

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. J. Schattenberg

**Analyse von *MTARC1* und Fettleber-assoziierten Genen und deren Einfluss auf die  
Entwicklung einer Leberverfettung bei PatientInnen mit Diabetes mellitus**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2024**

vorgelegt von: Malvina Brisbois

geb. am: 16.09.1994 in Luxemburg

Tag der Promotion: 12.02.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Krawczyk

Prof. Dr. T. Leinders-Zufall

Prof. Dr. C. Meier

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
Summary .....	11
Zusammenfassung.....	13
1. Einleitung .....	15
1.1. Die Leber .....	15
1.1.1. Anatomie.....	15
1.1.2. Funktionen der Leber.....	15
1.1.3. Die „Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung“ (MASLD).....	16
1.1.4. Die Pathogenese der Lebersteatose bis hin zur Steatohepatitis .....	17
1.1.5. Der Einfluss von genetischer Prädisposition auf die Entwicklung einer Lebererkrankung oder deren Progress.....	18
1.1.6. Die Leberfibrose und -zirrhose .....	20
1.1.7. Nicht-invasive Diagnostik einer Leberverfettung und -fibrose .....	20
1.2. Der Diabetes mellitus Typ II .....	23
1.2.1. Definition und Epidemiologie .....	23
1.2.2. Physiologie und Pathophysiologie .....	24
1.2.3. Risikofaktoren .....	25
1.3. Das metabolische Syndrom.....	26
1.4. Der oxidative Stress .....	27
1.4.1. Physiologische Wirkung.....	27
1.4.2. Pathophysiologische Wirkung.....	27
1.4.3. Oxidativer Stress und Diabetes mellitus Typ II .....	28
1.5. Zielsetzung .....	29
2. Patienten und Methodik .....	30
2.1. Studiendesign.....	30
2.2. Methodik .....	31

2.2.1.	Klinische Daten.....	31
2.2.2.	Transiente Elastographie.....	31
2.2.3.	Bioelektrische Impedanzanalyse .....	32
2.2.4.	Blutentnahme.....	32
2.2.5.	Molekulargenetische Untersuchung .....	34
2.2.6.	Oxidativer Stress .....	38
2.3.	Statistische Auswertung .....	41
3.	Ergebnisse .....	42
3.1.	Korrelation in den klinischen Charakteristika der PatientInnen .....	47
3.2.	Aufteilung der Genotypfrequenzen in unserer Kohorte .....	52
3.3.	Hardy-Weinberg-Equilibrium .....	55
3.4.	Ähnliches metabolisches Profil in den drei <i>MTARC1</i> -Genotypvarianten.....	56
3.5.	Kein signifikanter Unterschied der Lebersteifigkeit und Leberverfettung zwischen den <i>MTARC1</i> -Genotypvarianten .....	56
3.6.	Kein signifikanter Unterschied zwischen den <i>MTARC1</i> -Genotypvarianten bezüglich der Leberparameter, des metabolischen Profils und der Gesamtentzündung .....	58
3.7.	<i>MTARC1</i> p.A165T-Variante ist mit erhöhtem antioxidativem Niveau assoziiert.....	60
3.8.	Kein signifikanter Unterschied in der Leberfunktion bezüglich der weiteren 6 untersuchten Gene .....	62
3.8.1.	Analyse von <i>HSD17B13</i> rs72613567:TA.....	62
3.8.2.	Analyse von <i>PSD3</i> p.L186T.....	64
3.8.3.	Analyse von <i>MBOAT7</i> p.G17E .....	66
3.8.4.	Analyse von <i>PNPLA3</i> p.I148M .....	68
3.8.5.	Analyse von <i>TM6SF2</i> p.E167K.....	70
3.8.6.	Analyse von <i>SERPINA1 PIZ</i> p.E342K.....	72
3.9.	Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse.....	73
4.	Diskussion.....	74
4.1.	MASLD, Leberfibrose und DMII.....	74
4.2.	Die Leberverfettung als Teil des metabolischen Syndroms .....	75
4.3.	Die Rolle der Genetik .....	76
4.3.1.	<i>MTARC1</i> p.A165T-Variante als protektiver genetischer Faktor?.....	76
4.3.2.	<i>HSD17B13</i> rs72613567:TA als protektiver genetischer Faktor? .....	78

4.3.3.	<i>PSD3</i> p.L186T als protektiver genetischer Faktor? .....	78
4.3.4.	Genetische Risikofaktoren: <i>TM6SF2</i> p.E167K, <i>MBOAT7</i> p.G17E und <i>PNPLA3</i> p.I148M und deren Effekt auf die Entwicklung einer Leberverfettung und -fibrose? .....	79
4.4.	Oxidativer Stress und <i>MTARC1</i> p.A165T-Variante .....	80
4.5.	Klinischer Ausblick.....	80
4.6.	Vorteile der Studie .....	81
4.7.	Limitationen der Studie.....	81
	Literaturverzeichnis .....	83
	Danksagung .....	93
	Lebenslauf.....	94

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Photographie des FibroScan® .....	22
<b>Abbildung 2.</b> Plot der allelischen Diskriminierung am Beispiel der Genotypisierung der Proben und der Kontrollgruppen des SNPs im <i>MTARC1</i> -Gen. ....	37
<b>Abbildung 3.</b> PatientInnenrekrutierung. ....	42
<b>Abbildung 4.</b> Darstellung der Lebersteifigkeit (LSM) und -verfettung (CAP) in unserer Gesamtkohorte.....	46
<b>Abbildung 5.</b> Signifikante Korrelation zwischen Taillenumfang und BMI und HDL. ....	47
<b>Abbildung 6.</b> Nicht-signifikante Korrelation zwischen LSM und BMI. ....	47
<b>Abbildung 7A-H.</b> Signifikante Korrelation zwischen CAP und BMI, Taillenumfang, HbA1c, Triglyzeriden, Cholesterin, LDL, Bilirubin und AP. ....	49
<b>Abbildung 8A-D.</b> Signifikante Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und Bilirubin, AP, GGT sowie Taillenumfang. ....	50
<b>Abbildung 9A-B.</b> Signifikante Korrelation zwischen HbA1c und Cholesterin sowie Triglyzeriden.....	51
<b>Abbildung 10A-D.</b> Genotype, deren Variante ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Lebererkrankung ist: <i>MBOAT7</i> , <i>PNPLA3</i> , <i>SERPINA1</i> <i>PIZ</i> , <i>TM6SF2</i> . ....	53
<b>Abbildung 11A-C.</b> Genotype, deren Variante ein protektiver Faktor vor der Entwicklung einer Lebererkrankung ist: <i>HSD17B13</i> , <i>MTARC1</i> , <i>PSD3</i> .....	54
<b>Abbildung 12.</b> Vergleich der Leberverfettung und -steifigkeit zwischen den drei <i>MTARC1</i> -Genotypgruppen.....	57
<b>Abbildung 13A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei <i>MTARC1</i> -Genotypgruppen. ....	59
<b>Abbildung 13B.</b> Vergleich des metabolischen Profils zwischen den drei <i>MTARC1</i> -Genotypgruppen.....	59
<b>Abbildung 14.</b> TrxR2-Spiegel bei Wildtyp-, heterozygoten und mutierten PatientInnen. ....	61
<b>Abbildung 15.</b> SOD2- und UCP2-Spiegel bei mutierten, heterozygoten und Wildtyp-PatientInnen. ....	61
<b>Abbildung 16A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für <i>HSD17B13</i> rs72613567:TA. ....	63
<b>Abbildung 16B.</b> Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für <i>HSD17B13</i> rs72613567:TA. ....	63
<b>Abbildung 17.</b> Vergleich von GOT, Triglyzeriden und Lebersteifigkeit zwischen den Wildtyp- und heterozygoten sowie mutierten PatientInnen für <i>HSD17B13</i> rs72613567:TA.....	64

<b>Abbildung 18A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für <i>PSD3</i> p.L186T.....	65
<b>Abbildung 18B.</b> Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für <i>PSD3</i> p.L186T. ....	65
<b>Abbildung 19.</b> Vergleich von GPT zwischen den Wildtyp- und heterozygoten sowie mutierten PatientInnen für <i>PSD3</i> p.L186T.....	66
<b>Abbildung 20A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für <i>MBOAT7</i> p.G17E.....	67
<b>Abbildung 20B.</b> Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für <i>MBOAT7</i> p.G17E.....	67
<b>Abbildung 21.</b> Darstellung der Lebersteifigkeit bei Nicht-TrägerInnen und TrägerInnen eines oder zwei Allele der <i>MBOAT7</i> p.G17E-Variante. ....	68
<b>Abbildung 22A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für <i>PNPLA3</i> p.I148M.....	69
<b>Abbildung 22B.</b> Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für <i>PNPLA3</i> p.I148M.....	69
<b>Abbildung 23A.</b> Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für <i>TM6SF2</i> p.E167K.....	71
<b>Abbildung 23B.</b> Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für <i>TM6SF2</i> p.E167K.....	71

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Klinisch-chemische Parameter mit den jeweiligen Einheiten. ....	33
<b>Tabelle 2.</b> Auflistung der Gene, SNPs, Assay IDs und Allelen mit Farbstoff.....	35
<b>Tabelle 3.</b> Klinische Charakteristika der Kohorte. ....	44
<b>Tabelle 4.</b> Lebersteifigkeit (LSM) und -verfettung (CAP) in der Kohorte. ....	46
<b>Tabelle 5.</b> Ergebnisse des Hardy-Weinberg-Equilibriums. ....	55
<b>Tabelle 6.</b> <i>MTARC1</i> -Variante p.A165T ist nicht mit Leberverfettung assoziiert.....	57
<b>Tabelle 7.</b> <i>MTARC1</i> -Variante p.A165T ist nicht mit Leberzirrhose assoziiert. ....	58
<b>Tabelle 8.</b> Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse.....	73

# Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Ad	Adenin
ADP	Adenosinbiphosphat
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index, Körpermasseindex
C	Cytosin
Ca	Kalzium
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cm	Zentimeter
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	Controlled attenuation parameter, Leberverfettung
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
CVD	cardio-vascular disease, kardiovaskuläre Erkrankung
dl	Deziliter
DMII	Diabetes mellitus Typ II
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
g	Gramm
G	Glycin
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLUT2	Glukosetransporter 2
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gu	Guanin
HbA1c	Glykosyliertes Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	High-Density-Lipoprotein
<i>HSD17B13</i>	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 13

H <sub>2</sub> O	Wasser
I	Isoleucin
INR	International normalised ratio
IQR	Interquartile range
K	Lysin
IRE1α	Inositol-benötigenden Enzym1α
kg	Kilogramm
L	Leucin
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPO	Lipidperoxidation
LSM	Liver stiffness measurement, Lebersteifigkeit
m	Meter
mg	Milligramm
M	Methionin
MASH	Metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis
MASLD	Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung
<i>MBOAT7</i>	Membrane-bound O-acyltransferase 7
MDA	Malondialdehyd
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
<i>MTARC1</i>	Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1
M-Sonde	Medium-Sonde
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (Steatose hepatis)
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PCR	Real-time polymerase chain reaction, Echtzeit- Polymerasenkettenreaktion
<i>PNPLA3</i>	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
<i>PSD3</i>	Pleckstrin And Sec7 Domain Containing 3
qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction, Echtzeit- Polymerasenkettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reactive oxygen species
<i>SERPINA1 PIZ</i>	Serine protease inhibitor, clade A member 1
SLD	Steatotische Lebererkrankung
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOD2	Superoxide dismutase 2
T	Threonin
Th	Thymin
TAA	Total antioxidant activity
<i>TM6SF2</i>	Transmembrane 6 superfamily member 2
TrxR2	Thioredoxin reductase 2
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2
UKS	Universitätsklinikums des Saarlandes
USA	United States of America, Vereinigte Staaten
XL-Sonde	Extra-Large-Sonde
µl	Mikroliter

## Summary

**Background:** Type II diabetes (DMII) and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) are common in developed countries. The prevalence of MASLD in the general adult population is approximately 30%. DMII doubles the risk of developing MASLD. While exogenous risk factors play the central role in the MASLD pathogenesis, genetic variants are also known to modulate the development or progression of liver steatosis and fibrosis. Notably, recent studies have identified the *MTARC1* p.A165T variant as a protective factor against the development and progression of MASLD.

**Aim:** This study aims to analyze the *MTARC1* p.A165T polymorphism as a potential genetic modulator of MASLD in a non-invasively phenotyped cohort of patients with DMII. Additionally, we examine six MASLD-linked polymorphisms: *MBOAT7* p.G17E, *PNPLA3* p.I148M, *SERPINA1* p.E342K and *TM6SF2* p.E167K, *HSD17B13* rs72613567:TA and *PSD3* p.L186T, as well as the serum metabolic status and markers of oxidative stress in our patients.

**Methods:** Between December 2021 and March 2023, we prospectively enrolled 124 adults with DMII. Liver steatosis and fibrosis were assessed using controlled attenuation parameter (CAP) and liver stiffness measurements (LSM), respectively. MASLD-associated genetic variants were genotyped using TaqMan assays. Serum markers of oxidative stress were measured in a total of 15 carriers of the wild-type, 15 heterozygous and 10 homozygous carriers of the *MTARC1* polymorphism using ELISA (for UCP2, SOD2, TrxR2) and colorimetric tests (for the total antioxidant capacity – TAA, and the lipidperoxidation).

**Results:** The median LSM in the entire cohort was 6.6 kPa (range: 2 - 75 kPa), and the median CAP was 294 dB/m (range: 100 - 400 dB/m). MASLD was found in 65 (52.4%) of our patients, and liver fibrosis (defined by the LSM above 8 kPa) was identified in 47 (37.9%) patients. LSM values above 15 kPa, suggestive of liver cirrhosis, were detected in 18 (14.5%) patients. We found significant correlations between CAP and body mass index (BMI) ( $p < 0.01$ ), as well as between CAP and glycosylated hemoglobin (HbA1c) ( $p = 0.02$ ), triglycerides ( $p = 0.01$ ), low-density cholesterol ( $p = 0.01$ ), and total cholesterol ( $p = 0.01$ ). Additionally, significant correlations were identified between LSM and serum bilirubin ( $p = 0.01$ ), alkaline phosphatase (AP) ( $p < 0.01$ ) and glutamate glutamyl transferase (GGT) ( $p < 0.01$ ). Although the *MTARC1* p.A165T variant did not significantly affect either CAP or LSM levels, carriers of the protective genotype had maximum steatosis and fibrosis lower by 11% and 71%, respectively, compared to the carriers of the common allele. Notably, we identified a significantly higher concentration of TrxR2 ( $p = 0.01$ ), reflecting improved antioxidant capacities in carriers of the *MTARC1* p.A165T variant. In further genotype-related analyses, we detected higher levels of bilirubin and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) in carriers of the *TM6SF2* minor allele (both

$p = 0.03$ ). The *MBOAT7* p.G17E and *PSD3* p.L186T polymorphisms modulated the GGT ( $p = 0.02$ ) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) ( $p = 0.01$ ) levels, respectively.

**Conclusion:** The prevalence of MASLD and liver fibrosis in our patients was similar to the prevalence found in other cohorts. Although we detected several associations between the studied genetic variants and serum liver function tests, none of these polymorphisms significantly modulated liver steatosis or fibrosis. These negative results might be due to the relatively small number of patients in our prospectively recruited cohort. Differences in the serum marker of oxidative stress between carriers of the *MTARC1* genotypes underscore the protective role of this polymorphism in chronic liver diseases.

# Zusammenfassung

**Hintergrund:** Diabetes mellitus Typ II (DM II) und die metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (MASLD), sind häufige, chronische Erkrankungen in den entwickelten Ländern. Die Prävalenz der MASLD in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung liegt bei etwa 30%. DMII verdoppelt das Risiko, an MASLD zu erkranken. Während exogene Risikofaktoren die zentrale Rolle in der Pathogenese der MASLD spielen, sind auch genetische Faktoren bekannt, die die Entwicklung und den Verlauf der Lebersteatose und Leberfibrose modulieren. Rezente Studien haben die *MTARC1* p.A165T-Variante als Schutzfaktor gegen die Entwicklung und das Fortschreiten von MASLD identifiziert.

**Ziel:** Diese Studie zielt darauf ab, den *MTARC1* p.A165T-Polymorphismus als potenziellen genetischen Modulator von MASLD in einer nicht-invasiv phänotypisierten Kohorte von Patienten mit DMII zu identifizieren. Zusätzlich untersuchen wir sechs MASLD-assoziierte Polymorphismen: *MBOAT7* p.G17E, *PNPLA3* p.I148M, *SERPINA1* p.E342K und *TM6SF2* p.E167K, *HSD17B13* rs72613567:TA und *PSD3* p.L186T, sowie serologische Leberfunktionsuntersuchungen, das metabolische Profil und serologische Marker des oxidativen Stresses unserer PatientInnen.

**Methoden:** Zwischen Dezember 2021 und März 2023 haben wir 124 Erwachsene mit DMII prospektivisch aus unseren gastroenterologischen Ambulanzen und Stationen rekrutiert. Der Leberstatus unserer PatientInnen wurde mittels nicht-invasiver transientser Elastographie erhoben: Leberverfettung (CAP) und Lebersteifigkeit (LSM). Die laborchemischen Untersuchungen umfassten die Leberparameter und das metabolische Profil. Die Polymorphismen der MASLD-assoziierten Gene wurden mittels TaqMan-Assays genotypisiert. Die serologischen Marker des oxidativen Stresses wurden bei insgesamt 15 Wildtyp-, 15 heterozygoten und 10 homozygoten TrägerInnen des *MTARC1*-Polymorphismus mittels ELISA (für UCP2, SOD2, TrxR2) und kolorimetrischen Tests (für die gesamte antioxidative Kapazität – TAA und die Lipidperoxidation) gemessen.

**Ergebnisse:** Die mediane LSM in der gesamten Kohorte betrug 6,6 kPa (Bereich: 2 - 75 kPa), und die mediane CAP betrug 294 dB/m (Bereich: 100 - 400 dB/m). Eine MASLD wurde bei 65 (52,4%) unserer PatientInnen und eine Leberfibrose (definiert durch einen LSM über 8 kPa) wurde bei 47 (37,9%) PatientInnen identifiziert. LSM-Werte von über 15 kPa, und somit der hochgradige Verdacht auf eine Leberzirrhose, wurden bei 18 (14,5%) PatientInnen festgestellt. Es wurden signifikante Korrelationen zwischen CAP und Körpermasseindex (body mass index, BMI) ( $p < 0,01$ ) sowie zwischen CAP und glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c) ( $p = 0,02$ ), Triglyzeriden ( $p = 0,01$ ), Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin ( $p = 0,01$ ) und Gesamtcholesterin ( $p = 0,01$ ) nachgewiesen. Zusätzlich wurden signifikante Korrelationen

zwischen LSM und Serum-Bilirubin ( $p = 0,01$ ), der alkalischen Phosphatase (AP) ( $p < 0,01$ ) und der Glutamat-Glutamyl-Transferase (GGT) ( $p < 0,01$ ) identifiziert. Die *MTARC1* p.A165T-Variante beeinflusste weder CAP noch LSM signifikant. Homozygote TrägerInnen der *MTARC1* p.A165T-Variante präsentierten um 11% und 71% niedrigere Maximalwerte von CAP und LSM im Vergleich zu den Wildtyp-PatientInnen (jedoch  $p > 0,05$ ). Bemerkenswerterweise identifizierten wir bei TrägerInnen der *MTARC1* p.A165T-Variante eine signifikant höhere Konzentration von TrxR2 ( $p = 0,01$ ), was auf verbesserte antioxidative Kapazitäten hinweist. In den weiteren genotypbezogenen Analysen detektierten wir höhere Bilirubin- und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)-Werte bei TrägerInnen der *TM6SF2* p.E167K-Variante (beide  $p = 0,03$ ). Die *MBOAT7* p.G17E- und *PSD3* p.L186T-Polymorphismen beeinflussten die GGT- ( $p = 0,02$ ) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)-Werte ( $p = 0,01$ ).

**Schlussfolgerung:** Die in unserer Kohorte identifizierte Prävalenz von MASLD und Leberfibrose entsprach der in weiteren Kohorten beschriebenen Prävalenz. Obwohl wir mehrere Assoziationen zwischen den untersuchten genetischen Varianten und serologischen Leberfunktionsuntersuchungen feststellten, modulierte keiner dieser Polymorphismen signifikant die Lebersteatose oder -fibrose. Diese negativen Ergebnisse könnten auf die relativ geringe Anzahl von PatientInnen in unserer prospektiv rekrutierten Kohorte zurückzuführen sein. Die beschriebenen Unterschiede im Serum-Marker für oxidativen Stress zwischen homozygoten TrägerInnen der *MTARC1* p.A165T-Variante unterstreichen die Schutzfunktion dieses Polymorphismus bei chronischen Lebererkrankungen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Leber

### 1.1.1. Anatomie

Die Leber ist ein keilförmiges, weiches Organ, das sich im rechten Oberbauch unter dem Zwerchfell befindet. Das Organ wiegt zwischen 1400 und 1800 Gramm (g). Makroskopisch werden ein rechter und ein linker Leberlappen unterschieden, diese werden in acht weitere Segmente unterteilt. Die Arteria hepatica versorgt die Leber mit sauerstoffreichem Blut, damit die Hepatozyten, die Zellen aus denen die Leber zu einem großen Teil gebildet wird, versorgt werden. Die Vena portae liefert nährstoff- und schadstoffreiches, aus der Verdauung stammendes, Blut.

Die Leber besteht aus verschiedenen Zellen aus unterschiedlicher embryologischer Herkunft. Diese Zellen besitzen einzigartige Funktionen, die zusammen dazu beitragen, dass die Leber ihre multiplen Rollen erfüllen kann.

### 1.1.2. Funktionen der Leber

Die Leber stellt ein Schlüsselorgan im systemischen Stoffwechsel dar und erfüllt eine Vielzahl an Aufgaben<sup>1</sup>. Die Leber ist vor allem für den Glukose- und Fetthaushalt zuständig. Das durch die Vena portae und die Arteria hepatica gelieferte Blut und dessen Nähr- und Giftstoffe werden je nach Bedarf sofort verwendet, gespeichert, umgewandelt oder abgebaut. Diese Prozesse können durch unterschiedliche Mechanismen gestört werden: (chronische und akute) Infektionen, autoimmune Erkrankungen, genetische Prädispositionen oder, bei fehlender Identifikation einer Ursache, idiopathisch.

Im nüchternen Zustand befindet sich die Leber in einem Aufnahmemodus: der Glukagonspiegel ist hoch und der Insulinspiegel niedrig. Zur Nährstoffaufnahme sind eine Erhöhung des Insulinspiegels und fallende Glukagonspiegel notwendig. Glukagon ermöglicht die Glukogenese, die Neoglukogenese, die Fettoxidation sowie den Metabolismus weiterer Nährstoffe in den Hepatozyten<sup>1</sup>.

Im nicht-nüchternen Zustand hingegen findet das Gegenteil statt. Hierdurch sind katabolische Prozesse in der Leber gefördert: das Insulin hemmt die Neoglukogenese und fördert die Glykogen- und Lipidsynthese in den Hepatozyten<sup>1</sup>.

Darüber hinaus ist die Leber an der Synthese von Gerinnungsfaktoren sowie verschiedener Enzyme (wie zum Beispiel des Cytochroms P450, das eine wichtige Rolle im Medikamentenstoffwechsel spielt) beteiligt.

Außerdem ist die Leber ein wichtiges Entgiftungsorgan: das giftige Ammoniak wird hier zum ungiftigen Harnstoff umgewandelt. Auch Alkohol wird durch die Leber abgebaut: Alkohol wird einerseits durch die Alkoholdehydrogenase und die Aldehyddehydrogenase zu Essigsäure abgebaut und andererseits zu Fett umgewandelt. Als Letztes kann die Bildung von Galleflüssigkeit genannt werden. Diese ist für die Verdauung von Fetten notwendig<sup>1</sup>.

### 1.1.3. Die „Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung“ (MASLD)

Die nicht durch Alkohol bedingte Lebersteatose ist die Hauptmanifestation des metabolischen Syndroms<sup>2</sup>. Die Verfettung der Leber entsteht bei diesem Krankheitsbild hauptsächlich durch ein Ungleichgewicht zwischen Bildung (die erhöht ist) und Gebrauch (der sich erniedrigt gestaltet) von Triglyzeriden und Kohlenhydraten. Die Hypertriglyzeridämie ist ebenfalls ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II (DMII) sowie für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD). DMII verdoppelt das Risiko, an MASLD zu erkranken<sup>345</sup>. Triglyzeride sind der größte Energiespeicher des Körpers und werden bei Bedarf von deren Hauptspeicherorgan (dem Fettgewebe) zu Stellen mit hohem Stoffwechselbedarf, insbesondere Skelettmuskel, Leber und Herz, transportiert.

Im Gegensatz zu durch den Konsum von Alkohol bedingten Lebererkrankungen standen bisher die „nicht-alkoholische Fettlebererkrankung“ (NAFLD) und deren Komplikation die „nicht-alkoholische Steatohepatitis“ (NASH). Im Jahr 2023 wurde bezüglich der NAFLD eine neue Nomenklatur etabliert und weltweit angenommen: die „steatotischen Lebererkrankungen“ (SLD)<sup>6</sup>. Die Erfüllung eines der kardiometabolischen Risikofaktoren klassifiziert die SLD als MASLD. Als kardiometabolische Risikofaktoren gelten ein Körpermasseindex (body mass index, BMI) von größer oder gleich 30 Kilogramm/Quadratmeter (kg/m<sup>2</sup>), das metabolische Syndrom, ein gestörter Glukosemetabolismus bis hin zum DMII, die arterielle Hypertonie sowie erhöhte Triglyzeride- oder erniedrigte HDL-Cholesterin-Spiegel. Bei fehlenden kardiometabolischen Risikofaktoren und ohne andere Gründe für eine Steatose (zum Beispiel Alkohol, medikamentös-toxisch oder

monogenetische Erkrankungen) wird die Lebersteatose als kryptogen bezeichnet<sup>6</sup>. Ein daraufhin von Song et al. publizierter Leserbrief schlussfolgerte, dass der Unterschied zwischen MASLD und NAFLD sehr gering sei und somit, dass die bisherigen Ergebnisse älterer NAFLD-Studien auch nach der neuen MASLD-Definition gültig seien<sup>7</sup>. He et al. brachten fernerhin in ihrer im Februar 2024 publizierten Studie hervor, dass die Identifikation der PatientInnen mit einem höheren Risiko für die Entwicklung eines DMII durch die neue Nomenklatur vereinfacht werden könnte<sup>8</sup>.

Die MASLD gehört mittlerweile zu den häufigsten Ursachen für chronische Lebererkrankungen in den westlichen Ländern<sup>9</sup>. Die Inzidenz nimmt stets zu. Die Prävalenz der MASLD liegt in der Allgemeinbevölkerung in den entwickelten Ländern bei etwa 30%<sup>10</sup>, bei Menschen mit DMII liegt diese bei 55,5%<sup>11</sup>, oder sogar manchen Studien bei 70%<sup>3</sup>. Voraussichtlich soll diese bis 2030 die häufigste Indikation zur Lebertransplantation werden<sup>12,13,14</sup>. Die MASLD wird immer mehr als multisystemische Erkrankung, die sowohl extrahepatische Organe wie auch regulatorische Pfade betrifft, gesehen<sup>15,16</sup>.

Die entzündliche Komplikation der MASLD, die sich oft parallel zu DMII entwickelt<sup>17,4</sup>, ist die „Metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis“ (MASH)<sup>18,19,20</sup>. Die MASH ist ebenfalls multifaktoriell bedingt und kann nur durch eine histopathologische Untersuchung diagnostiziert werden. Vor allem fortbestehende Stressfaktoren, wie zum Beispiel oben erwähnte Faktoren oder ein erhöhter oxidativer Stress, führen zur MASH<sup>21,22</sup>. Unbehandelt schreitet die MASH fort und kann zu einer Leberfibrose und -zirrhose, sowie zu deren schwersten Komplikation, dem hepatozellulären Karzinom (HCC), führen<sup>21,23,24</sup>.

