

Masterarbeit

**Assoziation der hepatischen DPP-4 und Glucagon-like Peptide-2
Rezeptor mRNA-Expression im Rahmen der nicht-alkoholischen
Fettlebererkrankung**

eingereicht von

Tamara Kalchbrenner

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des

Universitätslehrgangs Master of Science Medizinische Genetik

am

Landeskrinikum Wiener Neustadt

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof. Mag. DDr. Erwin Petek

und

Dr. med. univ. Markus Ammann

Rettenbach, 16. August 2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rettenbach, 16. August 2022

Tamara Kalchbrenner eh

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	1
Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Zusammenfassung.....	6
Abstract.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Definition der NAFLD	10
1.2 Klassifikation der NAFLD	10
1.2.1 Nicht-alkoholische Fettleber	10
1.2.2 Nicht-alkoholische Steatohepatitis.....	11
1.3 Pathophysiologie der NAFLD	12
1.3.1 Gestörte Lipolyse.....	15
1.3.2 Proinflammatorische Zytokine	16
1.3.3 Sekretion von Adiponektin.....	16
1.3.4 Genetische Modifikatoren.....	17
1.3.5 Epigenetische Faktoren.....	17
1.3.6 Weitere Einflüsse.....	18
1.4 Therapie der NAFLD.....	19
1.5 Suche nach neuen therapeutischen Targets.....	19
1.5.1 Genetik des Glucagon-like Peptide-2	20
1.5.2 Wirkung des Glucagon-like Peptide-2	20
1.5.3 Genetik des Glucagon-like Peptide-2 Rezeptors.....	21
1.5.4 Expression des Glucagon-like Peptide-2 Rezeptors.....	21
1.5.5 Genetik der Dipeptidylpeptidase-4.....	23
1.5.6 Wirkung der Dipeptidylpeptidase-4.....	24

1.6	Ziel der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Studieninformation	26
2.2	Patientenkollektiv	26
2.3	Histologische Aufarbeitung und Prognosebewertung	26
2.3.1	NASH-CRN-System	27
2.3.2	SAF-Score nach Bedossa	28
2.4	Molekulargenetische Expressionsanalyse	30
2.4.1	Extraktion der RNA aus FFPE-Gewebe	30
2.4.2	Quantifizierung der RNA.....	31
2.4.3	mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR	31
2.4.4	Analyse der ermittelten Daten	32
3	Ergebnisse.....	32
3.1	mRNA-Expression bei NAS 1-3	32
3.2	mRNA-Expression bei Steatosegrad 0-3	33
3.3	mRNA-Expression bei Fibrosegrad 0-4.....	34
3.4	mRNA-Expression bei Inflammationsgrad 1-2	34
3.5	Korrelationsanalyse der mRNA-Expressionen	35
4	Diskussion und Zusammenfassung.....	36
5	Literaturverzeichnis	45

Abkürzungsverzeichnis

CRN	Clinical Research Network
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
FFPE	Formalin-fixed paraffin embedded
Gcg	Präproglucagon-Gen
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLP-2	Glucagon-like Peptide-2
GLP-2R	Glucagon-like Peptide-2 Rezeptor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HSC	Hepatische Sternzelle
IR	Insulinresistenz
KC	Kupfferzelle
LEC	Leberendothelzelle
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
NAFL	Nicht-alkoholische Fettleber
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD Activity Score
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain containing 3
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAF-Score	Steatose-Aktivität-Fibrose-Score
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Histologische Charakteristika der Steatohepatitis (3)	11
Abbildung 2	Schematische Darstellung exogener und endogener Faktoren (3).	14
Abbildung 3	Auswirkung der Insulinresistenz auf die Leber (3)	15
Abbildung 4	NAFLD Activity Score (NAS) nach Kleiner et al. (5).....	27
Abbildung 5	Staging der Steatohepatits nach Kleiner et al. (5).....	28
Abbildung 6	Steatosis-Activity-Fibrosis-Score (SAF) nach Bedossa (34).....	29
Abbildung 7	Algorithmus des SAF-Scores (34)	29
Abbildung 8	mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei NAS 1-3	33
Abbildung 9	mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Steatose 0-3	33
Abbildung 10	mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Fibrose 0-4	34
Abbildung 11	mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Inflammation 1-2	35
Abbildung 12	Korrelation der mRNA-Expressionen von GLP-2R und DPP-4.....	35

Zusammenfassung

Hintergrund: Mit einer globalen Prävalenz von etwa 25% ist die NAFLD die häufigste chronische Lebererkrankung in der westlichen Welt. Da bislang keine medikamentöse Therapie zur Verfügung steht, um das Fortschreiten der NAFLD zur NASH zu minimieren und/oder zu verhindern, sucht man in der Forschung nach Behandlungsansätzen. Die Assoziation der NAFLD mit der DPP-4-Expression konnte mehrfach im Tiermodell und am Menschen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene dargestellt werden. Jüngste Studien deckten eine mögliche therapeutische Wirkung von DPP-4-Inhibitoren in der Diabetestherapie auf. Weiters zeigte GLP-2 mit seiner intestinotropen Eigenschaft bei Mäusen nach partieller Hepatektomie eine signifikante Verbesserung der postoperativen Leberregeneration, weshalb derzeit diskutiert wird, ob es positive Auswirkungen auf die NAFLD hat.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die hepatische mRNA-Expression von DPP-4 mit pathologischen Befunden in Verbindung steht, die eine Leberschädigung nach den Kriterien des NAFLD Activity Scores widerspiegeln. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression des GLP-2R und histopathologischen Befunden bei der NAFLD analysiert. Weiters sollte ermittelt werden, ob es eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von DPP-4 und GLP-2R im Lebergewebe gibt, die auf einen möglichen physiologischen Rettungsweg hinweist.

Material und Methode: RNA aus FFPE-Lebergewebe von Patient*innen, die sich aufgrund verschiedener Indikationen einer Leberresektion unterzogen hatten, wurde extrahiert und mittels quantitativer RT-PCR die mRNA-Expression von DPP-4 und GLP-2R gemessen. Für die Quantifizierung wurde die Expression der DPP-4 und des GLP-2R auf das Housekeeping-Gen H6PDH normalisiert.

