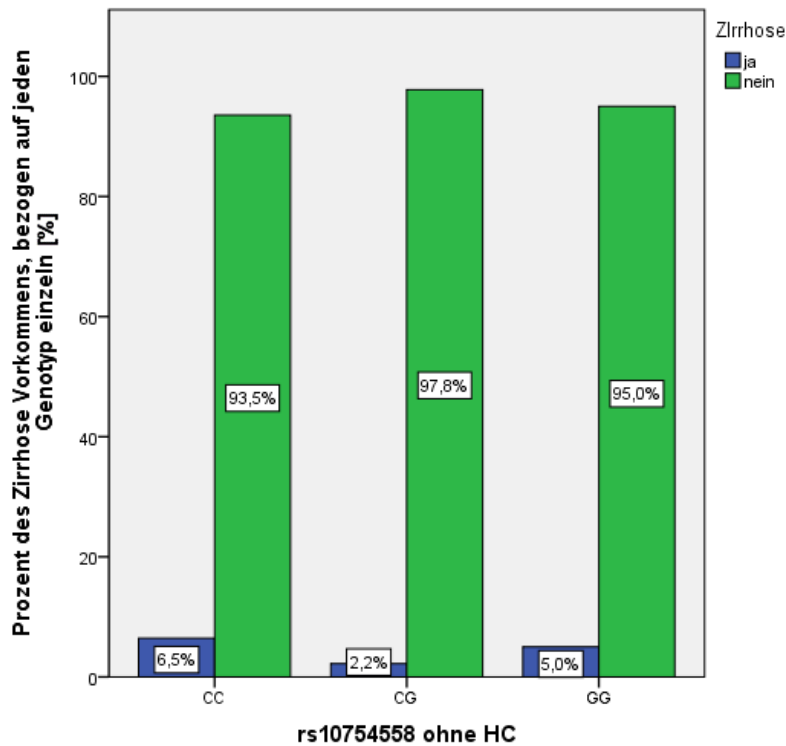


Abbildung 33 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer Zirrhose im Patientenkollektiv. Gruppiertes Balkendiagramm: Prozentual betrachtet ähnliche Häufigkeit einer Zirrhose in den drei verschiedenen Gruppen CC, CG, GG. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,544.

Im Exakten Test nach Fischer mit allen drei Genotypen ergab sich bei der Untersuchung des NAS-Scores für C-Allelträger signifikant höhere NAS-Scores ($p\text{-Wert}=0,044$). In der folgenden Tabelle sieht man die genaue Verteilung der einzelnen NAS-Score-Werte in absoluten und relativen Zahlen in den drei Gruppen CC, CG und GG.

Tabelle 12 Zusammenhang aus jeweiligen Genotypen und dem NAS-Score im Patientenkollektiv

rs10754558		NAS-Score									Gesamt
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
CC	Anzahl	0	1	6	10	6	2	2	2	0	29
	Anteil innerhalb von rs10754558 in %	0,0	3,4	20,7	34,5	20,7	6,9	6,9	6,9	0,0	100,0
CG	Anzahl	0	0	8	12	10	10	3	1	1	45
	Anteil innerhalb von rs10754558 in %	0,0	0,0	17,8	26,7	22,2	22,2	6,7	2,2	2,2	100,0
GG	Anzahl	1	2	2	2	9	0	2	2	0	20
	Anteil innerhalb von rs10754558 in %	5,0	10,0	10,0	10,0	45,0	0,0	10,0	10,0	0,0	100,0
Gesamt	Anzahl	1	3	16	24	25	12	7	5	1	94
	Anteil innerhalb von rs10754558 in %	1,1	3,2	17,0	25,5	26,6	12,8	7,4	5,3	1,1	100,0

Im genaueren Vergleich der C-Allelträger, also Genotypen CC und CG, mit Genotyp GG bestätigte sich oben genanntes Ergebnis: es ergaben sich signifikant höhere NAS-Score-Werte für C-Allelträger im Exakten Test nach Fisher (p-Wert hoch signifikant=0,008).

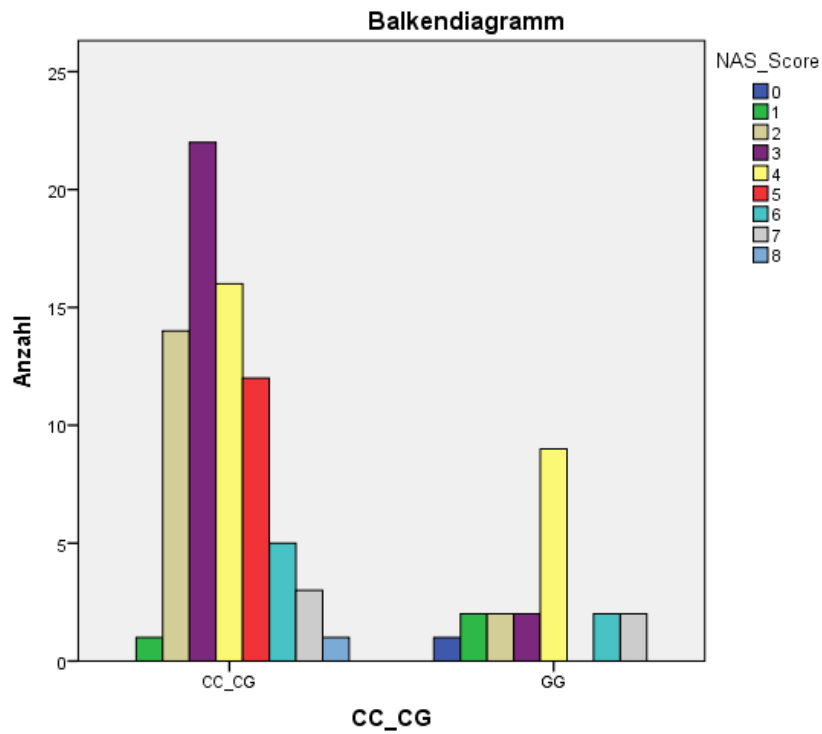


Abbildung 34 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und CG zusammengefasst versus GG und Verteilung des NAS-Scores;Gruppiertes Balkendiagramm: häufigeres Vorkommen höherer NAS-Scores bei C-Allelträgern. Der Exakte Test nach Fisher ergab einen hoch signifikanten p-Wert von 0,008.

Nun wurde der NAS-Score zur genaueren Betrachtung in drei Gruppen (0-2, 3-4, und >4) aufgeteilt. Wie die untere Graphik verdeutlicht, wiesen die drei Genotypen in etwa gleichmäßig verteilte Werte für den gruppierten NAS-Score auf ($p=0,728$).

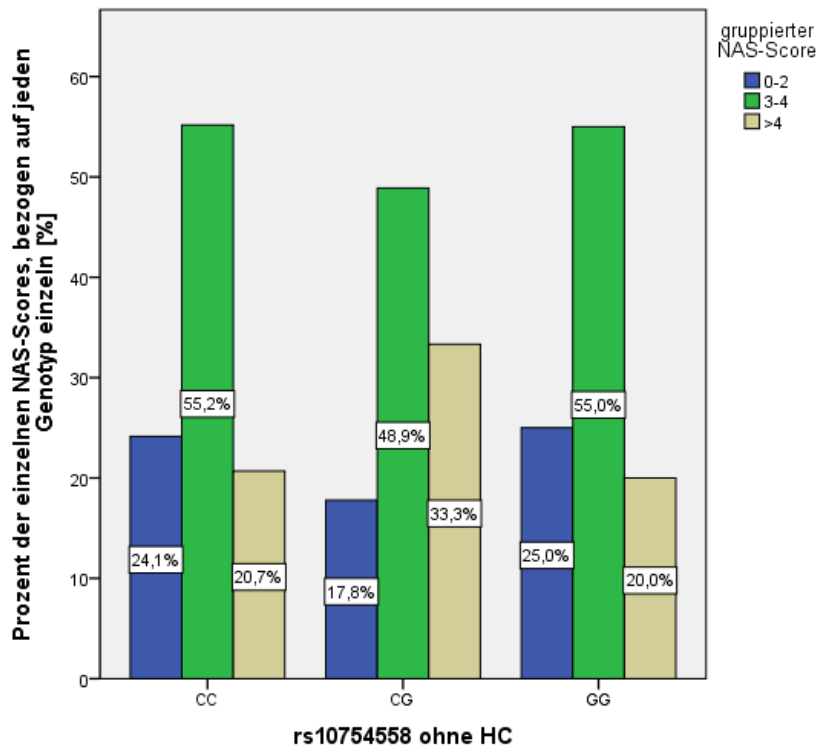


Abbildung 35 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG versus GG und Verteilung des gruppierten NAS-Scores; Gruppiertes Balkendiagramm: ähnliche Verteilung der NAS-Score-Werte in CC, CG, GG. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,728.

Ebenso lieferte der Chi-Quadrat-Test mit Genotyp CC und CG zusammengefasst und Genotyp GG ähnliche Verteilungsmuster des NAS-Scores ($p=0,799$), wie die folgende Graphik gut erkennen lässt.

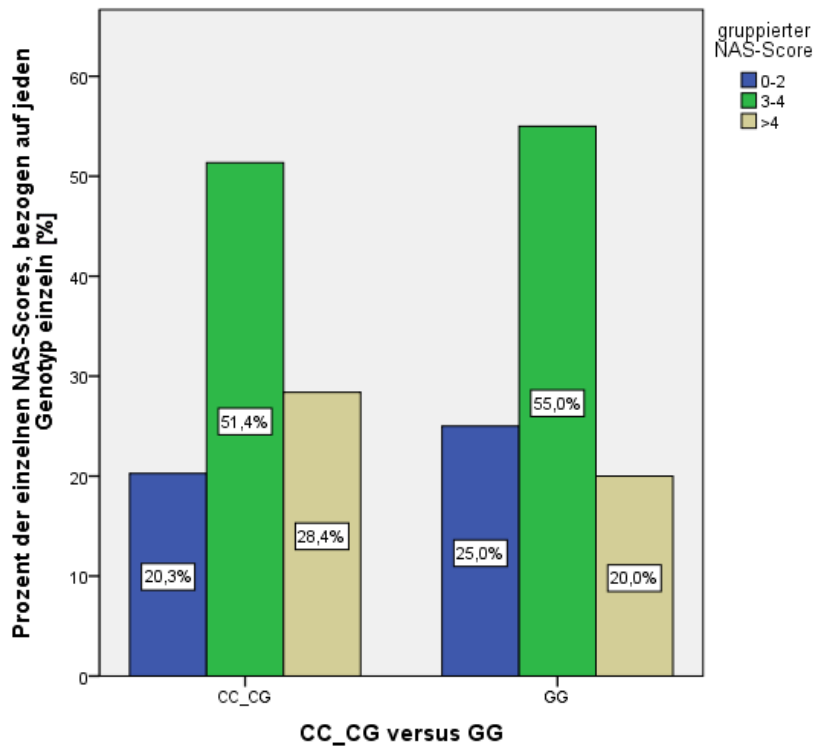


Abbildung 36 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und CG versus GG und Verteilung des gruppierten NAS-Scores; Gruppiertes Balkendiagramm: ähnliche Verteilung der NAS-Score-Werte in CC_CG und GG. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,799.

Weiterhin wurde der Zusammenhang der histologischen Parameter Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung bezüglich der drei Genotypen CC, CG und GG ermittelt. Die Tabelle weiter unten zeigt die genauen Ergebnisse in absoluten und relativen Zahlen. Es ergaben sich ähnliche Steatose-Grade in den drei Gruppen (p-Wert=0,261). Auch bezüglich des Ausmaßes der histologischen Inflammation zeigten sich zwischen den einzelnen Genotypen keine relevanten Unterschiede (p-Wert=0,646), dasselbe gilt für den Parameter Hepatozyten-Ballonierung (p-Wert=0,439).

Tabelle 13 Ausprägung histologischer Merkmale wie Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung abhängig vom jeweiligen Genotyp rs10754558 (in absoluten und relativen Zahlen)

	Genotyp			
Steatose	CC	CG	GG	Gesamt
<5 %	4 12,9 %	2 4,4 %	0 0 %	6 6,3 %
5-33 %	18 58,1 %	19 42,2 %	10 50 %	47 49 %
34-66 %	7 22,5 %	14 31,2 %	6 30 %	27 28,1 %
>66 %	2 6,5 %	10 22,2 %	4 20 %	16 16,6 %
Gesamt	31 100 %	45 100 %	20 100 %	96 100 %
Inflammation				
Inflammation	CC	CG	GG	Gesamt
Keine	5 17,2 %	8 19,5 %	3 15 %	16 17,8 %
Leichtgradig	20 69 %	27 65,9 %	11 55 %	58 64,4 %
Schwergradig	4 13,8 %	6 14,6 %	6 30 %	16 17,8 %
Gesamt	29 100 %	41 100 %	20 100 %	90 100 %
Ballonierung				
Ballonierung	CC	CG	GG	Gesamt
Keine	5 16,1 %	5 11,1 %	5 25 %	15 15,6 %
Leicht/teilweise	19 61,3 %	33 73,3 %	10 50 %	62 64,6 %
Schwer	7 22,6 %	7 15,6 %	5 25 %	19 19,8 %
Gesamt	31 100 %	45 100 %	20 100 %	96 100 %

3.5.1.3 Assoziation von peripheren Immunzellen und jeweiligem Genotyp

Analog zur gesamten Studienkohorte ergibt sich auch unter den NAFLD-Patienten ein hochsignifikanter Zusammenhang von rs10754558 und der Anzahl der Th1-Zellen im Kruskal-Wallis-Test mit identischem $p=0,007$.

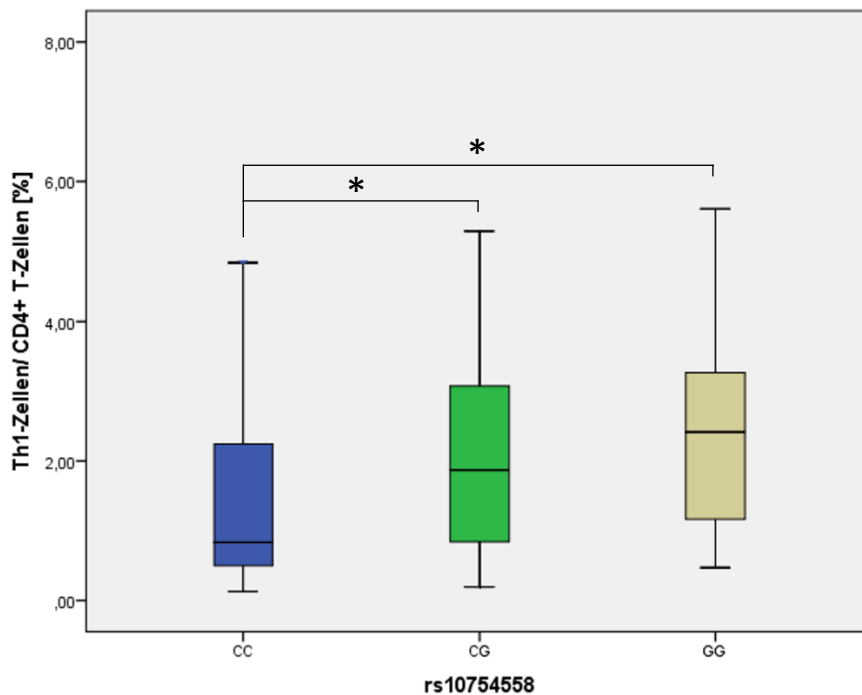


Abbildung 37 Zusammenhang von jeweiligem Genotyp (rs10754558) und dem Anteil der Th1-Zellen an CD4+ Zellen in Prozent im Patientenkollektiv. Boxplot: Für den WT zeigt sich der niedrigste Median für den prozentualen Anteil der Th1-Zellen in Bezug auf die CD4+ Zellen. Der Kruskal-Wallis-Test lieferte einen hochsignifikanten p-Wert ($p=0,007$).