#### 1.1.4. Die Pathogenese der Lebersteatose bis hin zur Steatohepatitis

Wie bereits im Kapitel 1.1.3. erwähnt, entsteht die Verfettung der Leber durch ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Gebrauch von Triglyzeriden und Kohlenhydraten. Fernerhin gehört zum Pathomechanismus der Lebersteatose die Akkumulation von freien Fettsäuren. Dieser Mechanismus findet hauptsächlich postprandial statt und erklärt sich durch eine in der Leber stattfindende *de novo* Lipogenese und durch eine von der Insulinresistenz begünstigte Störung der Lipolyse in den Adipozyten. Die hepatische Insulinresistenz ist durch eine beeinträchtigte Fähigkeit des Insulins, die Glukoseabgabe der Leber zu regulieren und somit den Glukosespiegel im Blut zu regulieren und zu verringern, gekennzeichnet. Der stimulierende Effekt von Insulin auf die Lipogenese bleibt jedoch erhalten<sup>25</sup>.

Der Progress der Lebersteatose ist multifaktoriell bedingt. Nach aktuellem Wissensstand kommt es durch inflammatorische Prozesse zu aufgeblähten Hepatozyten und

im längerfristigen Verlauf zu fibrotischen Veränderungen des Lebergewebes. Hierdurch werden die hepatozellulären Funktionen beeinträchtigt<sup>26</sup>. Fernerhin wird die Speicherfunktion der Leber beeinträchtigt. Daraus resultiert, dass eine Mehrheit der PatientInnen mit einer MASLD eine Insulinresistenz präsentieren<sup>27</sup>.

In den entwickelten Ländern beobachten wir eine sogenannte „Überernährung“. Mit ihr entwickelt sich die bereits erwähnte hepatische Insulinresistenz, die wiederum eng mit der Entwicklung von DMII und einer MASLD verbunden ist. Beide Erkrankungen präsentieren gemeinsame Pathomechanismen und sind somit eng miteinander verbunden. DMII gilt als Hauptverursacher von MASLD<sup>28</sup>.

Auch ein hoher Alkoholkonsum oder autoimmune Erkrankungen sind weitere Ursachen für eine chronische, lokale begrenzte und eine systemische Entzündung. Die chronischen Hepatitiden B und C verursachen Entzündungszustände, die vor allem auf die Leber beschränkt bleiben. Bei auf Dauer bestehenden entzündlichen Zuständen schreitet die Lebererkrankung fort und es entwickelt sich die sogenannte Steatohepatitis und im längerfristigen Verlauf eine Leberzirrhose.

Es besteht eine große interindividuelle Variabilität des Risikos einer Entwicklung einer MASLD: bei gleichem kardiometabolischen Risikoprofil ist dieses Risiko bei zwei verschiedenen Personen nicht identisch<sup>29</sup>. Dies könnte einerseits durch exogene Faktoren, wie zum Beispiel das metabolische Syndrom, die Sedentarität und der DMII<sup>30</sup>, und andererseits durch endogene, genetische Risikofaktoren erklärt werden.

### 1.1.5. Der Einfluss von genetischer Prädisposition auf die Entwicklung einer Lebererkrankung oder deren Progress

#### 1.1.5.1. Mit MASLD assoziierte Gene

Ein Gen ist eine kleine Region des Genoms, dessen Transkription durch einen oder mehrere Promoter und distale regulative Elemente reguliert ist<sup>31</sup>. Ein Gen beinhaltet die Information für die Synthese von funktionellen Proteinen oder nicht kodierender Ribonukleinsäure. Genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Fettlebererkrankung sowie deren Schweregrad sind in der Literatur ausgiebig beschrieben. Als Beispiele können membranbound O-acyltransferase 7 (*MBOAT7*) p.G17E<sup>32</sup>, patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) p.I148M<sup>33,34,35,36</sup>, serine protease inhibitor, clade A member 1

(*SERPINA1 PIZ*) p.E342K<sup>37,38</sup> und transmembrane 6 superfamily member 2 (*TM6SF2*) p.E167K<sup>33,39</sup> genannt werden<sup>38,40,41</sup>.

Protektive genetische Faktoren vor der Entwicklung einer Lebererkrankung konnten hingegen, bis auf *HSD17B13* rs72613567:TA<sup>42,43,44</sup> und *PSD3* p.L186T<sup>45</sup>, noch nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Rezente Forschungsarbeiten stellten die Hypothese, dass die mitochondrial amidoxime reducing component 1 (*MTARC1*) p.A165T-Variante protektiv vor der Entwicklung einer MASLD wirkt<sup>46,47</sup>. Eine bereits im Jahr 2020 publizierte Analyse von insgesamt 802456 PatientInnen zeigte, dass die TrägerInnen der *MTARC1* p.A165T-Variante einen gewissen Schutz gegen die Entstehung von MASLD und Leberzirrhose aufweisen<sup>48</sup>.

#### 1.1.5.2. *MTARC1* p.A165T und MASLD

*MTARC1*, kodiert durch das *MTARC1*-Gen, ist ein molybdänhaltiges Enzym, das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Der genaue molekulare Wirkmechanismus der *MTARC1* p.A165T-Variante in der Pathophysiologie der Lebersteatose ist unklar. Eine im Februar 2023 von Lewis et al. publizierte Studie konnte erste Ansätze bezüglich des *MTARC1*-Pathomechanismus liefern<sup>49</sup>. Lewis et al. zeigten, dass genetische Varianten innerhalb des *MTARC1*-Lokus mit Leberenzymen, Leberverfettung, Plasmalipiden und der Körperzusammensetzung assoziiert sind<sup>49</sup>. Diese Assoziationen sind, soweit beurteilbar, auf dieselbe ursächliche Variante zurückzuführen: rs2642438 (p.A165T), sodass ein gemeinsamer Mechanismus/Pathomechanismus vermutet wird. In vitro konnte eine Hemmung von *MTARC1* die Lipidakkumulation verringern und die Triglyzeridsekretion erhöhen<sup>49</sup>. Anfang des Jahres 2024 konnten Wu et al. einen weiteren Einblick in den Pathomechanismus von *MTARC1* bringen: bei der Mutation kommt es nicht zu einer Änderung seiner Aktivität, sondern zu einer Stabilitätsänderung des Proteins<sup>50,51</sup>. Die Aminosäure Alanin an Position 165, die im Falle einer Mutation durch die Aminosäure Threonin ausgetauscht wird, scheint für die Stabilität des Proteins zuständig zu sein. Ähnliche Erklärungen bezüglich des Pathomechanismus wurden von Dutta et al. im Februar 2024 hervorgebracht<sup>50</sup>.

In Kombination mit dem Cytochrom B5 ist *MTARC1* mit Detoxifikationsreaktionen verbunden und wirkt somit zudem antioxidativ. Die hepatische Expression von *MTARC1* scheint durch die Ernährungsweise reguliert zu sein. In einem Mäusemodell wurde durch die Abreicherung von *MTARC2*, einem *MTARC1*-Paralogen, die Bildung von Glycerolipiden in Adipozyten verringert. Diese Mäuse waren vor ernährungsbedingter Fettleibigkeit und den damit verbundenen Stoffwechselstörungen geschützt<sup>49</sup>.

In Zusammenarbeit mit den KollegInnen aus der Polish Academy of Science, (Warschau, Polen) konnte unsere Studiengruppe zeigen, dass die *MTARC1* p.A165T-Variante mit einem verbesserten Redoxstatus in PatientInnen mit autoimmunen Lebererkrankungen assoziiert ist<sup>46</sup>.

### 1.1.6. Die Leberfibrose und -zirrhose

Die Leberfibrose und -zirrhose sind eine Konsequenz von multiplen, bereits oben erwähnten, Erkrankungen. Diese entwickelt sich nach einer langen und unzureichend behandelten Entzündungsperiode. Es kommt zu einem Ersatz des gesunden Leberparenchyms durch fibrotisches Gewebe, bis hin zu regenerativen Knötchen. Diese Veränderungen führen zu einer portalen Hypertension, die selbst Komplikationen mit sich trägt: die portal-hypertensive Gastropathie und Ösophagusvarizen<sup>52</sup>.

Aktuell gibt es keine therapeutischen Maßnahmen, die eine Verzögerung des fortschreitenden Leidens ermöglichen, bis auf die Identifikation und Therapie der Genese des Leberschadens. Die Identifikation von protektiven Faktoren kann eine Rolle in der Entwicklung potenzieller therapeutischer Maßnahmen spielen.

### 1.1.7. Nicht-invasive Diagnostik einer Leberverfettung und -fibrose

Neben der invasiven Diagnostikmöglichkeit einer Leberverfettung, einer Steatohepatitis, einer Leberfibrose und einer Leberzirrhose mittels Leberbiopsie besteht die Möglichkeit der nicht-invasiven Methode der vibrationskontrollierten transienten Elastographie. Die 1999 durch die Firma Echosens patentierte, aus der Lebensmittelindustrie stammende und für die Analyse der Käse reife benutzte Technik der transienten Elastographie (FibroScan<sup>®</sup>) ermöglicht durch einen von einem Ultraschallkopf stammenden Impuls die Bestimmung von Leberverfettung und Lebersteifigkeit (**Abbildung 1**)<sup>53,54</sup>. Hierdurch können HochrisikopatientInnen im klinischen Alltag auf einer schnellen und reproduzierbaren Art und Weise gescreent und dementsprechend in einer Leberambulanz angebunden werden. Dieses Verfahren wird im klinischen Alltag regelmäßig benutzt, sowohl zum Erstassessment des Leberstatus wie auch im Rahmen der Nachsorge.

Die Vorteile des Verfahrens sind, dass es sich um ein nicht-invasives, wenig zeitaufwendiges Verfahren handelt und dass der/die PatientIn keine besondere Vor- oder Nachbereitung braucht. Fernerhin erfasst der FibroScan<sup>®</sup> ein größeres Lebergewebevolumen

als eine gezielte Leberpunktion. Ein nicht zu verachtender Nachteil ist jedoch, dass dieses Verfahren im Anfangsstadium der Leberzirrhose eine geringe Sensitivität aufweist. Die Wahrscheinlichkeit der Identifikation der verschiedenen Fibrosegrade beträgt bei Fibrose Grad  $\geq 1$ ,  $\geq 2$ ,  $\geq 3$  und 4 jeweils 0,78 – 0,97, 0,77 – 0,99, 0,73 – 1,00 und 0,89 – 0,997<sup>55</sup>. Besonders bei fortgeschrittenen Lebererkrankungen liefert dieses Verfahren ein zuverlässiges Ergebnis<sup>55</sup>: bei einer Lebersteifigkeit (liver stiffness measurement, LSM) von über 15 kPa kann man mit einer Sicherheit von fast 100% von einer Leberzirrhose ausgehen<sup>56,57</sup>. Fernerhin hat das Verfahren einen hohen negativen-prädiktiven Wert: bei einem Wert von kleiner als 8 kPa kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 94% bis 100% eine Fibrose ausgeschlossen werden<sup>58</sup>.

In einer Metaanalyse untersuchten Mózes FE et al. die diagnostische Genauigkeit von nicht-invasiven Testmethoden zur Detektion einer fortgeschrittenen Fibrose bei PatientInnen mit MASLD<sup>59</sup>. Eine Leberzirrhose wurde in verschiedenen Arbeiten durch einen LSM von über 12-15 Kilopascal (kPa) definiert<sup>60,61,57</sup>. In den 2021 aktualisierten Leitlinien für die klinische Praxis zur nicht-invasiven Testung zur Beurteilung des Schweregrads und der Prognose von Lebererkrankungen wurde ein höherer Cut-Off-Wert verwendet: bei einem gemessenen LSM-Wert über 15 kPa sollte von einer Leberzirrhose ausgegangen werden. Zwischen 12 und 15 kPa ist eine Leberzirrhose als wahrscheinlich einzustufen und eine weitere Diagnostik und Abklärung sollten in die Wege geleitet werden<sup>56</sup>. Ein LSM-Wert unter 8 kPa lässt eine Fibrose und Zirrhose ausschließen<sup>60,61</sup>. Bei einem LSM-Wert zwischen den zwei oben aufgeführten Werten wird von einer Fibrose gesprochen. Eine weitere Klassifizierung der Fibrose in Grad I, II und III ist nur mittels histologischer Sicherung möglich.

In den deutschen Leitlinien bezüglich der SLD und MASLD gibt es aktuell keine festgelegten Leberverfettung (controlled attenuation parameter, CAP)-Grenzwerte. Anfang des letzten Jahres 2024 wurden von Rinella et al. neue Leitfaden für die klinische Diagnosestellung einer Leberverfettung publiziert<sup>62</sup>. Die Leberverfettung ist durch einen CAP-Wert von größer oder gleich 288 dB/m definiert<sup>62</sup>. Auch bei PatientInnen mit MASLD besteht eine diagnostische Sicherheit bezüglich des FibroScan<sup>®</sup> 63,64,65.

**Abbildung 1.** Photographie des FibroScan®.



## 1.2. Der Diabetes mellitus Typ II

### 1.2.1. Definition und Epidemiologie

Gemäß der Weltgesundheitsorganisation ist der DMII als eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch einen chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel charakterisiert ist, definiert. Hierdurch kommt es im längerfristigen Verlauf zu kardiovaskulären, nephrologischen, neurologischen und ophthalmologischen Komplikationen<sup>66</sup>.

Das Pankreas ist ein im Oberbauch und im Retroperitoneum gelegenes Drüsenorgan, das sowohl eine exokrine wie auch eine endokrine Funktion erfüllt. Es lässt sich anatomisch in Pankreaskopf, -Corpus und -Schwanz unterteilen. Über den Ductus wirsungianus gelangen die durch die Bauchspeicheldrüse produzierten Verdauungsenzyme und Proenzyme in den Verdauungstrakt. Hierbei handelt es sich um die exokrine Funktion des Pankreas. Dieser Teil macht 95 bis 98% des gesamten Gewebevolumens aus. Die endokrine Funktion wird durch die Langerhans-Inseln erfüllt. Die Inselzellen produzieren verschiedene Hormone: die  $\alpha$ -Zellen produzieren Glukagon, die  $\beta$ -Zellen produzieren Insulin, die  $\delta$ -Zellen produzieren Somatostatin, die PP-Zellen produzieren pankreatisches Polypeptid und die  $\epsilon$ -Zellen produzieren Ghrelin.

Die Prävalenz von DMII hat epidemische Ausmaße angenommen und betrifft schätzungsweise über 500 Millionen Menschen weltweit<sup>67</sup>. Darüber hinaus wird erwartet, dass die Prävalenz von DMII weiter ansteigt und allein in den Vereinigten Staaten (USA) bis zum Jahr 2050 fast jeder dritte Mensch betroffen sein wird<sup>68</sup>. Aktuell sind es 9% der Erwachsenen in den USA, die an DMII leiden<sup>69</sup>. Die rapide Zunahme der Inzidenz und der Prävalenz in den letzten Jahrzehnten kann unter anderem durch die Zunahme der Adipositas, der Sedentarität und der Alterung der Bevölkerung erklärt werden<sup>70</sup>.

In einer 2019 publizierten Übersichtsarbeit in der 47 verschiedene Studien verglichen wurden, konnte von Magliano et al. eine seit 2006 in den westlichen Ländern fallende Inzidenz von DMII beobachtet werden. Dies könnte durch die Entwicklung verschiedener Präventionsstrategien erklärt werden. In den Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen könnten sich jedoch andere Tendenzen zeigen, Daten hierzu sind noch ausstehend<sup>71</sup>.

## 1.2.2. Physiologie und Pathophysiologie

Die ordnungsgemäße Funktion der  $\beta$ -Zellen wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert und reguliert. Die  $\beta$ -Zellen produzieren das Insulin als Präproinsulin. Proteine des endoplasmatischen Retikulums ermöglichen durch Konformationsänderungen die Bildung von Proinsulin aus dem Präproinsulin. Das Proinsulin wird dann in den Golgi-Apparat transportiert und in C-Peptid und Insulin gespalten. Nach diesem Reifungsprozess wird das Insulin bis zu seiner Freisetzung gespeichert. Bei steigenden Glukosekonzentrationen im Blut wird Glukose in die  $\beta$ -Zellen über den Glukosetransporter 2 (GLUT2) aufgenommen und der Katabolismus wird aktiviert. Der Glukosekatabolismus erhöht das Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat (ATP/ADP)-Verhältnis. Das Freisetzen des intrazellulär verfügbaren Insulins erfolgt durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentrationen. Dies ist durch die Depolarisierung der Zellmembran ermöglicht, die durch sich in der Plasmamembran befindenden ATP-abhängigen Kaliumkanäle schließen. Diese Reaktion ist ursächlich für eine Depolarisation der Zellmembran und die Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Somit steigt die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ , die durch Fusion der insulinhaltigen Granula mit der Plasmamembran zur Insulinfreisetzung führt.

Weitere intrazelluläre Signalwege spielen eine Rolle in der Insulinsekretion. Hier kann zum Beispiel das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), das den oben beschriebenen Signalweg durch die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unterstützt, genannt werden. Auch das extrazelluläre ATP scheint eine regulatorische Rolle zu spielen. Fernerhin ermöglichen die purinergen P2Y- und P2X-Rezeptoren der Membrane die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung unabhängig von der Glukosekonzentration<sup>70</sup>.

Die Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen bei PatientInnen mit DMII wird auf ein komplexes Geschehen, das verschiedene molekulare Signalwege involviert, zurückgeführt. Adipositas, oft mit chronischer Hyperglykämie und Hyperlipidämie einhergehend, erhöht den oxidativen Stress und führt zu einem chronischen Entzündungszustand der  $\beta$ -Zellen. Hierdurch kommt es durch ein metabolisches Ungleichgewicht zu einem Verlust der Integrität der Zellen und zu ihrem Tod. Fernerhin wird durch die chronisch erhöhten Glukosekonzentrationen die Produktion von Proinsulin und *in fine* von Insulin gesteigert, jedoch kommt es hier zu gehäuftem fehlgefaltetem Insulin und zu erhöhter Produktion von durch oxidative Proteinfaltung vermittelte reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese Reaktionen verändern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, begünstigen proapoptotische Signale und induzieren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel dem Interleukin IL-1, das die Entzündung der Inselzellen fördert<sup>70</sup>.

Die westliche Ernährungsweise führt zu erhöhten serologischen Glukosespiegeln sowie zu erhöhten zirkulierenden Lipoproteinen, die wiederum zu erhöhten ROS-Konzentrationen und gesteigertem Entzündungszustand führen. Hierdurch werden zunehmende fehlerhafte Proteine, unter anderem auch fehlerhaftes Insulin, gebildet. Dieses insgesamt pro-oxidative Umfeld führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion sowie Aktivierung und Produktion von oxidativ-wirkenden Enzymen<sup>70</sup>.

Parallel zur gestörten Insulinsekretion sowie zur Erhöhung des oxidativen Stresses der Zelle kommt die Insulinresistenz ins Spiel. Durch die Insulinresistenz ist die Aufnahme von Glukose in verschiedene Organe, wie zum Beispiel Leber, Muskel und Fettgewebe, beeinträchtigt und führt somit ebenfalls zu einem chronisch erhöhten serologischen Glukosespiegel. Der Insulinrezeptor, der sich an der Zellmembrane befindet, bindet das freigesetzte Insulin. Diese Bindung ermöglicht das Weiterleiten des Signals an den GLUT2, der vom Zellinnenraum an die Zelloberfläche befördert wird und den Eintritt von Glukose in die Zelle ermöglicht. Somit können die zirkulierenden Glukosekonzentrationen reduziert werden. Beim DMII besteht durch die Insulinresistenz ein gesteigerter Insulinbedarf, der jedoch durch die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse nur bedingt oder sogar gar nicht abgedeckt werden kann<sup>70</sup>.

Adipositas gehört zum Hauptrisikofaktor der Entwicklung eines DMII<sup>72</sup>. Hier fördert das Fettgewebe selbst durch verschiedene proinflammatorische Mechanismen die Insulinresistenz, unter anderem durch eine Erhöhung der freien Fettsäuren und eine Dysregulation der Adipokine<sup>70</sup>. Adipokine sind Zytokine, die im Fettgewebe produziert werden<sup>73</sup>.

### 1.2.3. Risikofaktoren

#### 1.2.3.1. Nicht-veränderbare, endogene Faktoren

Zu den nicht-veränderbaren Risikofaktoren gehören die Ethnizität, die familiäre Prädisposition und die genetische Veranlagung. Eine asiatische, afrikanische oder lateinamerikanische Herkunft ist mit einem erhöhten Risiko einer Entwicklung eines DMII, verglichen mit einer weißen amerikanischen Bevölkerung, verbunden<sup>74,75</sup>. Eine klare Erklärung diesbezüglich ist bisher noch nicht identifiziert. Bezüglich der genetischen Prädisposition haben mehrere Studien in den letzten Jahren die komplexe und polygene Natur von DMII gezeigt. Über 400 genetische Varianten sind mit DMII verbunden<sup>76</sup>. Diese genetischen Veränderungen führen durch einen modifizierten Effekt auf die Insulinsekretion zu einem erhöhten Risiko für die

Entwicklung eines DMII<sup>70</sup>. Auch die Epigenetik scheint eine wichtige Rolle zu spielen<sup>77</sup>. Unter Epigenetik versteht man Änderungen der Genfunktionen, die nicht durch eine Änderung in der Sequenz der Desoxyribonukleinsäuren (DNA) charakterisiert sind, sondern durch die Methylierung der DNA, Histon-Modifikationen oder Ribonukleinsäure (RNA)-vermittelte Prozesse.

#### 1.2.3.2. Veränderbare, exogene Faktoren

Zu den veränderbaren Risikofaktoren gehören Adipositas, geringe körperliche Aktivität und unausgewogene Diät<sup>78</sup>. Die Adipositas ist durch einen BMI von größer als oder gleich wie 30 kg/m<sup>2</sup> definiert<sup>79</sup>. Die Adipositas scheint das Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines DMII<sup>72,80</sup> sowie einer MASLD<sup>81,82</sup> zu sein. Die exakten pathophysiologischen Mechanismen sind noch nicht geklärt. Es wird eine Kombination von Zell-autonomen Mechanismen sowie Zwischen-Organ-Kommunikation vermutet<sup>70</sup>. Bereits 2004 wurde ein Zusammenhang zwischen einer regelmäßigen körperlichen Aktivität und der Entwicklung eines DMII vermutet<sup>83</sup>. Die Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study zeigte in den 1980er Jahren eine Reduktion der Entwicklung von DMII von 34% bei TeilnehmerInnen, die zwei bis drei Stunden in der Woche eine milde körperliche Aktivität (wie zum Beispiel Gehen) betrieben<sup>84</sup>.

### 1.3. Das metabolische Syndrom

Im Laufe der Jahre wurde die Definition des metabolischen Syndroms mehrfach überdacht und aktualisiert. Die 2001 publizierte Definition des National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III ist die weltweit am anerkanntesten Definition. Hiernach müssen drei der fünf folgenden Kriterien erfüllt sein: Taillenumfang über 88 Zentimeter (cm) bei Frauen oder 102 cm bei Männern, mittlerer Blutdruck über 130/85 Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg), nüchterne Triglyzeride-Spiegel über 150 Milligramm/Deciliter (mg/dl), nüchterne high density lipoprotein (HDL) Cholesterin-Spiegel unter 50 mg/dl bei Frauen und 40 mg/dl bei Männern und nüchterne Blutzucker-Spiegel über 100 mg/dl<sup>33</sup>.

Der Unterschied zwischen der oben genannten Definition sowie der der International Diabetes Federation von 2005 und den früheren Definitionen ist, dass die Fettleibigkeit allein als Kriterium gilt und eine gewisse Insulinresistenz nicht mehr notwendig ist. Das Konzept des metabolischen Syndroms ermöglicht die PatientInnen im klinischen Alltag zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines DMII und kardiovaskulärer Erkrankungen präsentieren<sup>33</sup>.

## 1.4. Der oxidative Stress

### 1.4.1. Physiologische Wirkung

Der oxidative Stress ist durch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien in einer Zelle definiert<sup>85</sup>. Dieses Ungleichgewicht ist die Konsequenz einer erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und/oder einer Reduktion der antioxidativen Kapazität. ROS sind chemisch hoch reaktive Moleküle, die als Oxidation/Reduktion-Zwischenprodukte auf dem Weg von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zu Wasser (H<sub>2</sub>O) entstehen. Die Hauptquelle von ROS ist die mitochondriale Respiration<sup>86,87</sup>.

Als Oxidation bezeichnet man eine Reaktion, in der mindestens ein Elektron von einem Reaktionspartner abgegeben wird. Die Reduktion hingegen bezeichnet eine Reaktion, in der der Reaktionspartner ein oder mehrere Elektrone aufnimmt. Dadurch sind die Produkte dieser Reaktionen (Oxidation oder Reduktion) nicht mehr chemisch neutral. Stattdessen sind diese chemisch aktiv.

Die Funktion der ROS liegt vor allem in den Signaltransduktionskaskaden, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren (wie zum Beispiel den nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2, der die Expression von intrazellulären antioxidativen Proteinen fördert<sup>88</sup>) aktivieren. ROS sind ebenfalls in der Immunreaktion beteiligt. Hier können ROS phagozytierte Fremdkörper (wie zum Beispiel Viren) zerstören<sup>89</sup>.

### 1.4.2. Pathophysiologische Wirkung

Pathologisch sind ROS, wenn sie in einer erhöhten Konzentration vorhanden sind. Durch die Präsenz von ROS oder durch oxidativ veränderte Moleküle entstehen Proteinschäden. Geschädigte Proteine können ihre physiologische Funktion verlieren, zu einer veränderten (erhöhten oder erniedrigten) Proteinexpression oder zu einer Aggregatbildung führen. Diese Prozesse sind ebenfalls in der Leber nachweisbar. Durch eine Erhöhung der ROS-Konzentrationen kommt es zu funktionellen und strukturellen Veränderungen. Somit besteht eine Verbindung zwischen einem erhöhten oxidativen Stress und einer MASLD<sup>90,91</sup>.

### 1.4.3. Oxidativer Stress und Diabetes mellitus Typ II

Die Hyperglykämie, vor allem die chronische Hyperglykämie, wie sie bei DMII vorhanden ist, erhöht die serologischen Marker der chronischen Inflammation und trägt zu erhöhten serologischen Spiegeln von ROS bei<sup>92,93</sup>.

Ein erhöhter oxidativer Stress und eine Inflammation führen zu einer Insulinresistenz und zu einer dysregulierten Insulinsekretion und somit zu einem dysregulierten Glukosemetabolismus<sup>94</sup>. Eine adäquate Therapie der Hyperglykämie und die Inhibition einer Überproduktion von ROS sind also entscheidend für eine Verzögerung des Auftretens des DMII. In chronischen hyperglykämischen Situationen, wie bei DMII, akkumulieren ROS und führen zu unspezifischen Schäden von DNA, Proteinen und weiteren Molekülen in verschiedenen Endorganen<sup>93</sup>.

In der Framingham Offspring Study konnte eine positive Assoziation zwischen der Insulinresistenz, des oxidativen Stresses und des DMII gezeigt werden<sup>95</sup>. Die Produktion von ROS ist durch antioxidative Systeme und Enzyme (unter anderem superoxide dismutase 2 – SOD2, thioredoxin reductase 2 – TrxR2, und mitochondrial uncoupling protein 2 – UCP2) ausgeglichen<sup>96</sup>. Fernerhin kann die intrazelluläre gesamte antioxidative Aktivität (total antioxidant activity, TAA) gemessen werden. Eine weitere Methode, den oxidativen Stress in einer Zelle zu bestimmen, ist die Lipidperoxidation: hierbei handelt es sich eine oxidative Reaktion, bei der die Zellmembrane, Enzyme oder Proteine auf irreversibler Art und Weise geschädigt werden.