Ergebnisse: Im Gruppenvergleich konnte nach Kategorisierung des Patientenkollektivs nach NAS1-3, Steatosegrad, Inflammationsgrad und Fibrosegrad kein statistisch signifikanter Unterschied der mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R dargestellt werden. Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der hepatischen mRNA-Expression der DPP-4 und jener des GLP-2R.

Konklusion: Nach Stratifizierung des Patientenkollektivs entsprechend den Kriterien des NAFLD Activity Scores in NAS 1-3, Steatosegrad 0-3, Inflammationsgrad 1-2 und Fibrosegrad 0-4 zeigte die mRNA-Expressionsanalyse der DPP-4 und des GLP-2R keinen Unterschied zwischen den einzelnen Stadien. Eine Korrelation der hepatischen mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R wurde festgestellt. Die dahinterstehende Kausalität kann mit dem derzeitigen Wissen nicht erklärt werden.

Schlagworte: NAFLD, mRNA-Expression, DPP-4, GLP-2R

Abstract

Background: With a global prevalence of about 25%, NAFLD is the most common chronic liver disease in the Western world. Since no drug therapy is yet available to minimize and/or prevent the progression of NAFLD to NASH, researchers are searching for treatment approaches. The association of NAFLD with DPP-4 expression has been demonstrated several times in animal models and in humans at both protein and mRNA levels. Latest studies have unraveled a potential therapeutic effect for DPP-4 inhibitors used in diabetes therapy. The intestinotropic property of GLP-2 showed also a significant improvement in postoperative liver regeneration in mice after partial hepatectomy and is currently being discussed to have also beneficial effects on NAFLD.

In this work, we investigated whether hepatic mRNA expression of DPP-4 is associated with pathological findings reflecting liver injury according to NAFLD Activity Score criteria. In addition, we analyzed the association between mRNA expression level of the GLP-2R and histopathological findings in NAFLD. Furthermore, we determined whether there is a correlation between mRNA expressions of DPP-4 with GLP-2R in liver tissue indicating a possible physiologic rescue pathway.

Materials and methods: RNA was extracted from FFPE liver tissue of histological specimens of patients who underwent liver resections for different indications, and quantitative RT-PCR was used to measure the mRNA expression level of the DPP-4 and GLP-2R. For quantification, the expression of DPP-4 and GLP-2R was normalized to the housekeeping gene H6PDH.

Results: In the group comparison, after categorization of the patient collective according to NAS 1-3, steatosis grade, inflammation grade and fibrosis grade, no statistically significant difference in the mRNA expression of DPP-4 and GLP-2R could be detected. Spearman's correlation analysis showed a statistically significant correlation between hepatic mRNA expression of DPP-4 and that of GLP-2R.

Conclusion: After stratifying the patient population according to the criteria of the NAFLD activity score into NAS 1-3, steatosis grade 0-3, inflammation grade 1-2 and fibrosis grade 0-4, mRNA expression analysis of DPP-4 and GLP-2R showed no difference between the stages. A correlation of hepatic mRNA expression of DPP-4

and GLP-2R was observed. The underlying causality cannot be explained with the current knowledge.

Keywords: NAFLD, mRNA expression, DPP-4, GLP-2R

1 Einleitung

1.1 Definition der NAFLD

Die häufigste chronische Lebererkrankung in der westlichen Welt ist die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, kurz NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) genannt. Der Terminus NAFLD beschreibt eine Form der Leberveränderung, die histologisch einer alkoholbedingten hepatischen Änderung ähnelt, jedoch kein „nennenswerter Alkoholkonsum vorliegt. Sie ist durch eine übermäßige Fettansammlung in der Leber gekennzeichnet, die mit einer Insulinresistenz (IR) einhergeht und durch das Vorhandensein einer Steatose in >5% der Hepatozyten gemäß der histologischen Analyse definiert ist“ (1). Betroffen sind von der NAFLD etwa 17-46% der Erwachsenen (1). Die globale Prävalenz liegt bei etwa 25%. Der Anstieg der Zahl an Betroffenen korreliert eng mit der zunehmenden Prävalenz des metabolischen Syndroms (2).

1.2 Klassifikation der NAFLD

Die NAFLD ist ein Übergriff für zwei pathologisch differente Erkrankungen, die sich sowohl histologisch, als auch prognostisch unterscheiden: die nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) (1). Während eine ausgeprägte Fettleber einfach mittels Ultraschalluntersuchung erkannt werden kann, ist die Histologie der Leberbiopsie der Goldstandard in der Abklärung und Prognoseabschätzung bei NAFLD. Dies erfolgt durch zwei Bewertungssysteme, die neben der Steatose, der lobulären und portalen Inflammation als auch der Ballonierung der Hepatozyten als Zeichen von zellulärem Stress und Schaden semiquantitativ das Fibroestadium erfassen (3). Hierfür gibt es anerkannte Bewertungssysteme, worauf im Methodenteil näher eingegangen wird.

1.2.1 Nicht-alkoholische Fettleber

Die nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) stellt das initiale Stadium der NAFLD dar und beschreibt eine weitgehend harmlose Ansammlung von Fetten in der Leber. Kennzeichnend für diese Steatose ist ein Leberfettgehalt von >5% (4). Histologisch zeigt sich das Bild einer grobvakuolären Verfettung mit einzelnen rupturierten Hepatozyten, die zu sogenannten „Fetzysten“ fusionieren und bedingt durch eine

inflammatorische Zellinfiltration die Bildung von Lipogranulomen verursachen. Die Lipidablagerung tritt in der Regel anfangs perizentral in Zone 3 auf, die jedoch in schweren Fällen den gesamten Azinus betreffen kann (3).

1.2.2 Nicht-alkoholische Steatohepatitis

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist die progressive Form der NAFLD. Der Übergang von der Steatose zur Steatohepatitis verläuft fließend. Der Begriff „Steatohepatitis“ beschreibt entzündliche Veränderungen infolge einer Parenchymverfettung und resultiert aufgrund des fibrotischen Parenchyumbaues in einer Zirrhose. Zu den histologischen Charakteristika, die den Leberzellschaden verursachen und das Gesamtbild der NASH ergeben, zählen die Verfettung, die hepatozelluläre Ballonierung, die Nekrose samt Apoptose sowie entzündliche Zellinfiltrate und eine perisinusoidale (Maschendraht-)Fibrose in Zone 3 (Abb. 1). Die hepatozelluläre Ballonierung beschreibt die Zellschwellung und die damit verbundene Transparenz des Zytoplasmas aufgrund zytoplasmatischer Flüssigkeitsansammlung oder eines toxischen Zellschadens (5).