Anschließende Post-hoc-Tests lieferten einen signifikanten Unterschied der Th1-Häufigkeit zwischen Wildtyp und G-Allelträgern (CG und GG), siehe Tabelle unten.

Tabelle 14 Paarweise Vergleiche der Genotypen für rs10754558 und der Häufigkeit der Th1-Zellen. Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Zwischen Wildtyp und heterozygotem Genotyp (p-Wert: 0,029), sowie zwischen Wildtyp und Genotyp GG (p-Wert: 0,013) ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Th1-Zellen: G-Allelträger verfügen über signifikant höhere Anzahlen an Th1-Zellen als Wildtypen.

Stichprobe1 - Stichprobe2	Angepasste Signifikanz
CC-CG	0,029
CC-GG	0,013
CG-GG	1,000

Minor-Allelträger im Patientenkollektiv hatten damit höhere Vorkommen an Th1-Zellen im Blut als der WT. Analysen bezüglich der Th-2-Zellen, Th-17-Zellen, aTreg-Zellen, rTreg-Zellen und dem Verhältnis aus Th-17- und rTreg-Zellen (Th-17_rTregratio) lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

3.5.1.4 Assoziation intrahepatischer Immunzellen mit jeweiligem Genotyp im Patientenkollektiv

Im Folgenden wurde die Assoziation der Genotypen des SNP rs10754558 sowie seiner Allele C und G mit dem Vorkommen intrahepatischer Immunzellen im Blut untersucht. Einschränkend sei zu erwähnen, dass nicht von allen Patienten Daten zu intrahepatischen Immunzellen vorhanden sind. Nur Patienten mit über 500 CD4+ intrahepatischen Zellen sind in die Analyse miteinbezogen worden. Es wurden Leber-Th1-Zellen, Leber-Th2-Zellen, Leber-Th17-Zellen, Leber-aTreg-Zellen, Leber-rTreg-Zellen und das Verhältnis aus Leber-Th17- und Leber-rTreg-Zellen (Th-17_rTregratio) mit in die Testungen einbezogen.

Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich signifikant höhere Leber-Th2-Zell-Frequenzen für G-Allelträger als für den Wildtyp (p= 0,031), wie der folgende Boxplot verdeutlicht.

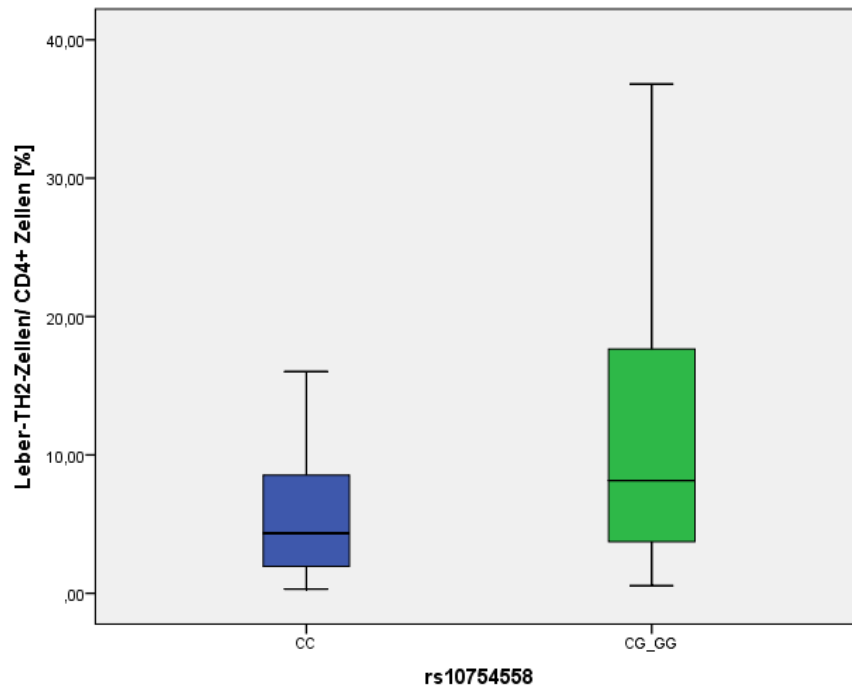


Abbildung 38 Zusammenhang von Minor-Allelträgerschaft für rs10754558 und Häufigkeit der Leber-Th2-Zellen. Boxplot: Der Vergleich der Mediane, für den Wildtyp 4,34 %, und für Allel G Träger 8,15 % bestätigt das häufigere Vorkommen der Leber-Th2-Zellen bezogen auf CD4+ Zellen bei Allel G tragenden NAFLD-Patienten. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten p-Wert von 0,031.

3.5.2 SNP rs35829419

3.5.2.1 Assoziation von Laborwerten und jeweiligem Genotyp

Tests mit den bereits erwähnten Laborparametern (ALT, ALT_08, ALT_er, AST, AST_08, AST_er, GGT, AP, AP_er, Ferritin, HbA1c, Vitamin D, CRP, CK-18, PNPLA3, NAFLD-Score) ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

3.5.2.2 Assoziation von histologischen Merkmalen und jeweiligem Genotyp

Die Analyse von histologischem Ergebnis und Genotyp ergab im Chi-Quadrat-Test keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von NAFL und NASH (p-Wert von 1,000), wie im folgenden Diagramm ersichtlich ist:

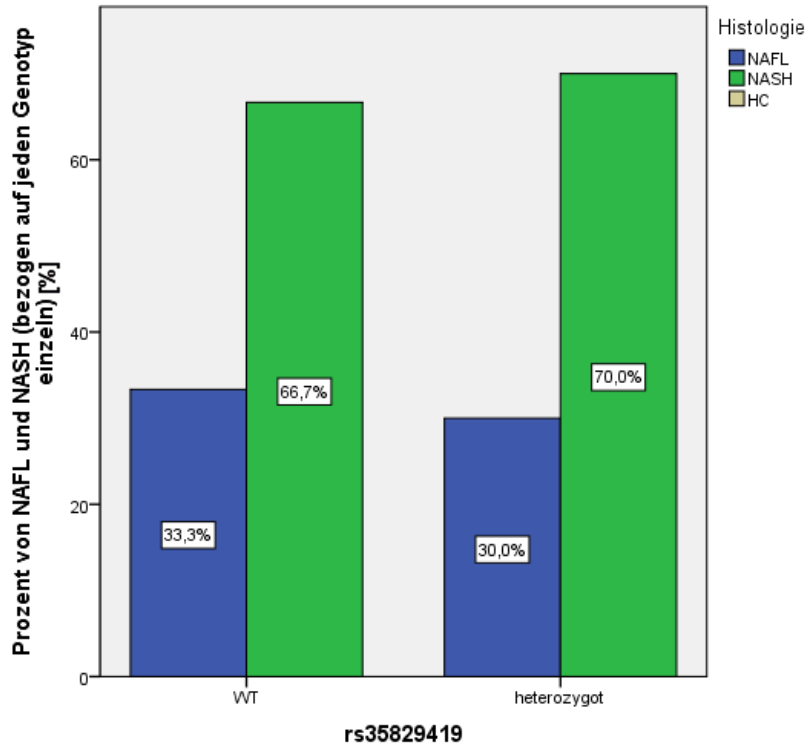


Abbildung 39 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Vorkommen einer NAFL oder NASH im Patientenkollektiv. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 1,0.

Zwischen WT und heterozygotem Genotyp fand sich bezüglich der Ausprägung einer Fibrose keine relevanten Unterschiede (im Chi-Quadrat-Test p-Wert von 0,231).

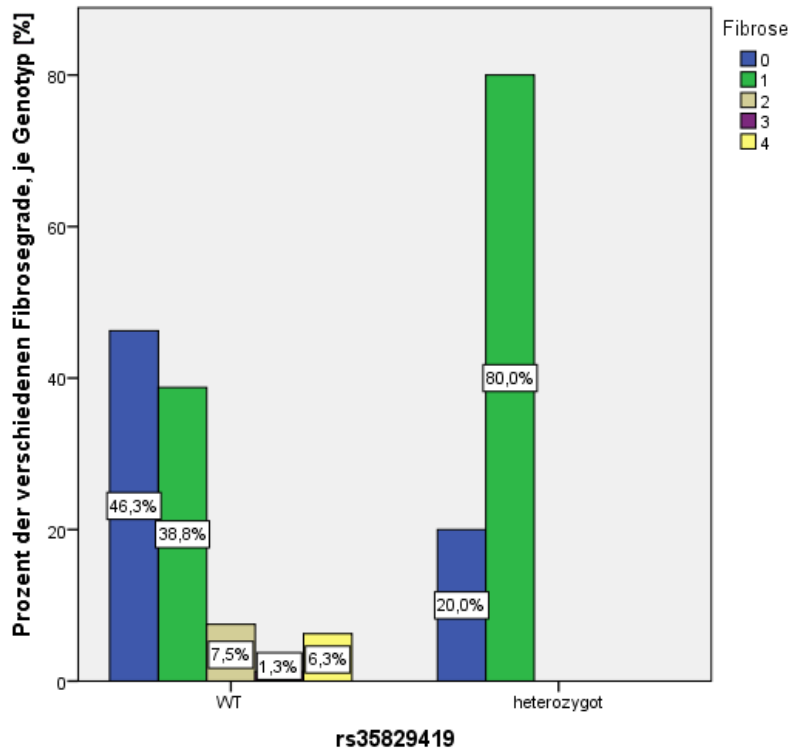


Abbildung 40 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Fibrosegrad im Patientenkollektiv. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,231.

Die Analyse von Zirrhose und Genotyp zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung einer Zirrhose (im Chi-Quadrat-Test p-Wert von 1,000).

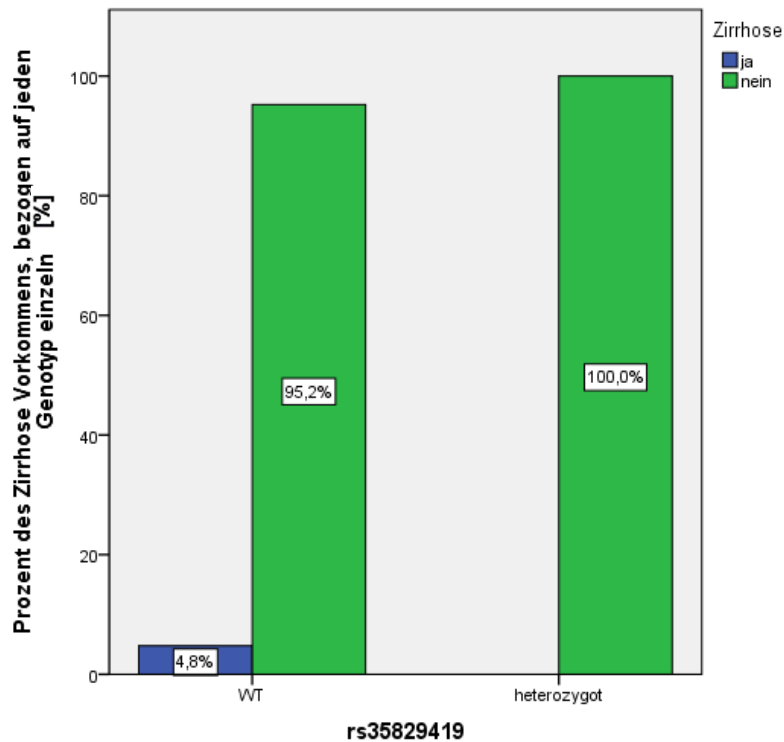


Abbildung 41 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Vorliegen einer Zirrhose im Patientenkollektiv. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 1,0.

Die Analyse aus NAS-Score und Genotyp ergab im exakten Test nach Fisher keine wegweisenden Unterschiede bezüglich der Höhe der NAS-Scores in den beiden Kollektiven CC und CA (p-Wert von 0,516).

Tabelle 15 Kreuztabelle, Analyse von NAS-Score und einzelnen Genotypen

Genotyp rs35829419		NAS_Score									Gesamt
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
CC	Absolute Zahl	1	2	14	21	23	8	7	5	1	82
	Anteil in %	1,2	2,4	17,1	25,6	28,0	9,8	8,5	6,1	1,2	100,0
CA	Absolute Zahl	0	1	1	3	2	3	0	0	0	10
	Anteil in %	0,0	10,0	10,0	30,0	20,0	30,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Gesamt	Anzahl	1	3	15	24	25	11	7	5	1	92
	Anteil innerhalb von rs35829419 in %	1,1	3,3	16,3	26,1	27,2	12,0	7,6	5,4	1,1	100,0

Der Vergleich der zwei Genotypen CA und CC bezüglich Steatosegrad ($p=1,00$), Inflammation ($p=0,376$) und Ballonierung ($p=0,219$) in der Leberbiopsie lieferte keine signifikanten Unterschiede im Chi-Quadrat-Test. In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Ergebnisse in absoluten und relativen Zahlen zusammengefasst.

Tabelle 16 Ausprägung histologischer Merkmale wie Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung abhängig vom jeweiligen Genotyp rs35829419 (in absoluten und relativen Zahlen)

Histologische Merkmale, in absoluten und relativen Zahlen bezogen den jeweiligen Genotyp			
Steatose	WT	Heterozygot	Gesamt
<5 %	6 7,1 %	0 0,0 %	6 6,4 %
5-33 %	40 47,6 %	5 50,0 %	45 47,9 %
34-66 %	24 28,6 %	3 30,0 %	27 28,7 %
>66 %	14 16,7 %	2 20,0 %	16 17,0 %
Gesamt	84 100 %	10 100 %	94 100 %
Inflammation			
Inflammation	WT	Heterozygot	Gesamt
Keine	16 20,3 %	0 0 %	16 18 %
Leichtgradig	49 62 %	8 80 %	57 64 %
Schwergradig	14 17,7 %	2 20 %	16 18 %
Gesamt	79 100 %	10 100 %	89 100 %
Ballonierung			
Ballonierung	WT	Heterozygot	Gesamt
Keine	12 14,3 %	2 20 %	14 14,9 %

Leicht/teilweise	53 63,1 %	8 80 %	61 64,9 %
Schwer	19 22,6 %	0 0 %	19 20,2 %
Gesamt	84 100 %	10 100 %	94 100 %

3.5.2.3 Assoziation peripherer/intrahepatischer Immunzellen und jeweiligem Genotyp
 Bezüglich der Anzahl von peripheren Th-1-Zellen, Th-2-Zellen, Th-17-Zellen, aTreg-Zellen, rTreg-Zellen, dem Verhältnis aus Th-17- und rTreg-Zellen (Th-17_rTregratio) und den einzelnen Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Letzteres gilt auch für die Analyse der intrahepatischen Immunzellen (Leber-Th1-Zellen, Leber-Th2-Zellen, Leber-Th17-Zellen, Leber-aTreg-Zellen, Leber-rTreg-Zellen und dem Verhältnis aus Leber-Th17- und Leber-rTreg-Zellen).