Der oxidative Stress ist somit nicht nur ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von ROS, sondern auch eine Dysfunktion der Enzyme, die ROS produzieren.

## 1.5. Zielsetzung

Basierend auf den in der Einleitung aufgeführten Punkten, werden in unserer Studie folgende Ziele angestrebt:

- Die Analyse der *MTARC1* p.A165T-Variante als potenzieller protektiver Faktor vor der Entwicklung einer MASLD in einer Kohorte von PatientInnen mit DMII. Rezente Studien haben gezeigt, dass die *MTARC1* p.A165T-Variante eine potenzielle protektive Rolle vor der Entwicklung einer MASLD spielen könnte<sup>46,48</sup>.
- Die Analyse der exogenen Faktoren, wie Adipositas und Sedentarität, als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Lebererkrankung wie der MASLD<sup>97</sup> und der endogenen genetischen Faktoren *MBOAT7* p.G17E<sup>32</sup>, *PNPLA3* p.I148M<sup>33,34,35,36</sup>, *SERPINA1* *PIZ* p.E342K<sup>37</sup> und *TM6SF2* p.E167K<sup>33,39</sup> als Risikofaktoren sowie *HSD17B13* rs72613567:TA<sup>42,43,44</sup> und *PSD3* p.L186T<sup>45</sup> als protektive Faktoren einer Entwicklung einer Lebererkrankung<sup>38,40,41</sup> in einer Kohorte von PatientInnen mit DMII.
- Die Untersuchung des oxidativen Stresses in den Zellen, durch die Messung der Serum-Spiegel der antioxidativ wirkenden Enzyme SOD2 und TrxR2, des antioxidativ wirkenden Proteins UCP2, der Lipidperoxidation durch Kontakt unserer Proben mit Malondialdehyd und der Messung der gesamten antioxidativen Aktivität.

## 2. Patienten und Methodik

### 2.1. Studiendesign

Nach positivem Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Kennnummer: 185/21) wurden zwischen Dezember 2021 und März 2023 PatientInnen aus den hepatologischen und diabetologischen Ambulanzen sowie den gastroenterologischen Stationen des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) in Homburg prospektiv in unsere Studie eingeschlossen. Die Studie wurde gemäß den ethischen Grundsätzen durchgeführt, die ihren Ursprung in der Deklaration von Helsinki haben<sup>98</sup>. Alle TeilnehmerInnen der Studie erhielten die Informationen zur Studie schriftlich und stimmten der Teilnahme sowie der Verwendung ihrer Daten und Probenmaterialien zu Forschungszwecken zu. Die Rekrutierung der PatientInnen erfolgte ausschließlich durch die Autorin dieser Dissertation.

Als Einschlusskriterien galten das Vorhandensein eines DMII sowie eine Volljährigkeit. Die Präsenz einer anderen Lebererkrankung als die MASLD, eine aktive Tumorerkrankung, ein dekompensierter Zustand einer Leberzirrhose, ein Zustand nach Leber- oder anderer Organtransplantation und eine Schwangerschaft galten jeweils als Ausschlusskriterium. Die Ethnizität der PatientInnen galt nicht als Ein- oder Ausschlusskriterium.

Nach mündlicher Aufklärung der PatientInnen über das Ziel der Studie erfolgte die schriftliche Einwilligung über die zu erhebenden Daten: klinisch-chemische Laborparameter, molekulargenetische Untersuchungen (*MTARC1* p.A165T, *HSD17B13* rs72613567:TA, *MBOAT7* p.G17E, *PNPLA3* p.I148M, *PSD3* p.L186T, *SERPINA1 PIZ* p.E342K und *TM6SF2* p.E167K), Messung des oxidativen Stresses der Zellen sowie Durchführung einer Messung der Körperzusammensetzung (Bioimpedanzanalyse, BIA-Messung) und einer transienten Elastographie (FibroScan<sup>®</sup>) zur Bestimmung der Leberverfettung und der Lebersteifigkeit.

Aufgrund vorrangiger Studienergebnisse stellen wir die Hypothese, dass die Identifizierung der genetischen Variante *MTARC1* rs2642438 p.A165T potenzielle protektive Eigenschaften mit sich bringt und somit vor der Entwicklung von chronischen und fortschreitenden Lebererkrankungen bei PatientInnen mit DMII vorbeugt.

## 2.2. Methodik

### 2.2.1. Klinische Daten

Es wurde von allen StudienteilnehmerInnen eine Anamnese über Krankheitsbeginn, Krankheitsverlauf, weitere Vorerkrankungen und aktuelle Therapie erhoben.

### 2.2.2. Transiente Elastographie

In der Abteilung der Gastroenterologie des UKS wird mit dem Gerät FibroScan<sup>®</sup> Expert 630 (Echosens AG; Paris, Frankreich) gearbeitet. Ursprünglich wurde diese Technik von der Lebensmittelindustrie entwickelt, um auf einer atraumatischen Art und Weise den Reifungsprozess des Käses zu beurteilen<sup>54,53</sup>.

Bei dieser Methode wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines von einem Ultraschallkopf stammenden Impulses gemessen. Die Ultraschallsonde wird an der rechten mittleren Axillarlinie unter dem Rippenbogen oder zwischen den unteren Rippen, wo sich die Leber lokalisiert, positioniert. Mithilfe dieses Verfahrens kann zwischen normalem Lebergewebe und krankem Bindegewebe (im Sinne einer fibrotisch und zirrhotisch veränderten Leber) unterschieden werden, da diese unterschiedliche Dichten aufweisen: Bindegewebe ist narbig verändert und somit dichter als normales Lebergewebe. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Impulses nimmt mit der Vernarbung des Gewebes zu.

Basierend auf den anatomischen Gegebenheiten, welche die Distanz zwischen Ultraschallsonde und Leberkapsel maßgeblich beeinflussen (zum Beispiel das metabolische Syndrom mit einer Erhöhung des Taillenumfangs), wurde entweder die Medium- (M-Sonde) oder die Extra-Large-Sonde (XL-Sonde) verwendet.

Zum Erhalt eines zuverlässigen Ergebnisses müssen mindestens zehn Messungen am gleichen Punkt durchgeführt werden<sup>55</sup>. Als weiteres Kriterium eines zuverlässigen Ergebnisses gilt das Verhältnis zwischen dem Interquartilbereich und dem Medianwert (interquartile range und median, IQR/Median, %) der LSM<sup>99</sup>. Nach Maßgaben des Herstellers unseres Gerätes sollte dieses Verhältnis bei  $\leq 30$  % bleiben, wenn das mediane Endergebnis der Steifigkeit mehr als 7,1 Kilopascal (kPa) beträgt ([www.echosens.com](http://www.echosens.com)).

### 2.2.3. Bioelektrische Impedanzanalyse

Die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA-Messung) dient zur Messung der Körperzusammensetzung der PatientInnen. Ermittelt werden Fettmasse, Muskelmasse und Wassergehalt.

Während der Analyse wird ein schwacher Wechselstrom mit hoher Frequenzzahl durch den Körper geleitet. Aus dem Widerstand, den der Körper dem Wechselstrom entgegensetzt, werden Messwerte erhalten, mit denen die Körperzusammensetzung errechnet werden kann. Der Körper wird in drei verschiedene Kompartimente unterteilt: die Fettmasse, die Zellmasse und die Masse außerhalb der Zelle. Im dekompenzierten Zustand handelt es sich nicht um eine sinnvolle Untersuchung, da das Gerät keinen Unterschied zwischen intra- und extrazellulärem Wassergehalt machen kann.

In unserer Studie erfolgte eine einzige Messung am Tag der Rekrutierung der PatientInnen. Eine Wiederholung der BIA-Messung kann im klinischen Alltag im Rahmen des Monitorings der PatientInnen sehr hilfreich sein.

### 2.2.4. Blutentnahme

Die Entnahme von peripherem, venösem Blut erfolgte mittels Einmalbutterfly (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Zur Durchführung unserer laborchemischen und genetischen Untersuchungen sammelten wir bei jedem/r unserer PatientIn insgesamt 20 Milliliter (ml) Vollblut.

Zur Durchführung der klinisch-chemischen Analysen wurden Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), die jeweils Citrat, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Lithium-Heparin als gerinnungshemmende Substanzen enthielten, verwendet. Die Analysen erfolgten im Zentrallabor des UKS in Homburg.

Die molekulargenetischen Untersuchungen und die Messung des oxidativen Status erfolgten im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II des UKS in Homburg. Nach der venösen Blutentnahme wurden die hierzu benötigten Serum- und EDTA-Monovetten bei -80°C, beziehungsweise bei -20 °C, gelagert.

In der Tabelle 1 wurden die Parameter der klinisch-chemischen Analysen und deren Einheiten aufgelistet.

**Tabelle 1.** Klinisch-chemische Parameter mit den jeweiligen Einheiten.

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>
Natrium	mmol/l
Kalium	mmol/l
Bilirubin	mg/dl
AP	U/l
GGT	U/l
GPT	U/l
GOT	U/l
Kreatinin	mg/dl
Harnstoff	mg/dl
HbA1c	%
Glukose	mg/dl
CRP	mg/l
Cholesterin	mg/dl
Triglyzeride	mg/dl
LDL	mg/dl
HDL	mg/dl
Lipase	U/l
Albumin	g/l
LDH	U/l
Hämoglobin	g/dl
Leukozyten	1/nl
Thrombozyten	1/nl
INR	-
Quick	%
TSH	Um/l

**Abkürzungen:** AP, alkalische Phosphatase; CRP, C-reaktives Protein; GGT, Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase; HbA1c, glykosyliertes Hämoglobin; HDL, High-Density-Lipoprotein; INR, international normalised ratio; LDH, Laktat-Dehydrogenase; LDL, Low-Density-Lipoprotein; TSH, thyroidea stimulierendes Hormon.

## 2.2.5. Molekulargenetische Untersuchung

Die molekulargenetischen Analysen basierten auf der Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) in den in der **Tabelle 2** aufgelisteten Genen aus PatientInnen-DNA. Die bisher identifizierten humanen SNPs sind unter anderem in der Datenbank Ensembl unter [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) angegeben.

Die Prüfung der Blutproben auf die SNPs erfolgte durch allelische Diskriminierung mithilfe des TaqMan<sup>®</sup> SNP-Genotypisierungssassays (ThermoFisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA). Die bestimmten DNA-Sequenzen wurden mittels Echtzeit-Polymerasenkettreaktion (real-time polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert. Die Echtzeit-PCR, die auch als quantitative PCR oder qPCR bezeichnet wird, ist eine einfache und elegante Methode zur Bestimmung der Menge einer Zielsequenz oder eines Zielgens, das in einer Probe vorhanden ist. Die Detektion erfolgte mithilfe einer fluorogenen Sonde.

### 2.2.5.1. Listung der SNPs

*MBOAT7* p.G17E<sup>32</sup>, *PNPLA3* p.I148M<sup>33,34,35,36</sup>, *SERPINA1 PIZ* p.E342K<sup>37</sup> sowie *TM6SF2* p.E167K<sup>33,39</sup> gelten in der Literatur als genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen und fortschreitenden Lebererkrankung<sup>38,40,41</sup>. *HSD17B13* rs72613567:TA<sup>42,43,44</sup> und *PSD3* p.L186T<sup>45</sup> gelten hingegen als protektive genetische Faktoren<sup>44,45</sup>. In rezenten Studien wurde *MTARC1* p.A165T als möglicher protektiver genetischer Faktor identifiziert<sup>100,46,48,101</sup>.

### 2.2.5.2. DNA-Extraktion

Aus dem gesammelten Vollblut, dessen Gerinnung mit dem Chelatbildner EDTA gehemmt wurde, wurde die DNA mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) isoliert. Dies erfolgte nach dem Spin-Protokoll aus dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini and Blood Mini Handbook (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>) im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II des UKS in Homburg. Alle Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die **Tabelle 2** listet die von Applied Biosystems vorgefertigten TaqMan<sup>®</sup> Assays auf und stellt die Zuordnung der Farbstoffe zu den eingebauten Basen dar.

**Tabelle 2.** Auflistung der Gene, SNPs, Assay IDs und Allelen mit Farbstoff.

Gen	SNP	Assay ID	Allel → Farbstoff	Mutation
<i>HSD17B13</i>	rs72613567	Hs00745562_CE	Th.Th. = Wildtyp → VIC™	rs72613567:
			Th.Ad. = Variante → FAM™	TA
<i>MBOAT7</i>	rs641738	C__8716820_10	C = Wildtyp → VIC™	p.G17E
			Th. = Variante → FAM™	
<i>MTARC1</i>	rs2642438	C__1235772_10	Gu. = Wildtyp → FAM™	p.A165T
			Ad. = Variante → VIC™	
<i>PNPLA3</i>	rs738409	C_____7241_10	C = Wildtyp → VIC™	p.I148M
			Gu. = Variante → FAM™	
<i>PSD3</i>	rs71519934	Hs00472475_CE	GTh. = Wildtyp → VIC™	p.L186T
			Ad.G = Variante → FAM™	
<i>SERPINA1</i> <i>PIZ</i>	rs28929474	C__2985132_20	Ad. = Wildtyp → VIC™	p.E342K
			Gu. = Variante → FAM™	
<i>TM6SF2</i>	rs58542926	C__89463510_10	C = Wildtyp → VIC™	p.E167K
			Th. = Variante → FAM™	

**Abkürzungen:**

Aminosäuren: A, Alanin; E, Glutaminsäure; G, Glycin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; T, Threonin.

Gene: *HSD17B13*: Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 13; *MBOAT7*: Membrane-bound O-acyltransferase 7; *MTARC1*: Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1; *PNPLA3*: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; *PSD3*: Pleckstrin And Sec7 Domain Containing 3; *SERPINA1 PIZ*: Serine protease inhibitor, clade A member 1; SNP, single-nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus; *TM6SF2*: Transmembrane 6 superfamily member 2.

ID: Identifikation.

FAM™ und VIC™: Farbstoffmarkierungen zur Detektion der Allele.

Nukleinbasen: Ad., Adenin; C, Cytosin; Gu., Guanin; Th., Thymin.

### 2.2.5.3. DNA-Amplifikation

Die DNA-Amplifikation erfolgte, wie bereits unter dem Punkt 2.5. erwähnt, durch eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). Durch dieses in der Molekularbiologie häufig verwendete Verfahren wird ein bestimmtes DNA-Fragment in vitro millionenfach vervielfältigt. Ziel dessen ist es, das Fragment weiter zu charakterisieren und zu untersuchen. Die Polymerasekettenreaktion unterteilt sich in drei aufeinanderfolgende Schritte. Zuerst kommt es zur Denaturierung des bestimmten DNA-Doppelstrangs. Dies erfolgt bei 90-95°C. Im zweiten Schritt koppeln sich Oligonukleotid-Primer bei 55-60°C an die jeweilige komplementäre DNA-Sequenz der zwei Einzelstränge. Das zu amplifizierende DNA-Fragment

wird somit eingegrenzt. Die Polymerase kann diesen Oligonukleotid-Primer als Startmolekül benutzen. Im QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) wurde die DNA-Polymerase des Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet. Im dritten und letzten Schritt entstanden so wieder zwei doppelsträngige DNA-Fragmente, die für das nächste Zyklus nun als Matrize benutzt werden konnten.

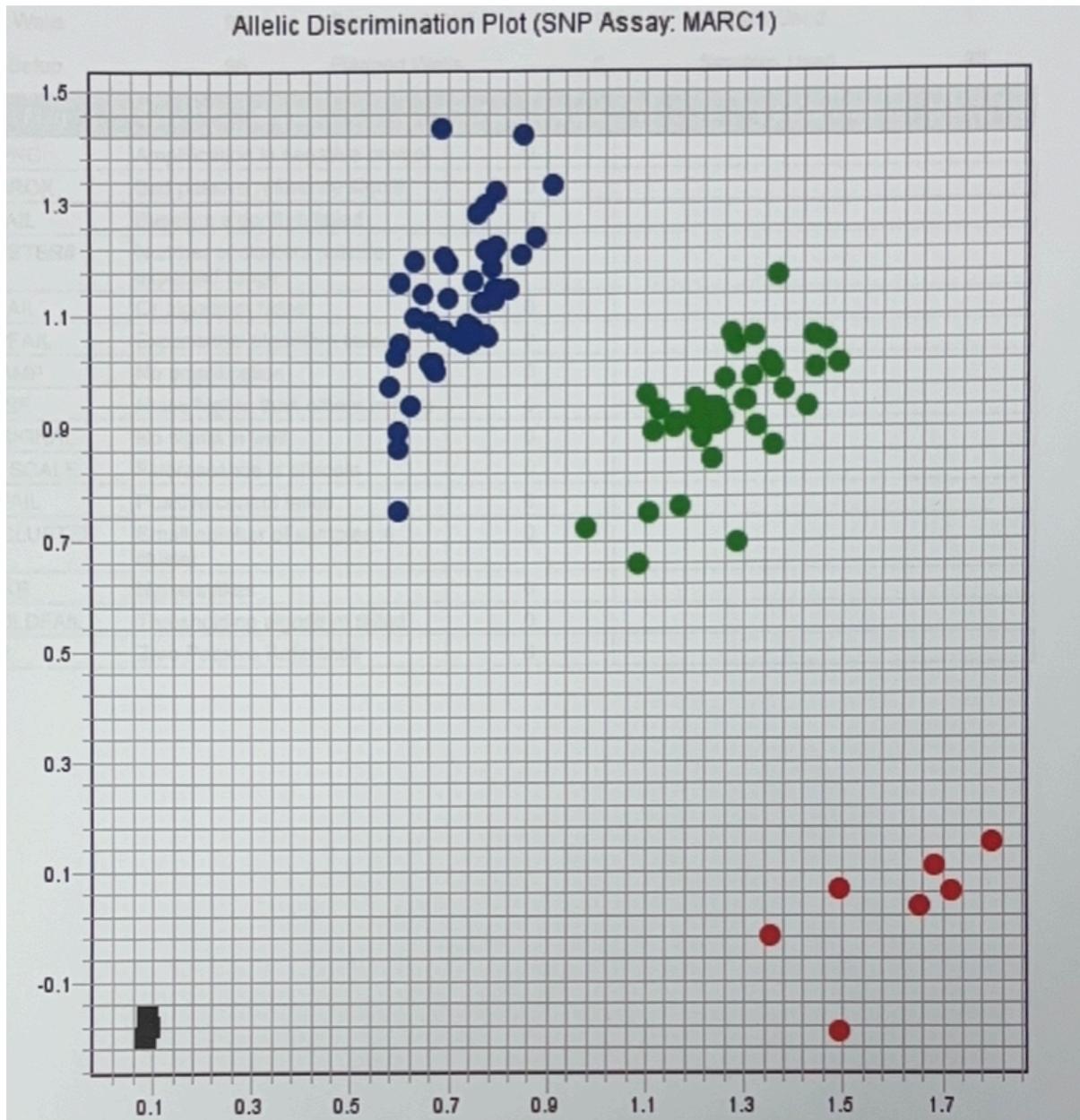
#### 2.2.5.4. Allelische Diskriminierung

Die allelische Diskriminierung erfolgte mithilfe des TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays (ThermoFisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA). Hierbei wird analysiert, ob das Wildtyp- oder das mutierte Allel vorhanden ist und ob es sich um eine(n) homozygote(n) (zwei identische Allele) oder heterozygote(n) (zwei verschiedene Allele) TrägerIn handelt.

#### 2.2.5.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgte über die 7500 FAST 2.0.4. Software von Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA) (**Abbildung 2**).

**Abbildung 2.** Plot der allelischen Diskriminierung am Beispiel der Genotypisierung der Proben und der Kontrollgruppen des SNPs im *MTARC1*-Gen.



**Legende:** Blau zeigt den Wildtyp (FAM<sup>TM</sup>-Farbstoff), Rot die Mutanten (VIC<sup>TM</sup>-Farbstoff) und Grün die heterozygoten Proben.

## 2.2.6. Oxidativer Stress

Zur Bestimmung des oxidativen Status einer Zelle können direkte und indirekte Methoden verwendet werden. Die direkten Messmethoden sind im klinischen Alltag sowohl zeit- als auch kostenintensiv, sodass diese für unsere Studie nicht in Frage kamen. Zur indirekten Bestimmung des oxidativen Stresses gibt es drei unterschiedliche Ansätze.

Zum Ersten kann die Konzentration der ROS bestimmt werden. Diese entstehen unter anderem in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung. Diese chemisch veränderten Moleküle sind hochreaktiv. Eine anhaltende erhöhte ROS-Konzentration kann auf direktem oder indirektem Weg zu einer vermehrten Oxidation und somit einer Schädigung von Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und/oder DNA-Basen führen. Dieser Mechanismus wird als Lipidperoxidation bezeichnet.

Der zweite Ansatz der Messung des oxidativen Stresses besteht in der Bestimmung des Einflusses von antioxidativ wirkenden Substanzen, wie zum Beispiel Vitamin E (Trolox), durch die Bestimmung der gesamten antioxidativen Aktivität (total antioxidant activity, TAA).

Der dritte Ansatz besteht in der Bestimmung von antioxidativ wirkenden Enzymen, unter anderem der superoxide dismutase 2 (SOD2) und der thioredoxin reductase 2 (TrxR2) sowie von antioxidativ wirkenden Proteinen, dem mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2).

In unserer Arbeit quantifizierten wir zur Bestimmung des oxidativen Stresses der Zellen unserer PatientInnen die Lipidperoxidation, die TAA, die Spiegel der Enzyme SOD2 und TrxR2 sowie die Spiegel des Proteins UCP2.

### 2.2.6.1. Lipidperoxidation (LPO)

Zur Durchführung dieses Experimentes wurde das Kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit (Colorimetric) ab118970 (Abcam; Cambridge, Großbritannien) benutzt. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Experiment. Unsere Proben wurden in Kontakt mit Malondialdehyd (MDA) gebracht. Nach Erhalt des finalen Präparats wurde die Absorption bei einer Optischen Dichte von 532 Nanometern (nm) gemessen. Die finale Konzentration ist proportionell zur Absorption, kann aus einer linearen Darstellung abgelesen und aus der unten aufgeführten Formel ausgerechnet werden.

$$\text{MDA Konzentration} = (A/[ml]) * 4 * D = (\text{nmol/ml})$$

**Abkürzungen:** A = Quantität von MDA in der Probe, von der Standard-Kurve abgelesen (nmol), mL = benutztes Plasma-Volumen (20µl = 0,020 mL), 4 = Korrektur (200µl der 800µl Reaction Mix), D = Dilutionsfaktor = 4.

#### 2.2.6.2. Gesamte antioxidative Aktivität (total antioxidant activity, TAA)

Zur Durchführung dieses Experimentes wurde der Total Antioxidant Capacity Assay Kit „ab65329“ (Abcam; Cambridge, Großbritannien) benutzt. Bei diesem Experiment handelt es sich um eine kolorimetrische und quantitative Analyse, bei der die Konzentration von ionisiertem Kupfer ( $\text{Cu}^+$ ), nach Konversion von  $\text{Cu}^{2+}$ , in einer Lösung mittels eines gefärbten Reagenzstoffes bestimmt wird.  $\text{Cu}^+$  wird mit einer kolorimetrischen Probe chelatisiert. Diese weist eine Absorptionsspitze bei 570 nm auf, welche in einer proportionalen Relation zur totalen antioxidativen Kapazität steht. Mithilfe der empfohlenen Standards konnte eine lineare Kurve erhalten werden. Somit konnte die gesamte antioxidative Kapazität unserer Proben aus dieser linearen Kurve abgelesen werden.

Die Lagerung und Rekonstitution der Reagenzstoffe sowie die Experimentdurchführung erfolgte wie in der durch die Firma Abcam mitgelieferten Anleitung beschrieben.

#### 2.2.6.3. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2)

Das Experiment zur Bestimmung der Spiegel des antioxidativ wirkenden Proteins UCP2 beruht auf dem Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, Sandwich-ELISA) Verfahren. Hierzu wurde das Kit Human UCP2 (Mitochondrial uncoupling protein 2) MBS764304 (MyBioSource Inc.; San Diego, California, USA) verwendet. Die im Kit gelieferten Mikrotitrationsplatten sind bereits mit einem spezifischen Antikörper beschichtet. Nach Durchführung der in den jeweiligen Anleitungen aufgelisteten Experimentschritte wird zur Detektion des Proteins ein spezifischer Biotin-konjugierter Antikörper hinzugefügt. Die Messungen der optischen Dichte können innerhalb von 5 Minuten bei einer 450 nm-Wellenlänge durchgeführt werden. Die erhaltene Kurve ergab sich im Experiment als linear.

#### 2.2.6.4. Superoxide dismutase 2 (SOD2) und thioredoxin reductase 2 (TrxR2)

Die Messung der antioxidativ wirkenden Enzyme SOD2 und TrxR2 beruht ebenfalls auf dem Sandwich-ELISA-Verfahren. Hierzu wurden das Kit For Human Superoxide Dismutase [Mn], Mitochondrial (SOD2) ELISA MBS706038 (MyBioSource Inc.; San Diego, California, USA) beziehungsweise das Kit For Thioredoxin Reductase 2 MBS2031994 (MyBioSource Inc.; San

Diego, California, USA) verwendet. Die Vorgehensweise ist analog zu den in Abschnitt 2.2.3.3. beschriebenen Arbeitsschritten.

Für die Bestimmung der SOD2-Konzentrationen wurden während dieses Experimentes ebenfalls Standards benutzt. Hier konnte eine lineare Kurve erhalten werden. Zur Bestimmung der TrxR2-Konzentration hingegen wurde eine Graphik mit einer nicht-linearen Anpassungskurve erstellt. In den beiden Experimenten konnte die Konzentration der jeweiligen Enzyme aus den somit erhaltenen Kurven abgelesen werden.

## 2.3. Statistische Auswertung

Die oben genannten Daten wurden zur Auswertung im Programm Microsoft Excel (Version 16.85) eingepflegt und zur statistischen Auswertung in einer GraphPad Prism-Datei (GraphPad Prism, Version 10.2.3) kodiert: laborchemische Parameter, Ergebnisse des FibroScan® (Lebersteifigkeit und Leberverfettung), Ergebnisse der Bioimpedanz-Analyse, Ergebnisse der genetischen Untersuchungen und Ergebnisse der Messungen des oxidativen Stresses.

Zur Bestimmung des Hardy-Weinberg-Equilibriums wurde die Formel folgender Internetseite verwendet: <https://www.wolframalpha.com/input?i=hardy+weinberg+equilibrium>. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests erfolgte eine Normalitätsprüfung der analysierten Parameter.

Die Genotypisierung ergab drei verschiedene Möglichkeiten: Wildtyp (kein Träger einer Variante), mutiert (Träger von zwei mutierten Allelen eines Gens) oder heterozygot (Träger von einem mutierten Allel und einem nicht-mutierten Allel eines Gens).

In einer ersten Analyse wurden die drei Gruppen untereinander verglichen. Im Falle einer normalen Verteilung der Parameter wurde im Vergleich dreier Gruppen der One-Way-Anova-Test angewandt und bei einer nicht-normalen Verteilung der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

In einem zweiten Schritt wurden zwei Gruppen verglichen: die Wildtyp-PatientInnen wurden mit den TrägerInnen eines mutierten oder zwei mutierter Allele kombiniert verglichen. Im Falle einer normalen Verteilung der Parameter wurde im Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte t-Test angewandt. Bei einer nicht-normalen Verteilung der Parameter wurde im Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney-Test verwendet.