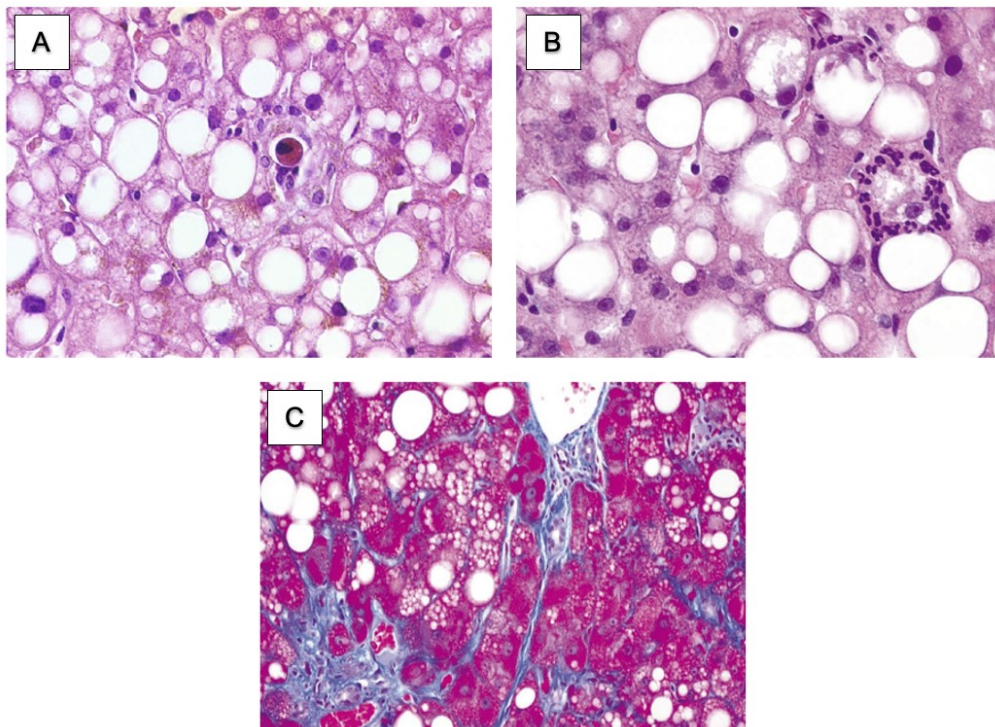


Abbildung 1 Histologische Charakteristika der Steatohepatitis (3)

A) Fettleber mit apoptotischen Leberzellen; B) Verfettete und ballionierte Hepatozyten in Anwesenheit neutrophiler Granulozyten, die eine geschädigte Leberzelle umringen; C) Maschendrahtfibrose mit grob- und feinvakuolärer Leberverfettung (3)

Von großer diagnostischer Relevanz ist die Abgrenzung der „einfachen“ Leberzellverfettung von der Steatohepatitis (5), da die NASH als eine der Hauptursachen des hepatozelluläre Karzinoms (HCC) gilt. Aufgrund der entzündlichen Prozesse bei der NASH wird die hepatische Fibrose begünstigt, infolgedessen steigt das Risiko eines Progresses zur Leberzirrhose und eines HCC (6). Groß angelegte epidemiologischen Studien konnten demonstrieren, dass die Koexistenz von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 das HCC-Risiko erhöhen. Jene Patient*innen, die am NAFLD-assoziierten HCC leiden, sind für gewöhnlich zum Zeitpunkt der Diagnose älter als jene, die vom nicht-NAFLD-assoziierten HCC betroffen sind. Zusätzlich weisen sie mehr extrahepatische Komorbiditäten auf, jedoch eine geringere Zirrhose-Prävalenz (1). Prognosen sagen voraus, dass die Zirrhose als Folgeerscheinung der NASH Hauptursache für Lebertransplantationen sein wird (7). Mit Hilfe von Daten wiederholter, serieller Leberbiopsien von Betroffenen über mehrere Jahre hinweg konnte demonstriert werden, dass der Verlauf der NAFLD von der Steatose bis hin zur NASH keinen linearen Verlauf zeigt, sondern dynamischer als angenommen ist. Die Fibrosefortschrittsrate bei einer einfachen Steatose liegt etwa bei 14 Jahren pro Fibrorestadium, während der Progress um ein histologisches Fibrorestadium bei NASH geschätzt alle 7 Jahren beobachtet wird. Weiters zeigen Daten, dass mit zunehmendem Fibrorestadium das Risiko der Mortalität exponentiell wächst und die NAFLD die Lebenserwartung um durchschnittlich vier Jahre reduziert (2). Warum es in manchen Fällen bei der Steatose bleibt, bei anderen jedoch lediglich nekroinflammatorische, fibrotische Veränderungen auftreten, ist bislang nicht bekannt (3).

1.3 Pathophysiologie der NAFLD

Die NAFLD stellt eine hochkomplexe und heterogene Multisystemerkrankung dar, bei der verschiedenste Faktoren ineinandergreifen, die zum charakteristischen Krankheitsbild mit Entzündungen, Lipotoxizität, Insulinresistenz und Darmdysbiose führen (8). Ursächlich für eine NAFLD sind häufig Adipositas, ein metabolisches Syndrom im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 und Mangelernährung (5). Laut WHO ist zu erwarten, dass die Zahlen der an NAFLD-Erkrankten durch den Anstieg an Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sowie einer alternden Bevölkerung weiter zunehmen werden (6). Der Begriff metabolisches Syndrom beschreibt eine Reihe