3.6 Allelanalyse bezogen auf die gesamte Kohorte

3.6.1 SNP rs10754558

Die Analyse eines Zusammenhangs von Laborwerten oder histologischen Parametern und den Allelen C und G lieferte keine signifikanten Ergebnisse, jedoch die Testung mit den peripheren Immunzellen:

Es ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des G Allels für rs10754558 und dem erhöhten Vorkommen von Th1-Zellen im Mann-Whitney-U-Test (p-Wert=0,002), im Vergleich zu WT-Trägern. Derselbe Zusammenhang hatte sich bereits für Th1-Zellen und Minor-Allelträger bezogen auf die gesamte Studienkohorte sowie die NAFLD-Kohorte herausgestellt (hier p-Wert=0,003).

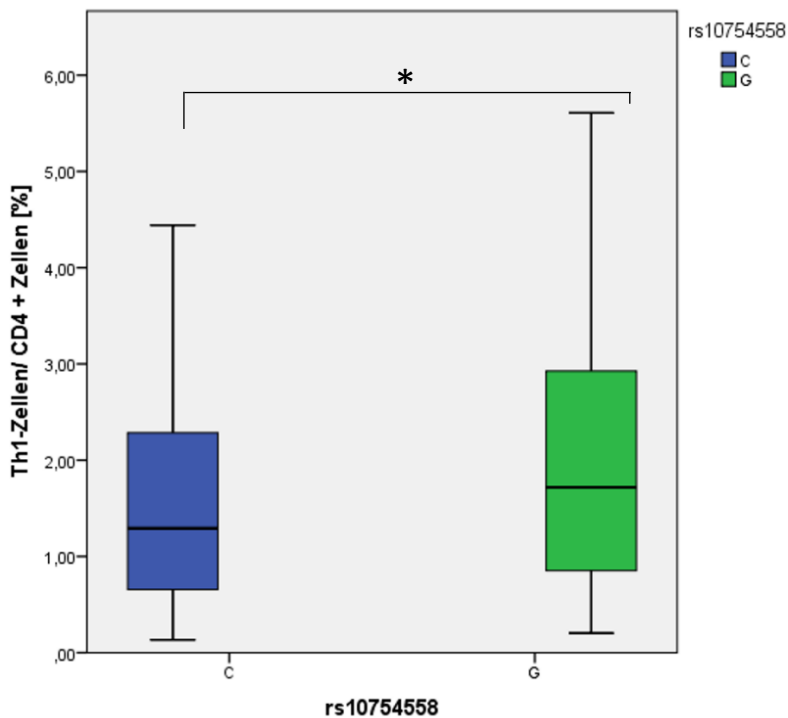


Abbildung 42 Zusammenhang von Vorliegen des Allels G und dem Vorkommen von Th1-Zellen. Der Median der Th1-Zellen war für Allel G 1,72 %, für Allel C nur 1,3 %. Somit kommen Th1-Zellen bezogen auf CD4+ Zellen bei G-Allelträgern häufiger vor. Die Effektstärke betrug 0,16, was nach Cohen einem schwachen Effekt entspricht. ($p=0,003$ im Mann-Whitney-U-Test)

3.6.2 SNP rs35829419

Die Analyse eines Zusammenhangs von Laborwerten oder histologischen Parametern und den Allelen C und A lieferte keine signifikanten Ergebnisse, jedoch die Testung mit den peripheren Immunzellen:

Für den SNP rs35829419 ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen einem erhöhten Vorkommen von Th2-Zellen und dem Tragen von Allel A im Mann-Whitney-U-Test (p -Wert=0,028). In der Betrachtung der gesamten Studienkohorte zeigten sich ebenfalls für Heterozygote signifikant höhere Frequenzen von Th-2-Zellen im Mann-Whitney-U-Test (p -Wert=0,024), s. oben Punkt 4.4.2.3.

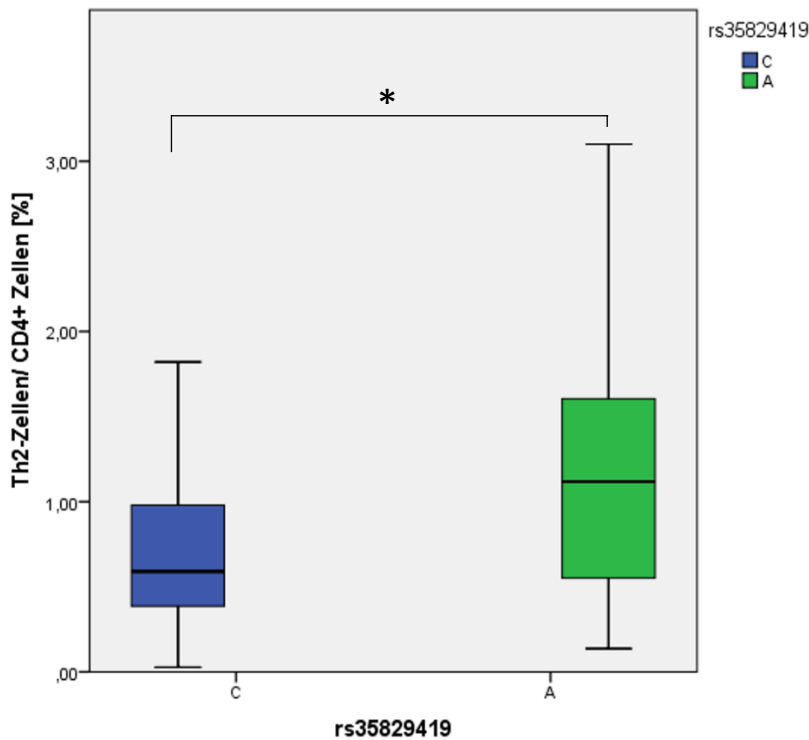


Abbildung 43 Zusammenhang von Tragen des Allels A und Häufigkeit der Th2-Zellen. Der Median der Th2-Häufigkeit entsprach für C-Allelträger 0,59 %, für Minor-Allelträger allerdings fast das Doppelte mit einem Wert von 1,12 % bezogen auf die CD4+ Zellen. Effektstärke=0,12, schwacher Effekt nach Cohen. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,024.

3.6.3 gemeinsame Analyse der beiden SNPs

Die Analyse eines Zusammenhangs von Laborwerten, histologischen Parametern sowie Immenzellen und dem Tragen eines oder mehrerer Minor-Allele (beider SNPs) ergab signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl peripherer Immunzellen:

Es zeigte sich, dass Minor-Allelträger über signifikant mehr periphere Th1-Zellen verfügen als Major-Allelträger ($p=0,004$ im Mann-Whitney-U-Test). Derselbige Zusammenhang fand sich ebenso in der Allelanalyse alleinig für den SNP rs10754558 für die gesamte Studienkohorte mit etwas höherer Signifikanz (p -Wert 0,002), sowie in der Analyse der Genotypen CC versus CG_GG mit ebenfalls höherer Signifikanz ($p=0,003$).

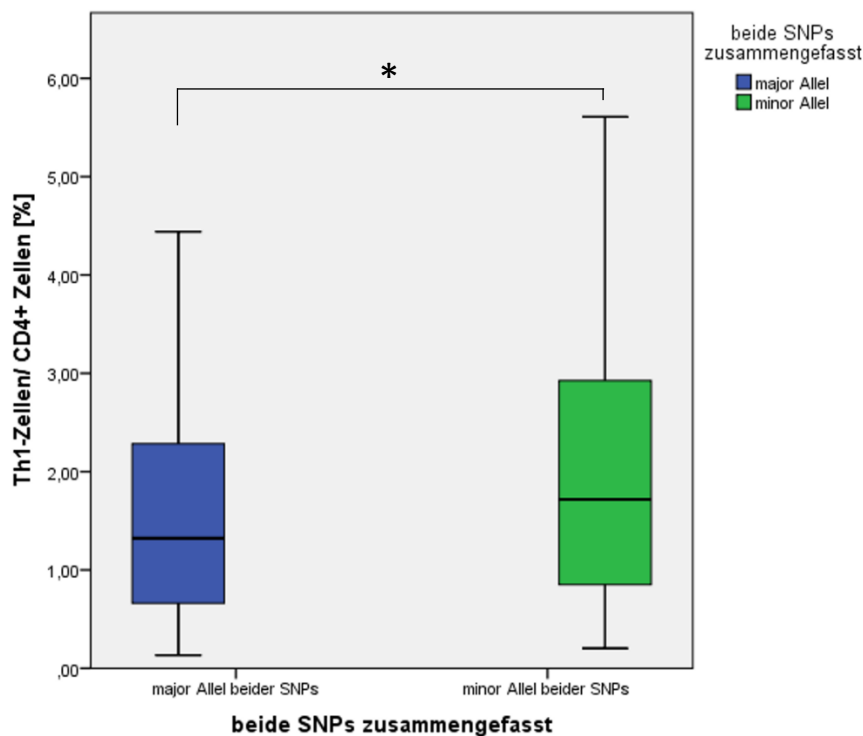


Abbildung 44 Zusammenhang von Trägerschaft des Minor-Allels eines/beider SNPs und Häufigkeit der Th1-Zellen. Boxplot: Für Major-Allelträger ergab sich ein Median der Häufigkeit von Th1-Zellen von 1,32 %, für Minor-Allelträger beider SNPs zusammengefasst entsprach der Median dagegen einem Wert von 1,72 % bezogen auf die CD4+ Zellen. Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich ein p-Wert von 0,003.

3.7 Allelanalyse bezogen auf die NAFLD-Patienten

3.7.1 SNP rs10754558

Es erfolgte die Analyse eines Zusammenhangs von Laborwerten, histologischen Parametern und peripheren sowie intrahepatischen Immunzellen und den Allelen C und G von rs10754558. Es ergab sich analog der genaueren Auswertung unter Punkt 4.4.1.3 ein sehr signifikant höheres Vorkommen von peripheren Th1-Zellen bei Minor-Allelträgern von rs10754558 (p-Wert=0,003).

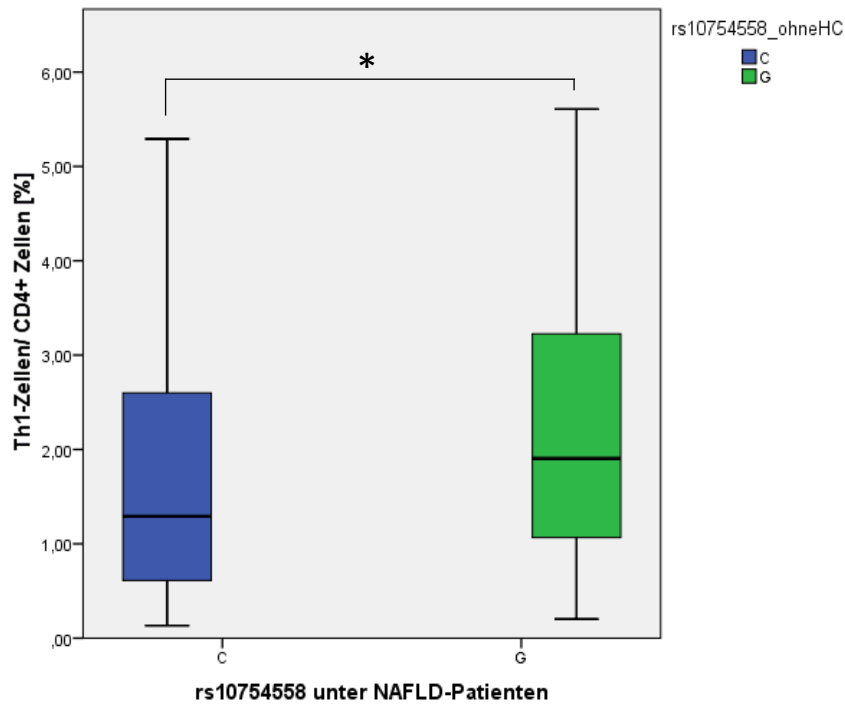


Abbildung 45 Zusammenhang von G-Allelträgerschaft und Häufigkeit der Th1-Zellen im Patientenkollektiv. Der Median der Th1-Häufigkeit ergibt für Allel C einen Wert von 1,3 %, für G-Allelträger allerdings einen deutlich höheren Wert von 1,9 % bezogen auf CD4+ Zellen. Der Mann-Whitney-U-Test lieferte einen p-Wert von $p=0,003$.

3.7.2 SNP rs35829419

Analog zu SNP rs10754558 fand eine Analyse von Laborwerten, histologischen Parametern, peripheren und intrahepatischen Immunzellen und den Allelen C und A des SNP rs35829419 statt, die keine signifikanten Zusammenhänge erbrachte.

4. Diskussion

4.1 Hintergrund der Studie

Im Kontext der NAFLD-Pathogenese sind bereits einige Risikogene entdeckt worden wie etwa das *PNPLA3-Gen* oder das *NLRP3-Gen*, welches für das NLRP3-Inflammasom kodiert und in zahlreichen Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Beispielsweise bestätigte die Studie von Wan et al. die pathologische Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Entwicklung von der Steatose zur NASH. Mridha et al. zeigte, dass dessen Blockade in Mäusen mit experimentell induzierter NASH nachweislich zu einer Reduktion von Inflammation und Fibrose führte. Ein NLRP3-knock-in in Mausmodellen wiederum führte in der Studie von Wree, Eguchi et al. zu einer Hyperaktivität des NLRP3-Inflammasoms mit anschließender schwerer hepatischer Entzündung, Fibrose und einer verkürzten Lebensdauer der Mäuse. Da die Aktivität des *NLRP3-Gens*, wie beispielhaft durch obige Studien verdeutlicht, nachweislich an der NAFLD-Pathogenese beteiligt ist, untersucht die vorliegende Arbeit die Fragestellung, inwiefern die beiden genetischen NLRP3-Polymorphismen rs10754558 und rs35829419 Einfluss auf die Entwicklung einer NAFLD haben. Letztere wurden bereits in Zusammenhang mit anderen Krankheitsbildern beschrieben und sind hinsichtlich ihrer Bedeutung für die NAFLD-Pathogenese noch nicht ausreichend erforscht.