Fernerhin wurde die klinische Korrelation zwischen verschiedenen Parametern untersucht, sowie der Pearson's Chi<sup>2</sup>-Test zur Feststellung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen zwei kategorischen Variablen benutzt.

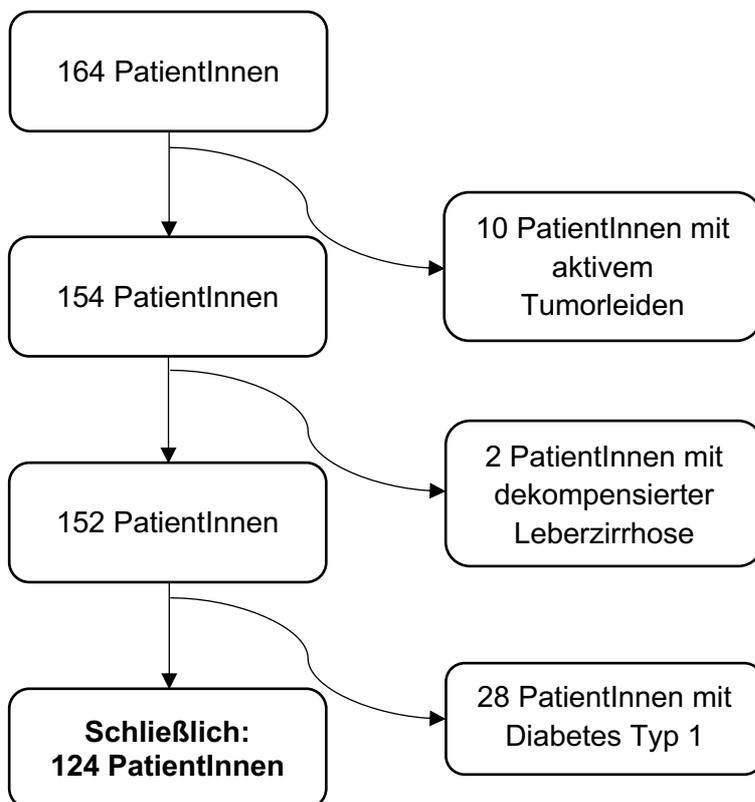
Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die statistische Analyse wurde ausschließlich von der Autorin dieser Dissertation durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Nach positivem Ethikvotum wurden prospektivisch insgesamt 164 PatientInnen rekrutiert. Insgesamt wurden 10 PatientInnen mit aktivem Tumorleiden und 2 PatientInnen mit dekompensierter Leberzirrhose wurden vor Beginn der Analyse ausgeschlossen. Von diesen 152 verbleibenden PatientInnen wurden weitere 28 PatientInnen, die an Diabetes Typ I litten, ausgeschlossen, sodass eine homogene Gruppe von 124 PatientInnen mit DMII entstehen konnte (**Abbildung 3**).

**Abbildung 3.** PatientInnenrekrutierung.



Von den 124 PatientInnen waren 67 Männer und 57 Frauen. Das mediane Alter betrug 69 Jahre (Bereich: 31 - 93) und der mediane BMI betrug 29,3 kg/m<sup>2</sup> (Bereich: 15,3 - 55,7). Der mediane HbA1c-Wert lag bei 7,3% (Bereich: 4,6 - 13,8). Fernerhin wurden die Leberparameter bestimmt: die medianen Werte von Bilirubin, GGT, GOT und GPT zeigten sich im Normbereich in der Gesamtkohorte. Der mediane AP-Wert zeigte sich mit 87 U/l (Bereich: 28 - 374) insgesamt erhöht. Bezüglich des Lipidprofils unserer Kohorte zeigten sich die Medianwerte des Gesamtcholesterins, der Triglyzeride und des LDLs erhöht: 151 (Bereich: 71 - 522), 123 (Bereich: 62 - 3031) und 78 (Bereich: 25 - 221) jeweils. Der mediane HDL-Spiegel unserer PatientInnen zeigte sich bei 46 mg/dl (Bereich: 13 - 95).

Die medianen Werte der Nierenretentionsparameter sowie des Blutbilds zeigten sich im Normbereich: der Kreatinin-Medianwert betrug 1,0 mg/dl (Bereich: 0,5 - 5,1), der Harnstoff-Medianwert 37 mg/dl (Bereich: 10 - 218), der mediane Hämoglobin-Wert 13,4 g/dl (Bereich: 7,8 - 18,7), der mediane Leukozyten-Wert 8,0 /nl (Bereich: 3,5 - 18,5) und der mediane Thrombozyten-Wert 245 /nl (Bereich: 53 - 530). Auch die Medianwerte der Elektrolyte Natrium und Kalium sowie der Lipase und des Albumins zeigten sich im Normbereich: 138 mmol/l (Bereich: 127 – 144), 4,2 mmol/l (Bereich: 3,3 – 5,3), 36 U/l (Bereich: 5 – 280), 41 g/l (Bereich: 22 – 52), jeweils. Als Letztes wurde die Gerinnung bestimmt. Die Medianwerte des INR- und des Quick-Wertes zeigten sich normwertig: 0,96 (Bereich: 0,82 - 2,72) und 109% (Bereich: 23 - 126) jeweils, sodass bei keinem unserer PatientInnen eine ausgeprägte Leberfunktionsstörung identifiziert werden konnte. Diese klinischen Charakteristika der Kohorte sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

**Tabelle 3.** Klinische Charakteristika der Kohorte.

<b>Parameter</b>	
N	124
Männer / Frauen (%)	67 / 57 (54 / 46)
Alter (Jahre)	69 (31 – 93)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,3 (15,3 – 55,7)
HbA1c (%; NGSP)	7,3 (4,6 – 13,8)
Glukose (mg/dl)	162 (67 – 437)
Bilirubin (mg/dl)	0,5 (0,2 – 1,9)
AP (U/l)	87 (28 – 374)
GGT (U/l)	32 (9 – 869)
GOT (U/l)	27 (9 – 322)
GPT (U/l)	25 (5 – 154)
Cholesterin (mg/dl)	151 (71 – 522)
Triglyzeride (mg/dl)	123 (62 – 3031)
LDL (mg/dl)	78 (25 – 221)
HDL (mg/dl)	46 (13 – 95)
Lipase (U/l)	36 (5 – 280)
Albumin (g/l)	41 (22 – 52)
Natrium (mmol/l)	138 (127 – 144)
Kalium (mmol/l)	4,2 (3,3 – 5,3)
INR (-)	0,96 (0,82 – 2,72)
Quick (%)	109 (23 – 126)
Kreatinin (mg/dl)	1,0 (0,5 – 5,1)
Harnstoff (mg/dl)	37 (10 – 218)
Hämoglobin (g/dl)	13,4 (7,8 – 18,7)
Leukozyten (1/nl)	8,0 (3,5 – 18,5)
Thrombozyten (1/nl)	245 (53 – 530)

Die Parameter mit ihrer entsprechenden Einheit sind in Form von Medianwert begleitend vom Bereich (Minimum – Maximum) angegeben.

Fernerhin wurden Lebersteifigkeit und Leberparameter unserer StudienteilnehmerInnen analysiert.

In unserer Kohorte konnte Folgendes beobachtet werden: 123 der 124 (99,1%) rekrutierten PatientInnen präsentierten ein metabolisches Syndrom. Der mediane Wert der LSM betrug in unserer Gesamtkohorte 6,6 kPa (Bereich: 2 - 75). Bei 77 (62,1%) PatientInnen konnte bei einem LSM-Wert von kleiner als 8 kPa eine Leberfibrose ausgeschlossen werden. Bei 18 (14,5%) unserer PatientInnen zeigte sich bei einem LSM-Wert von über 15 kPa der hochgradige Verdacht auf eine Leberzirrhose. Zwischen diesen zwei Werten, in einer sogenannten „Grauen Zone“, befanden sich 29 (23,4 %) unserer PatientInnen. Eine Leberfibrose (inklusive der fortgeschrittenen Leberfibrose und Leberzirrhose, definiert durch einen LSM über 8 kPa) wurde bei 47 (37,9%) PatientInnen identifiziert.

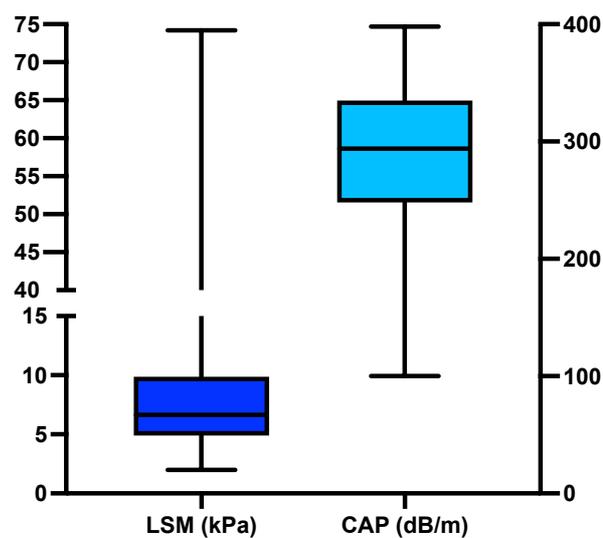
Der mediane Wert der CAP betrug 294 dB/m (Bereich: 100 - 400). Insgesamt lag die Prävalenz der MASLD bei 52,4% (65 unserer PatientInnen). Diese Ergebnisse wurden in **Tabelle 4** sowie in **Abbildung 4** dargestellt.

**Tabelle 4.** Lebersteifigkeit (LSM) und -verfettung (CAP) in der Kohorte.

<b>Parameter der transienten Elastographie</b>	
LSM (kPa)	10,7 (2 – 75)
< 8 kPa <sup>60,61</sup> : Ausschluss Leberfibrose	N = 77
8 - 15 kPa <sup>56</sup> : „Graue Zone“, Fibrose F2-F3	N = 29
> 15 kPa <sup>56</sup> : hochgradiger Verdacht auf Leberzirrhose	N = 18
CAP (dB/m)	288 (100 – 400)
≤ 288 dB/m <sup>62</sup> : keine Leberverfettung	N = 59
> 288 dB/m <sup>62</sup> : Leberverfettung	N = 65

Die Parameter mit ihrer entsprechenden Einheit sind in Form von Mittelwert begleitend vom Bereich (Minimum – Maximum) angegeben.

**Abbildung 4.** Darstellung der Lebersteifigkeit (LSM) und -verfettung (CAP) in unserer Gesamtkohorte.

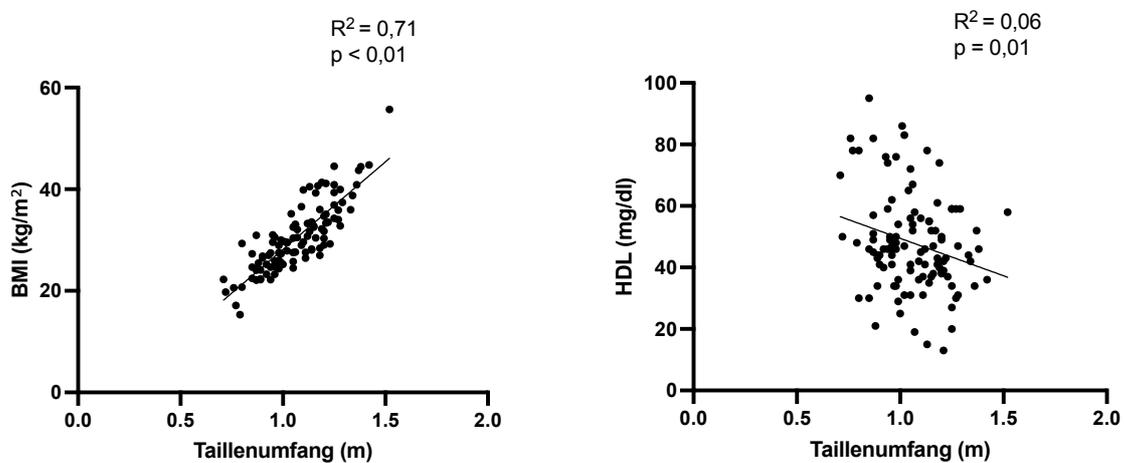


Bis auf den Taillenumfang zeigten sich alle unsere analysierten Parameter nicht normal verteilt, sodass die statistischen Tests entsprechend angewandt wurden.

### 3.1. Korrelation in den klinischen Charakteristika der PatientInnen

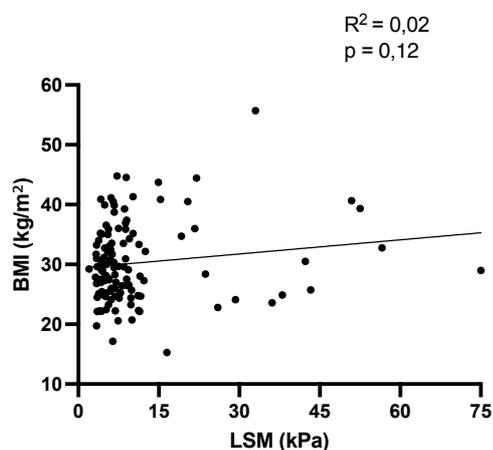
Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen Taillenumfang und BMI ( $p < 0,01$ ) sowie HDL ( $p = 0,01$ ) (**Abbildung 5**) dargestellt werden: bei steigendem Taillenumfang zeigte sich ein signifikant höheres BMI und bei niedrigerem Taillenumfang signifikant höhere HDL-Cholesterin-Spiegel.

**Abbildung 5.** Signifikante Korrelation zwischen Taillenumfang und BMI und HDL.



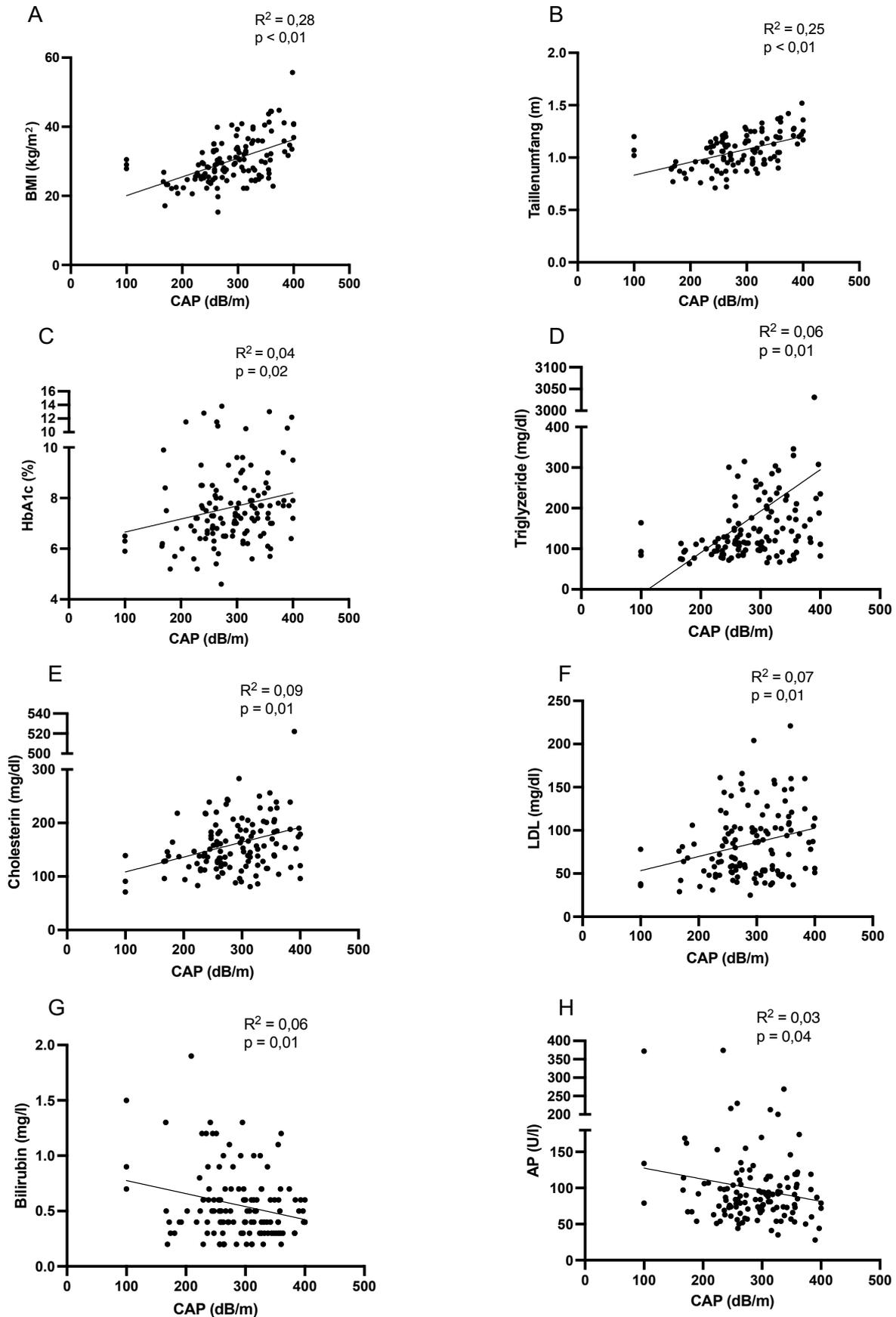
Trotz fehlender Signifikanz konnten wir beobachten, dass sich die Lebersteifigkeit mit dem BMI tendenziell steigend zeigte ( $p = 0,12$ ) (**Abbildung 6**).

**Abbildung 6.** Nicht-signifikante Korrelation zwischen LSM und BMI.



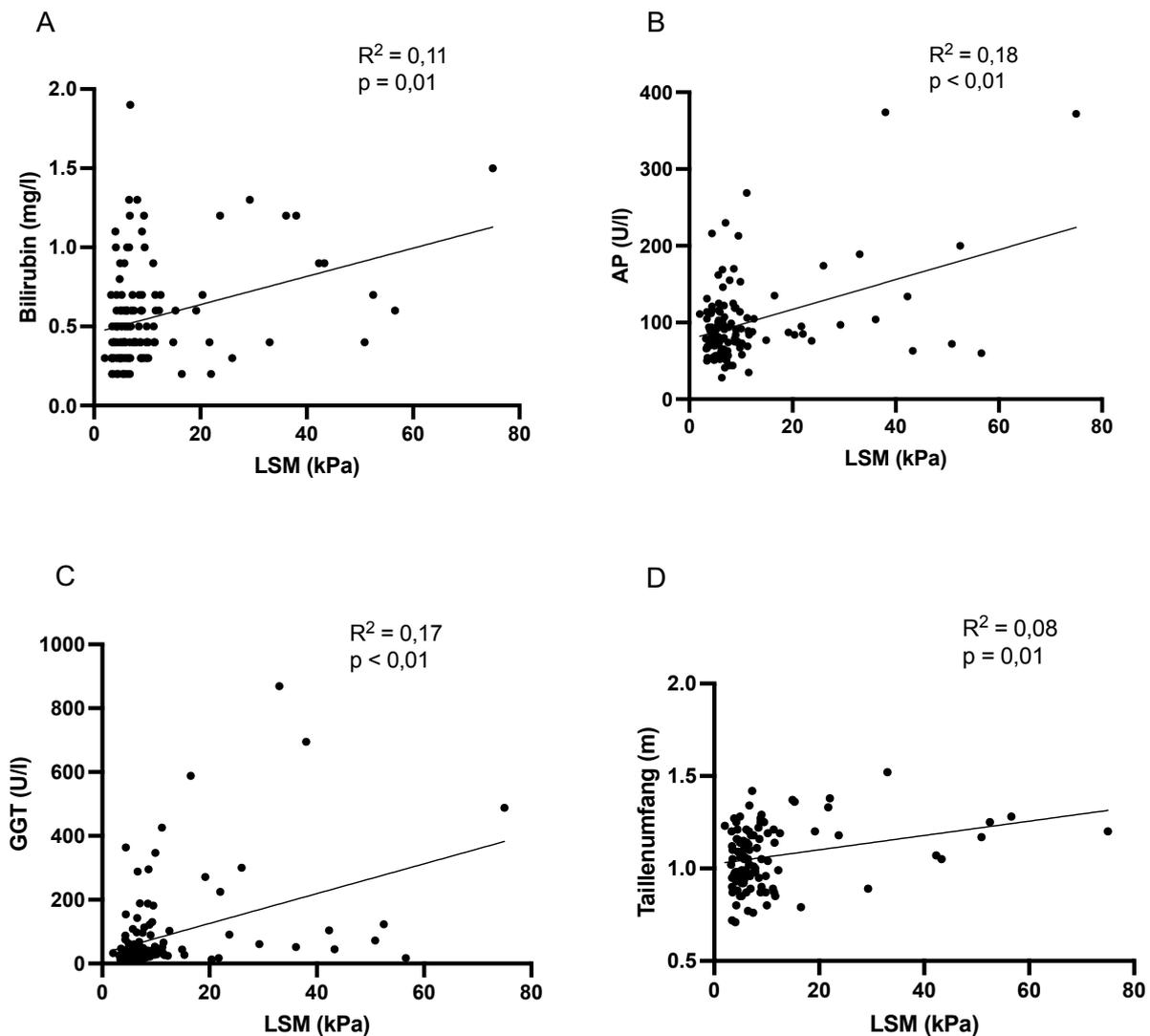
Fernerhin konnte eine signifikante Korrelation zwischen CAP und BMI, Taillenumfang, HbA1c, Triglyzeriden, Cholesterin, LDL, Bilirubin und AP gezeigt werden: eine Zunahme der Leberverfettung korrelierte mit steigenden BMI ( $p < 0,01$ ), Taillenumfang ( $p < 0,01$ ), HbA1c ( $p = 0,02$ ), Triglyzeriden ( $p = 0,01$ ), Gesamt-Cholesterin ( $p = 0,01$ ), LDL-Cholesterin ( $p = 0,01$ ), Bilirubin ( $p = 0,01$ ) und AP ( $p = 0,04$ ) (**Abbildung 7A-H**).

**Abbildung 7A-H.** Signifikante Korrelation zwischen CAP und BMI, Taillenumfang, HbA1c, Triglyzeriden, Cholesterin, LDL, Bilirubin und AP.



Außerdem wurde die klinische Korrelation zwischen der LSM und den Leberparametern sowie dem metabolischen Profil untersucht und in **Abbildung 8A-D** dargestellt. Hier konnte eine signifikante Korrelation zwischen steigender Lebersteifigkeit und steigenden Spiegeln von Bilirubin ( $p = 0,01$ ), AP ( $p < 0,01$ ), GGT ( $p < 0,01$ ) sowie zunehmendem Taillenumfang ( $p = 0,01$ ) identifiziert werden (**Abbildung 8A-D**).

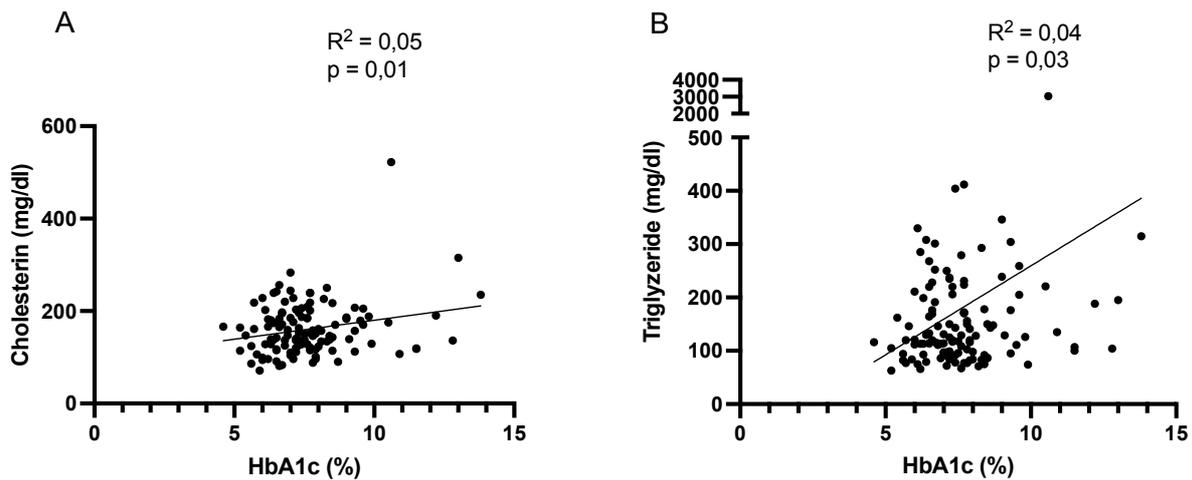
**Abbildung 8A-D.** Signifikante Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und Bilirubin, AP, GGT sowie Taillenumfang.



In diesen Graphen der **Abbildung 8A-D** zeigen sich einige Punkte weit außerhalb der Korrelationslinie. Diese Werte lassen annehmen, dass diese PatientInnen ein akutes Problem hatten. Zum Zeitpunkt der Inklusion in unsere Studie ließ sich jedoch bei fehlenden anamnestischen oder klinischen Verdachtsäußerungen keine hydrope Dekompensation oder Virusreaktivierung annehmen. Die PatientInnen gaben alle Wohlbefinden an.

Zuletzt konnte eine signifikante Korrelation zwischen HbA1c und Cholesterin ( $p = 0,01$ ) sowie Triglyzeriden ( $p = 0,03$ ) festgestellt werden: ein weniger gut eingestellter Blutzucker zeigte derangierte Gesamt-Cholesterin- und Triglyzeride-Spiegel (**Abbildung 9A-B**).

**Abbildung 9A-B.** Signifikante Korrelation zwischen HbA1c und Cholesterin sowie Triglyzeriden.



In beiden Graphen der **Abbildung 9A-B** zeigt sich jeweils ein Punkt, der sich weit außerhalb der Korrelationslinie befindet. In beiden Fällen handelt es sich um den gleichen Patienten, der einen schlecht eingestellten DMII präsentiert (HbA1c 10,6%). Seine Leberwerte zeigten sich jedoch im Normbereich.

## 3.2. Aufteilung der Genotypfrequenzen in unserer Kohorte

Bei unseren 124 rekrutierten PatientInnen erfolgte die Genotypisierung von *HSD17B13* rs72613567:TA, *MBOAT7* p.G17E, *MTARC1* p.A165T, *PNPLA3* p.I148m, *PSD3* p.L186T, *SERPINA1 PIZ* p.E342K und *TM6SF2* p.E167K.

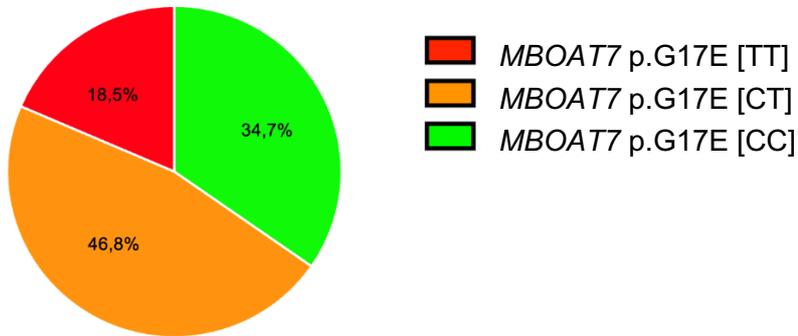
Der Großteil unserer StudienteilnehmerInnen zeigten einen nicht mutierten Status für *PNPLA3* p.I148m, *SERPINA1 PIZ* p.E342K und *TM6SF2* p.E167K: jeweils 56,5%, 97,6% und 82,3%. Lediglich 3,2% der rekrutierten PatientInnen zeigten einen homozygot-mutierten Status für *PNPLA3* p.I148m und 0,8% für *TM6SF2* p.E167K. In der Analyse von *SERPINA1 PIZ* p.E342K zeigte sich kein(e) einzige(r) homozygot-mutierte(r) Patient(in). Bezüglich der *MBOAT7* p.G17E-Analyse zeigten 46,8% der PatientInnen einen heterozygoten Status, 18,5% der PatientInnen waren Träger der Wildtyp-Variante in homozygoter Form und 34,7% wiesen zwei mutierte Allele für *MBOAT7* p.G17E auf.