von Stoffwechselanomalien, die entweder ursächlich für eine Insulinresistenz sind oder als Folge davon abgeleitet werden können. Dazu zählen neben Diabetes mellitus Typ 2, Hypertriglyceridämie und einem niedrigen HDL-Cholesterin, ein erhöhter Taillenumfang und/oder Bluthochdruck. Liegt ein metabolisches Syndrom mit einer erhöhten Triglyceridansammlung in der Leber sowie eine hepatische Insulinresistenz vor, zu deren Ursachen weder Alkohol (weniger als 20g Alkohol pro Tag bei Männern bzw. <10g/d bei Frauen), Viren (z. B. Hepatitis C), Medikamente (z.B. Methotrexat) etc. zählen, spricht man bei dieser Art von Steatose von der NAFLD. Das metabolische Syndrom kann somit als Risikoprädiktor für die NASH gesehen werden (9), im Umkehrschluss die NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms (10). Grundsätzlich haben Patient*innen mit einer NAFLD eine erhöhte Gesamtmortalität, wobei kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigere Todesursache als leberzellassozierte Veränderungen sind (11). In Bezug auf Mortalität und Morbidität bei Lebererkrankungen wird der NAFLD mittlerweile eine tragende Rolle zuteil (6). Bedingt durch Übergewicht im Kindes- und Jugendalter steigt das NAFLD-Risiko im Erwachsenenalter. Folglich wird der Grundstein für leberbedingte Morbidität und/oder Mortalität bereits im jungen Alter gesetzt und mit metabolischen Komorbiditäten eine zusätzliche Belastung für das Gesundheitssystem geschaffen. Als logische Konsequenz daraus sollte die NAFLD nicht als autonome Lebererkrankung betrachtet werden, sondern als Teil einer Systemerkrankung (2).

Anfänglich beschrieb man die Pathogenese der NAFLD anhand einer „2 hit“-Hypothese. Kennzeichnend für den „1st hit“ ist die Steatose und Manifestation der Insulinresistenz. Der „2nd hit“ resultiert aus dem „1st hit“ und beschreibt entzündliche hepatische Vorgänge. Man geht davon aus, dass zusätzliche molekulare, epigenetische und metabolische Faktoren an der Pathogenese beteiligt sind, weshalb die „2 hit“-Hypothese mittlerweile in eine „multiple hit“-Hypothese umgeändert wurde (12). Wie Abbildung 2 zeigt, ist das Krankheitsbild der NAFLD auf ein multifaktorielles Geschehen zurückzuführen. Da die Bedeutung der einzelnen Einflüsse, die mit der Entwicklung und dem Fortschreiten dieser chronischen Krankheit in Verbindung stehen, bislang nicht vollends geklärt ist, wird im Folgenden auf die pathogenetische Bedeutung der Insulinresistenz sowie auf endogene und exogene Faktoren, die zum einen direkt an der Pathogenese der

NAFLD beteiligt sind, zum anderen indirekt durch ihre Insulinresistenz-fördernde Wirkung zum Krankheitsbild beitragen, näher eingegangen (7).

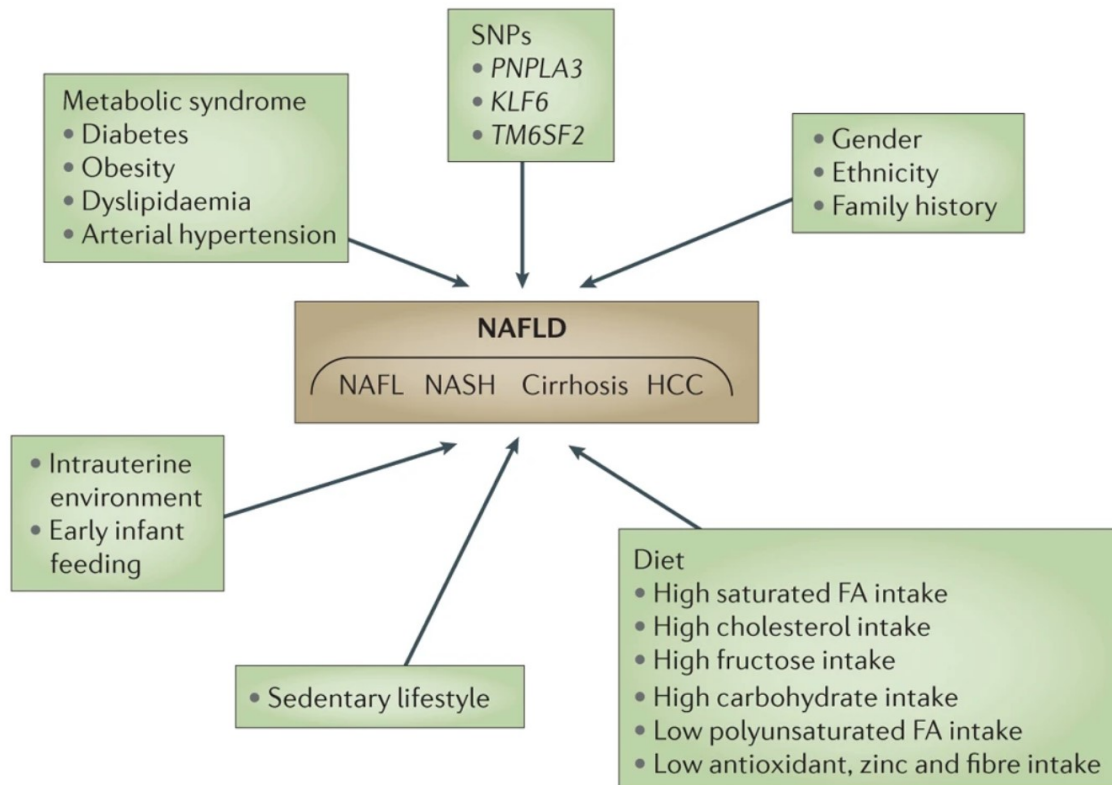


Abbildung 2 Schematische Darstellung exogener und endogener Faktoren (3)

„Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Insulinresistenz (IR) und NAFLD, wobei die Prävalenz von NAFLD bei Patienten mit Diabetes im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes um das Fünffache höher ist. Die IR ist sowohl an der Pathogenese der NAFLD als auch am Fortschreiten der Krankheit von Steatose zu NASH beteiligt (Abb. 3). Daher stellt die Modulation der IR eine potenzielle Strategie für die Behandlung der NAFLD dar“ (7).