Die Zielsetzung der vorliegenden Studie bestand darin, zu überprüfen, ob die beiden SNPs rs10754558 und rs35829419 des *NLRP3-Gens* mit einem erhöhten Auftreten für NAFL und/oder NASH assoziiert sind. Zu diesem Zweck wurde in einer Kohortenstudie die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen bei NAFLD-Patienten sowie bei gesunden Kontrollen ermittelt. Ein vermehrtes Vorkommen eines bestimmten Genotyps/Allels könnte hierbei auf eine Assoziation mit einem erhöhten oder erniedrigten Auftreten der NAFLD hindeuten. In einem zweiten Schritt wurde zunächst in der gesamten Studienkohorte, also NAFLD-Patienten inklusive gesunder Kontrollen (n=202), sowie anschließend lediglich dem Patientenkollektiv (n=159) der Zusammenhang der obigen SNPs mit folgenden Merkmalen untersucht: Höhe von Laborwerten, klinischen Scores wie etwa dem NAFLD activity score, histologische Befunde sowie der Häufigkeit von

Effektor-T-Zellen und T-regulierenden Zellen in der Blutprobe bzw. im Lebergewebe (bei biopsierten Patienten).

Die folgende Graphik gibt einen vereinfachten Überblick über die bisher bekannte Rolle des NLRP3-Inflammasoms sowie der SNPs rs10754559 und rs35829419 im menschlichen Metabolismus.

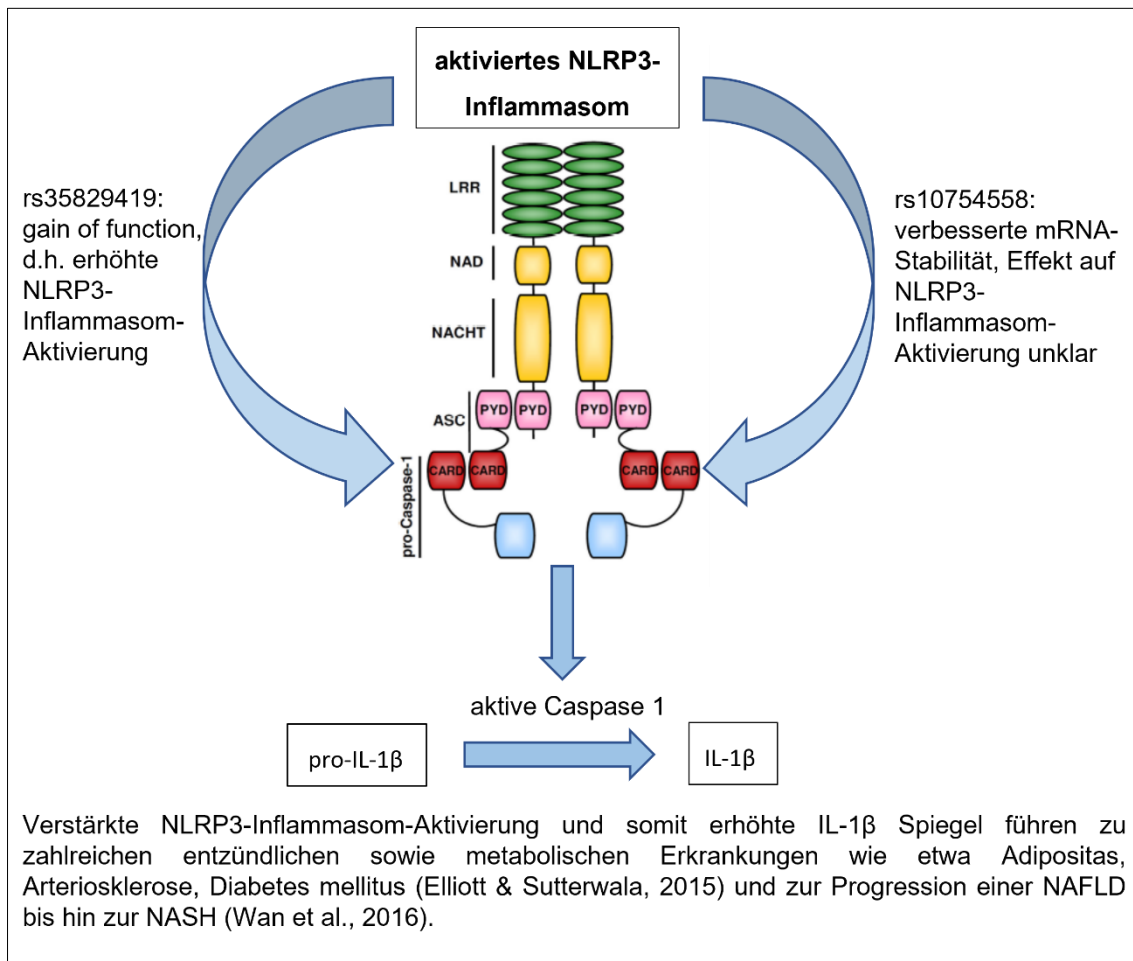


Abbildung 46 Vereinfachte Darstellung der bisher bekannten Auswirkungen einer gesteigerten Aktivität des NLRP3-Inflammasoms auf den Stoffwechsel unter Bezugnahme auf rs10754558 und rs35829419. Modifiziert nach Eitel et al. (2010); Druckerlaubnis eingeholt.

4.2 Diskussion von rs10754558 und Zusammenhang mit Laborparametern

Einleitend stellt sich die Hauptfrage dieser Dissertation, ob eine Assoziation von rs10754558 und dem Vorliegen einer NAFL-/NASH-Erkrankung besteht, die auf eine kausale Rolle in der Pathogenese hindeuten könnte. In diesem Studienkollektiv wurde

kein signifikanter Zusammenhang von rs10754558 mit der histologischen Diagnose einer NAFLD gefunden ($p=0,998$), dafür jedoch mit erhöhten Transaminasewerten. Für den Wildtyp CC des SNP rs10754558 ergaben sich in der Studienkohorte signifikant höhere AST-Mediane ($p=0,018$) und häufiger hochnormale (in den oberen 20 % des Normbereichs und darüber liegende) ALT-Werte ($p=0,02$) im Vergleich zu den Genotypen CG und GG. Unter den NAFLD-Patienten fand sich zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp CC im Vergleich zu CG plus GG mit erhöhten AP-Werten ($p=0,009$). Eine erhöhte AP kann für das vermehrte Auftreten von Cholestase stehen, im Rahmen der NAFLD kommt es bekanntermaßen vermehrt zu intrahepatischer Cholestase (Shipovskaya & Dudanova).

Im Folgenden soll nun der Fokus auf die für die NAFLD klinisch relevanten Transaminasenerhöhungen und die Rolle des Minor-Allels gelegt werden. Die aufgeführten Studien vermitteln einen Überblick über die bisherigen Erkenntnisse von rs10754558 im Kontext metabolischer Erkrankungen.

Studien bezüglich einer Assoziation von rs10754558 und erhöhten Transaminasen existieren bisher noch nicht. Die Studie von Liwei Bai ermittelte in einem chinesischen Studienkollektiv für das Tragen des C Allels ein signifikant erhöhtes Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken. Wie in Kapitel 3.4 dargestellt, wurde in dieser Arbeit eine signifikante Assoziation von erhöhter AST, ALT_08 und Genotyp CC ermittelt. Dieser Zusammenhang deutet, im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Liwei Bai, auf die Rolle des C Allels als Risikofaktor für metabolische Erkrankungen hin. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Ergebnisse von Liwei Bai auch durch ethnische Unterschiede beeinflusst sein könnten. Außerdem bestand das chinesische Patientenkollektiv aus doppelt so vielen Männern wie Frauen, im Gegensatz zur vorliegenden NAFLD-Kohorte, die sich aus etwa doppelt so vielen Frauen wie Männern zusammensetzt.

Im Widerspruch zu obigen Ergebnissen und unserer Studie ermittelte die Studie von L. Zhang et al. eine signifikante Assoziation des G Allels und dem Risiko an einem metabolischen Syndrom zu erkranken. Mit Letzterem sind auch erhöhte ALT- und AST-Werte eng verknüpft. Die zitierte chinesische Studie verfügte über mehr als viermal so

viele Teilnehmer wie die hier diskutierte Studie. Da die komplette Studie leider nur in Chinesisch verfügbar ist, ist eine weitere Diskussion der Ergebnisse und der dazu führenden Begleitfaktoren nicht möglich.

Außerdem ergab eine Studie von Zhou et al., dass in einer chinesischen Studienpopulation aus KHK-Patienten und gesunden Kontrollen Minor-Allelträger höhere IL-1 β -Spiegel im Serum aufwiesen und gleichzeitig häufiger an schwerwiegenden kardialen Ereignissen sowie schwergradigerer KHK litten.

Es lässt sich nun diskutieren, ob dem Minor-Allel von rs10754558 eine protektive Funktion in Bezug auf Transaminasenerhöhungen zugeschrieben werden darf. Hierfür sind sicherlich weitere Studien mit größeren Studienpopulationen erforderlich, die belegen, dass sich oben erwähnte Ergebnisse reproduzieren lassen. Einen weiteren Zusammenhang gilt es zu beachten: Intronische SNPs, wie in diesem Fall rs10754558, liegen zu großen Teilen gekoppelt mit funktionellen Polymorphismen vor. Diese sind für die veränderte Genexpression verantwortlich, d.h. sie können im Kopplungsungleichgewicht (engl.: linkage disequilibrium) mit funktionellen Polymorphismen liegen. Bei der NASH handelt es sich um keine monogene, sondern eine multifaktoriell vererbte Erkrankung, d.h. zahlreiche Gene und zahlreiche Mutationen spielen zusammen. Um den tatsächlichen Effekt des intronischen SNPs rs10754558 in der Pathogenese der NASH herausfiltern zu können, bedarf es weiterführender, größerer Studien, die in ihre Analyse funktionelle SNPs miteinschließen. In der hier vorliegenden Studie wurde die Risikovariante des *PNPLA3*-Gens mit untersucht: Signifikante Zusammenhänge zwischen der histologischen Diagnose, den einzelnen Genotypen von rs10754558 und rs35829419 sowie dem Vorhandensein der Risikovariante des *PNPLA3*-Gens konnten nicht festgestellt werden.

In einer finnischen Studienkohorte wurde für rs738409 des *PNPLA3*-Gens ein signifikanter Zusammenhang mit erhöhten AST-Werten und eine Tendenz mit erhöhten ALT-Werten gefunden, unabhängig vom Alter, Geschlecht und BMI des Patienten (Kotronen et al., 2009). Die *PNPLA3*-mRNA-Expression war positiv mit dem Übergewicht der Studienteilnehmer bzw. bei nicht Adipösen mit deren Leberfettgehalt assoziiert. In

Bezug auf das ebenfalls an der NAFLD-Genese beteiligte *NLRP3-Gen* bedeutet dies, dass die Kenntnis der mRNA-Expression des in dieser Studie untersuchten NLRP3-Inflammasoms einen genaueren Aufschluss über mögliche Assoziationen mit Transaminasenerhöhungen liefern könnte. Bisher ist nicht gänzlich erforscht, wie sich rs10754558 auf die Expression des NLRP3-Inflammasoms auswirkt. In einer Studie von Hitomi et al. ergaben sich Hinweise dafür, dass rs10754558, welches im 3'UTR (untranslatierten Bereich) des *NLRP3-Gens* liegt, die Stabilität der mRNA beeinflusst. Laut Pontillo et al. soll das G-Allel im Vergleich zum C-Allel für mehr Stabilität der mRNA sorgen. Jedoch bleibt bisher unklar, inwiefern sich diese stabilere mRNA auf die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms und die folgende IL-1 β -Sekretion auswirkt.

Im vorliegenden Studienkollektiv wurde ein signifikanter Zusammenhang mit ALT-Werten in den oberen 20 % der Norm gefunden, nicht aber mit den ALT-Werten, die erst ab den Referenzwerten von 50 U/l (Männer) bzw. 35 U/l (Frauen) als erhöht galten. Ein kleiner Exkurs in die Historie der Transaminasen-Grenzwerte: Die heute noch gebräuchlichen ALT-Schwellenwerte stammen aus den 1980er Jahren und wurden damals eingeführt, um an Hepatitis A oder B erkrankte Blutspender herauszufiltern (Prati, Taioli, Zanella, & et al., 2002). Höchstwahrscheinlich gab es in der Referenzpopulation auch Patienten mit NAFLD (Daniel, Ben-Menachem, Vasudevan, Ma, & Blumenkehl, 1999). Daher kann davon ausgegangen werden, dass durch die gegenwärtigen Schwellenwerte eine große Zahl an NAFLD-Fällen nicht als pathologisch erfasst werden (Prati et al., 2002). Um auf das oben erwähnten Ergebnis zurückzukommen, bedeutet dies: Der hier gefundene signifikante Zusammenhang von WT-Genotyp und normalhohen ALT-Werten könnte für ein höheres NAFLD-Risiko für den WT von rs10754558 sprechen.

4.3 Diskussion von rs10754558 und Zusammenhang mit histologischen Parametern und Entzündungszellen

Die Analyse der histologischen Parameter und rs10754558 in unserer Kohorte lässt keine Rückschlüsse auf ein vermehrtes Vorkommen einer NAFL/NASH, Zirrhose, Fibrose sowie histologische Parameter wie Steatose, Inflammation oder Hepatozyten-Ballonierung zu.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage sind diese Ergebnisse schwer zu interpretieren. Bisher ist nicht ausreichend erforscht, ob und inwiefern rs10754558 Einfluss auf die Expression des *NLRP3-Gens* nimmt, ob es Allel-spezifische Unterschiede gibt und wie sich dies letztlich auf die Entwicklung der NAFLD auswirkt (vergleiche Kapitel 1.2.7). Bekannt ist, dass rs10754558 im intronischen Bereich des *NLRP3-Gens* liegt. Auch wenn der Polymorphismus nicht im kodierenden Bereich liegt, kann er Einfluss auf die Transkription und damit die Translation von Aminosäuren nehmen. Laut der Studie von Hitomi et al. führt das Vorhandensein des G Allels über eine veränderte mRNA-Stabilität zu einer 1,4-fach erhöhten NLRP3-Expression. Der Effekt dieser vermehrten Expression auf die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung wurde allerdings nicht ermittelt. Letzterer Studie zufolge hätte man im vorliegenden Studienkollektiv eine Assoziation von Allel G und dem Vorkommen einer NAFLD erwarten können. Die Studie von Addobbati et al. hingegen fand eine signifikant erhöhte NLRP3-Expression in peripheren (mit LPS und ATP stimulierten) Monozyten bei C-Allelträgern sowie einen signifikanten Zusammenhang von C-Allelträgern und dem Vorliegen einer rheumatoiden Arthritis. Diese erhöhte NLRP3-Expression ließe wiederum im vorliegenden Studienkollektiv eine Assoziation des C-Allels mit dem vermehrten Auftreten einer NAFLD vermuten.

In der Analyse der Immunzellen ergab sich ein signifikant häufigeres Vorkommen von Th1-Zellen im peripheren Blut für heterozygote sowie homozygote G-Allelträger im Vergleich mit dem WT in der gesamten Studienkohorte der vorliegenden Arbeit ($p=0,003$): Für G-Allelträger lag der Median für die Frequenz von Th1-Zellen/CD4+ Zellen bei 1,7 %, für den WT lediglich bei 0,95 %.