In der Analyse von *MTARC1* p.A165T konnten 46,8% PatientInnen ohne Nachweis eines mutierten Allels identifiziert werden. Ein mutiertes Allel, und somit ein heterozygoter Status für *MTARC1* p.A165T, konnte in 45,1% unserer PatientInnen nachgewiesen werden. Ein homozygot-mutierter Status für *MTARC1* p.A165T zeigte sich bei 8,1% unserer PatientInnen. Fernerhin zeigten jeweils 53,2% und 50,0% der StudienteilnehmerInnen keine mutierte Variante für jeweils *HSD17B13* rs72613567:TA und *PSD3* p.L186T. Die Präsenz von zwei mutierten Allelen für *HSD17B13* rs72613567:TA und *PSD3* p.L186T wurde in 12,1% und 9,7% der PatientInnen identifiziert. Die restlichen PatientInnen waren TrägerInnen eines mutierten und eines Wildtyp-Allels.

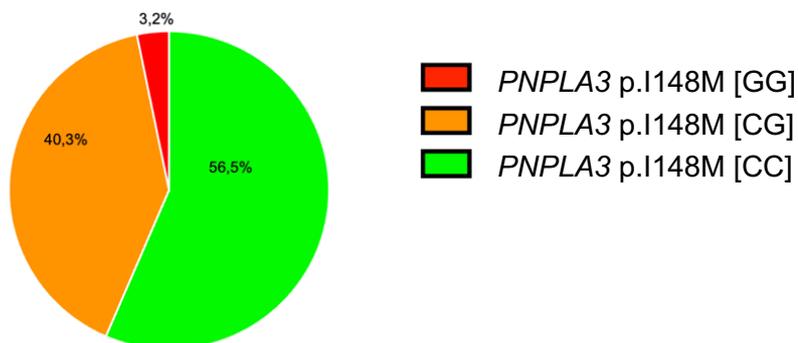
Die Ergebnisse der Analyse der Genotypfrequenzen in unserer Kohorte wurden in **Abbildung 10A-D** für die mit erhöhtem Risiko einer Entwicklung einer Lebererkrankung verbundenen Genen und **Abbildung 11A-C** für die davor schützenden Gene aufgeführt.

**Abbildung 10A-D.** Genotype, deren Variante ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Lebererkrankung ist: *MBOAT7*, *PNPLA3*, *SERPINA1 PIZ*, *TM6SF2*.

A



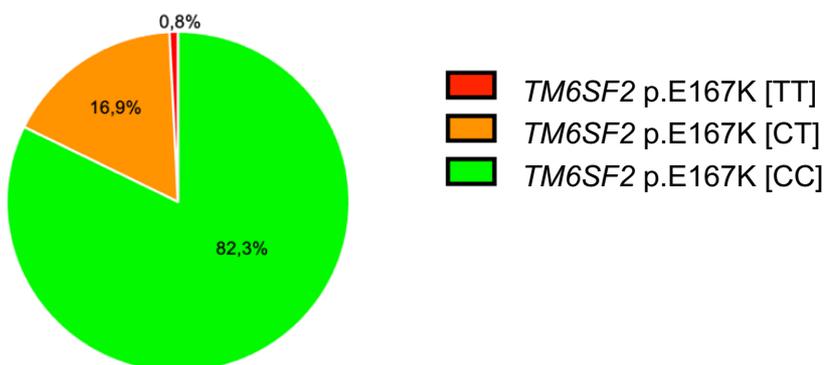
B



C

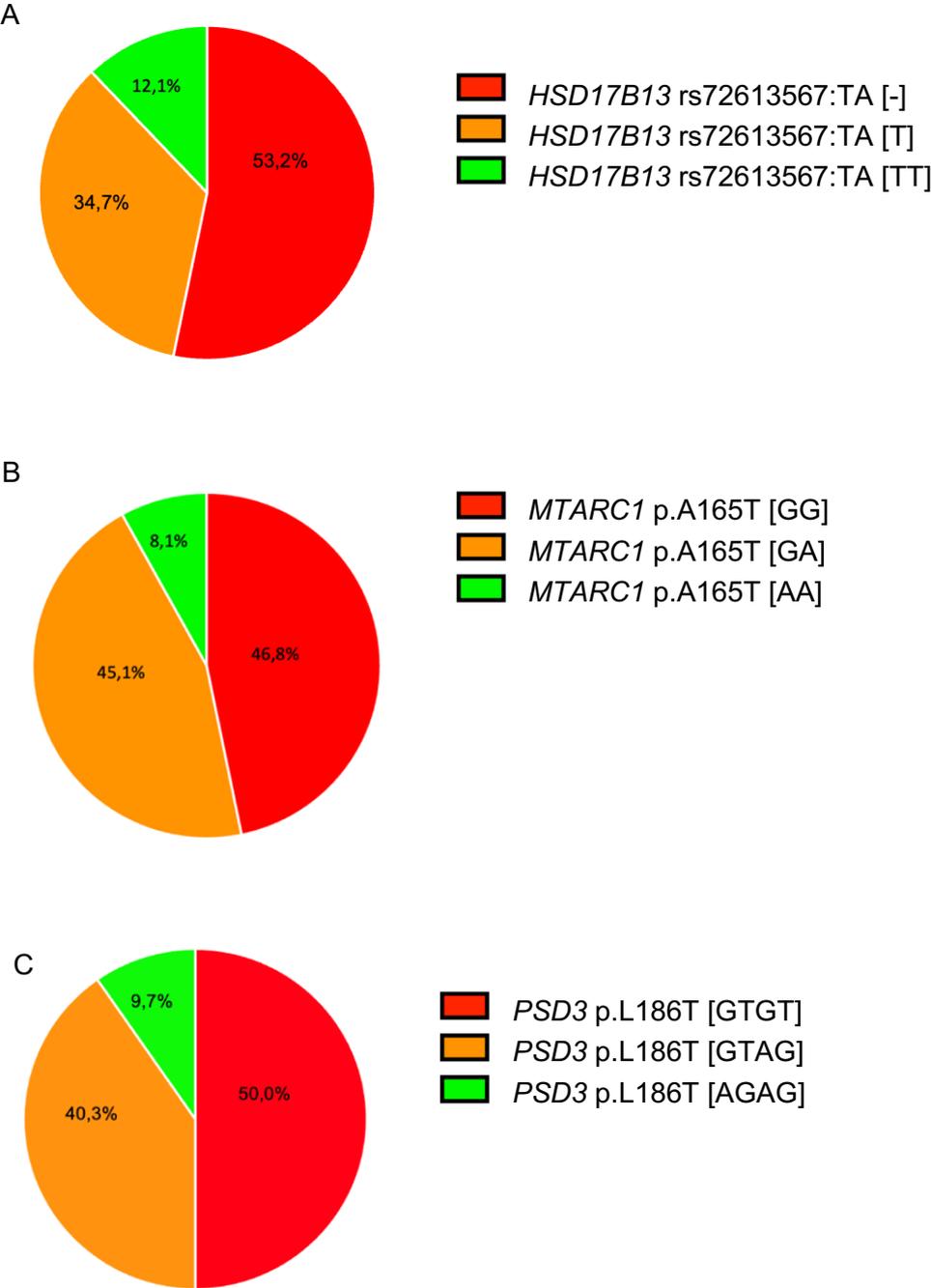


D



**Legende:** Grün für den Wildtyp, Orange für die Heterozygote, Rot für Mutierte.

**Abbildung 11A-C.** Genotype, deren Variante ein protektiver Faktor vor der Entwicklung einer Lebererkrankung ist: *HSD17B13*, *MTARC1*, *PSD3*.



**Legende:** Grün für die Mutierte, Orange für die Heterozygote, Rot für Wildtyp.

### 3.3. Hardy-Weinberg-Equilibrium

Zur Überprüfung der Genotypisierung wurde das Prinzip des Hardy-Weinberg-Equilibriums appliziert. Das Prinzip des Hardy-Weinberg-Equilibriums beruht auf folgende Aussage: Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beobachteten und den erwarteten Genotyp-Häufigkeiten. Bei einem Ergebnis von größer oder gleich 0 ist diese Hypothese zurückgewiesen. Bei negativen Ergebnissen bestätigt sich diese Hypothese und die Häufigkeit der Genotypen weicht nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, sodass die Genotypisierung als erfolgreich durchgeführt kategorisiert werden kann.

In unserem Fall wich die Häufigkeit der Genotypen nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, sodass auf eine erfolgreich durchgeführte Genotypisierung schließen lässt. Unsere Ergebnisse wurden in **Tabelle 5** aufgeführt.

**Tabelle 5.** Ergebnisse des Hardy-Weinberg-Equilibriums.

<b>Gen</b>	<b>SNP</b>	<b>Protein</b>	<b>X</b>
<i>HSD17B13</i>	rs72613567	rs72613567 :TA	-0,46
<i>MBOAT7</i>	rs641738	p.G17E	-3,65
<i>MTARC1</i>	rs2642438	p.A165T	-3,36
<i>PNPLA3</i>	rs738409	p.I148M	-1,90
<i>PSD3</i>	rs71519934	p.L186T	-3,67
<i>SERPINA1 PIZ</i>	rs28929474	p.E342K	-3,82
<i>TM6SF2</i>	rs58542926	p.E167K	-3,84

**Abkürzungen:** Siehe Tabelle 2, X: Ergebnis der Bestimmung des Hardy-Weinberg-Equilibriums.

**Legende:** negative Ergebnisse (X) weisen auf eine fehlende Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und somit auf eine erfolgreiche Genotypisierung.

### 3.4. Ähnliches metabolisches Profil in den drei *MTARC1*-Genotypvarianten

Ein optimal eingestellter Blutzucker (definiert durch einen HbA1c von < 5,7%) zeigte sich bei 8 (6,5%) PatientInnen; 24 (19,4%) der 124 PatientInnen (1 davon in der mutierten Gruppe) präsentierten einen zufriedenstellenden HbA1c von < 6,5%. Der Taillenumfang betrug mehr als 102 cm bei 41 (61,2%) der eingeschlossenen Männer und mehr als 88 cm bei 48 (84,2%) der Frauen, sodass insgesamt 89 (71,2%) PatientInnen einen nach der Definition des metabolischen Syndroms erhöhten Taillenumfang präsentierten. Bezüglich des Lipid-Profiles konnten bei 7 (5,6%) PatientInnen ein erhöhter Cholesterin-Spiegel, bei 44 (35,5%) erhöhte Triglyzeride, bei 16 (12,9%) ein erhöhter LDL-Spiegel und bei 31 (25%) ein erniedrigter HDL-Spiegel identifiziert werden. Bis auf eine(n) einzige(n) Patienten(in) waren alle PatientInnen metabolisch ungesund, und bei diesem(er) Patienten(in) handelte es sich um einen *MTARC1*-Wildtyp-Patienten.

### 3.5. Kein signifikanter Unterschied der Lebersteifigkeit und Leberverfettung zwischen den *MTARC1*-Genotypvarianten

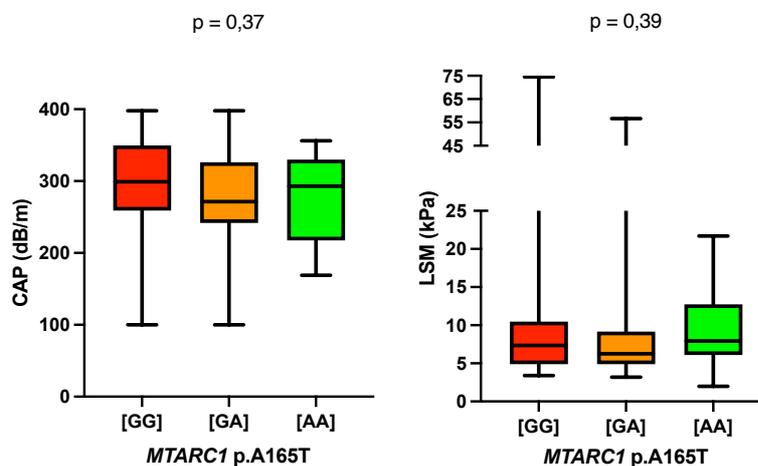
Die durch die transiente Elastographie erhaltenen Parameter wurden zwischen den TrägerInnen von zwei mutierten Allelen für *MTARC1* p.A165T und TrägerInnen von einem oder keinem mutierten Allel für *MTARC1* p.A165T sowie zwischen TrägerInnen von mindestens einem mutierten Allel und Nicht-TrägerInnen verglichen.

Bei den TrägerInnen von mindestens einem mutierten Allel für *MTARC1* p.A165T betrug der mediane LSM-Wert 6,5 kPa (2 – 56,6 kPa). Insgesamt 8 dieser 66 PatientInnen zeigten einen Wert größer oder gleich 15 kPa und somit den hochgradigen Verdacht auf eine Leberzirrhose. Bei den PatientInnen ohne Nachweis eines mutierten Allels für *MTARC1* p.A165T betrug der mediane LSM-Wert 7,4 kPa (3,4 - 75 kPa), 10 der 58 PatientInnen zeigten einen Wert größer oder gleich 15 kPa und somit den hochgradigen Verdacht auf eine Leberzirrhose. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen zeigte sich nicht ( $p > 0,05$ ).

Wir führten die gleiche Analyse für die Leberverfettung durch und verglichen TrägerInnen mindestens eines mutierten Allels für *MTARC1* p.A165T mit Nicht-TrägerInnen. Bei TrägerInnen von mindestens einem mutierten Allel für *MTARC1* p.A165T betrug der

mediane CAP-Wert 280 dB/m (Bereich: 100 - 400 dB/m), 33 der 66 PatientInnen zeigten einen Wert größer als 288 kPa und somit eine Leberverfettung. Bei fehlender Präsenz eines mutierten Allels für *MTARC1* p.A165T betrug der mediane CAP-Wert 299 kPa (Bereich: 100 - 400 dB/m), 31 der 58 PatientInnen zeigten einen Wert größer als 288 dB/m und somit eine Leberverfettung. Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ( $p > 0,05$ ). Das Spektrum der Lebersteifigkeit und der Leberverfettung in der mutierten Gruppe zeigte sich deutlich kleiner als das Spektrum in der Wildtyp- und heterozygoten Gruppe und die maximalen CAP- und LSM-Werte zeigten sich um 11% und 71% niedriger (ohne Signifikanz) (**Abbildung 12**).

**Abbildung 12.** Vergleich der Leberverfettung und -steifigkeit zwischen den drei *MTARC1*-Genotypgruppen.



Auch in der Chi<sup>2</sup>-Analyse konnte weder eine Verbesserung der Leberverfettung noch eine geringere Prävalenz der Leberzirrhose bei PatientInnen mit mutiertem Status für *MTARC1* p.A165T im Vergleich zu den Wildtyp- oder heterozygoten PatientInnen identifiziert werden (**Tabelle 6** und **Tabelle 7**).

**Tabelle 6.** *MTARC1*-Variante p.A165T ist nicht mit Leberverfettung assoziiert.

	<i>MTARC1</i> p.A165T [GG]	<i>MTARC1</i> p.A165T [GA]+[AA]	Total
CAP ≤ 288 dB/m	26	33	59
CAP > 288 dB/m	32	33	65
Total	58	66	124

Chi<sup>2</sup>-Test, p-Wert = 0,59

**Tabelle 7.** *MTARC1*-Variante p.A165T ist nicht mit Leberzirrhose assoziiert.

	<i>MTARC1</i> p.A165T [GG]	<i>MTARC1</i> p.A165T [GA]+[AA]	Total
LSM ≤ 15 kPa	48	58	106
LSM > 15 kPa	10	8	18
Total	58	66	124

Chi<sup>2</sup>-Test, p-Wert = 0,45

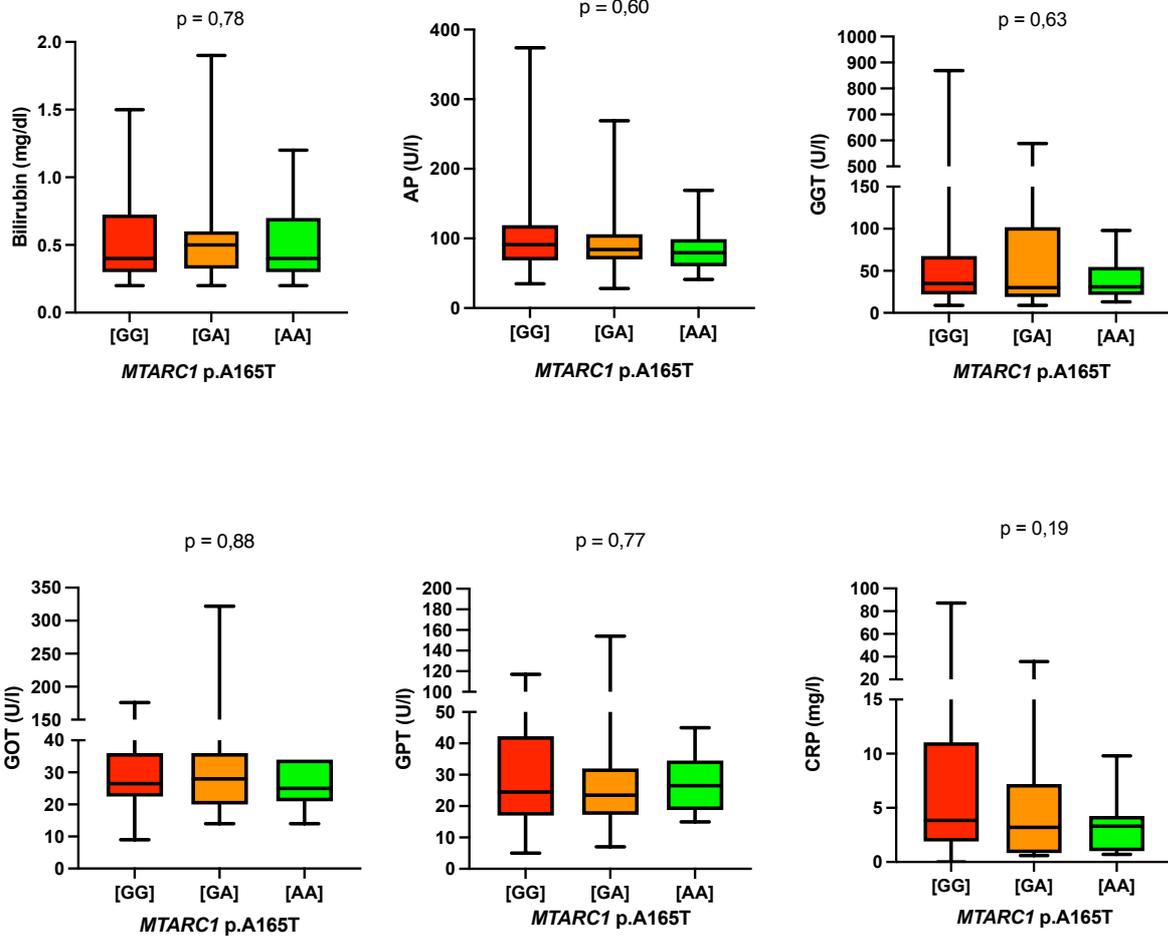
### 3.6. Kein signifikanter Unterschied zwischen den *MTARC1*-Genotypvarianten bezüglich der Leberparameter, des metabolischen Profils und der Gesamtentzündung

In unserer Kohorte zeigten sich auffällige Bilirubinwerte bei 5 (4%) PatientInnen, zwei davon in der Wildtyp-Gruppe und drei davon in der heterozygoten Gruppe. Alle PatientInnen der mutierten Gruppe zeigten normwertige Bilirubinwerte. Erhöhte AP-Werte zeigten sich bei 36 (29%) unserer PatientInnen und erhöhte GGT-Werte bei 52 (41,9%) PatientInnen. In der mutierten Gruppe zeigten sich 2 (20%) unserer PatientInnen mit erhöhten AP-Werten, 3 (30%) mit erhöhten GGT-Werten. Erhöhte GOT- und GPT-Parameter zeigten sich bei jeweils 30 (24,2%) PatientInnen, nur ein(e) Patient(in) erwies einen erhöhten GPT-Wert in der mutierten Gruppe. Insgesamt waren die Transaminasen (sowohl GOT- als auch GPT-Parameter) bei 39 (31,5%) der PatientInnen erhöht.

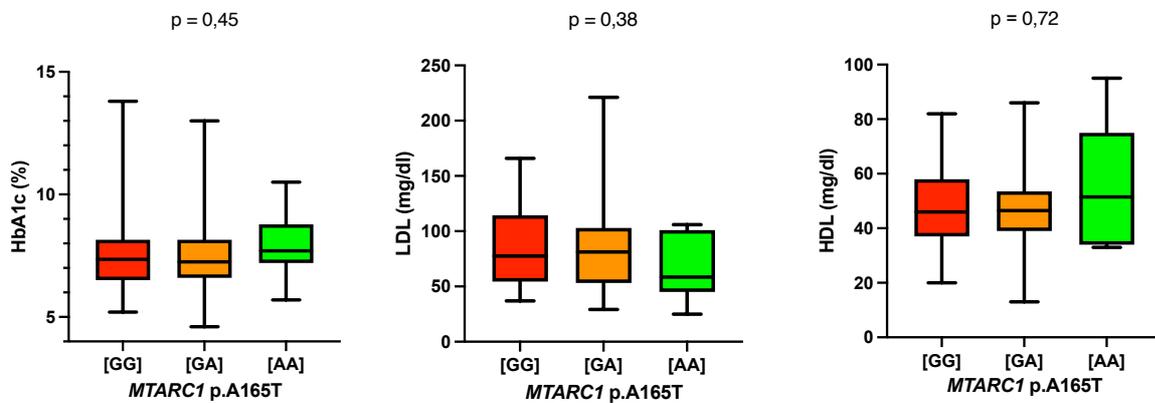
Wir verglichen die Leberparameter (Bilirubin, AP, GGT, GOT, GPT), das metabolische Profil (HbA1c, LDL, HDL, Triglyzeride, Cholesterin), die Gesamtentzündung (CRP-Wert), die Lebersteifigkeit und die Leberverfettung zwischen den drei Genotypgruppen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypgruppen beobachtet werden (alle  $p > 0,05$ ) (**Abbildung 13A-B**).

Es konnte jedoch eine gewisse Tendenz beobachtet werden. In der Gruppe der PatientInnen mit mutiertem Status zeigte sich ein deutlich eingeschränkteres Spektrum und niedrigere Maximalwerte der Leberparameter und des CRP-Wertes im Vergleich zu jenen, die der Wildtyp- oder Heterozygot-Gruppe zugeordnet waren (**Abbildung 13A**), sodass hier die mutierte *MTARC1*-Variante eine gewisse protektive Wirkung darstellen könnte. Interessanterweise konnte auch erkannt werden, dass der höchste GGT-Wert in der Gruppe der mutierten PatientInnen niedriger war als der niedrigste entsprechende Wert in der Wildtyp- und heterozygoten Gruppe (**Abbildung 13A**).

**Abbildung 13A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei *MTARC1*-Genotypgruppen.



**Abbildung 13B.** Vergleich des metabolischen Profils zwischen den drei *MTARC1*-Genotypgruppen.



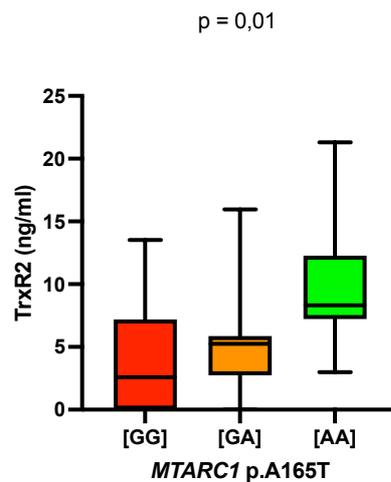
Diese Analysen wurden ebenfalls zwischen Wildtyp- und mutierten PatientInnen sowie zwischen den Wildtyp-PatientInnen und den heterozygoten und mutierten PatientInnen kombiniert durchgeführt. Beide Analysen ergaben untereinander ähnliche Ergebnisse, die auch mit den Ergebnissen der Analyse der drei verschiedenen Gruppen vergleichbar sind. Signifikante Unterschiede wurden nicht identifiziert. Um einen potenziell additiven Effekt der *MTARC1*-Variante p.A165T zu identifizieren, untersuchten wir die laborchemischen und bildgebenden Leberparameter bei PatientInnen, die Träger eines oder zwei Allele von *PNPLA3* p.I148M waren, da es sich hierbei um einen ausgiebig untersuchten, genetischen Risikofaktor für die Entwicklung einer Lebererkrankung handelt. Hier ergaben sich leider weiterhin keine signifikanten Unterschiede, die auf einen protektiven Effekt von *MTARC1*-Variante p.A165T hinweisen könnten.

### 3.7. *MTARC1* p.A165T-Variante ist mit erhöhtem antioxidativem Niveau assoziiert

Basierend auf den 2021 von Janik et al. publizierten Ergebnissen bezüglich des Redox-Status bei einem PatientInnenkollektiv mit Autoimmunhepatitis, erfolgte zum Vergleich die Bestimmung des oxidativen Stresses in unserem PatientInnenkollektiv. Durch Janik et al. konnte eine positive Assoziation zwischen antioxidativem Niveau und der *MTARC1* p.A165T-Variante identifiziert werden<sup>46</sup>.

In unserer Kohorte konnte bei der Messung des TrxR2-Niveaus mittels Sandwich-ELISA-Verfahren eine signifikante Differenz zwischen den drei verschiedenen Gruppen beobachtet werden (**Abbildung 14**).

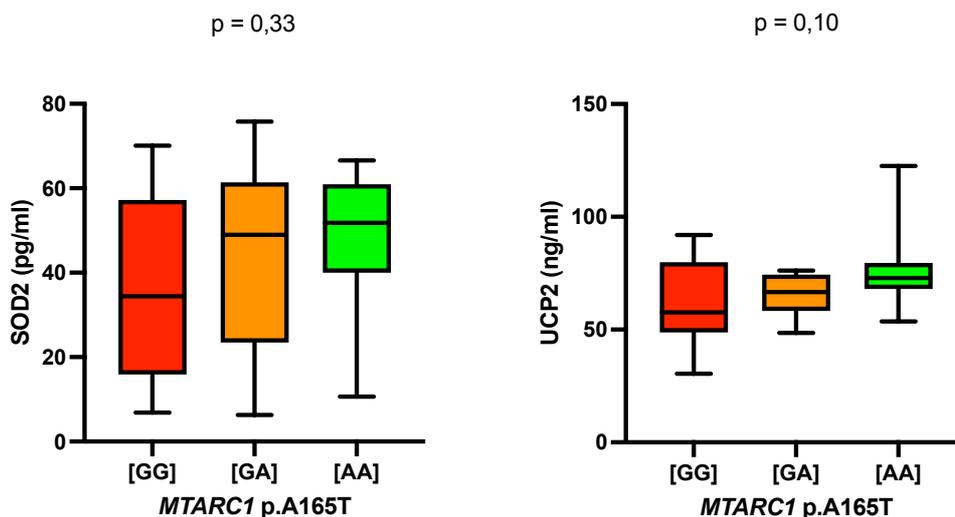
**Abbildung 14.** TrxR2-Spiegel bei Wildtyp-, heterozygoten und mutierten PatientInnen.



**Abkürzungen:** TrxR2, thioredoxin reductase 2.

Im Rahmen der Bestimmung der SOD2- und UCP2-Spiegel zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Trotz der fehlenden Signifikanz konnte eine positive Tendenz festgestellt werden: der mittlere Wert der mutierten PatientInnengruppe zeigte sich höher als der mittlere Wert in der heterozygoten Gruppe. Dieser wiederum ist höher als der mittlere Wert der Wildtyp-Gruppe (**Abbildung 15**).