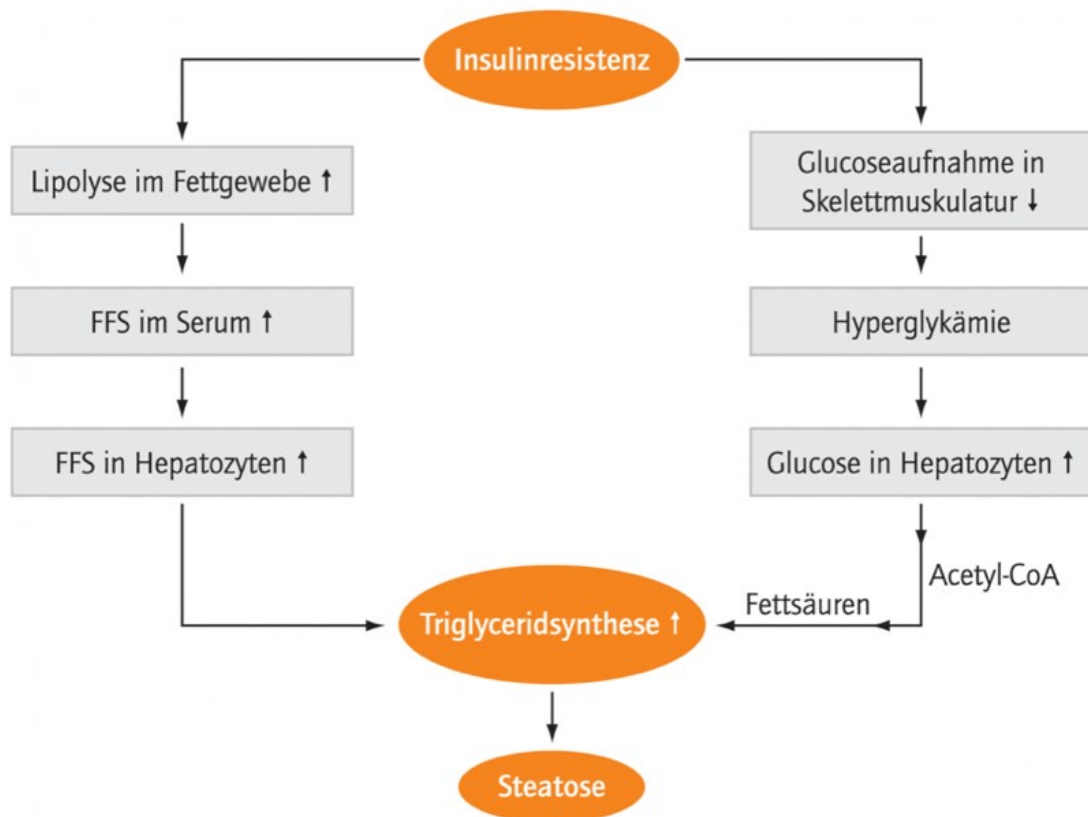


Abbildung 3 Auswirkung der Insulinresistenz auf die Leber (3)

1.3.1 Gestörte Lipolyse

Betroffen vom metabolischen Syndrom und von der NAFLD sind hauptsächlich adipöse Personen (9). Als „1st hit“ und somit essentiell in der Entstehung der NAFLD kann die hepatische Lipidakkumulation beschrieben werden. Ursächlich dafür ist eine erhöhte Lipolyse im Fettgewebe. Wegen einer hyperkalorischen Ernährung und Insulinresistenz kommt es zu Störungen im hepatischen Lipidstoffwechsel (12). Aufgrund der Gewichtszunahme und der deutlichen Ausdehnung des Fettgewebes wird die Funktion der Fettzellen gestört und der Zelltod tritt ein. Hypoxie und vermehrte Infiltration von Makrophagen im Fettgewebe fördern die Expression von Chemokinen und die Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen. Diese lokale Entzündung hemmt die Adipozyten in der Fettspeicherung. Nicht veresterte freie Fettsäuren gelangen in den Blutkreislauf. Über die FATP5-Transporter (Fettsäure-Transportprotein 5) werden diese von den Hepatozyten aufgenommen, angehäuft und fördern die Synthese von Triglyceriden. Dabei entstehen Diacylglycerin-Zwischenprodukte, welche die hepatische Insulinsignalisierung

durch die Aktivierung der Proteinkinase C ϵ stören. Infolgedessen stimuliert die hepatische Insulinresistenz die Glukoneogenese, die bedingt durch die Hyperglykämie in einer kompensatorischen Insulinproduktion resultiert. Somit ist die Leber nicht nur einer hohen Konzentration an zirkulierenden freien Fettsäuren ausgesetzt, sondern auch hohen Insulinspiegeln, um die systemische Insulinresistenz zu kompensieren (4).

1.3.2 Proinflammatorische Zytokine

Die übermäßige Zufuhr an freien Fettsäuren und eine übermäßige Lipidakkumulation verursachen eine hepatozelluläre Schädigung, die eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interleukinen sowie eine für die NAFLD charakteristische chronische Entzündung der Leber zu Folge hat (12). Weiters regt TNF- α die Lipolyse der Adipozyten an, fördert die Aktivierung von stressbedingten Proteinkinasen und Inhibitoren, welche zur Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats 1 beitragen und die Insulinsignalisierung abschwächen (7).

1.3.3 Sekretion von Adiponektin

Adiponektin gehört zur Gruppe der Adipozytokinen und zeigt in den Endothelzellen eine entzündungshemmende Wirkung durch die Regulierung von proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen. Zusätzliche Funktionen des Adiponektins sind unter anderem die Kontrolle der Makrophagenfunktion, die Hemmung von endothelialen Zytokinen und die Induktion antiinflammatorischer Zytokine (8). Adiponektin wird hauptsächlich von Adipozyten produziert sowie sezerniert und hat eine positive Wirkung auf die Insulinempfindlichkeit. Obwohl es in hoher Konzentration im Blutkreislauf zirkuliert, konnte gezeigt werden, dass der Plasmaspiegel bei NAFLD-Betroffenen mit Insulinresistenz deutlich vermindert ist als bei jenen ohne NAFLD. Adiponektin unterstützt die Fettsäure- β -Oxidation, die Glukoseverwertung und hemmt die Fettsäuresynthese. Im Mausmodell für Diabetes wurde demonstriert, dass die Gabe von Adiponektin-Rezeptor-Agonisten eine verbesserte Insulinempfindlichkeit zur Folge hatte (7).