In der Gruppe der NAFLD-Patienten herrschen ähnliche Verhältnisse: Genotypen mit einem oder zwei G-Allelen wiesen ein signifikant häufigeres Vorkommen von Th1-Zellen (bezogen auf CD4+ Zellen) im peripheren Blut auf ($p=0,007$): zwischen Wildtyp und heterozygotem Genotyp ergab sich ein p -Wert von 0,029, zwischen Wildtyp und Genotyp GG ein p -Wert von 0,013. Auch in der Allelanalyse wurde eine signifikant höhere Frequenz von Th1-Zellen bei G-Allelträgern festgestellt ($p=0,002$ für gesamte Studienkohorte, $p=0,003$ für Patientenkollektiv). In der gemeinsamen Auswertung beider SNPs stellte sich für Minor-Allelträger ebenfalls ein hochsignifikant häufigeres Vorkommen von Th1-Zellen im peripheren Blut heraus ($p=0,006$). Dieser Zusammenhang ist allerdings schwächer als bei der alleinigen Betrachtung von rs10754558 (siehe oben: $p=0,003$).

Unter den NAFLD-Patienten wurde außerdem für G-Allelträger ein signifikant größeres Vorkommen von intrahepatischen Th2-Zellen festgestellt ($p=0,031$).

In der bereits zitierten Studie von Zhang et al. wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für ein metabolisches Syndrom, das bekanntermaßen mit der NAFLD assoziiert ist, für Genotyp GG und das Tragen des Allels G des SNP rs10754558 gefunden. Eine Studie von Zhou et al. ergab zudem höhere IL-1 β -Spiegel im Serum bei Minor-Allelträgern sowie ein höheres Risiko an schwerwiegenden kardialen Ereignissen und schwergradiger KHK zu erkranken. Weitere Krankheitsbilder, die bisher mit dem SNP rs10754558 in Verbindung gebracht wurden, zielen eher auf Allel C als Risikoallel ab, hier jedoch im Kontext mit Autoimmunerkrankungen.

Die Rolle der verschiedenen Th-Zellen in der Pathogenese der NAFLD ist bisher noch nicht gänzlich geklärt. In der Studie von Rau et al. zeigten sich höhere Frequenzen von Th1- und Th2-Zellen bei NAFLD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen im peripheren Blut. Eine ältere Studie von Inzaugarat et al. ergab lediglich eine höhere Frequenz von Th1-Zellen im peripheren Blut von NASH-Patienten bei unverändertem Verhältnis der Th2-Zellen. Das in der vorliegenden Studie ermittelte signifikant erhöhte prozentuale Vorkommen der Th1-Zellen im peripheren Blut von G-Allelträgern könnte auf eine höhere entzündliche Aktivität im Vergleich zu C-Allelträgern hindeuten.

Es könnte allerdings auch sein, dass bei C-Allelträgern mit NAFLD die peripheren Th1-Zellen vermehrt in der Leber und nicht peripher zu finden sind. Das könnte durch ein möglicherweise unterschiedliches Homing, dem Prozess der differentiellen Zielorganfindung bei Lymphozyten, bei C- und G-Allelträgern erklärt werden (von Andrian and Mempel (2003)). Intrahepatisch fand sich bei NAFLD-Patienten mit Allel C kein Zusammenhang mit einem erhöhten Vorkommen von Immunzellen. Bei G-Allelträgern hingegen lag ein signifikant höheres Vorkommen von intrahepatischen Th2-Zellen vor. Hier sei erneut darauf hingewiesen, dass lediglich eine geringe Fallzahl für die intrahepatischen Zellen vorlag und die Ergebnisse daher nur eingeschränkt beurteilbar sind. Dass in der Leber von NAFLD-Patienten signifikant höhere Frequenzen von Th1-, Th2- und Th17-Zellen im Vergleich zum peripheren Blut vorliegen, wurde bereits in der Studie von Rau et al. beschrieben. Der größte Unterschied zwischen peripheren und intrahepatischen Immunzellen bestand bei NAFL sowie NASH im Vorkommen Interferon γ -sezernierender Zellen. Ferner wurde in Lebergewebeproben von NASH-Patienten mit morbidem Adipositas eine erhöhte Expression von Genen entdeckt, die an der Aktivierung von T-Zellen, vornehmlich Th1-Zellen, beteiligt sind (Bertola et al., 2010). Eine hochregulierte Expression dieser Gene fand sich auch bereits bei NAFL-Patienten, was impliziert, dass Th-Zellen bereits in frühen Krankheitsstadien eine Rolle spielen (Bertola et al., 2010).

Andererseits kann der hier ermittelte Zusammenhang bezüglich der erhöhten Th1-Zellfrequenz im peripheren Blut bei G-Allelträgern auch im Rahmen der bestehenden Adipositas im Sinne einer low grade inflammation interpretiert werden. Diese low grade inflammation kann die Gemeinsamkeit zum metabolischen Syndrom, insbesondere der NAFLD, darstellen. 95 % der NAFLD-Patienten aus der Studienkohorte waren adipös (BMI > 30kg/m²), wofür bereits eine proinflammatorische Stoffwechsellage im Sinne einer low grade inflammation beschrieben wurde: So fanden sich beispielsweise in der Studie von Dicker et al. im peripheren Blut adipöser Patienten vermehrt proinflammatorische, Th1-Zellen-stimulierende Zytokine im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen. Dass generell bei Adipositas eine veränderte adaptive Immunabwehr besteht, ist bereits in einigen Vorgänger-Studien belegt worden: Die

Studie von Rocha et al. beispielsweise konnte zeigen, dass im Fettgewebe von adipösen Mäusen mehr CD4- und CD8- Zellen als im Fettgewebe von normalgewichtigen Mäusen vorkommen. Außerdem fiel im viszeralen Fettgewebe (VAT) der adipösen Mäuse eine höhere Expression von Interferon γ -mRNA und eine damit verbundene vermehrte Aktivität von Th1-Zellen auf (Rocha et al., 2008). In der Studie von Feuer et al. wurde zudem eine verminderte Aktivität von anti-inflammatorischen Treg-Zellen festgestellt. Interferon- γ -knock-out-Mäuse hingegen verfügten über eine bessere Glukosetoleranz, niedrigere Leptin- und Cholesterol- Plasmaspiegel. Die Studie von Haiyan Zhou und Feng Liu beschreibt für das viszerale Fettgewebe bei Mäusen mit schlankem Habitus ein vermehrtes Vorkommen von Th2- und Treg-Zellen, die sich förderlich auf die Insulinsensitivität auswirkten. Im viszeralen Fettgewebe von adipösen Mäusen dominierten hingegen Th1- und Th17-Zellen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Promotion zu den intrahepatischen Th-Zellen sind unter Berücksichtigung gewisser Einschränkungen zu betrachten. Es sei darauf hingewiesen, dass für die durchgeführten Analysen mit den intrahepatischen T-Zellen nur wenige Patientenproben zur Verfügung standen und es daher schwierig ist, aus den Ergebnissen allgemeingültige Aussagen abzuleiten. Nur Patienten mit über 500CD4+ intrahepatischen T-Zellen wurden in die Studie miteinbezogen. Es gab lediglich 33 Proben von NAFL-Patienten, davon nur 7 mit Genotyp GG, außerdem 63 Proben von NASH-Patienten, wovon nur 13 den Genotyp GG aufwiesen. Bei solch geringen Fallzahlen ist es nicht möglich, eine allgemeingültige Aussage zu treffen.

4.4 Diskussion von Ergebnissen zu rs35829419

Für ein vermehrtes Auftreten einer NAFL/NASH in Bezug auf die jeweiligen hier untersuchten Genotypen (CC und CA) von rs35829419 ergab sich kein signifikanter Hinweis ($p=0,052$). Das Minor-Allel A kam jedoch in der gesunden Kontrollgruppe überhaupt nicht vor. Der heterozygote Genotyp CA, somit auch das Minor-Allel A, traten signifikant häufiger, nämlich ausschließlich unter den NAFLD-Patienten auf (p -Wert=0,009).

Die Analyse mit den untersuchten Laborwerten lieferte sowohl in der gesamten Studienkohorte als auch in der NAFLD-Kohorte keine signifikanten Zusammenhänge. Die Tests mit den Transaminaseparametern ALT ($p=0,381$), ALT_08 ($p=0,921$), AST ($p=0,757$) und AST_08 ($p=0,83$) lassen auf keine Assoziation mit rs35829419 schließen. Allerdings ergab die gemeinsame Analyse von rs35829419 und rs10754558 für Wildtypen signifikant mehr hochnormale AST-Werte (AST_08) als für Minor-Allelträger ($p=0,03$). In der alleinigen Analyse von rs10754558 hatte sich noch kein signifikanter Zusammenhang hierfür gezeigt. Dies könnte ein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für Wildtypen beider SNPs sein, an höheren/hochnormalen AST-Werten zu leiden.

In der Auswertung hinsichtlich der Entzündungszellen wurde in der gesamten Kohorte für den heterozygoten Genotyp ein erhöhter Anteil an Th2-Zellen (bezogen auf CD4+ Zellen) im peripheren Blut festgestellt ($p=0,024$). Ebenso lieferte die Allelanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen Minor-Allelträgern und der Frequenz von Th2-/CD4+ Zellen ($p=0,028$). Zuallererst sei auf die eingeschränkte Beurteilbarkeit der Analysen zu rs35829419 hingewiesen, da in der Studienkohorte keine homozygoten Minor-Allelträger vorlagen und die Zahl der heterozygoten lediglich bei 21 (von 197) lag.

Gemäß der NCBI-Datenbank handelt es sich beim SNP rs35829419 um eine missense-Mutation in einem Protein-codierenden Bereich des *NLRP3-Gens*, bei der die Substitution des Nukleotids C durch A zu einer veränderten Transkription sowie Translation führt, sodass statt Glutamin Lysin entsteht (N. C. f. B. I. National Library of Medicine, 2020). Das Minor-Allel A, auch bekannt unter „Q705K“, stellt laut Verma et al. eine gain-of-function Variante dar. Es führte in Th1-Zellen mit und ohne Stimulation zu einer gesteigerten NLRP3-Inflammasomaktivierung, belegt durch erhöhte mRNA-Level für IL-1 β und einer gesteigerten IL-1 β -Produktion (Verma et al., 2012). Die Tatsache, dass in der NASH-Pathogenese eine Überaktivität des NLRP3-Inflammasoms vorhanden ist, wurde von Wan et al. bereits erwiesen. In unserem Studienkollektiv könnte man darauf aufbauend eine Assoziation von heterozygotem Genotyp bzw. dem Allel A und Parametern, die für eine NASH sprechen, erwarten. Aufgrund der kleinen Studienpopulation und des geringen Vorkommens des Minor-Allels im Kollektiv sind obige Ergebnisse zu den Transaminasen nur eingeschränkt beurteilbar. Außerdem sollte

der SNP rs35829419 mit anderen bereits bekannten, mit NAFLD assoziierten SNPs untersucht werden, welche bereits im Zusammenhang mit dem SNP rs10754558 diskutiert wurden (siehe 4.2). Signifikante Zusammenhänge zwischen der histologischen Diagnose, den einzelnen Genotypen von rs35829419 als auch rs10754558 und der hier mit untersuchten Risikovariante des *PNPLA3*-Gens konnten nicht festgestellt werden.

Die Testung der einzelnen Genotypen von rs35829419 und histologischer Diagnose ergab unter Studienteilnehmern mit WT sowie heterozygotem Genotyp prozentual etwa denselben Anteil an NAFL und NASH (Tendenz von $p=0,052$). Interessanterweise fanden sich unter den gesunden Studienteilnehmern keine Träger des Minor-Allels. Letzteres könnte einerseits eine krankheitsspezifische Beobachtung sein, andererseits an der geringen Anzahl der Minor-Allelträger im Studienkollektiv liegen. Insgesamt trugen lediglich 21 Personen der gesamten Studienkohorte das Minor-Allel von rs35829419. Auch die Analysen mit den weiteren histologischen Parametern (Fibrose, Zirrhose, NAS-Score, Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung) ergaben keinen Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Art des Genotyps bzw. dem Tragen des Major- oder Minor-Allels. Allerdings gab es unter den 94 für rs35829419 genotypisierten Patienten mit bioptisch gesicherter NAFLD lediglich 10 mit heterozygotem Genotyp. Da die bisher bekannte MAF von rs35829419 (laut ALFA, (2021b): $MAF=0,03768$) ziemlich gering ist und somit absehbar war, dass die vorliegende Studie mit einer Fallzahl von 202 entsprechend niedrig gepowert sein wird, wurde auf eine prospektive Poweranalyse verzichtet.

Wie bereits in der Diskussion der Ergebnisse zu rs10754558 erläutert (siehe 4.3), legen frühere NAFLD-Studien eine Th1-dominierte Immunantwort im peripheren Blut (Inzaugarat et al., 2011) und in der Leber nahe (Bertola et al., 2010; Guebre-Xabier et al., 2000). Vor diesem Hintergrund wäre ein signifikant häufigeres Vorkommen von peripheren Th1- statt wie der hier ermittelten peripheren Th2-Zellen für den Genotyp CA zu erwarten. Eine Th1-dominierte Antwort bedeutet jedoch nicht, dass nicht auch Th2-Zellen vermehrt aktiv sind (Rau et al., 2016). Das hier gefundene erhöhte Vorkommen von peripheren Immunzellen bei Genotyp CA könnte man als eine erhöhte Anfälligkeit der Minor-Allelträger für inflammatorische Prozesse interpretieren. Dies

würde mit Ergebnissen von Vorgängerstudien übereinstimmen, laut derer das Tragen des Minor-Allels mit einem erhöhten Risiko für zahlreiche Erkrankungen (z.B. Lepra, kolorektales Karzinom, HIV, rheumatoide Arthritis, abdominales Aortenaneurysmen, Colitis Ulcerosa und atopischer Dermatitis) assoziiert sein soll (Q. Zhang et al., 2015). Laut der Studie von Klen et al. sorgt das Tragen von einem oder zwei A-Allelen für vermehrt makrovaskuläre Komplikationen bei Typ 2 Diabetikern. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch einige Studien, die dem Minor-Allel gar eine protektive Rolle in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen zuschreiben. So ergab beispielsweise die Studie von Varghese et al. für weibliche Minor-Allelträger ein reduziertes Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden, für männliche A-Allelträger allerdings erhöhte CRP-Werte. Gemäß der erwähnten Studien sind die bisherigen Ergebnisse für die Rolle des Minor-Allels teilweise widersprüchlich und noch unklar.

Abschließend sei nochmal daran erinnert, dass sich die Ergebnisse der peripheren und vor allem der intrahepatischen Entzündungszellen aufgrund des geringen Vorkommens von Minor-Allelträgern nur eingeschränkt beurteilen lassen. Beispielsweise umfasste die Stichprobe für die intrahepatischen Immunzellen von Trägern des Genotyps CA lediglich eine Anzahl von 5, für die peripheren lag die Stichprobe bei 16. Hier bedarf es größerer Stichproben und somit größerer Studienkohorten.