**Abbildung 15.** SOD2- und UCP2-Spiegel bei mutierten, heterozygoten und Wildtyp-PatientInnen.



**Abkürzungen:** SOD2, superoxide dismutase 2; UCP2, mitochondrial uncoupling protein 2.

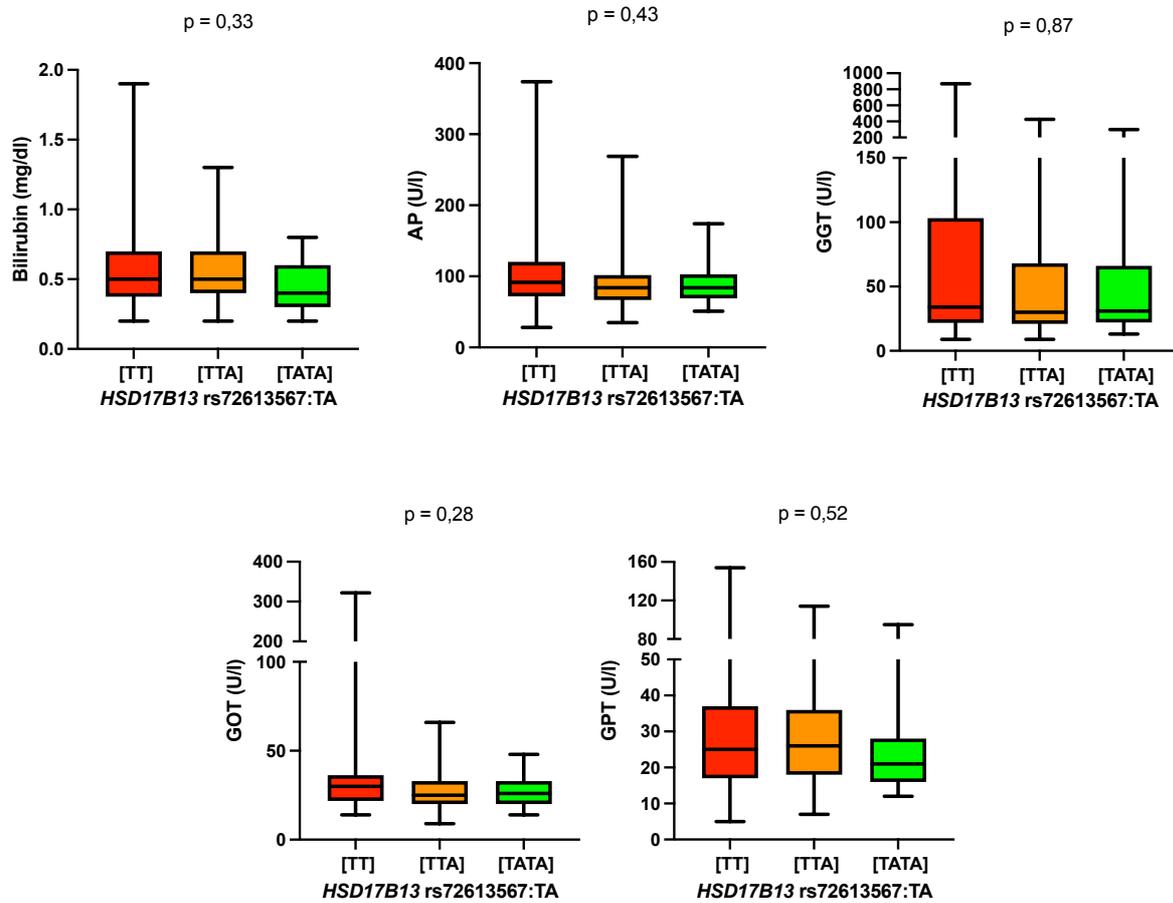
### 3.8. Kein signifikanter Unterschied in der Leberfunktion bezüglich der weiteren 6 untersuchten Gene

Die oben aufgeführten Analysen wurden ebenfalls für *HSD17B13* rs72613567:TA, *MBOAT7* p.G17E, *PNPLA3* p.I148M, *PSD3* p.L186T, *SERPINA1* PIZ p.E342K und *TM6SF2* p.E167K durchgeführt. Exemplarisch wurden die Graphen der Leberparameter sowie der Lebersteifigkeit und Leberverfettung aufgeführt.

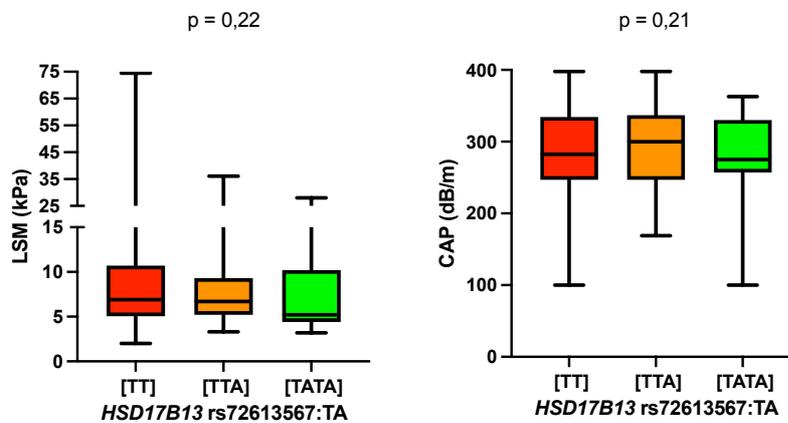
#### 3.8.1. Analyse von *HSD17B13* rs72613567:TA

Ähnlich zu den Ergebnissen, die in der Analyse von *MTARC1* p.A165T erhalten wurden, konnte eine visuelle Tendenz identifiziert werden: die maximalen Werte von Bilirubin, AP, GGT, GOT und GPT zeigten sich in der Gruppe der mutierten PatientInnen stets niedriger als die entsprechenden Werte in der Gruppe der Wildtyp- und heterozygoten PatientInnen (alle  $p > 0,05$ ) (**Abbildung 16A**). Das Gleiche lässt sich auch bezüglich der Lebersteifigkeit und der Leberverfettung darstellen ( $p > 0,05$ ) (**Abbildung 16B**).

**Abbildung 16A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für *HSD17B13* rs72613567:TA.

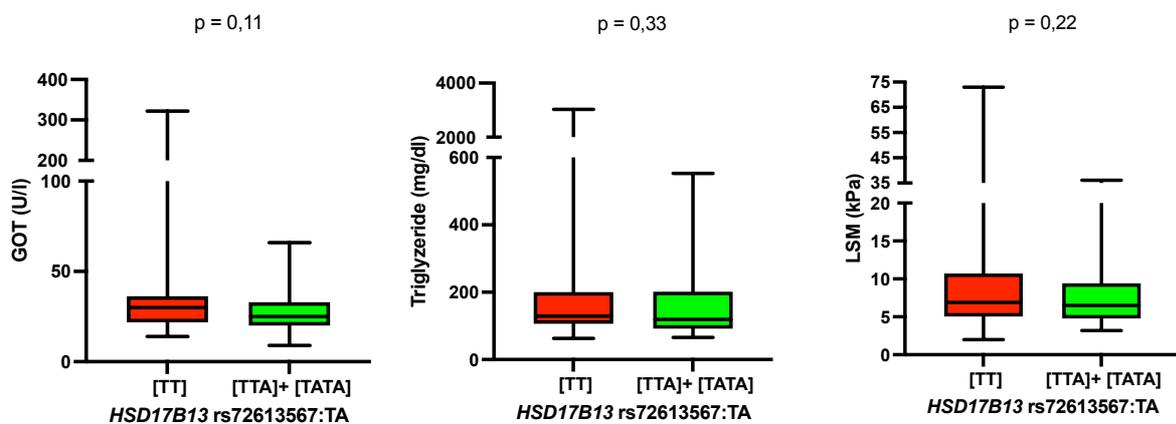


**Abbildung 16B.** Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für *HSD17B13* rs72613567:TA.



Diese Analysen wurden ebenfalls zwischen Wildtyp- und mutierten PatientInnen sowie zwischen den auf der einen Seite Wildtyp- PatientInnen und den auf der anderen Seite heterozygoten und mutierten PatientInnen durchgeführt. In **Abbildung 17** sind die interessanten Ergebnisse aufgeführt: die Maximalwerte von GOT, Triglyzeriden und LSM zeigten sich bei den Wildtyp-PatientInnen deutlich höher als in der anderen Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden nicht identifiziert ( $p > 0,05$ , jeweils).

**Abbildung 17.** Vergleich von GOT, Triglyzeriden und Lebersteifigkeit zwischen den Wildtyp- und heterozygoten sowie mutierten PatientInnen für *HSD17B13* rs72613567:TA.

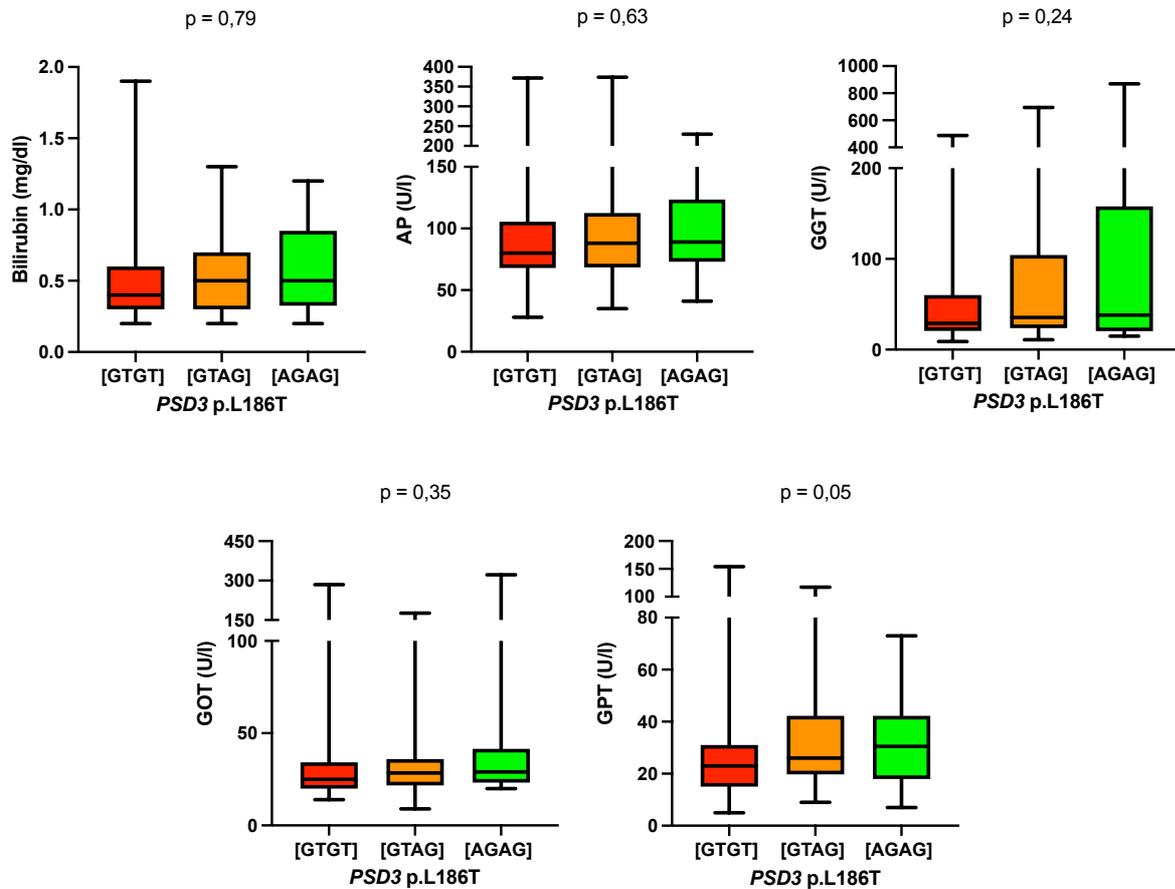


### 3.8.2. Analyse von *PSD3* p.L186T

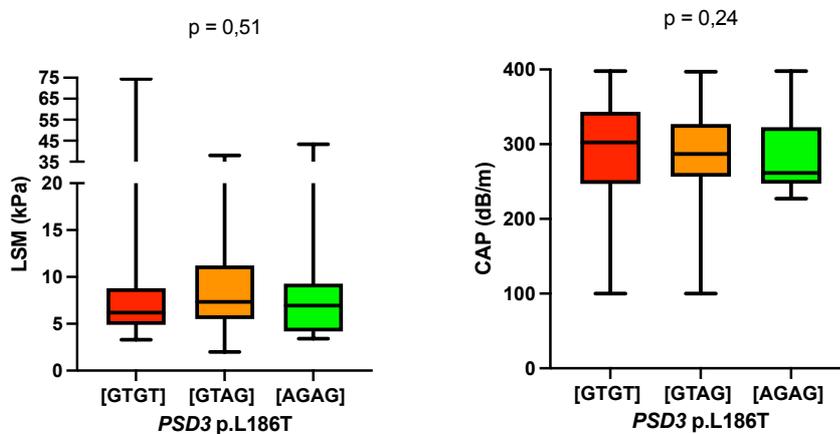
Bezüglich der *PSD3* p.L186T-Analyse konnten wir keinen Unterschied zwischen den drei Genotypgruppen identifizieren. Die GGT- ( $p = 0,24$ ) und GOT-Werte ( $p = 0,35$ ) zeigten sich in der mutierten Gruppe für *PSD3* p.L186T nicht niedriger als die entsprechenden Parameter der Wildtyp- und der heterozygoten Gruppe. Die Bilirubin- ( $p = 0,79$ ), AP- ( $p = 0,63$ ) und GPT-Werte ( $p = 0,05$ ) zeigten sich in der mutierten Gruppe für *PSD3* p.L186T tendenziell niedriger als in den zwei anderen Genotypgruppen (**Abbildung 18A**).

Die Lebersteifigkeit zeigte sich bei homozygoten TrägerInnen der *PSD3* p.L186T-Variante niedriger als bei Wildtyp-PatientInnen ( $p = 0,51$ ). Die Maximalwerte der Leberverfettung zeigten sich für die drei Gruppen identisch ( $CAP = 400$  dB/m), die mittleren CAP-Werte zeigten sich jedoch bei TrägerInnen einer oder zwei *PSD3* p.L186T-Varianten niedriger ( $p = 0,24$ ) (**Abbildung 18B**). Ein eindeutiger, protektiver Effekt dieses Polymorphismus konnte in unserer Kohorte nicht identifiziert werden.

**Abbildung 18A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für *PSD3* p.L186T.

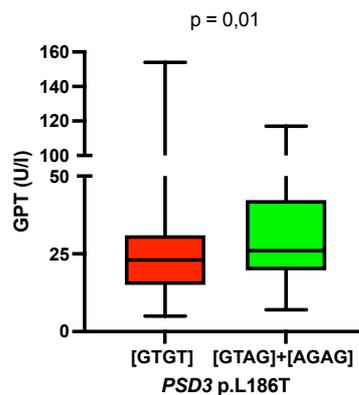


**Abbildung 18B.** Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für *PSD3* p.L186T.



Für die Analyse von *PSD3* p.L186T erfolgte ebenfalls der Vergleich zwischen Wildtyp- und mutierten PatientInnen sowie zwischen den auf der einen Seite Wildtyp- und heterozygoten PatientInnen und den auf der anderen Seite mutierten PatientInnen. Hier fiel ein signifikanter Unterschied im Vergleich der GPT auf ( $p = 0,01$ ), mit einem höheren Mittelwert bei den TrägerInnen der Variante im Vergleich zu den Wildtyp-PatientInnen (**Abbildung 19**).

**Abbildung 19.** Vergleich von GPT zwischen den Wildtyp- und heterozygoten sowie mutierten PatientInnen für *PSD3* p.L186T.

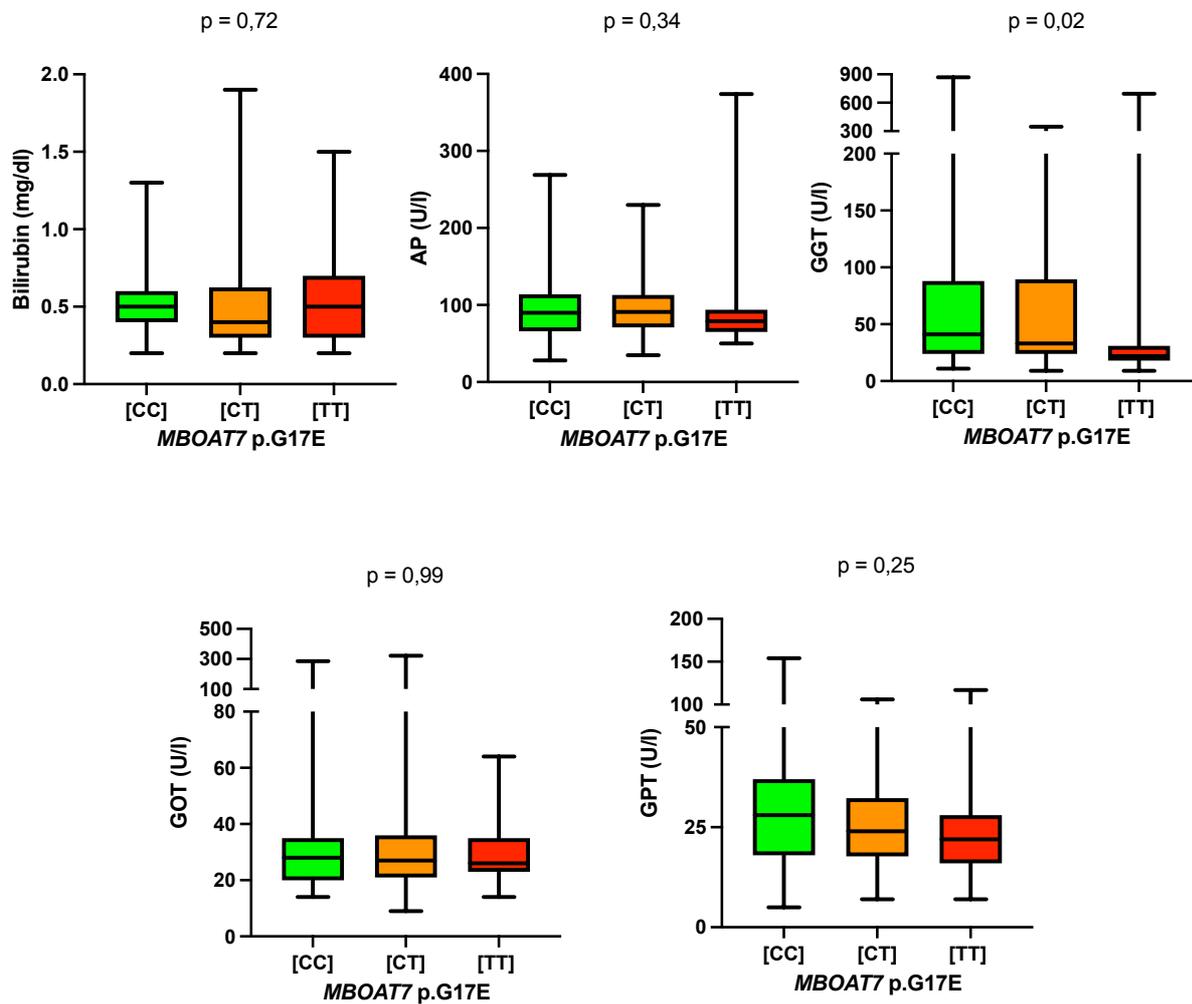


### 3.8.3. Analyse von *MBOAT7* p.G17E

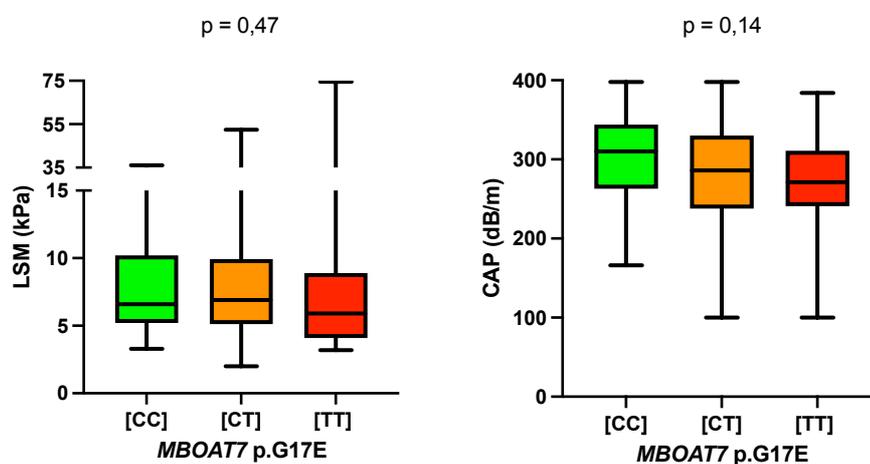
In der *MBOAT7* p.G17E-Analyse ließ bis auf einen signifikanten Unterschied bei GGT ( $p = 0,02$ ) zwischen den drei Genotypgruppen kein signifikanter Unterschied darstellen. Hierbei zeigten sich, entgegen unseren Erwartungen, insgesamt niedrigere GGT-Werte bei mutierten PatientInnen ( $p = 0,02$ ). Auch bei den GOT- und GPT-Spiegeln zeigte sich entgegen unseren Erwartungen fallende Werte bei TrägerInnen einer *MBOAT7* p.G17E-Variante ( $p = 0,99$  und  $p = 0,25$ ). Die maximalen Werte der AP zeigte sich deutlich höher bei Trägern einer *MBOAT7* p.G17E-Variante ( $p = 0,34$ ) (**Abbildung 20A**).

Die Lebersteifigkeit zeigte sich in der mutierten Gruppe steigend im Vergleich zu den heterozygoten und Wildtyp-PatientInnen ( $p > 0,05$ ). Bezüglich der Leberverfettung zeigten sich keine sich deutlich verschlechternde Parameter bei TrägerInnen einer *MBOAT7* p.G17E-Variante (**Abbildung 20B**).

**Abbildung 20A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für *MBOAT7* p.G17E.

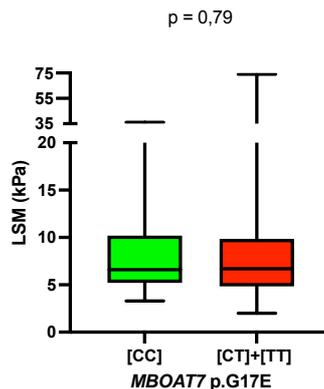


**Abbildung 20B.** Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für *MBOAT7* p.G17E.



In der *MBOAT7* p.G17E-Analyse fielen deutlich höhere LSM-Werte bei TrägerInnen einer Variante als bei den Nicht-TrägerInnen einer mutierten Variante, jedoch ohne signifikanten Unterschied ( $p = 0,79$ ) (**Abbildung 21**).

**Abbildung 21.** Darstellung der Lebersteifigkeit bei Nicht-TrägerInnen und TrägerInnen eines oder zwei Allele der *MBOAT7* p.G17E-Variante.

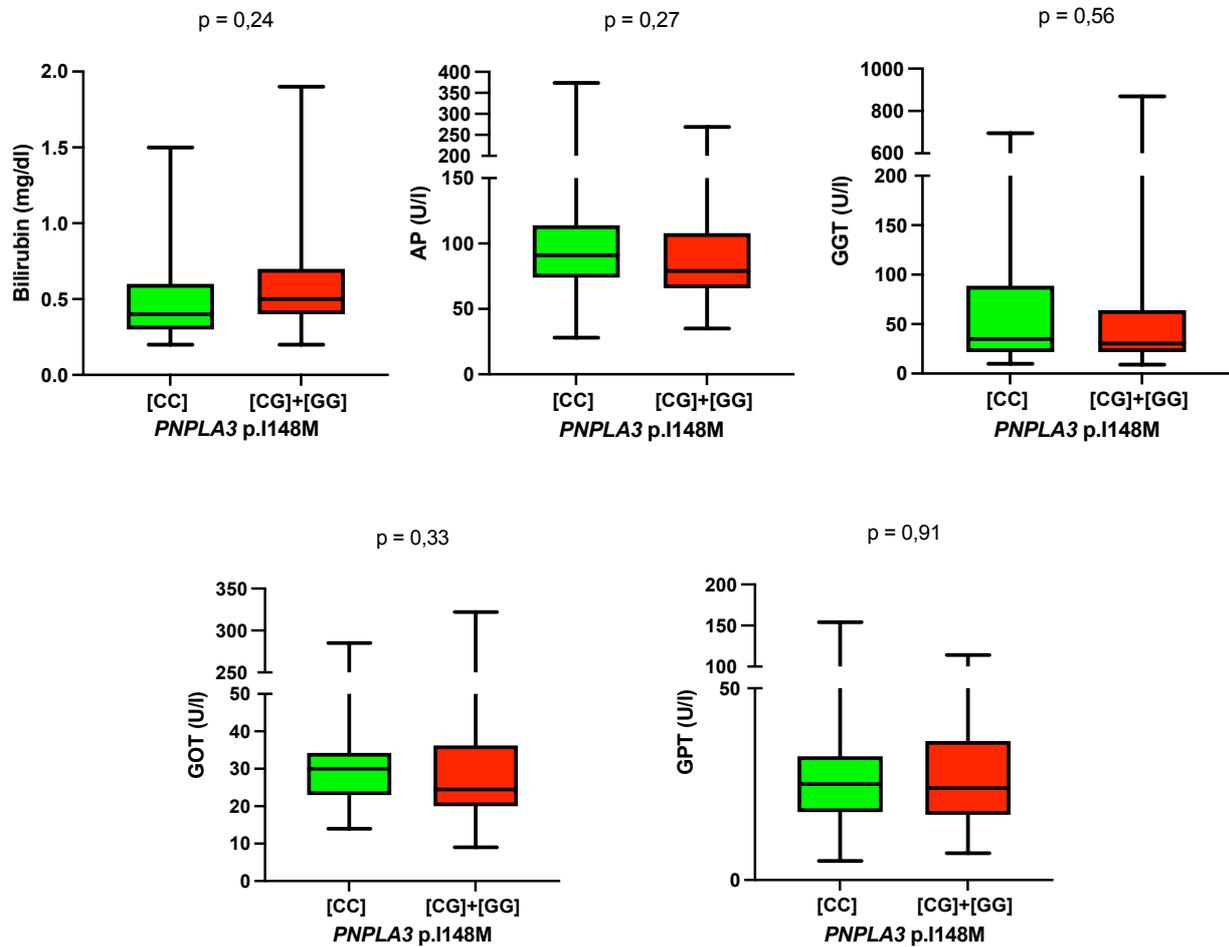


#### 3.8.4. Analyse von *PNPLA3* p.I148M

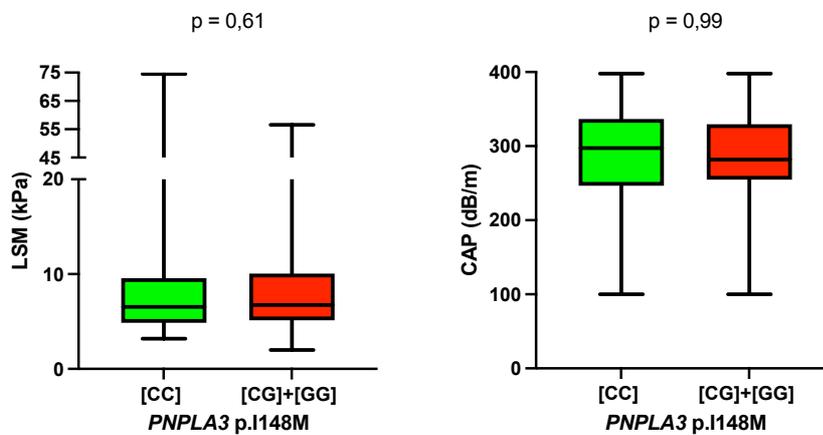
Bei Identifikation von nur vier mutierten PatientInnen in der *PNPLA3* p.I148M-Analyse wurden die heterozygoten und mutierten PatientInnen zur statistischen Auswertung in eine Gruppe zusammengefügt. Somit entstanden nur zwei zu vergleichenden Gruppen. Hier zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den Genotypgruppen. Gemäß unseren Erwartungen und basierend auf der Literatur zeigten sich die Bilirubin- ( $p = 0,24$ ), GGT- ( $p = 0,56$ ) und GOT-Spiegel ( $p = 0,33$ ) bei TrägerInnen einer *PNPLA3* p.I148M-Variante höher als bei Wildtyp-PatientInnen. Diese Tendenz ließ sich für AP ( $p = 0,27$ ) und GPT ( $p = 0,91$ ) nicht bestätigen (**Abbildung 22A**).