1.3.4 Genetische Modifikatoren

Zwillings- und Aggregationsstudien konnten zeigen, dass bei der NAFLD eine genetische Prädisposition vorliegen kann. Als Risikofaktoren gelten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in oder neben Genen, die in der hepatischen Homöostase und im Lipidstoffwechsels, in der VLDL-Sekretion und im Kohlenhydratstoffwechsel involviert sind (13). In genomweiten Assoziationsstudien wurden die Gene PNPLA3 und TM6SF2 als genetische Modifikatoren identifiziert (1). Es konnte demonstriert werden, dass das PNPLA3 Gen, das für Ile148Met (rs738409 C/G) codiert, in der Hydrolyse von Triacylglycerinen in Adipozyten involviert ist, während das für E167K (rs58542926 C/T) codierende TM6SF2 zum Funktionsverlust des Proteins des Lipidtransporters im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im ER-Golgi-Kompartiment führt, wodurch es wiederum zur gesteigerten hepatischen Ablagerung von Triglyceriden kommt (14). Darüber hinaus wurden Varianten in weiteren Genen identifiziert, die mit einer NAFLD-Prädisposition oder dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert werden können, jedoch erfordern diese Daten und Ergebnisse weitere Studien (13).

1.3.5 Epigenetische Faktoren

Im Zusammenspiel mit vererbten Risikofaktoren scheinen epigenetische Veränderungen, die als Reaktion auf bestimmte Umweltfaktoren (z. B. Ernährung) auftreten, das Krankheitsrisiko zu beeinflussen. Aufgrund der transgenerationalen Übertragung der epigenetischen Veränderungen wird die Entwicklung von Stoffwechselkrankheiten im späteren Leben teilweise vom maternalen Phänotyp und von der intrauterinen Umgebung gesteuert (15). Da die Modulation der epigenetischen Mechanismen durch Umweltreize beeinflusst wird, sind sie zwar reversibel, jedoch kann ihr Ungleichgewicht zur Entstehung von massiven Störungen führen (16). Sowohl am Mausmodell als auch an Studien mit Menschen konnte gezeigt werden, dass epigenetische Veränderungen, die Modifikationen umfassen, welche zur Veränderung der Genexpression und infolgedessen des Phänotyps führen, mit den Pathomechanismen der NAFLD assoziiert werden können. Hierzu zählen veränderte DNA-Methylierungsmuster, Histonmodifikationen sowie die Expression von miRNAs (15). Neben der Entwicklung einer Insulinresistenz aufgrund abweichender Histonmodifikationen, scheint vor allem

eine abnorme DNA-Methylierung erhebliche Auswirkung auf die Genexpression zu haben und fördernd für die Entwicklung eines NAFLD-assoziierten hepatozellulären Karzinoms zu sein. Aufgrund diverser Metaboliten wie Insulin, Glukose und Lipide kommt es zur Störung der Genregulation auf epigenetischer Ebene, die eine proinflammatorische Wirkung auf den Körper zur Folge hat und Stoffwechselfvorgänge beeinflusst. Weiters ist die DNA-Methylierung in Veränderungen von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Aktuell liegt seitens der Forschung die Aufmerksamkeit auf den MicroRNAs (miRNA), weil sie regulativ in die Genexpression eingreifen und die Übersetzung von Proteinen beeinflussen. Da sie unter anderem in Zellaktivitäten wie Differenzierung, Entwicklung, Proliferation und Apoptose involviert sind, führt eine Deregulation der miRNAs zu pathologischen Veränderungen, weshalb sie aufgrund des karzinomfördernden Potenzials als Onkogene oder Tumorsuppressorgene klassifiziert werden können. Von großer Bedeutung ist hierbei die am häufigsten in der Leber exprimierte MicroRNA miR-122, die eine tumorsuppressive Eigenschaft zu haben scheint. Während der Steatohepatitis wird sie gehemmt, wodurch das Silencing von miR-122 als neuartiger Marker für die frühe Phase des Übergangs der NASH zum HCC verwendet und somit zur Unterscheidung zwischen Steatohepatitis und Leberkarzinomen herangezogen werden könnte. Aufgrund ihres Abbaus durch endogene RNasen und ihrer Wirkung auf verschiedene Organe ist der therapeutische Einsatz von miRNAs bislang aber nicht möglich (16).

1.3.6 Weitere Einflüsse

Neben Umweltfaktoren (Ernährung, körperliche Aktivität, etc.) scheint die Darm-Leber-Achse eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Progredienz der NAFLD zu spielen (12). Es ist bekannt, dass die Darmmikrobiota von NAFLD-Patient*innen different zu jener von gesunden Menschen ist. Einerseits werden Veränderungen in der Darmmikrobiota mit Fettleibigkeit assoziiert, andererseits führt eine intestinale Dysbiose zur Abschwächung der Darmbarriere (4). Studien an Mäusen konnten zeigen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Darmmikrobiota und der NAFLD besteht. Mäuse ohne Darmmikrobiota waren resistent gegenüber Fettleibigkeit und Lebersteatose, während keimfreie Mäuse

nach Transplantation der fäkalen Mikrobiota von Mäusen mit dem metabolischen Syndrom unabhängig von der Ernährung eine Lebersteatose entwickelten (17).

1.4 Therapie der NAFLD

Von der Food and Drug Administration (FDA) wurde bis dato kein Medikament zur Behandlung der NAFLD zugelassen (8). Derzeit beinhaltet die Therapie neben der Änderung des Lebensstils (Gewichtsreduktion und – normalisierung, körperliche Aktivität etc.), die Kontrolle von metabolischen Risikofaktoren (Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie, Insulinresistenz) und pharmakologischen Behandlungen, insbesondere jene von kardiovaskulären Risikofaktoren. Seitens der Arzneimittelforschung ist man bemüht, therapeutische Targets zu finden, die das Fortschreiten der NAFL zur NASH minimieren und/oder verhindern, weil bislang ausschließlich für NASH-Patient*innen eine medikamentöse Therapie zur Verfügung steht (18).