Die Variante Q705 liegt erwiesenermaßen in einem linkage disequilibrium Abschnitt des *NLRP3-Gens*. Beispielsweise zeigte die Studie von X. Li & Qin, dass letztere Variante im Kopplungsungleichgewicht mit Polymorphismus C10X des *CARD8-Gens* liegt, welches ebenfalls an der Bildung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist. Lagen beide Polymorphismen vor, ergab sich eine erhöhte IL-1 β -Sekretion im Sinne einer gesteigerten NLRP3-Inflammasomaktivierung. Letztere findet hauptsächlich in aktivierten Monozyten und Makrophagen statt, welche in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen wiederum Zellen der erworbenen Immunabwehr, die Th-Zellen, aktivieren (Tilg, Moschen, & Szabo, 2016). Eine erhöhte IL-1 β -Aktivität induzierte letztlich eine zunehmende hepatische Steatose (Stienstra et al., 2010) und Fibrose (Gieling, Wallace, & Han, 2009). Die Untersuchung mit weiteren an der NAFLD-Pathogenese beteiligten Polymorphismen wäre daher auch für den SNP rs35829419

sinnvoll, zusätzlich zur hier mituntersuchten Risikovariante des *PNPLA3-Gens*. Außerdem sollten ebenso Studienteilnehmer mit Genotyp AA vertreten sein.

4.5. Einschränkungen der Studie

Anfangs ist zu erwähnen, dass die Gruppe der NAFLD-Patienten ein Kollektiv aus morbid adipösen, bariatrischen Patienten (BMI im Durchschnitt 49,3 kg/m²) darstellt und nicht zwingend repräsentativ für die NAFLD ist. Außerdem ist die Gruppe der gesunden Kontrollen eingeschränkt passend, da sie im Gegensatz zur Gruppe der NAFLD-Patienten über einen normwertigen BMI (im Durchschnitt 21,7 kg/m²) verfügen. Eine altersentsprechende gesunde Kontrollgruppe für NAFLD-Patienten zu finden, ist mit Schwierigkeiten verbunden, wenn man die hohe Prävalenz der NAFLD als häufigste chronische Lebererkrankung und deren Assoziation mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ II und arterieller Hypertonie bedenkt.

Ferner sei an die geringe MAF von rs35829419 erinnert und das hiermit verbundene geringe Vorkommen heterozygoter bzw. das Fehlen homozygoter Minor-Allelträger. Diese geringen Stichproben erschweren die Interpretation der ermittelten Ergebnisse.

Abschließend sollte die geringe Fallzahl der histologisch gesicherten NAFL-/NASH-Patienten erwähnt werden, weshalb die Ergebnisse zu den Analysen mit den histologischen Parametern nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen und ausreichendem Vorkommen aller verschiedenen Genotypen sind für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge erforderlich. Außerdem sollte auf Genebene untersucht werden, wie sich die beiden Polymorphismen auf die Expression des *NLRP3-Gens* bzw. auf die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms und damit letztlich auf die NAFLD auswirken. Interessant wäre auch die beiden hier untersuchten SNPs und das Vorkommen der NAFLD in anderen Ethnien zu untersuchen, da die hier erzielten Ergebnisse lediglich von Europäern stammen. Außerdem sollten genetische Assoziationsstudien mit anderen bereits bekannten, NAFLD-assoziierten SNPs in größeren Studienkollektiven durchgeführt werden, um eine mögliche Assoziation der beiden SNPs mit funktionellen SNPs aufzudecken.

4.6 Ausblick

Einige Auslöser für die Entwicklung einer NAFLD, klinische sowie genetische, sind bereits bekannt: 50 % des hepatischen Fettgehalts lassen sich laut Studien durch genetische Variabilität erklären, die anderen 50 % sind erworbene Faktoren wie etwa die Ernährung und das Maß an Bewegung (Krawczyk, Portincasa, & Lammert, 2013; Loomba et al., 2017; Romeo et al., 2008; Vespasiani-Gentilucci et al., 2018). In Zukunft könnten mittels molekulargenetischer Analytik frühzeitig Patienten mit genetischem Risikoprofil für die Entwicklung einer Steatose und deren Folgeschäden identifiziert werden (Carlsson et al., 2020). Beispielsweise wurde die häufige I148M-Variante (rs738409) des *PNPLA3-Gens* bereits vielfach als genetische Risikovariante für die Entwicklung einer Steatose, NAFLD bzw. deren Spätkomplikationen Fibrose, Zirrhose sowie das HCC beschrieben (Krawczyk et al., 2013). Ein kollektives Screening für die PNPLA3-Risikovariante könnte gerade homozygote Träger detektieren und diese einer regelmäßigen HCC-Vorsorge zuführen (Krawczyk et al., 2013). Eine personalisierte Diagnostik wie auch eine individualisierte Therapie werden in der Behandlung der NAFLD an Bedeutung zunehmen und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Bezogen auf das NLRP3-Inflammasom würde dies bedeuten, dass Patienten mit gain of function Varianten des *NLRP3-Gens* frühzeitig identifiziert werden könnten und mit Hilfe von speziell entwickelten Medikamenten eine Überaktivität des NLRP3-Inflammasoms und damit die Entstehung bzw. der Fortschritt einer NASH verhindert werden könnte. Die Blockierung von IL-1 β -Signalwegen, etwa durch anti-IL-1 β -Antikörper, sind bereits Gegenstand der Forschung beispielsweise in der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 sowie des metabolischen Syndroms (Donath, Dinarello, & Mandrup-Poulsen).

5. Zusammenfassung

Frühere Studien (Mridha et al., 2017; Wan et al., 2016) haben ergeben, dass eine Überaktivität des NLRP3-Inflammasoms an der Pathogenese der NASH maßgeblich beteiligt ist. Aus diesem Grunde ist es von Bedeutung genetische Risikovarianten im *NLRP3-Gen*, die zu einer verstärkten Inflammasomaktivität führen, im Rahmen der NAFLD zu untersuchen. Die vorliegende Dissertation hat sich mit der Fragestellung beschäftigt, inwiefern die Einzelnukleotid-Polymorphismen (kurz SNP) rs10754558 und rs35929419 des *NLRP3-Gens* mit einer Suszeptibilität für eine NAFL und/oder NASH assoziiert sind.

Die Studienkohorte bestand aus 202 Teilnehmern der Würzburger NAFLD-Kohorte der Universitätsklinik Würzburg, 159 NAFLD-Patienten, die im Rahmen der Fettlebersprechstunde der Universitätsklinik Würzburg behandelt wurden und 43 gesunde Kontrollen. Voraussetzung für die Aufnahme in das Patientenkollektiv der durch die Ethikkommission genehmigten Studie war zuallererst die Aufklärung und Zustimmung des Patienten, außerdem eine klinisch oder histologisch diagnostizierte Fettlebererkrankung. Sekundäre Ursachen einer Fettleber oder andere Lebererkrankungen waren Ausschlusskriterien. Alle Teilnehmer erhielten eine Blutentnahme, 97 NAFLD-Patienten eine Leberbiopsie, davon 10 perkutan und 87 subkapsulär im Zuge einer bariatrischen OP. Die Genotypisierung übernahm das Labor der Universitätsklinik Homburg, die weiteren Analysen der Blutwerte, der peripheren und intrahepatischen Immunzellen und die Begutachtung der Leber-Histologie fanden an der Universitätsklinik Würzburg im Rahmen eines vorherigen Forschungsvorhabens statt (Rau et al., 2016).

Für beide SNPs war das Hardy-Weinberg-Equilibrium im Studien- sowie Patientenkollektiv erfüllt. Zwischen den einzelnen Genotypen und dem Vorliegen einer NAFL und/oder NASH fanden sich für beide SNPs keine signifikanten Zusammenhänge. Für den Wildtyp CC des SNP rs10754558 ergaben sich in der Studienkohorte signifikant höhere AST-Mediane ($p=0,018$) und häufiger hochnormale (in den oberen 20 % des Normbereichs) ALT-Werte ($p=0,02$) im Vergleich zu den Genotypen CG und GG. Unter

den NAFLD-Patienten fand sich zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp CC im Vergleich zu CG plus GG mit erhöhten AP-Werten ($p=0,009$). Hier lässt sich nun über eine protektive Rolle des Minor Allels in Bezug auf Leberwerterhöhungen spekulieren. Da bisher die Funktion von rs10754558 im *NLRP3-Gen* noch nicht ausreichend erforscht ist, sollten Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene folgen und Studien mit anderen Polymorphismen des *NLRP3-Gens* und mit NAFLD-assoziiierter Gene durchgeführt werden, um eine mögliche Assoziation mit anderen für die Entwicklung der NAFLD relevanten SNPs nicht zu übersehen. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass die vorliegenden Daten für eine effektivere und frühere Diagnostik der NAFLD einen niedrigeren Grenzwert, insbesondere für die ALT, nahelegen (mit dem gegenwärtigen ALT-Grenzwert und dem WT fand sich keine Assoziation, mit ALT_08 hingegen schon).

In der Analyse mit den Entzündungswerten zeigten sich für die Genotypen CG und GG signifikant erhöhte Frequenzen von Th1-Zellen im peripheren Blut ($p=0,003$). Zusätzlich lässt sich das vermehrte Vorkommen von Th1-Zellen auch im Rahmen der bestehenden Adipositas bzw. des metabolischen Syndroms im Sinne einer low grade inflammation interpretieren (s. Diskussion). Immerhin sind 95 % der NAFLD-Patienten der Studienkohorte von Adipositas betroffen.

Die Ergebnisse zu SNP rs35829419, einer gain-of-function Variante im *NLRP3-Gen*, waren nur eingeschränkt beurteilbar, da keine homozygoten Allel A Träger vorlagen und die Stichprobenzahl für die Analyse der intrahepatischen Immunzellen viel zu gering war, um aussagekräftig sein zu können. In der gesamten Kohorte stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem heterozygoten Genotyp von rs35829419 und einer erhöhten Frequenz an Th2-Zellen ($p=0,024$) im peripheren Blut heraus. Innerhalb der NAFLD gingen frühere Studien bisher eher von einer Th1-dominierten Immunantwort aus (Bertola et al., 2010), wenn nicht gar einer Th2-Defizienz (Guebret-Xabier et al., 2000). Das hier vorliegende Ergebnis könnte immerhin auf eine höhere entzündliche Aktivität bei Minor-Allelträgern hindeuten. Die Variante Q705 liegt erwiesenermaßen in einem linkage disequilibrium Abschnitt des *NLRP3-Gens*. Die weitere Untersuchung mit größeren Stichproben und weiteren Polymorphismen, die in

der NAFLD-Pathogenese bekanntermaßen eine Rolle spielen, wäre daher auch für den SNP rs35829419 sinnvoll.

Im Hinblick auf die zunehmende Prävalenz der NAFLD als Volkskrankheit der westlichen Welt wird die personalisierte Medizin, inklusive Prävention, Diagnostik und Therapie immer mehr an Bedeutung zunehmen. Die Identifizierung von genetischen Risikovarianten, die an der Pathogenese der NAFLD beteiligt sind, ist ein erster Schritt auf dem Weg hin zu besseren Therapiemöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, L. A., Lymp, J. F., St Sauver, J., Sanderson, S. O., Lindor, K. D., Feldstein, A., & Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, *129*(1), 113-121.
- Addobbati, C., da Cruz, H. L. A., Adelino, J. E., Melo Tavares Ramos, A. L., Fragoso, T. S., Domingues, A., . . . Sandrin-Garcia, P. (2018). Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflammation Research*, *67*(3), 255-264. doi:10.1007/s00011-017-1119-2
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. . (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. . *Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science;*
- Angulo, P. (2002). Non alcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*, *346*, 1221-1231.
- Angulo P, H. J., Marchesini G et al. (2007). NAFLD fibrosis score Online calculator. The NAFLD fibrosis score. A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* *45*(4):846-854. Retrieved from <http://naflscore.com>
- Angulo, P., Hui Jm Fau - Marchesini, G., Marchesini G Fau - Bugianesi, E., Bugianesi E Fau - George, J., George J Fau - Farrell, G. C., Farrell Gc Fau - Enders, F., . . . Day, C. P. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. (0270-9139 (Print)).
- Anstee, Q. M., Targher, G., & Day, C. P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *10*(6), 330-344. doi:10.1038/nrgastro.2013.41
- Arab, J. P., Arrese, M., & Trauner, M. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*, *13*, 321-350. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043617
- Armstrong, M. J., Gaunt, P., Aithal, G. P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., . . . Newsome, P. N. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*, *387*(10019), 679-690. doi:10.1016/s0140-6736(15)00803-x
- Bae2, Y. L. a. S.-C. (2016). Association between functional NLRP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Lupus*(25), 1558-1566.
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., . . . Latz, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, *183*(2), 787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*, *7*, 221-239. doi:10.2147/ceg.s62831
- Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M. C., Iannelli, A., . . . Gual, P. (2010). Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One*, *5*(10), e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577

- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C., & Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*, *58*(3), 593-608. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.005
- Bluemel, S., Williams, B., Knight, R., & Schnabl, B. (2016). Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *311*(6), G1018-g1036. doi:10.1152/ajpgi.00245.2016
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, *65*(8), 1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
- Carlsson, B., Lindén, D., Brolén, G., Liljeblad, M., Bjursell, M., Romeo, S., & Loomba, R. (2020). Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *51*(12), 1305-1320. doi:https://doi.org/10.1111/apt.15738
- Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., . . . Sutterwala, F. S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(26), 9035-9040. doi:10.1073/pnas.0803933105
- Chackelevicius, C. M., Gambaro, S. E., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2016). Th17 involvement in nonalcoholic fatty liver disease progression to non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, *22*(41), 9096-9103. doi:10.3748/wjg.v22.i41.9096
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., . . . Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, *55*(6), 2005-2023. doi:10.1002/hep.25762
- Clark, & J. (2003). The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*, *98*(5), 960-967. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07486.x
- Court, M. H. (2005-2008). Courtlab-HWcalculator. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Khalid_Hassan10/post/Does_anyone_know_how_to_calculate_Hardy_Weinberg_Equilibrium_for_14_different_alleles/attachment/59d64ad979197b80779a50fd/AS:477303651213312@1490809466020/download/Court+lab+-+HW+calculator+-+important.xls
- Crispe, I. N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, *27*, 147-163. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629
- Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L., Persechini, P. M., & Ojcius, D. M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, *282*(5), 2871-2879. doi:10.1074/jbc.M608083200
- Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., & Szabo, G. (2011). Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*, *54*(1), 133-144. doi:10.1002/hep.24341
- Daniel, S., Ben-Menachem, T., Vasudevan, G., Ma, C. K., & Blumenkehl, M. (1999). Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol*, *94*(10), 3010-3014. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01451.x
- Dicker, D., Salook, M. A., Marcoviciu, D., Djaldetti, M., & Bessler, H. (2013). Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection. *Obes Facts*, *6*(2), 146-151. doi:10.1159/000350775

- Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-1 β , Interleukin-18, and the Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1), 1-11. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x>
- Donath, M. A.-O., Dinarello, C. A., & Mandrup-Poulsen, T. Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes. (1474-1741 (Electronic)).
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320(5876), 674-677. doi:10.1126/science.1156995
- Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Qjm*, 103(2), 71-83. doi:10.1093/qjmed/hcp158
- Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guenon, I., Fick, L., Le Bert, M., . . . Couillin, I. (2008). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol*, 180(2), 1169-1178.
- Düwell, P. (2011). Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen am Beispiel von Atherosklerose und der experimentellen Colitis *Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.*
- Dyson, J. K., Anstee, Q. M., & McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterology*, 5(3), 211. doi:10.1136/flgastro-2013-100403
- E. Roeb, H. M. S., H. Bantel, U. Baumann, A. Canbay, M. Demir, U. Drebbler, A. Geier, J. Hampe,, C. Hellerbrand, A. P.-W., J. M. Schattenberg, C. Schramm, H. K. Seitz, N. Stefan, F. Tacke,, & A. Tannapfel, P. L. J., J. Bojunga. (2015, 02/2015 [zitiert am 11.09.2018]). S2k Leitlinie Nicht- alkoholische Fettlebererkrankungen AWMF Register Nr. 021-025 [Internet]. Retrieved from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-025I_S25_NASH_Nicht_alkoholische_Fettlebererkrankung_2015-01.pdf
- Eitel, J., Suttrop, N., & Opitz, B. (2010). Innate immune recognition and inflammasome activation in listeria monocytogenes infection. *Front Microbiol*, 1, 149. doi:10.3389/fmicb.2010.00149
- Elliott, E. I., & Sutterwala, F. S. (2015). Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*, 265(1), 35-52. doi:10.1111/imr.12286
- Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., & Beer, H. D. (2007). The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol*, 17(13), 1140-1145. doi:10.1016/j.cub.2007.05.074
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., . . . Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, 15(8), 930-939. doi:10.1038/nm.2002
- Friedman, S., Sanyal, A., Goodman, Z., Lefebvre, E., Gottwald, M., Fischer, L., & Ratziu, V. (2016). Efficacy and safety study of cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in adult subjects with liver fibrosis: CENTAUR Phase 2b study design. *Contemp Clin Trials*, 47, 356-365. doi:10.1016/j.cct.2016.02.012
- Ganz, M., & Szabo, G. (2013). Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepato Int*, 7 Suppl 2, 771-781. doi:10.1007/s12072-013-9468-6
- Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2012). Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*, 748, 65-106. doi:10.1007/978-1-4614-3573-0_4

- Gieling, R. G., Wallace, K., & Han, Y.-P. (2009). Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1324-G1331. doi:10.1152/ajpgi.90564.2008
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., . . . Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7611-7615.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., . . . Ruland, J. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 459(7245), 433-436. doi:10.1038/nature07965
- Guebre-Xabier, M., Yang, S., Lin, H. Z., Schwenk, R., Krzych, U., & Diehl, A. M. (2000). Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology*, 31(3), 633-640. doi:10.1002/hep.510310313
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., . . . Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 9(8), 857-865. doi:10.1038/ni.1636
- Hanaei, S., Sadr, M., Rezaei, A., Shahkarami, S., Ebrahimi Daryani, N., Bidoki, A. Z., & Rezaei, N. (2018). Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 42(3), 269-275. doi:10.1016/j.clinre.2017.09.003
- Harley, I. T., Stankiewicz, T. E., Giles, D. A., Softic, S., Flick, L. M., Cappelletti, M., . . . Divanovic, S. (2014). IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*, 59(5), 1830-1839. doi:10.1002/hep.26746
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11), 1123-1132. doi:10.1038/ni1254
- Hirsova, P., & Gores, G. J. (2015). Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(1), 17-27. doi:10.1016/j.jcmgh.2014.11.005
- Hirsova, P., Ibrahim, S. H., Gores, G. J., & Malhi, H. (2016). Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res*, 57(10), 1758-1770. doi:10.1194/jlr.R066357
- Hitomi, Y., Ebisawa, M., Tomikawa, M., Imai, T., Komata, T., Hirota, T., . . . Tamari, M. (2009). Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 124(4), 779-785.e776. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.044
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., & Kolodner, R. D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*, 29(3), 301-305. doi:10.1038/ng756
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., . . . Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 9(8), 847-856. doi:10.1038/ni.1631
- Information, N. C. f. B. (2021a, 9.4.2021). dbSNP Short Genetic Variations, Reference SNP (rs) Report, rs10754558. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10754558?vertical_tab=true#frequency_tab
- Information, N. C. f. B. (2021b, 9.4.2021). dbSNP Short Genetic Variations, Reference SNP (rs) Report, rs35829419. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs35829419?vertical_tab=true#frequency_tab

- Invivogen. (2012a). review-nod-like-receptors-invivogen. Retrieved from <https://www.invivogen.com/review-nlr>
- Invivogen. (2012b). Tlr's & innate immunity. *Invivogen*. Retrieved from <https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/old/docs/reviews/review-innate-immunity-invi>
- Inzaugarat, M. E., Ferreyra Solari, N. E., Billordo, L. A., Abecasis, R., Gadano, A. C., & Chernavsky, A. C. (2011). Altered phenotype and functionality of circulating immune cells characterize adult patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Immunol*, *31*(6), 1120-1130. doi:10.1007/s10875-011-9571-1
- Johannes Weiss, M. R., Jan Meertens, Ilona Hering, Lisa Reichert, Theodor Kudlich, Ann-Kathrin Koschker, Christian Jurowich & Andreas Geier (2016). Feasibility of liver stiffness measurement in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery using XL probe. *51:10*, 1263-1268, .
- Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., . . . Nunez, G. (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, *440*(7081), 233-236. doi:10.1038/nature04517
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., . . . Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *41*(6), 1313-1321. doi:10.1002/hep.20701
- Klen, J., Goricar, K., Janez, A., & Dolzan, V. (2015). NLRP3 Inflammasome Polymorphism and Macrovascular Complications in Type 2 Diabetes Patients. *J Diabetes Res*, *2015*, 616747. doi:10.1155/2015/616747
- Kobe, B., & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, *11*(6), 725-732.
- Kotronen, A., Peltonen, M., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Bergholm, R., Johansson, L. M., . . . Yki-Jarvinen, H. (2009). Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*, *137*(3), 865-872. doi:10.1053/j.gastro.2009.06.005
- Krawczyk, M., Portincasa, P., & Lammert, F. (2013). PNPLA3-associated steatohepatitis: toward a gene-based classification of fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, *33*(4), 369-379. doi:10.1055/s-0033-1358525
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, *146*(3), 726-735. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.049
- Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2010). Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol*, *42*(6), 792-795. doi:10.1016/j.biocel.2010.01.008
- Land, W. G. (2015a). The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University medical journal*, *15*(2), e157-e170.
- Land, W. G. (2015b). The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University Med Journal*, *15*(2).
- Li, X., & Qin, J. (2005). Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med (Berl)*, *83*(4), 258-266. doi:10.1007/s00109-004-0622-4
- Li, Z. Z., Berk, M., McIntyre, T. M., & Feldstein, A. E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, *284*(9), 5637-5644. doi:10.1074/jbc.M807616200

- Liu, Y. L., Reeves, H. L., Burt, A. D., Tiniakos, D., McPherson, S., Leathart, J. B., . . . Anstee, Q. M. (2014). TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*, 5, 4309. doi:10.1038/ncomms5309
- Loomba, R., Lawitz, E., Mantry, P. S., Jayakumar, S., Caldwell, S. H., Arnold, H., . . . Investigators, G.-U.-. (2017). The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.29514
- Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2013). Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol*, 58(5), 1007-1019. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.021
- Maedler, K., Dharmadhikari, G., Schumann, D. M., & Storling, J. (2009). Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin Biol Ther*, 9(9), 1177-1188. doi:10.1517/14712590903136688
- Mandelia, C., Collyer, E., Mansoor, S., Lopez, R., Lappe, S., Nobili, V., & Alkhoury, N. (2016). Plasma Cytokeratin-18 Level As a Novel Biomarker for Liver Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *63*(2), 181-187. doi:10.1097/mpg.0000000000001136
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., . . . Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228-232. doi:10.1038/nature04515
- Marso, S. P., Daniels, G. H., Brown-Frandsen, K., Kristensen, P., Mann, J. F., Nauck, M. A., . . . Buse, J. B. (2016). Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 375(4), 311-322. doi:10.1056/NEJMoa1603827
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237-241. doi:10.1038/nature04516
- Mathews, R. J., Robinson, J. I., Battellino, M., Wong, C., Taylor, J. C., Eyre, S., . . . McDermott, M. F. (2014). Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann Rheum Dis*, 73(6), 1202-1210. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203276
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295-298.
- Mridha, A. R., Wree, A., Robertson, A. A. B., Yeh, M. M., Johnson, C. D., Van Rooyen, D. M., . . . Farrell, G. C. (2017). NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol*, 66(5), 1037-1046. doi:10.1016/j.jhep.2017.01.022
- Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., . . . Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 452(7183), 103-107. doi:10.1038/nature06664
- National Library of Medicine. (2020, 17.08.2020). *Genetics home reference*. Retrieved from <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>
- National Library of Medicine, N. C. f. B. I. (2020, 21.04.2020). db SNP Short Genetic Variations. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs35829419>
- Natsuki Kawana, Y. Y., Yoshihiro Kino, & Satoh, a. J.-i. (2014). Molecular Network of NLRP3 Inflammasome Activation Responsive Genes in a Human Monocyte Cell Line. *Austin Journal of Clinical Immunology*, 1(4).
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*, 52(2), 774-788. doi:10.1002/hep.23719

- Neuschwander-Tetri, B. A., Loomba, R., Sanyal, A. J., Lavine, J. E., Van Natta, M. L., Abdelmalek, M. F., . . . Doo, E. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, *385*(9972), 956-965. doi:10.1016/s0140-6736(14)61933-4
- Pan, J., Ou, Z., Cai, C., Li, P., Gong, J., Ruan, X. Z., & He, K. (2018). Fatty acid activates NLRP3 inflammasomes in mouse Kupffer cells through mitochondrial DNA release. *Cell Immunol*, *332*, 111-120. doi:10.1016/j.cellimm.2018.08.006
- Paramel, G. V., Sirsjo, A., & Fransen, K. (2015). Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. *Mediators Inflamm*, *2015*, 846782. doi:10.1155/2015/846782
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., . . . Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, *6*(11), 1133-1141. doi:10.1038/ni1261
- Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017, Dec 21). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2018/01/09. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29307986>
- Pontillo, A., Brandao, L., Guimaraes, R., Segat, L., Araujo, J., & Crovella, S. (2010). Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity*, *43*(8), 583-589. doi:10.3109/08916930903540432
- Pontillo, A., Vendramin, A., Catamo, E., Fabris, A., & Crovella, S. (2011). The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol*, *106*(3), 539-544. doi:10.1038/ajg.2010.474
- Prati, D., Taioli, E., Zanella, A., & et al. (2002). Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Annals of Internal Medicine*, *137*(1), 1-10. doi:10.7326/0003-4819-137-1-200207020-00006
- Ratziu, V., Harrison, S. A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., . . . Group, G.-I. S. (2016). Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*, *150*(5), 1147-1159 e1145. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.038
- Rau, M., Schilling, A. K., Meertens, J., Hering, I., Weiss, J., Jurowich, C., . . . Geier, A. (2016). Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol*, *196*(1), 97-105. doi:10.4049/jimmunol.1501175
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., & Libby, P. (2008). Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation. *Circ Res*, *103*(5), 467-476. doi:10.1161/circresaha.108.177105
- Rockey, D. C., Caldwell, S. H., Goodman, Z. D., Nelson, R. C., Smith, A. D., & American Association for the Study of Liver, D. (2009). Liver biopsy. *Hepatology*, *49*(3), 1017-1044. doi:10.1002/hep.22742
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., . . . Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, *40*(12), 1461-1465. doi:10.1038/ng.257
- Saab, S., Manne, V., Nieto, J., Schwimmer, J. B., & Chalasani, N. P. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Latinos. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *14*(1), 5-12; quiz e19-10. doi:10.1016/j.cgh.2015.05.001

- Saadah, S., Younossi Zm Fau - Remer, E. M., Remer Em Fau - Gramlich, T., Gramlich T Fau - Ong, J. P., Ong Jp Fau - Hurley, M., Hurley M Fau - Mullen, K. D., . . . Sheridan, M. J. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. (0016-5085 (Print)).
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Scientific, T. F. Mutationsnachweis. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html#:~:text=Die%20folgende%20Abbildung%20zeigt%20den%20Ablauf%20eines%20TaqMan,TaqMan%20Sonde%20durch%20den%20NFQ%20am%203%27-Ende%20unterdr%C3%BCckt.>
- Seki, E., & Brenner, D. A. (2008). Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*, *48*(1), 322-335. doi:10.1002/hep.22306
- Shaw, P. J., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2010). NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol*, *40*(3), 624-627. doi:10.1002/eji.200940211
- Shipovskaya, A. A., & Dudanova, O. P. Intrahepatic cholestasis in nonalcoholic fatty liver disease. (0040-3660 (Print)).
- Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P., & Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, *49*(4), 489-502. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.022
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., . . . Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, *52*(3), 812-817.
- Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C., Keshtkar, S., Groener, J. E., van Rooijen, N., . . . Muller, M. (2010). Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*, *51*(2), 511-522. doi:10.1002/hep.23337
- Stutz, A., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2009). Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest*, *119*(12), 3502-3511. doi:10.1172/JCI40599
- Szabo, G., & Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol*, *57*(3), 642-654. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.035
- Tan, M. S., Yu, J. T., Jiang, T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Zhang, W., . . . Tan, L. (2013). NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. *J Neuroimmunol*, *265*(1-2), 91-95. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.10.002
- Tang, Y., Bian, Z., Zhao, L., Liu, Y., Liang, S., Wang, Q., . . . Ma, X. (2011). Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol*, *166*(2), 281-290. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04471.x
- Tannapfel, A., Dienes, H. P., & Lohse, A. W. (2012). The indications for liver biopsy. *Dtsch Arztebl Int*, *109*(27-28), 477-483. doi:10.3238/arztebl.2012.0477
- Tato, C. M., & O'Shea, J. J. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature*, *441*(7090), 166-168. doi:10.1038/441166a
- Tato, C. M., & O'Shea, J. J. (2006). What does it mean to be just 17? *Nature*, *441*, 166. doi:10.1038/441166a
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., Rawla, P., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and risk of hepatocellular carcinoma progression. *Clinical and experimental hepatology*, *6*(4), 289-294. doi:10.5114/ceh.2020.102153
- Tilg, H., Moschen, A. R., & Szabo, G. (2016). Interleukin-1 and inflammasomes in ALD/AAH and NAFLD/NASH. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.28456