Die Leberverfettung zeigte sich in beiden Gruppen sehr ähnlich (maximale und minimale Werte identisch,  $p = 0,99$ ). Auch bezüglich der Lebersteifigkeit zeigten sich ähnliche mittlere Werte. In der Wildtyp-Gruppe zeigte sich jedoch entgegen unseren Erwartungen höhere LSM-Werte ( $p = 0,61$ ) (**Abbildung 22B**).

**Abbildung 22A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für *PNPLA3* p.I148M.



**Abbildung 22B.** Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für *PNPLA3* p.I148M.



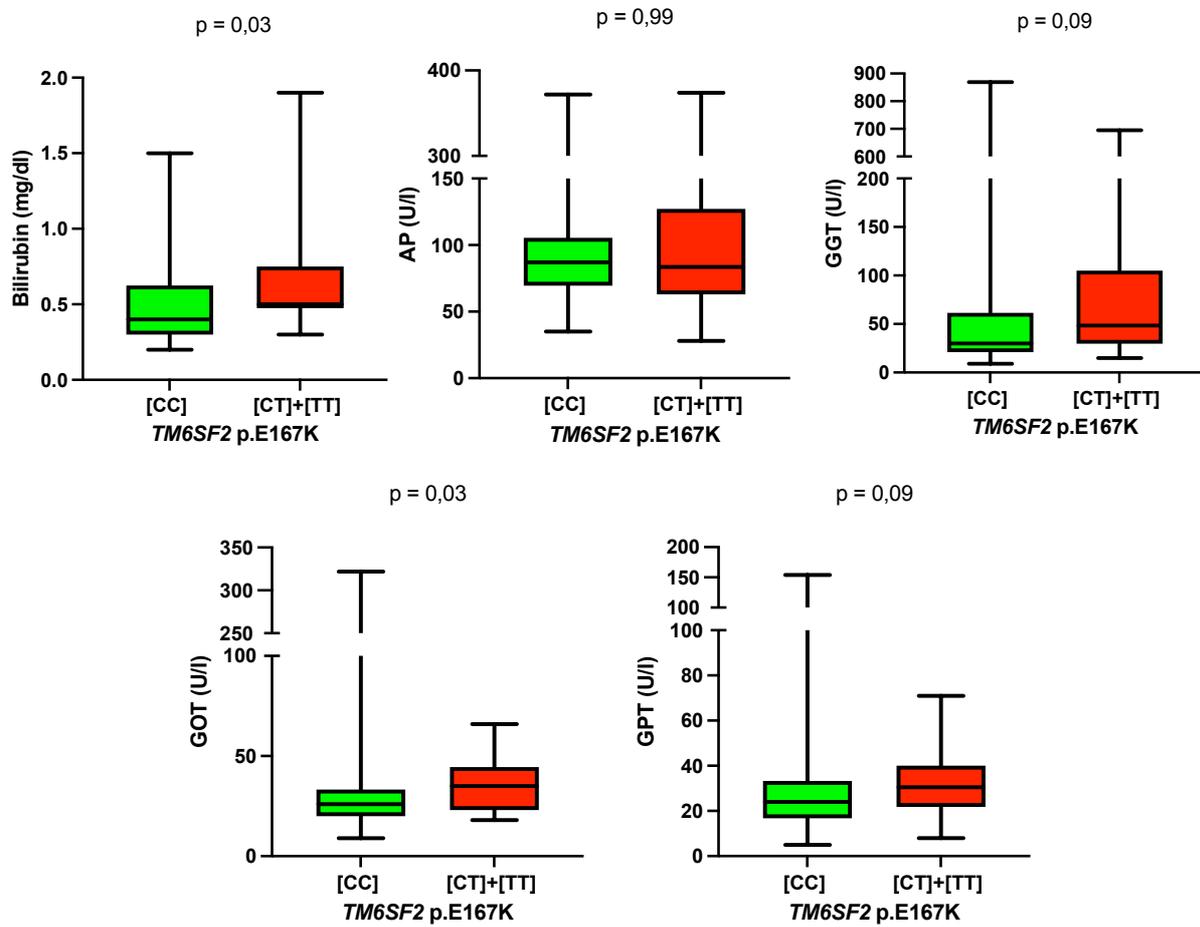
### 3.8.5. Analyse von *TM6SF2* p.E167K

Bei Nachweis eines einzigen mutierten Falles in der *TM6SF2* p.E167K-Analyse wurde dieser in die Gruppe der heterozygoten PatientInnen integriert. Somit entstanden zur statistischen Analyse nur zwei Gruppen.

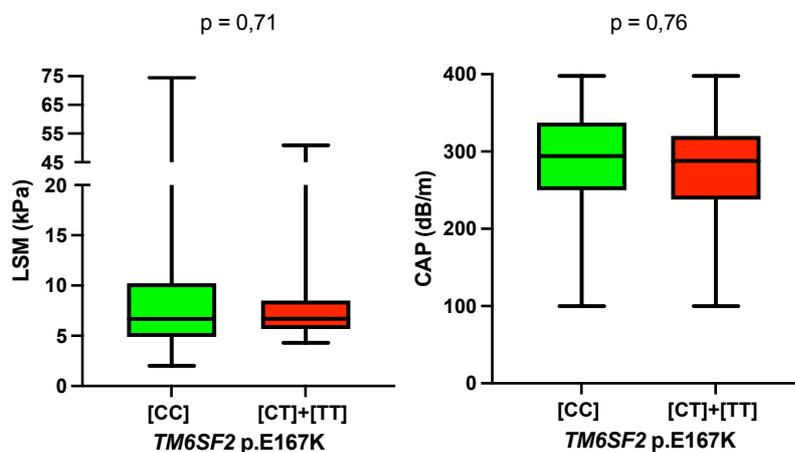
Wir konnten höhere Bilirubin-Spiegel ( $p = 0,03$ ) und ähnliche AP-Spiegel ( $p = 0,99$ ) bei TrägerInnen der *TM6SF2* p.E167K-Variante im Vergleich zu Nicht-TrägerInnen der *TM6SF2* p.E167K-Variante identifizieren. Fernerhin konnten wir nachweisen, dass TrägerInnen der *TM6SF2* p.E167K-Variante eine niedrigere Aktivität von GGT ( $p = 0,09$ ), GOT ( $p = 0,03$ ) und GPT ( $p = 0,09$ ) präsentierten. Trotz niedrigeren Werten von GOT-Spiegeln zeigte sich der mittlere GOT-Wert höher bei TrägerInnen der *TM6SF2* p.E167K-Variante (**Abbildung 23A**).

Bezüglich der Ergebnisse der transienten Elastographie zeigten sich in beiden Gruppen ähnliche Erkenntnisse ( $p = 0,71$  für die Analyse der Lebersteifigkeit und  $p = 0,76$  für die Analyse der Leberverfettung) (**Abbildung 23B**).

**Abbildung 23A.** Vergleich der Leberparameter zwischen den drei Genotypgruppen für *TM6SF2* p.E167K.



**Abbildung 23B.** Vergleich der Lebersteifigkeit und -verfettung zwischen den drei Genotypgruppen für *TM6SF2* p.E167K.



### 3.8.6. Analyse von *SERPINA1 PIZ* p.E342K

Bezüglich *SERPINA1 PIZ* p.E342K bestand bei nur insgesamt 3 heterozygoten PatientInnen und 0 mutierten PatientInnen keine sinnvolle Möglichkeit einer statistischen Analyse.

### 3.9. Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse

In unserer Studie konnten bei den spezifischen Genotypanalysen ein signifikanter Unterschied zwischen Bilirubin und GOT bei *TM6SF2* p.E167K sowie GGT bei *MBOAT7* p.G17E identifiziert werden. Fernerhin konnten wir nachweisen, dass die TrxR2-Spiegel bei den PatientInnen mit mutiertem *MTARC1*-Status höher als bei heterozygoten und Wildtyp-PatientInnen waren (**Tabelle 8**). Im Rahmen der weiteren Analysen konnten multiple signifikante Korrelationen zwischen den klinischen Charakteristika unserer PatientInnen identifiziert werden (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8.** Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse.

Verglichene Parameter	p-Wert
<i>MBOAT7</i> p.G17E und GGT	0,02
<i>MTARC1</i> p.A165T und TrxR2	0,01
<i>PSD3</i> p.L186T und GPT	0,01
<i>TM6SF2</i> p.E167K und Bilirubin	0,03
<i>TM6SF2</i> p.E167K und GOT	0,03
Korrelation zwischen Taillenumfang und BMI	< 0,01
Korrelation zwischen Taillenumfang und HDL	0,01
Korrelation zwischen CAP und BMI	< 0,01
Korrelation zwischen CAP und Taillenumfang	< 0,01
Korrelation zwischen CAP und HbA1c	0,02
Korrelation zwischen CAP und Triglyzeriden	0,01
Korrelation zwischen CAP und Cholesterin	0,01
Korrelation zwischen CAP und LDL	0,01
Korrelation zwischen CAP und Bilirubin	0,01
Korrelation zwischen CAP und AP	0,04
Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und Bilirubin	0,01
Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und AP	< 0,01
Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und GGT	< 0,01
Korrelation zwischen Lebersteifigkeit und Taillenumfang	0,01
Korrelation zwischen HbA1c und Cholesterin	0,01
Korrelation zwischen HbA1c und Triglyzeriden	0,03

## 4. Diskussion

Eine frühzeitige Diagnose der Leberverfettung und -fibrose ist von großer klinischer Bedeutung. Eine rechtzeitige Diagnose stellt die Möglichkeit einer optimalen und engmaschigeren Anbindung der PatientInnen in einer Leberambulanz sowie eine rechtzeitige Identifizierung von Komplikationen und eine dementsprechende Therapieeinleitung. Im Zuge unserer Arbeit sollten die *MTARC1* p.A165T-Variante und die oben genannten weiteren Genpolymorphismen bei PatientInnen mit DMII identifiziert und die Leberverfettung oder das Vorhandensein einer Leberfibrose in Zusammenhang mit den Genpolymorphismen analysiert werden.

Entsprechend der aktuellen Datenlage und trotz Einschluss von RisikopatientInnen in unserer Studie, erwarteten wir in unserem PatientInnenkollektiv eine höhere Prävalenz der Leberverfettung im Vergleich zur Leberfibrose. Dies ließ sich bestätigen: eine Lebersteatose wurde bei 52,4% und eine Leberfibrose bei 23,3% unserer PatientInnen festgestellt. Fernerhin wurde, aufgrund der bereits existierenden Literatur, eine positive Korrelation zwischen der mutierten *MTARC1*-Variante und der Leberfunktion erwartet. In unserem PatientInnenkollektiv und im Rahmen der *MTARC1*-Analyse konnte jedoch keine eindeutige Rolle dieser Variante identifizieren. In der *TM6SF2* p.E167K-Analyse konnten, gemäß unseren Erwartungen, bei TrägerInnen eines oder zwei mutierten Allels höhere Bilirubin-Werte und GOT-Spiegel identifiziert werden. Im Rahmen der *MBOAT7* p.G17E-Analyse zeigten sich, entgegen der bisherigen Literatur, erniedrigte GGT-Spiegel bei TrägerInnen mindestens einer Variante. Auch in der Analyse von *PSD3* p.L186T fielen entgegen der bisherigen Literatur erhöhte GPT-Spiegel bei TrägerInnen mindestens eines mutierten Allels.

### 4.1. MASLD, Leberfibrose und DMII

Die Prävalenz der MASLD liegt in der Allgemeinbevölkerung in den entwickelten Ländern bei etwa 30%<sup>10</sup>, bei Menschen mit DMII liegt diese bei 55,5%<sup>11</sup>. PatientInnen mit DMII haben ein zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MASLD. Auf der anderen Seite haben PatientInnen mit MASLD ein zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines DMII<sup>4,5</sup>. Die Prävalenz der Leberfibrose hingegen ist deutlich geringer: diese wird bei etwa 2,8% der Allgemeinbevölkerung geschätzt<sup>102</sup>. Bei PatientInnen mit DMII liegt die Prävalenz der Leberfibrose bei etwa 21%<sup>103</sup>.

Im Jahr 2022 publizierten Choi et al. ihre Studie, die die Prävalenz der Steatosis hepatis sowie der Fibrose in den USA untersuchte<sup>104</sup>. Diese Daten wurden, wie für unsere Studie,

mittels transienter Elastographie erhoben. Bei Choi et al. lag bei insgesamt 4.083 rekrutierten PatientInnen eine Leberverfettung bei 27,3% und eine Leberfibrose bei 7,7% vor<sup>104</sup>. Die von den KollegInnen benutzten Cut-Off-Werte wichen leicht von den in unserer Studie benutzten Cut-Off-Werten: der CAP-Cut-Off lag bei < 302 dB/m für den Ausschluss einer Lebersteatose und der LSM-Cut-Off bei < 8,2 kPa für den Ausschluss einer Leberfibrose<sup>104</sup>. Im Gegensatz zu diesen Werten lagen unsere Cut-Off-Werte bei jeweils < 288 dB/m<sup>62</sup> und < 8 kPa<sup>60,61</sup>. Die unterschiedlichen Cut-Off-Wert könnten dazu beitragen, die Steatose oder Fibrose in einer Kohorte zu unter- oder überschätzen. Wie bereits erwähnt identifizierten wir eine Lebersteatose bei 52,4% und eine Leberfibrose bei 23,3% unserer PatientInnen. Diese deutlich höheren Prozentsätze erklären sich durch die unterschiedlichen Kohorten: unsere PatientInnen gehören, im Gegensatz zur Kohorte von Choi et al., die ihre Studie innerhalb der Allgemeinbevölkerung durchführten, zu einer Risikogruppe für die Entwicklung einer dieser Erkrankungen und eine höhere Prävalenz im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung war erwartet.

In einer systematischen Überprüfung und Metaanalyse untersuchten En Li Cho et al. die Prävalenz der MASLD bei PatientInnen mit DMII<sup>4</sup>. Durch dieses Einschlusskriterium (DMII) ist ein Vergleich der Ergebnisse möglich. Hier wurden 156 Studien und 1.832.125 PatientInnen zur Analyse rekrutiert. Bei En Li Cho et al. konnte eine Steatose oder Steatohepatitis bei 65,1% der PatientInnen nachgewiesen werden<sup>4</sup>. Durch diese Analyse gelang der Nachweis des ausgeprägten Zusammenhangs und der ähnlichen Pathogenese zwischen DMII und MASLD. Die Ergebnisse unserer Studie sind ähnlich zu diesen Ergebnissen.

Fernerhin ist der Vergleich unserer Ergebnisse mit der bisherigen Literatur aufgrund von im Laufe der letzten Jahre häufig geänderten CAP- und LSM-Cut-Off-Werte nur bedingt möglich. Einen internationalen Consens bezüglich dieser Parameter besteht noch nicht.

## 4.2. Die Leberverfettung als Teil des metabolischen Syndroms

Wie bereits im Zuge unserer Arbeit erwähnt, ist das metabolische Syndrom durch das Vorhandensein von mindestens drei der folgenden Kriterien definiert: ein erhöhter Taillenumfang (> 88 cm bei Frauen und > 102 cm bei Männern), eine arterielle Hypertonie (mittlerer Blutdruck > 130/85 mmHg), erhöhte Triglyzeride-Spiegel (> 150 mg/dl), erniedrigte HDL-Cholesterin-Spiegel (< 50 mg/dl bei Frauen und < 40 mg/dl bei Männern) und ein gestörter Glukosemetabolismus (bis hin zum DMII)<sup>33</sup>.

Das metabolische Syndrom gehört zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer CVD<sup>33,105</sup>. Targher et al. konnten in einer Metaanalyse, die 34.043 PatientInnen mit einer MASLD aus 16 prospektiven und retrospektiven Studien untersuchte, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer CVD identifizieren<sup>106</sup>. Diese Metaanalyse zeigte ebenfalls, dass das kardiovaskuläre Risiko und das Outcome der PatientInnen mit dem Schweregrad der Lebererkrankung zusammenhing<sup>106</sup>. Choudhary et al. bestätigten im Jahr 2019 diese Ergebnisse in ihrer Studie<sup>107</sup>.

In unserer Kohorte konnte, beobachtet werden, dass 123 der 124 (99,1%) rekrutierten PatientInnen ein metabolisches Syndrom präsentierten. Die Integrierung der Leberverfettung in die Definition des metabolischen Syndroms könnte die Klassifizierung der PatientInnen in die Kategorie der PatientInnen mit hohem kardiovaskulärem Risiko und somit das Screening dieser PatientInnen für kardiovaskuläre Erkrankungen vereinfachen. Hierzu gibt es aktuell noch keine Daten in der Literatur.

### 4.3. Die Rolle der Genetik

In den letzten Jahren wurden genetische Faktoren intensiv erforscht. Bezüglich des Einflusses der Genetik auf die Entwicklung einer chronischen und fortschreitenden Lebererkrankung bleiben Fragen teilweise unbeantwortet. Am Beispiel des chronischen Alkoholkonsums kann erkannt werden, dass nur ein geringer Prozentsatz der Menschen eine Leberzirrhose entwickeln<sup>108</sup>, sodass eine gewisse vorliegende genetische Komponente vermutet wird. Die genetische Komponente würde sowohl bei einer Alkohol-assoziierten wie auch bei einer nicht-alkoholisch-bedingten Lebererkrankung eine Rolle spielen. Die meisten bereits identifizierten Gene sind als Risikofaktoren eingestuft: *MBOAT7* p.G17E<sup>32</sup>, *PNPLA3* p.I148M<sup>33,34,35,36</sup>, *SERPINA1* *PIZ* p.E342K<sup>37</sup> und *TM6SF2* p.E167K<sup>33,39,38,40,41</sup>. Zu den protektiven Faktoren gehören *HSD17B13* rs72613567:TA<sup>42,43,44</sup>, *MTARC1* p.A165T<sup>47</sup> und *PSD3* p.L186T<sup>45</sup>.

#### 4.3.1. *MTARC1* p.A165T-Variante als protektiver genetischer Faktor?

In rezenten Studien wurde die *MTARC1* p.A165T-Variante mit einer niedrigeren Leberverfettung sowie einem niedrigeren Risiko einer Entwicklung einer chronischen Alkoholgeförderten Lebererkrankung assoziiert<sup>47</sup>. Emdin et al. konnten die *MTARC1* p.A165T-Variante als protektiver Faktor vor der Entwicklung einer Leberzirrhose jeglicher Genese identifizieren<sup>48</sup>. Fernerhin schien diese *MTARC1* p.A165T-Variante mit niedrigeren Cholesterin-Spiegeln und niedrigeren Leberparametern assoziiert zu sein<sup>48</sup>. In dieser Studie

wurden 12.361 PatientInnen mit Leberzirrhose und 790.095 Kontroll-PatientInnen aus 8 Kohorten analysiert<sup>48</sup>. Diese Studie brachte hervor, dass *MTARC1* in Zukunft ein potenzieller therapeutischer Ansatz darstellen könnte<sup>109</sup>.

Der Prozentsatz der Präsenz der homozygot-mutierten *MTARC1* p.A165T-Variante weltweit liegt bei etwa 4,3%, ein heterozygot-mutierter Status liegt bei etwa 66,2% der Bevölkerung vor<sup>110</sup>. In Europa liegt die homozygot-mutierte *MTARC1* p.A165T-Variante bei etwa 7,8% der Bevölkerung vor. In unserer Studie, durchgeführt in einem deutschen Zentrum und somit mit einer Mehrheit von europäischen PatientInnen, identifizierten wir leicht höhere Zahlen: 8,1% unserer PatientInnen zeigten sich homozygot-mutiert (insgesamt 10 homozygote TrägerInnen des mutierten *MTARC1*-Genotyps).

Luukkonen et al. untersuchten in ihrer Studie die Assoziation zwischen Leberhistologie und der *MTARC1* p.A165T-Variante<sup>100</sup>. In dieser Studie wurden 369 PatientInnen genotypisiert<sup>100</sup>. Ein homozygot- oder heterozygot-mutierter Status für *MTARC1* p.A165T-Variante wurde bei 160 (43,3%) PatientInnen identifiziert, 209 (56,7%) PatientInnen wiesen einen Wildtyp auf<sup>100</sup>. TrägerInnen von mindestens einer *MTARC1* p.A165T-Variante zeigten eine signifikant niedrigere inflammatorische Aktivität (7,2 versus 17,5 %,  $p = 0,006$ )<sup>100</sup>. Fernerhin zeigte sich ein deutlich niedrigerer Anteil an fortgeschrittenen (F2- bis F4-) Fibrosen bei den TrägerInnen eines oder zwei mutierten Allele für *MTARC1* p.A165T<sup>100</sup>. Die Prävalenz der Steatose zeigte sich jedoch zwischen den *MTARC1*-Genotypvarianten nicht signifikant unterschiedlich<sup>100</sup>. Die Autoren konnten somit schlussfolgern, dass nicht die Prävalenz einer Leberverfettung, sondern eher der Schweregrad der MASLD durch die *MTARC1* p.A165T-Variante beeinflusst ist<sup>100</sup>. In der Analyse unserer Kohorte konnte, ähnlich zu Luukkonen et al., keinen signifikanten Unterschied der Leberfunktion zwischen den drei Genotypvarianten (Wildtyp, heterozygot und homozygot) identifizieren. Auch im Lipidprofil der PatientInnen konnte kein signifikanter Unterschied identifiziert werden. Aus unserer Analyse enthüllt sich jedoch eine gewisse Tendenz: die Leberparameter zeigten sich in der mutierten Gruppe tendenziell fallend und der maximale Wert der jeweiligen Leberparameter zeigte sich in der mutierten Gruppe deutlich niedriger als die maximalen Werte in den heterozygoten und Wildtyp-Gruppen. Diese Erkenntnisse gehen somit mit den Ergebnissen von Luukkonen et al. einher. Ob ein Unterschied im Schweregrad der Leberfibrose durch die *MTARC1* p.A165T-Variante besteht, konnte in unserer Analyse nicht beurteilt werden, da wir die Leberfibrose nur durch das nicht-invasive Verfahren der transienten Elastographie bestimmten.

#### 4.3.2. *HSD17B13* rs72613567:TA als protektiver genetischer Faktor?

Vilar-Gomez et al. untersuchten den protektiven Effekt von *HSD17B13* rs72613567:TA in einer Studie, in der 1.153 nicht-hispanische PatientInnen mit histologisch gesicherter MASLD rekrutiert wurden<sup>111</sup>. Hier konnte ein positiver Effekt von *HSD17B13* rs72613567:TA nur bei *PNPLA3* p.I148M-Wildtyp-PatientInnen identifiziert werden, sodass man hier schlussfolgern muss, dass der Effekt von *PNPLA3* p.I148M wahrscheinlich schwerwiegender ist als der protektive Effekt von *HSD17B13* rs72613567:TA<sup>111</sup>. In unserer Arbeit konnten wir bei fehlender Signifikanz eine gewisse Tendenz identifizieren: die maximalen Werte der laborchemischen Leberparameter, der CAP- und der LSM-Werte zeigten sich niedriger in der Gruppe der homozygot-mutierten PatientInnen als in den Gruppen der heterozygot-mutierten und Wildtyp-PatientInnen, sodass ein gewisser protektiver Effekt von *HSD17B13* rs72613567:TA vermutet werden kann.

#### 4.3.3. *PSD3* p.L186T als protektiver genetischer Faktor?

Der Effekt von *PSD3* p.L186T auf die Entwicklung einer Lebererkrankung wurde durch Mancina et al. untersucht<sup>45</sup>. Hierzu wurden 1.951 PatientInnen mit europäischer Herkunft und mit hohem Risiko für eine MASLD unterschiedlicher Genese bei vorliegender Histologie untersucht. Der mutierte Allel für *PSD3* p.L186T war mit einer niedrigeren Prävalenz von Leberverfettung, Leberfibrose und Inflammation verbunden. In unserer Arbeit konnten wir diese Ergebnisse nicht bestätigen. Wir identifizierten sogar eine signifikant höhere GPT-Aktivität bei TrägerInnen der *PSD3* p.L186T-Variante im Vergleich zu den Wildtyp-PatientInnen. Alle weiteren Analysen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypgruppen. Zum Zeitpunkt unserer Arbeit konnten keine Studien identifiziert werden, die sowohl die Themen des DMII und der MASLD sowie die Analyse der Polymorphismen der Genen *PSD3* p.L186T und *HSD17B13* rs72613567:TA untersuchten.

#### 4.3.4. Genetische Risikofaktoren: *TM6SF2* p.E167K, *MBOAT7* p.G17E und *PNPLA3* p.I148M und deren Effekt auf die Entwicklung einer Leberverfettung und -fibrose?

In der Literatur wurden genetische Risikofaktoren ausgiebig untersucht. *MBOAT7* p.G17E<sup>32</sup>, *PNPLA3* p.I148M<sup>33,34,35,36</sup> und *TM6SF2* p.E167K<sup>33,39</sup> gehören zu den am besten untersuchten Genen<sup>38,40,41</sup>.

Durch Longo et al. wurde 2022 die *TM6SF2* p.E167K-Variante parallel zu *MBOAT7* p.G17E und *PNPLA3* p.I148M in PatientInnen mit MASLD analysiert<sup>112</sup>. Hier konnte ein additiver Effekt dieser drei Mutationen festgestellt werden: sowohl der Schweregrad der SLD wie auch die Inzidenz von HCC zeigten sich bei homozygoten TrägerInnen der drei Mutationen in dieser Kohorte erhöht<sup>112</sup>.

Eine dieses Jahr von Coelho Lavrado et al. publizierte Studie analysierte den kombinierten Effekt von *PNPLA3* p.I148M und *TM6SF2* p.E167K bei PatientInnen mit MASLD und DMII auf die Entwicklung einer Leberzirrhose<sup>113</sup>. In ihrer Studie wurden 407 PatientInnen mit MASLD und DMII während 11 Jahren verlaufskontrolliert. Das Vorhandensein eines einzigen Risikoallels (von maximal vier) erhöhte bereits das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose<sup>113</sup>. Die Kombination von mindestens zwei Risikoallelen erhöhte dieses Risiko umso mehr<sup>113</sup>. Auch bezüglich der Komplikationen der Leberzirrhose zeigten sich bei mutierten TrägerInnen von *PNPLA3* p.I148M und heterozygoten und mutierten TrägerInnen von *TM6SF2* p.E167K ähnliche Ergebnisse<sup>113</sup>. Insgesamt schlussfolgerten die KollegInnen, dass der Schweregrad der MASLD und deren Progress zu MASH oder Leberzirrhose durch *PNPLA3* p.I148M- und *TM6SF2* p.E167K-Polymorphismen bei PatientInnen mit DMII beeinflusst wird<sup>113</sup>. Diese Ergebnisse spiegelten die Ergebnisse von Wang et al. in 2016: hier wurden die *PNPLA3* p.I148M- und *TM6SF2* p.E167K-Polymorphismen und deren Effekt auf die Entwicklung einer MASLD in der Han-chinesischen Bevölkerung untersucht<sup>114</sup>.