1.5 Suche nach neuen therapeutischen Targets

Da die Insulinresistenz eine Schlüsselfigur in der Entstehung der NAFLD zu sein scheint, konzentriert man sich einerseits auf Faktoren, die im Glukosestoffwechsel involviert sind, andererseits auf Targets, die bei der Stimulation der Leberregeneration beteiligt sind. Es ist bekannt, dass DPP-4 durch die Inaktivierung von GLP-1 und der damit verbundenen Insulinresistenz eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukosestoffwechsels einnimmt. Durch Nahrungsaufnahme wird neben GLP-1 auch GLP-2 von den enteroendokrinen Zellen sezerniert. GLP-2 ist in seiner Aminosäuresequenz dem GLP-1 sehr ähnlich, besitzt jedoch im Gegensatz zu GLP-1 keine insulinotrope Wirkung, sondern zeigt eine intestinotrope Aktivität. Aufgrund der Tatsache, dass in mehreren experimentellen und empirischen Studien beobachtet werden konnte, dass im Tiermodell und am Menschen sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene eine mögliche Assoziation der DPP-4-Expression mit der NAFLD-Entstehung vorliegt, und das intestinotrope Inkretin GLP-2, welches aus neuroendokrinen L-Zellen des Ileums und Colons sezerniert und durch die DPP-4 inaktiviert wird, bei Mäusen nach einer partiellen Hepatektomie zu einer signifikanten Verbesserung der Leberregeneration führte, wird in dieser

Studie Hauptaugenmerk auf GLP-2 und seinen Rezeptor GLP-2R sowie auf DPP-4 als mögliche therapeutische Angriffspunkte gelegt.

1.5.1 Genetik des Glucagon-like Peptide-2

Das Glucagon-like Peptide-2 (GLP-2) ist ein Gastrointestinalhormon, das aus 33 Aminosäuren besteht und zur Peptidfamilie des Präproglucagon-Gens gehört. Exprimiert wird das Präproglucagon-Gen (Gcg-Gen) von den enteroendokrinen L-Zellen der Darmschleimhaut, α -Zellen der Pankreasinseln und Neuronen im Kern des Solitärtraktes (19). Das Gcg-Gen befindet sich am Chromosomenlokus 2q24.2, besteht aus 6 Exons und codiert für das Präproglucagon. Dabei handelt es sich um ein Präprotein mit einer Größe von 180 Aminosäuren (20). Der Promoter des Gcg-Gens enthält vier Enhancer-Elemente sowie ein cAMP-Element. Steigt die Konzentration von cAMP, wird das Gcg vermehrt exprimiert. In Anwesenheit bestimmter Aminosäuren, die Targets für bestimmte Homöodomain-Protein-Transkriptionsfaktoren darstellen, wird die Expression zusätzlich verstärkt. Präproglucagon wird posttranslational zu Proglucagon modifiziert. Proglucagon ist ein Peptid, das in Gegenwart der Prohormonkonvertasen 1/3 und 2 nach Nahrungsaufnahme unterschiedlich verarbeitet wird. Die Prohormonkonvertase 2 kommt vorwiegend in den α -Inselzellen vor und spaltet Proglucagon in Glucagon, während in den L-Zellen des Darms und in bestimmten Neuronen der Anteil an Prohormonkonvertase 1/3 überwiegt, die Proglucagon zu GLP-1, GLP-2, Oxyntomodulin und Glicentin modifiziert (21). GLP-2 wird anschließend von den endokrinen L-Zellen des Darms sezerniert (22).

1.5.2 Wirkung des Glucagon-like Peptide-2

Charakteristisch für das GLP-2 ist neben einer intestinotropen, zytoprotektiven und neuroprotektiven Wirkung, seine wachstumsfördernde und entzündungshemmende Eigenschaft. Die trophische Wirkung entfaltet GLP-2 überwiegend im Darm, indem es die Proliferation der Kryptenzellen fördert, die Hemmung der Apoptose induziert und den Nährstoffverdaulichkeit und die Nährstoffaufnahme anregt. Weiters zeigt sich eine Beteiligung des GLP-2 an der Regulation von Größe und Integrität des Darms nach einem Insult (23). Die Darmspezifität des GLP-2 wird klinisch beim

Kurzdarmsyndrom ausgenutzt, in dem DDP-4-resistente GLP-2-Analoga zur Behandlung eingesetzt werden. (24).

1.5.3 Genetik des Glucagon-like Peptide-2 Rezeptors

Die Wirkung von GLP-2 wird durch die Bindung an seinen spezifischen GLP-2-Rezeptor (GLP-2R) vermittelt, dessen Gen am humanen Chromosom 17p13.3 lokalisiert ist (25). Der GLP-2R gehört zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (23). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von sieben transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, für deren Aktivierung und Signalübertragung ein Anstieg von cAMP nötig ist. GLP-2R zeigt außerdem die Eigenschaft, an verschiedene G-Protein-Untereinheiten binden zu können und mehrere Pathways zu aktivieren. Mit Studien konnte belegt werden, dass bei Zellen, die diesen Rezeptor natürlich exprimieren, die „Phosphatidylinositol-3-Kinase- γ (PI3K γ) und die anschließende Akt-Phosphorylierung die intrazellulären Wege sind, die durch GLP-2 aktiviert werden“ (22). Hauptwirkungsort von GLP-2 ist im Darm. Eine essentielle Rolle scheint hierbei das enterische Nervensystem einzunehmen, da die enterischen Neuronen den GLP-2R exprimieren. Nach seiner Aktivierung gelangt das Signal von Nervenzellen zurück zum Darmepithel, dessen Wachstum und Reparatur stimuliert wird (22).