- Trauner, M., Arrese, M., & Wagner, M. (2010). Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3), 299-310. doi:10.1016/j.bbali.2009.10.007
- Varghese, G. P., Fransen, K., Hurtig-Wennlof, A., Bengtsson, T., Jansson, J. H., & Sirsjo, A. (2013). Q705K variant in NLRP3 gene confers protection against myocardial infarction in female individuals. *Biomed Rep*, 1(6), 879-882. doi:10.3892/br.2013.155
- Verma, D., Särndahl, E., Andersson, H., Eriksson, P., Fredrikson, M., Jönsson, J.-I., . . . Söderkvist, P. (2012). The Q705K Polymorphism in NLRP3 Is a Gain-of-Function Alteration Leading to Excessive Interleukin-1 β and IL-18 Production. *PLoS One*, 7(4), e34977. doi:10.1371/journal.pone.0034977
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(3), 274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x
- Vespasiani-Gentilucci, U., Gallo, P., Dell'Unto, C., Volpentesta, M., Antonelli-Incalzi, R., & Picardi, A. (2018). Promoting genetics in non-alcoholic fatty liver disease: Combined risk score through polymorphisms and clinical variables. *World J Gastroenterol*, 24(43), 4835-4845. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4835
- Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., . . . Romero-Gomez, M. (2015). Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 149(2), 367-378.e365. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.005
- von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 3(11), 867-878. doi:10.1038/nri1222
- Wan, X., Xu, C., Yu, C., & Li, Y. (2016). Role of NLRP3 Inflammasome in the Progression of NAFLD to NASH. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2016, 1-7. doi:10.1155/2016/6489012
- Wang, S., Fang, F., Jin, W. B., Wang, X., & Zheng, X. S. (2015). Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res*, 14(4), 17447-17452. doi:10.4238/2015.December.21.15
- Weiss, J., Rau, M., & Geier, A. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 111(26), 447-452. doi:10.3238/arztebl.2014.0447
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Johnson, C. D., Canbay, A., . . . Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*, 59(3), 898-910. doi:10.1002/hep.26592
- Wree, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M. E., . . . Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*, 92(10), 1069-1082. doi:10.1007/s00109-014-1170-1
- Wu, Z., Wu, S., & Liang, T. (2021). Association of NLRP3 rs35829419 and rs10754558 Polymorphisms With Risks of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Genet*, 12, 690860. doi:10.3389/fgene.2021.690860
- Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S., & Cooper, G. J. (2003). The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*, 112(1), 91-100. doi:10.1172/jci17797
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., . . . Diehl, A. M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1366-1374. doi:10.1002/hep.21655
- Yamasaki, K., Muto, J., Taylor, K. R., Cogen, A. L., Audish, D., Bertin, J., . . . Gallo, R. L. (2009). NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to

- hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem*, 284(19), 12762-12771. doi:10.1074/jbc.M806084200
- Yeniova Ao Fau - Küçükazman, M., Küçükazman M Fau - Ata, N., Ata N Fau - Dal, K., Dal K Fau - Kefeli, A., Kefeli A Fau - Başığit, S., Başığit S Fau - Aktaş, B., . . . Beyan, E. High-sensitivity C-reactive protein is a strong predictor of non-alcoholic fatty liver disease. (0172-6390 (Print)).
- Younossi, Z. M., Ratziu, V., Loomba, R., Rinella, M., Anstee, Q. M., Goodman, Z., . . . Sanyal, A. J. (2019). Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 394(10215), 2184-2196. doi:10.1016/s0140-6736(19)33041-7
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., & Srishord, M. (2011). Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(6), 524-530.e521. doi:https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.03.020
- Zhang, L., Zhang, D., Zheng, Y., Hu, Z., Zeng, Y., & Yue, F. (2016). [Association of NLRP3 gene single nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 33(4), 530-534. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.04.024
- Zhang, Q., Fan, H. W., Zhang, J. Z., Wang, Y. M., & Xing, H. J. (2015). NLRP3 rs35829419 polymorphism is associated with increased susceptibility to multiple diseases in humans. *Genet Mol Res*, 14(4), 13968-13980. doi:10.4238/2015.October.29.17
- Zhou, D., Wang, X., Chen, T., Wen, W., Liu, Y., Wu, Y., & Yuan, Z. (2016). The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. *Biomed Res Int*, 2016, 3185397. doi:10.1155/2016/3185397
- Zhou, H., & Liu, F. (2018). Regulation, Communication, and Functional Roles of Adipose Tissue-Resident CD4(+) T Cells in the Control of Metabolic Homeostasis. *Front Immunol*, 9, 1961. doi:10.3389/fimmu.2018.01961
- Zhou, Y., Lu, M., Du, R. H., Qiao, C., Jiang, C. Y., Zhang, K. Z., . . . Hu, G. (2016). MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 11, 28. doi:10.1186/s13024-016-0094-3

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>transactivator domain</i>
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ALT	<i>Alanin-Aminotransferase</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein</i>
AST	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BIR	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat domain</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CARD8	<i>Caspase Recruitment Domain Family Member 8</i>
CCR	<i>Chemokinrezeptor</i>
cias1	<i>Cold-induced Autoinflammatory Syndrome 1-Gen</i>
COL13A1	<i>Kollagen Typ XIII alpha I bildendes Gen</i>
COL1A1	<i>Gen, welches für Alpha-1-Typ-I-Kollagen kodiert</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
FACS	<i>engl. "fluorescence activated cell sorting", Durchflusszytometrie</i>
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
HC	<i>healthy control, gesunder Kontrollproband</i>
HCC	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>
HWG	<i>Hardy-Weinberg-Gleichgewicht</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IQR	<i>Interquartilenbereich</i>
KHK	<i>koronare Herzkrankheit</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>Leucine-rich Repeat, engl. für "Leucin-reiche Wiederholung"</i>
NACHT	<i>NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (class 2 transcription activator of the MHC, HET-E (heterokaryon incompatibility), TP1 (telomerase-associated protein 1)</i>
NAFLD	<i>nichtalkoholische Fettlebererkrankung</i>
NAS	<i>NAFLD activity Score</i>
NASH	<i>nichtalkoholische Steatohepatitis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFS	<i>NAFLD Fibrosis Score</i>
NLRP	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing</i>
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 [NALP3] and cryopyrin</i>
NLRs	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>

NPV *Negativer prädiktiver Wert*
PAMPs *pathogen-associated molecular patterns*
PCR *Polymerase-Kettenreaktion*
PNPLA3 *patatin-like Phospholipase 3*
PPAR *Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor*
PPV *Positiver prädiktiver Wert*
PRRs *Pattern Recognition Receptors*
PYD *PYRIN domain*
RNA *Ribonukleinsäure*
SNP *engl. für "single nucleotide polymorphism", Einzelnukleotid-Polymorphismus*
TLRs *Toll-like receptors*
Treg-Zellen *regulatorische T-Zellen*
UTR *untranslatierte Region*
VAT *engl. visceral adipose tissue, dt. viszerales Fettgewebe*
WT *Wildtyp*

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Diagnostischer Algorithmus bei NAFLD	9
Abbildung 2 Aufbau der NLR Subfamilien.....	12
Abbildung 3 Schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasoms.....	13
Abbildung 4 Metabolismus des NLRP3-Inflammasoms.....	14
Abbildung 5 Das <i>NLRP3-Gen</i> mit seinen bisher untersuchten SNPs	16
Abbildung 6 Mutationsnachweis mithilfe der TaqMan-PCR.....	27
Abbildung 7 Verteilung der BMI-Werte unter den NAFLD-Patienten	32
Abbildung 8 Zusammenhang von Genotyp CC versus CG versus GG für rs10754558 und der Höhe des ALT-Werts.....	39
Abbildung 9 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs10754558 und Vorkommen hochnormaler ALT-Werte.	40
Abbildung 10 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG/GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte.....	41
Abbildung 11 Zusammenhang von CC versus CG/GG Genotyp für rs10754558 und der Höhe des AST-Werts.....	42
Abbildung 12 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und.....	43
Abbildung 13 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und G-Allelträgern für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte.....	44
Abbildung 14 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC	46
Abbildung 15 Zusammenhang von jeweiligem Genotyp (rs10754558) und der Häufigkeit der Th1-Zellen. Boxplot:	47
Abbildung 16 Zusammenhang von G-Allelträgerschaft und Häufigkeit der Th1-Zellen.	48
Abbildung 17 Zusammenhang von WT versus heterozygoten Genotyp für rs35829419 und der Höhe des ALT-Werts.	49
Abbildung 18 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs35829419 und Vorkommen hochnormaler ALT-Werte.	50

Abbildung 19 Zusammenhang von WT versus heterozygoten Genotyp für rs35829419 und der Höhe des AST-Werts.	51
Abbildung 20 Zusammenhang zwischen Genotyp für den SNP rs35829419 und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte.	52
Abbildung 21 Zusammenhang zwischen den einzelnen Genotypen des SNP rs35829419 und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC.....	53
Abbildung 22 Zusammenhang von Genotyp und Häufigkeit der Th2-Zellen für den SNP rs35829419.....	54
Abbildung 23 Zusammenhang zwischen WT Genotyp beider SNPs und der Höhe des ALT-Werts.....	55
Abbildung 24 Zusammenhang zwischen Genotyp beider SNPs und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte.	56
Abbildung 25 Zusammenhang zwischen WT Genotyp beider SNPs und der Höhe des AST-Werts.....	57
Abbildung 26 Zusammenhang zwischen Genotyp beider SNPs und Vorkommen hoch-/normaler AST-Werte.	58
Abbildung 27 Zusammenhang zwischen Trägerschaft eines oder mehrerer Minor-Allele und Vorkommen einer NAFL, NASH oder HC	59
Abbildung 28 Zusammenhang zwischen Minor-Allelträgerschaft und häufigerem Vorkommen von Th1-Zellen.....	60
Abbildung 29 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen hoch-/normaler ALT-Werte.....	63
Abbildung 30 Zusammenhang von CC versus CG und GG Genotyp für rs10754558 und der Höhe des AST-Werts.....	64
Abbildung 31 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer NAFL oder NASH im Patientenkollektiv.....	65
Abbildung 32 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Fibrosegrad in der NAFLD-Kohorte.....	66
Abbildung 33 Zusammenhang zwischen Genotyp CC, CG und GG für den SNP rs10754558 und Vorkommen einer Zirrhose im Patientenkollektiv.	67

Abbildung 34 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und CG zusammengefasst versus GG und Verteilung des NAS-Scores;.....	69
Abbildung 35 Zusammenhang zwischen Genotyp CC versus CG versus GG und Verteilung des gruppierten NAS-Scores;.....	70
Abbildung 36 Zusammenhang zwischen Genotyp CC und CG versus GG und Verteilung des gruppierten NAS-Scores;.....	71
Abbildung 37 Zusammenhang von jeweiligem Genotyp (rs10754558) und dem Anteil der Th1-Zellen an CD4+ Zellen in Prozent im Patientenkollektiv.	73
Abbildung 38 Zusammenhang von Minor-Allelträgerschaft für rs10754558 und Häufigkeit der Leber-Th2-Zellen.....	75
Abbildung 39 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Vorkommen einer NAFL oder NASH im Patientenkollektiv.....	76
Abbildung 40 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Fibrosegrad im Patientenkollektiv.....	77
Abbildung 41 Zusammenhang zwischen Genotyp von rs35829419 und Vorliegen einer Zirrhose im Patientenkollektiv.	78
Abbildung 42 Zusammenhang von Vorliegen des Allels G und dem Vorkommen von Th1-Zellen.....	81
Abbildung 43 Zusammenhang von Tragen des Allels A und Häufigkeit der Th2-Zellen.	82
Abbildung 44 Zusammenhang von Trägerschaft des Minor-Allels eines/beider SNPs und Häufigkeit der Th1-Zellen.....	83
Abbildung 45 Zusammenhang von G-Allelträgerschaft und Häufigkeit der Th1-Zellen im Patientenkollektiv.....	84
Abbildung 46 Vereinfachte Darstellung der bisher bekannten Auswirkungen einer gesteigerten Aktivität des NLRP3-Inflammasoms auf den Stoffwechsel unter Bezugnahme auf rs10754558 und rs35829419.....	86

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Bei Studienteilnehmern erhobene Laborparameter	23
Tabelle 2 Häufigkeit der Fibrose unter NAFL- und NASH-Patienten.....	32
Tabelle 3 Vorkommen metabolischer Erkrankungen im Patientenkollektiv	33
Tabelle 4: Verteilung der Genotypen der beiden SNPs in der gesamten Studienkohorte	34
Tabelle 5: Verteilung der Genotypen unter NAFLD-Patienten versus Gesunden	35
Tabelle 6: Auswertungen bezogen auf die gesamte Studienkohorte.....	37
Tabelle 7 Verteilung der Genotypen von rs10754558 bezogen auf die histologische Diagnose.....	45
Tabelle 8 Im paarweisen Vergleich der verschiedenen Genotypen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Minor-Allelträgern.	47
Tabelle 9 Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests mit den einzelnen Genotypen für rs10754558 und den getesteten Immunzellen	48
Tabelle 10 Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests mit den einzelnen Genotypen für rs35829419 und den getesteten Immunzellen	54
Tabelle 11: Auswertungen bezogen auf die NAFLD-Patienten	61
Tabelle 12 Zusammenhang aus jeweiligen Genotypen und dem NAS-Score im Patientenkollektiv.....	68
Tabelle 13 Ausprägung histologischer Merkmale wie Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung abhängig vom jeweiligen Genotyp rs10754558 (in absoluten und relativen Zahlen)	72
Tabelle 14 Paarweise Vergleiche der Genotypen für rs10754558 und der Häufigkeit der Th1-Zellen.	74
Tabelle 15 Kreuztabelle, Analyse von NAS-Score und einzelnen Genotypen	78
Tabelle 16 Ausprägung histologischer Merkmale wie Steatose, Inflammation und Hepatozyten-Ballonierung abhängig vom jeweiligen Genotyp rs35829419 (in absoluten und relativen Zahlen)	79

IV. Auszug aus dem Studienprotokoll der Universitätsklinik Homburg

Im Anschluss werden die Geräte und Reagenzien aufgeführt, die gemäß dem Studienprotokoll der Universitätsklinik Homburg für die Genotypisierung im dortigen Labor verwendet wurden.

Geräte und Reagenzien für die DNA-Extraktion:

QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen	
- Qiagen Protease	
- Puffer AL	
- Puffer AW1	
- Puffer AW2	
- Puffer AE	
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipetten 2, 5, 10, 20, 100, 200 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
2 ml Collection Tubes sowie Spin Columns	Qiagen

Geräte und Reagenzien für die TaqMan-PCR:

TaqMan Real Time PCR 7500 fast	Applied Biosystems
96 well fast PCR Platten	Sarstedt
MicroAMP Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
TaqMan GTXpress Master Mix	Applied Biosystems
Sonden VIC und FAM	Applied Biosystems
Primer	Thermo Fisher Scientific
Aqua bidest. „LiChrosolv“	Merck

Geräte und Reagenzien für die Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit:

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipette 2,5 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präzisionswischtücher Kimtech science	Kimberly-Clark Professional

V. Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Professor Geier sowie PD Dr. Monika Rau, die mich zuverlässig betreut und deren kompetente Anleitung mich stets motiviert haben. Des Weiteren danke ich Dr. Johannes Weiß für die interessante Zeit in der Fettlebersprechstunde der Universitätsklinik Würzburg.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern sowie meiner Schwester, die mich auf meinem bisherigen Weg stets liebevoll und weise unterstützt haben. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, der den letzten Schritten dieser Arbeit den nötigen Schwung verliehen hat.

VI. Lebenslauf