Wir untersuchten in unserer Studie die Genpolymorphismen einzeln. Im Rahmen der *TM6SF2* p.E167K-Analyse konnten in unserer Studie interessanterweise signifikante Ergebnisse bezüglich des Bilirubin-Spiegels und der GOT-Aktivität nachgewiesen werden. TrägerInnen mindestens eines mutierten Allels von *TM6SF2* p.E167K zeigten signifikant höhere Werte bezüglich dieser zwei Parameter. *TM6SF2* kodiert für ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das mit dem Inositol-benötigenden Enzym 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), einem primären Stresssensor des endoplasmatischen Retikulums, interagiert<sup>115</sup>. Die *TM6SF2* p.E167K-Variante ist mit einem erhöhten Risiko einer SLD sowie eines DMII assoziiert<sup>115</sup>. Die

Rolle dieser Variante auf den Glukosemetabolismus ist noch nicht ganz geklärt<sup>115</sup>. Fan et al. identifizierten den IRE1 $\alpha$ -Signalweg als potenzielle Erklärung<sup>115</sup>.

#### 4.4. Oxidativer Stress und *MTARC1* p.A165T-Variante

Rixen et al. publizierten im September 2023 einen Artikel über den positiven Effekt der *MTARC1*-Variante rs2642438 (p.A165T) auf die Reduktion der Wasserperoxidspiegels in eukaryoten Zellen<sup>116</sup>. Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gehört zu den Haupt-ROS<sup>116</sup>. Die *MTARC1* p.A165T-Variante erwies sich in der Lage, die N-sauerstoffhaltigen Verbindungen zu reduzieren und damit Entgiftungsreaktionen zu vermitteln<sup>117</sup>.

In unserer Studie erfolgten die Messungen der gesamten antioxidativen Kapazität und der TrxR2-, SOD2- und UCP2-Spiegel. Es ließen sich signifikant höhere TrxR2-Spiegel bei TrägerInnen der *MTARC1* p.A165T-Variante und somit eine erhöhte antioxidative Kapazität bei diesen PatientInnen darstellen. Diese Ergebnisse passen zu den Ergebnissen von Janik et al., die eine verbesserte antioxidative Aktivität in Verbindung mit der *MTARC1* p.A165T-Variante bei PatientInnen mit Autoimmunhepatitis bringen konnten<sup>46</sup>. Zu diesen spezifischen Messungen bei PatientInnen mit DMII gibt es in der aktuellen Literatur keine Datenlage. Wir vermuten, dass sich die in unserer Studie aufweisende Tendenz bei einer größeren Kohorte als Signifikanz darstellen könnte.

#### 4.5. Klinischer Ausblick

Leitliniengerecht müssen PatientInnen, die an einer Leberzirrhose leiden, ein regelmäßiges Screening bezüglich der Komplikationen (unter anderem des HCCs und der Ösophagusvarizen) erhalten<sup>118</sup>. Die MASLD und die damit verbundenen steigenden Zahlen von Leberfibrose und Leberzirrhose aufgrund von unzureichender Identifikation dieses PatientInnenkollektivs stellen eine Herausforderung für die Gesundheitssysteme weltweit dar. Zur Bestimmung der eventuellen Therapie dieser muss die Ursache identifiziert werden.

Über die Vermeidung gewisser exogener Risikofaktoren für die Progression der Lebererkrankung sollen die PatientInnen ausführlich aufgeklärt werden. Ein interessanter und weiter zu untersuchender Ansatzpunkt für die Zukunft wäre eine potenzielle ziel- und gerichtete Therapie. Nach Identifikation von genetischen Faktoren, die eine protektive Rolle spielen oder mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Lebererkrankung verbunden sind, könnte eine dementsprechende Therapie entwickelt werden. Am Beispiel von

*MTARC1*, dessen Pathomechanismus noch nicht ganz geklärt ist, jedoch am ehesten mit einer Enzyminstabilität zusammenhängt, könnte eine zielgerichtete Therapie den Schweregrad der MASLD positiv beeinflussen<sup>51</sup>.

Fernerhin scheint im klinischen Alltag eine frühzeitige Erkennung der PatientInnen mit Diabetes und Prädiabetes von Vorteil zu sein. Diese Option scheint im klinischen Alltag gut umsetzbar zu sein, da zur Diagnosestellung eines gestörten Glukosemetabolismus ein nüchterner Glukosespiegel von > 126 mg/dl oder ein zu jeglichem Zeitpunkt gemessener Blutzuckerspiegel von > 200 mg/dl notwendig ist<sup>119</sup>. Auch die weiteren modifizierbaren Risikofaktoren (erhöhter BMI und erhöhte serologische Lipidspiegel) scheinen trotz bisherigen Ergebnissen der Forschung über MASLD-beeinflussende Gene eine wichtige Rolle zu spielen. Lebensstilverändernde Maßnahmen zur Prävention einer Progression der Leberverfettung sollten weiterhin im Vordergrund bei der Behandlung dieser PatientInnen sein. Eine engmaschige Kontrolle der klinischen und laborchemischen Parameter könnte eine bessere Compliance der PatientInnen und eine Verzögerung der Komplikationen mit sich bringen<sup>120,4</sup>.

## 4.6. Vorteile der Studie

Bei unserer Studie handelte es sich um eine prospektive Arbeit, die in einer Abteilung durchgeführt wurde, die auf die Behandlung von PatientInnen mit sowohl DMII als auch Fettleber spezialisiert ist. Wir kombinierten genetische Analysen mehrerer SNPs mit einer nicht-invasiven, schnellen Methode zur Messung von Leberfibrose und -steatose. Die Zuverlässigkeit des FibroScan<sup>®</sup> wurde im Zuge dieser Arbeit mehrfach erwähnt<sup>54,55,63</sup>.

Durch die Genotypisierung mehrerer genetischer Varianten konnten wir deren Rolle bei der Entwicklung von MASLD bei PatientInnen mit DMII im Detail analysieren. Zusätzlich fügten wir Messungen des oxidativen Stresses bei PatientInnen mit verschiedenen *MTARC1*-Genotypen hinzu. Dieser Ansatz erlaubte uns, neue Zusammenhänge zwischen dieser protektiven Variante und verbesserter Leberfunktion zu finden.

## 4.7. Limitationen der Studie

Obwohl unsere Kohorte insgesamt 124 TeilnehmerInnen umfasste, könnte diese Zahl zu gering gewesen sein, um alle Feinheiten der Gen-Phänotyp-Assoziationen im Zusammenhang mit dem Leberstatus bei PatientInnen mit DMII zu detektieren. Außerdem hätten uns sequenzielle Messungen der Lebersteatose und -fibrose mittels transienter Elastographie,

zum Beispiel alle 12 oder 24 Monate, die Möglichkeit gegeben, den Zusammenhang zwischen den untersuchten Varianten und der Dynamik der Leberschädigung zu analysieren.

Fernerhin haben wir die Analyse des oxidativen Stresses nur bei einer geringen Anzahl von PatientInnen durchgeführt. Somit ist die Aussagekraft unserer Ergebnisse unter Vorbehalt zu interpretieren. Zuletzt muss erwähnt werden, dass im Rahmen der Datenerhebung und der Analyse keine Rücksicht auf die bestehende Therapie des DMII genommen wurde.

## Literaturverzeichnis

1. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
2. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(1):99-128. doi:10.1007/s00018-018-2947-0
3. Dharmalingam M, Yamasandhi Pg. Nonalcoholic fatty liver disease and Type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018;22(3):421. doi:10.4103/ijem.IJEM\_585\_17
4. En Li Cho E, Ang CZ, Quek J, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2023;72(11):2138-2148. doi:10.1136/gutjnl-2023-330110
5. Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Diabetes Res*. 2020;2020:1-16. doi:10.1155/2020/3920196
6. Fouad Y. Metabolic-associated fatty liver disease: New nomenclature and approach with hot debate. *World J Hepatol*. 2023;15(2):123-128. doi:10.4254/wjh.v15.i2.123
7. Song SJ, Lai JCT, Wong GLH, Wong VWS, Yip TCF. Can we use old NAFLD data under the new MASLD definition? *J Hepatol*. 2024;80(2):e54-e56. doi:10.1016/j.jhep.2023.07.021
8. He L, Zheng W, Qiu K, Kong W, Zeng T. Changing from NAFLD to MASLD: The new definition can more accurately identify individuals at higher risk for diabetes. *J Hepatol*. 2024;80(2):e85-e87. doi:10.1016/j.jhep.2023.09.035
9. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and Risk Factors for Hepatic Steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000;132(2):112. doi:10.7326/0003-4819-132-2-200001180-00004
10. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):637-653. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.008
11. Forlano R, Stanic T, Jayawardana S, et al. A prospective study on the prevalence of <scp>MASLD</scp> in people with type-2 diabetes in the community. Cost effectiveness of screening strategies. *Liver International*. 2024;44(1):61-71. doi:10.1111/liv.15730
12. Nouredin M, Vipani A, Bresee C, et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender

- Variances. *American Journal of Gastroenterology*. 2018;113(11):1649-1659. doi:10.1038/s41395-018-0088-6
13. Wong RJ, Singal AK. Trends in Liver Disease Etiology Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States, 2014-2019. *JAMA Netw Open*. 2020;3(2):e1920294. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.20294
  14. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2021;19(3):580-589.e5. doi:10.1016/j.cgh.2020.05.064
  15. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431
  16. Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022;10(4):284-296. doi:10.1016/S2213-8587(22)00003-1
  17. Ballestri S, Zona S, Targher G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(5):936-944. doi:10.1111/jgh.13264
  18. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019;71(4):793-801. doi:10.1016/j.jhep.2019.06.021
  19. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(8):854-858. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03312.x
  20. Sanyal AJ, Campbell–Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1183-1192. doi:10.1053/gast.2001.23256
  21. Elizabeth M. Brunt. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2004;24(1):3-20. doi:10.1055/s-2004-823098
  22. Canbay A, Kachru N, Haas JS, Sowa J, Meise D, Ozbay AB. Patterns and predictors of mortality and disease progression among patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(7):1185-1194. doi:10.1111/apt.16016
  23. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-133. doi:10.1002/hep.29466

24. Bertot LC, Jeffrey GP, Wallace M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease-related cirrhosis is commonly unrecognized and associated with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Commun.* 2017;1(1):53-60. doi:10.1002/hep4.1018
25. Sanders FWB, Acharjee A, Walker C, et al. Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. *Genome Biol.* 2018;19(1):79. doi:10.1186/s13059-018-1439-8
26. Faccioli LAP, Cetin Z, Kocas-Kilicarslan ZN, et al. Evaluation of Human Hepatocyte Drug Metabolism Carrying High-Risk or Protection-Associated Liver Disease Genetic Variants. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13406. doi:10.3390/ijms241713406
27. Saponaro C, Gaggini M, Gastaldelli A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes: Common Pathophysiologic Mechanisms. *Curr Diab Rep.* 2015;15(6):34. doi:10.1007/s11892-015-0607-4
28. Qi X, Li J, Caussy C, Teng GJ, Loomba R. Epidemiology, screening, and Co-management of type 2 diabetes mellitus and Metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease. *Hepatology.* Published online May 8, 2024. doi:10.1097/HEP.0000000000000913
29. Luukkonen PK, Qadri S, Ahlholm N, et al. Distinct contributions of metabolic dysfunction and genetic risk factors in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2022;76(3):526-535. doi:10.1016/j.jhep.2021.10.013
30. Berná G, Romero-Gomez M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. *Liver International.* 2020;40(S1):102-108. doi:10.1111/liv.14360
31. Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res.* 2007;17(6):669-681. doi:10.1101/gr.6339607
32. Huang G, Wallace DF, Powell EE, Rahman T, Clark PJ, Subramaniam VN. Gene Variants Implicated in Steatotic Liver Disease: Opportunities for Diagnostics and Therapeutics. *Biomedicines.* 2023;11(10):2809. doi:10.3390/biomedicines11102809
33. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):231-237. doi:10.1242/dmm.001180
34. Wajsbrot NB, Leite NC, Franca PHC, Cardoso CRL, Salles GF, Villela-Nogueira CA. Parental History of Type 2 Diabetes Mellitus and PNPLA3 Polymorphism Increase the Risk of Severe Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* Published online December 19, 2023. doi:10.1007/s10620-023-08214-7
35. Moon S, Chung GE, Joo SK, et al. A PNPLA3 Polymorphism Confers Lower Susceptibility to Incident Diabetes Mellitus in Subjects With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2022;20(3):682-691.e8. doi:10.1016/j.cgh.2021.04.038

36. Arslanow A, Stokes CS, Weber SN, Grünhage F, Lammert F, Krawczyk M. The common PNPLA3 variant p.I148M is associated with liver fat contents as quantified by controlled attenuation parameter. *Liver International*. 2016;36(3):418-426. doi:10.1111/liv.12937
37. Strnad P, Buch S, Hamesch K, et al. Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi\*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis. *Gut*. 2019;68(6):1099-1107. doi:10.1136/gutjnl-2018-316228
38. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg JM, et al. Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *J Lipid Res*. 2017;58(1):247-255. doi:10.1194/jlr.P067454
39. Luo F, Oldoni F, Das A. TM6SF2: A Novel Genetic Player in Nonalcoholic Fatty Liver and Cardiovascular Disease. *Hepatol Commun*. 2022;6(3):448-460. doi:10.1002/hep4.1822
40. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018;68(2):268-279. doi:10.1016/j.jhep.2017.09.003
41. Trépo E, Valenti L. Update on NAFLD genetics: From new variants to the clinic. *J Hepatol*. 2020;72(6):1196-1209. doi:10.1016/j.jhep.2020.02.020
42. Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(12):1096-1106. doi:10.1056/NEJMoa1712191
43. Chambers JC, Zhang W, Sehmi J, et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat Genet*. 2011;43(11):1131-1138. doi:10.1038/ng.970
44. Tang S, Zhang J, Mei TT, Zhang WY, Zheng SJ, Yu HB. Association of HSD17B13 rs72613567: TA allelic variant with liver disease: review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):490. doi:10.1186/s12876-021-02067-y
45. Mancina RM, Sasidharan K, Lindblom A, et al. PSD3 downregulation confers protection against fatty liver disease. *Nat Metab*. 2022;4(1):60-75. doi:10.1038/s42255-021-00518-0
46. Janik MK, Smyk W, Kruk B, et al. MARC1 p.A165T variant is associated with decreased markers of liver injury and enhanced antioxidant capacity in autoimmune hepatitis. *Sci Rep*. 2021;11(1):24407. doi:10.1038/s41598-021-03521-3
47. Innes H, Buch S, Hutchinson S, et al. Genome-Wide Association Study for Alcohol-Related Cirrhosis Identifies Risk Loci in MARC1 and HNRNPUL1. *Gastroenterology*. 2020;159(4):1276-1289.e7. doi:10.1053/j.gastro.2020.06.014

48. Emdin CA, Haas ME, Khera A V., et al. A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLoS Genet.* 2020;16(4):e1008629. doi:10.1371/journal.pgen.1008629
49. Lewis LC, Chen L, Hameed LS, et al. Hepatocyte mARC1 promotes fatty liver disease. *JHEP Reports.* 2023;5(5):100693. doi:10.1016/j.jhepr.2023.100693
50. Dutta T, Sasidharan K, Ciociola E, et al. Mitochondrial amidoxime-reducing component 1 p. Ala165Thr increases protein degradation mediated by the proteasome. *Liver International.* Published online February 20, 2024. doi:10.1111/liv.15857
51. Wu M, Tie M, Hu L, et al. Fatty liver disease protective MTARC1 p.A165T variant reduces the protein stability of MTARC1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;702:149655. doi:10.1016/j.bbrc.2024.149655
52. Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *The Lancet.* 2021;398(10308):1359-1376. doi:10.1016/S0140-6736(21)01374-X
53. Benedito J, Carcel JA, Sanjuan N, Mulet A. Use of ultrasound to assess Cheddar cheese characteristics. *Ultrasonics.* 2000;38(1-8):727-730. doi:10.1016/S0041-624X(99)00157-2
54. Patel K, Wilder J. Fibroscan. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2014;4(5):97-101. doi:10.1002/cld.407
55. Oeda S, Tanaka K, Oshima A, Matsumoto Y, Sueoka E, Takahashi H. Diagnostic Accuracy of FibroScan and Factors Affecting Measurements. *Diagnostics.* 2020;10(11):940. doi:10.3390/diagnostics10110940
56. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. Published online 2021.
57. Tapper EB, Parikh ND. Diagnosis and Management of Cirrhosis and Its Complications. *JAMA.* 2023;329(18):1589. doi:10.1001/jama.2023.5997
58. Koehler EM, Plompen EPC, Schouten JNL, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology.* 2016;63(1):138-147. doi:10.1002/hep.27981
59. Mózes FE, Lee JA, Selvaraj EA, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut.* 2022;71(5):1006-1019. doi:10.1136/gutjnl-2021-324243
60. Papatheodoridi M, Hiriart JB, Lupsor-Platon M, et al. Refining the Baveno VI elastography criteria for the definition of compensated advanced chronic liver disease. *J Hepatol.* 2021;74(5):1109-1116. doi:10.1016/j.jhep.2020.11.050
61. [https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2022/10/LL-NAFLD\\_Leitline-deutsch\\_zfg.pdf](https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2022/10/LL-NAFLD_Leitline-deutsch_zfg.pdf).

62. Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2023;77(5):1797-1835. doi:10.1097/HEP.0000000000000323
63. Yilmaz Y. The role of FibroScan in the era of metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease. *Hepatology Forum*. Published online 2023. doi:10.14744/hf.2022.2022.0044
64. Siddiqui MS, Vuppalanchi R, Van Natta ML, et al. Vibration-Controlled Transient Elastography to Assess Fibrosis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(1):156-163.e2. doi:10.1016/j.cgh.2018.04.043
65. Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S. Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand? *World J Gastroenterol*. 2016;22(32):7236. doi:10.3748/wjg.v22.i32.7236
66. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> .
67. Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2022;400(10365):1803-1820. doi:10.1016/S0140-6736(22)01655-5
68. Javeed N, Matveyenko A V. Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiology*. 2018;33(2):138-150. doi:10.1152/physiol.00003.2018
69. Le P, Chaitoff A, Rothberg MB, McCullough A, Gupta NM, Alkhouri N. Population-Based Trends in Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in US Adults With Type 2 Diabetes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(11):2377-2378. doi:10.1016/j.cgh.2018.11.023
70. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6275. doi:10.3390/ijms21176275
71. Magliano DJ, Islam RM, Barr ELM, et al. Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review. *BMJ*. Published online September 11, 2019;l5003. doi:10.1136/bmj.l5003
72. Clodi M, Toplak H, Resl M, et al. Adipositas und Typ-2-Diabetes (Update 2023). *Wien Klin Wochenschr*. 2023;135(S1):91-97. doi:10.1007/s00508-023-02184-6
73. Pelczyńska M, Miller-Kasprzak E, Piątkowski M, et al. The Role of Adipokines and Myokines in the Pathogenesis of Different Obesity Phenotypes—New Perspectives. *Antioxidants*. 2023;12(12):2046. doi:10.3390/antiox12122046
74. Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023). *Wien Klin Wochenschr*. 2023;135(S1):7-17. doi:10.1007/s00508-022-02122-y

75. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-1395. doi:10.1002/hep.20466
76. Meigs JB. The Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes: Opportunities for Health Translation. *Curr Diab Rep*. 2019;19(8):62. doi:10.1007/s11892-019-1173-y
77. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2019;29(5):1028-1044. doi:10.1016/j.cmet.2019.03.009
78. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpour Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(7):994-1003. doi:10.1080/17461391.2019.1571114
79. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7 Suppl):s176-85.
80. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(3):213-215. doi:10.1056/NEJMp068177
81. Loomis AK, Kabadi S, Preiss D, et al. Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):945-952. doi:10.1210/jc.2015-3444
82. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679-689. doi:10.1002/hep.23280
83. Weinstein AR. Relationship of Physical Activity vs Body Mass Index With Type 2 Diabetes in Women. *JAMA*. 2004;292(10):1188. doi:10.1001/jama.292.10.1188
84. Salonen JT, Seppänen K, Rauramaa R, Salonen R. Risk Factors for Carotid Atherosclerosis: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Ann Med*. 1989;21(3):227-229. doi:10.3109/07853898909149939
85. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
86. Karkucinska-Wieckowska A, Simoes ICM, Kalinowski P, et al. Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: A complex relationship. *Eur J Clin Invest*. 2022;52(3). doi:10.1111/eci.13622
87. Zhao Y, Zhou Y, Wang D, et al. Mitochondrial Dysfunction in Metabolic Dysfunction Fatty Liver Disease (MAFLD). *Int J Mol Sci*. 2023;24(24):17514. doi:10.3390/ijms242417514

88. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med.* 2011;32(4-6):234-246. doi:10.1016/j.mam.2011.10.006
89. Banerjee S, Ghosh S, Mandal A, Ghosh N, Sil PC. ROS-associated immune response and metabolism: a mechanistic approach with implication of various diseases. *Arch Toxicol.* 2020;94(7):2293-2317. doi:10.1007/s00204-020-02801-7
90. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2020;152:116-141. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025
91. Li S, Tan HY, Wang N, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26087-26124. doi:10.3390/ijms161125942
92. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal.* 2016;473(24):4527-4550. doi:10.1042/BCJ20160503C
93. Luc K., Schramm-Luc A., Guzik T.J., Mikolajczyk T.P. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2019;70(6):809-824.
94. Paradies G. Oxidative stress, cardiopilin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14205. doi:10.3748/wjg.v20.i39.14205
95. Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF, Vasan RS, Benjamin EJ. Association of Oxidative Stress, Insulin Resistance, and Diabetes Risk Phenotypes. *Diabetes Care.* 2007;30(10):2529-2535. doi:10.2337/dc07-0817
96. Nam H, Lim JH, Kim TW, et al. Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Hepatic Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease through the Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation. *Antioxidants.* 2023;12(12):2040. doi:10.3390/antiox12122040
97. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
98. World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA.* 2013;310(20):2191. doi:10.1001/jama.2013.281053
99. Shen M, Lee A, Lefkowitz JH, Worman HJ. Vibration-controlled Transient Elastography for Assessment of Liver Fibrosis at a USA Academic Medical Center. *J Clin Transl Hepatol.* 2022;10(2):197-206. doi:10.14218/JCTH.2021.00188

100. Luukkonen PK, Juuti A, Sammalkorpi H, et al. MARC1 variant rs2642438 increases hepatic phosphatidylcholines and decreases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J Hepatol.* 2020;73(3):725-726. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.021
101. Schneider C V., Schneider KM, Conlon DM, et al. A genome-first approach to mortality and metabolic phenotypes in MTARC1 p.Ala165Thr (rs2642438) heterozygotes and homozygotes. *Med.* 2021;2(7):851-863.e3. doi:10.1016/j.medj.2021.04.011
102. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, et al. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol.* 2010;10(1):40. doi:10.1186/1471-230X-10-40
103. Lomonaco R, Godinez Leiva E, Bril F, et al. Advanced Liver Fibrosis Is Common in Patients With Type 2 Diabetes Followed in the Outpatient Setting: The Need for Systematic Screening. *Diabetes Care.* 2021;44(2):399-406. doi:10.2337/dc20-1997
104. Choi YS, Beltran TA, Calder SA, Padilla CR, Berry-Cabán CS, Salyer KR. Prevalence of Hepatic Steatosis and Fibrosis in the United States. *Metab Syndr Relat Disord.* 2022;20(3):141-147. doi:10.1089/met.2021.0111
105. Silveira Rossi JL, Barbalho SM, Reverete de Araujo R, Bechara MD, Sloan KP, Sloan LA. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab Res Rev.* 2022;38(3). doi:10.1002/dmrr.3502
106. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol.* 2016;65(3):589-600. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.013
107. Choudhary NS, Duseja A. Screening of Cardiovascular Disease in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Whom and How? *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9(4):506-514. doi:10.1016/j.jceh.2019.02.005
108. Schwantes-An T, Darlay R, Mathurin P, et al. Genome-wide Association Study and Meta-analysis on Alcohol-Associated Liver Cirrhosis Identifies Genetic Risk Factors. *Hepatology.* 2021;73(5):1920-1931. doi:10.1002/hep.31535
109. Sveinbjornsson G, Ulfarsson MO, Thorolfsdottir RB, et al. Multiomics study of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2022;54(11):1652-1663. doi:10.1038/s41588-022-01199-5
110. <https://www.ensembl.org/index.html>.
111. Vilar-Gomez E, Pirola CJ, Sookoian S, Wilson LA, Liang T, Chalasani N. The Protection Conferred by HSD17B13 rs72613567 Polymorphism on Risk of Steatohepatitis and Fibrosis May Be Limited to Selected Subgroups of Patients With NAFLD. *Clin Transl Gastroenterol.* 2021;12(9):e00400. doi:10.14309/ctg.0000000000000400
112. Longo M, Meroni M, Paolini E, et al. TM6SF2/PNPLA3/MBOAT7 Loss-of-Function Genetic Variants Impact on NAFLD Development and Progression Both in Patients and

- in *In Vitro Models. Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2022;13(3):759-788. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.11.007
113. Lavrado NC, Salles GF, Cardoso CRL, et al. Impact of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on the prognosis of patients with MASLD and type 2 diabetes mellitus. *Liver International*. Published online January 31, 2024. doi:10.1111/liv.15845
114. Wang X, Liu Z, Wang K, et al. Additive Effects of the Risk Alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population. *Front Genet.* 2016;7. doi:10.3389/fgene.2016.00140
115. Fan Y, Wolford BN, Lu H, et al. Type 2 diabetes sex-specific effects associated with E167K coding variant in TM6SF2. *iScience.* 2021;24(11):103196. doi:10.1016/j.isci.2021.103196
116. Rixen S, Indorf PM, Kubitzka C, et al. Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes. *Molecules.* 2023;28(17):6384. doi:10.3390/molecules28176384
117. Kubitzka C, Bittner F, Ginsel C, Havemeyer A, Clement B, Scheidig AJ. Crystal structure of human mARC1 reveals its exceptional position among eukaryotic molybdenum enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(47):11958-11963. doi:10.1073/pnas.1808576115
118. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005;42(5):1208-1236. doi:10.1002/hep.20933
119. Pippitt K, Li M, Gurgle HE. Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis. *Am Fam Physician.* 2016;93(2):103-109.
120. Alexopoulos A, Crowley MJ, Wang Y, et al. Glycemic Control Predicts Severity of Hepatocyte Ballooning and Hepatic Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2021;74(3):1220-1233. doi:10.1002/hep.31806

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in der Abteilung der Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg durchgeführt worden. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ausgesprochener Dank gilt folgenden Personen, deren Hilfe für diese Arbeit unabdingbar gewesen ist:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Marcin Krawczyk für die Möglichkeit diese Arbeit und Dissertation durchführen zu können, für seine motivierende und hilfreiche Betreuung, sein Vertrauen und Interesse.

Den MitarbeiterInnen der hepatologischen und diabetologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin II, insbesondere Frau Dr. med. Silva Yusefpur und Frau Stefanie Jürgen, für ihre Unterstützung bei der Erhebung der klinischen Daten.

Allen MitarbeiterInnen des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin II, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber, Frau Irina Lambert und Frau Senem Özen-Karatayli, für die stetige Mitbetreuung, die hilfreiche Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit.

Von Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in jedem Abschnitt des humanmedizinischen Studiums bis hin zum Berufsbeginn jederzeit unterstützten. Ein großes Dankeschön gilt an meinen Freunden, die mich stets motivierten und mir in allen Situationen zur Seite standen.

# Lebenslauf

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