1.5.4 Expression des Glucagon-like Peptide-2 Rezeptors

Die GLP-2R-Expression konnte bislang nicht vollends geklärt werden. Es wird beschrieben, dass dieser Rezeptor hauptsächlich im Darmtrakt - in erster Linie im Zwölffingerdarm und im proximalen Dünndarm - exprimiert wird, jedoch zeigen Studien eine schwache Expression von GLP-2R im Dickdarm. Extraintestinal findet man GLP-2R im ZNS, Lunge, Pankreas. „Auf zellulärer Ebene wird GLP-2R in den enteroendokrinen L-Zellen, in subepithelialen Myofibroblasten des Darms, in enterischen Neuronen der Submukosa und des Plexus myentericus, in Alphazellen des Pankreas und in Astrozyten im Gehirn exprimiert“ (23). Aufgrund der Expression von GLP-2R in Myofibroblasten wurde angenommen, dass sich die trophische Wirkung von GLP-2 über Myofibroblasten indirekt manifestiert, jedoch erfolgt die tatsächliche Induktion über die Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren, die den proliferativen Effekt von GLP-2 zur Folge haben (22). Um Klarheit über die

vollständige Funktion des GLP-2R zu erlangen, untersuchten El-Jamal et al. 2014 im Mausexperiment, in welchen Organen dieser Rezeptor exprimiert wird. Es zeigte sich eine Zunahme des GLP-2R in Richtung des distalen Darms, unerwarteterweise wurde eine deutliche Expression von GLP-2R mRNA in den primären Hepatozyten entdeckt. Während man sah, dass die GLP-2R mRNA bei Patient*innen mit entzündlichen Darmerkrankungen im Darmgewebe deutlich reduziert war und die Therapie mit GLP-2 nur einen geringen Effekt hatte, konnte im Rahmen dieser Studie eine neue Wirkung von GLP-2 demonstriert werden. Durch histologische und molekulare Untersuchungen stellte man fest, dass GLP-2 die Regeneration der Maus-Hepatozyten nach einer partiellen Hepatektomie beschleunigte und förderte. Es handelt sich bei der hepatischen Regeneration um einen komplexen Prozess, beim dem nach einer Leberschädigung die reifen Leberzellen (Hepatozyten, Kupfferzellen, Gallengangszellen und sinusoidale Endothelzellen) gemeinsam mit Wachstumsfaktoren und Hormonen versuchen, die Schädigung zu kompensieren und das verloren gegangene Lebergewebe wiederherzustellen. Die DNA-Synthese bei diesem Prozesse erlangt nach 24-48h sein Maximum, die Hand in Hand mit der Hochregulierung wachstumsbezogener und zellzyklusregulierter Gene einhergeht. Um dies zu veranschaulichen, wurden die Mäuse einer partiellen Hepatektomie unterzogen. Eine Gruppe wurde mit GLP-2 behandelt, die andere nicht. Durch eine anschließende immunhistochemische Färbung von Leberproben dieser Mäuse mit dem Proliferationsmarker Ki-67 konnte bei den Mäusen, die mit GLP-2 behandelt wurden, durch den Anstieg von Ki-67 und eine hochregulierte Expression von zellzyklusregulierten Genen die regenerationsfördernde Wirkung von GLP-2 auf die Leber veranschaulicht werden (23). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen versuchten Fuchs et al. die Wirkung von GLP-2 in der Leber zu klären und kamen zum Schluss, dass ein Verlust des GLP-2R die Steatose fördere. Im Gegensatz zu Jamel et al. konnten sie in Hepatozyten keine GLP-2R mRNA-Transkripte detektieren, jedoch war es ihnen möglich, einen funktionsfähigen GLP-2R in den hepatischen Sternzellen (HSC) nachzuweisen und erhöhte Werte von Sternzell-aktivierenden Markern in GLP-2R-negativen Mäusen zu detektieren. Zusammenfassend hoben sie einen kausalen Zusammenhang zwischen ernährungsbedingten hepatozellulären Schäden und einem prandialen Signaltransduktionsweg hervor, der das aus dem Darm-stammenden GLP-2 mit der HSC-Aktivität verbindet (26). Taher et al. untersuchten unterdessen am Hamster die

Rolle des GLP-2R in der Regulation des hepatischen Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels und konnten die lipogene Eigenschaft von GLP-2 in der Leber nachweisen. Sie zeigten, dass GLP-2 die lipogene Genexpression stimuliert und Lebersteatose, Nüchtern-dyslipidämie sowie VLDL-Überproduktion fördert. Weiters demonstrierten sie, dass das Fehlen von GLP-2R zur Beeinträchtigung der VLDL-Sekretion führt, wodurch sie die Bedeutung von GLP-2 im Lipid- und Lipoprotein-Stoffwechsel der Leber unterstrichen (27).

1.5.5 Genetik der Dipeptidylpeptidase-4

Die Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) zirkuliert entweder löslich (sCD26/DPP-4) im Blutkreislauf oder liegt in zellmembranassoziiierter Form vor, die unter CD26 bekannt ist.

Bei der DPP-4 handelt es sich um eine hochkonservierte Exopeptidase. DPP-4 ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das auf der Oberfläche von Epithel-, Endothel-, Stroma-, Stamm- und Immunzellen zu finden ist und unter anderem in der Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt und Knochenmark exprimiert wird. sCD26 wird aus den extrazellulären Aminosäuren 39-766 gebildet und von Matrixmetalloproteinasen in die extrazelluläre Umgebung abgegeben, wo es enzymatisch aktiv ist. Die Wirkung von DPP-4 auf die Aktivität verschiedener Chemokine und Peptidhormone beruht auf der Abspaltung des N-terminalen Dipeptid, wobei es sich hierbei in der Regel um ein vorletztes Alanin oder Prolin handelt.

CD26 stellt ein großes Protein dar. Es setzt sich aus 766 Aminosäuren zusammen, die größtenteils extrazellulär liegen. Zusätzlich besitzt es einen hydrophoben Transmembrananker aus etwa 7 bis 28 Aminosäuren und einer kurzen intrazellulären Sequenz, die aus 6 Aminosäuren besteht. CD26 stellt ein Single-Pass-Transmembranprotein dar, dessen Aktivität streng geregelt wird. Es wird zum einen die Gen- sowie Proteinexpression als auch der Transfer von CD26 an die Zelloberfläche kontrolliert, zum anderen obliegt die Interaktion mit Bindungspartnern einer strengen Regulierung. Die Zelle kann auf verschiedenste zell- und gewebsspezifische Faktoren, wie z. B. Interleukine, Hepatozyten-Nuklearfaktor, klassische Leukozytenaktivierung schnell reagieren, sodass, obwohl initial kein

CD26-Zelloberflächenspiegel vorliegt, in kürzester Zeit eine hohe Anzahl an Rezeptoren exprimiert wird (28).

1.5.6 Wirkung der Dipeptidylpeptidase-4

DPP-4 und eine Reihe andere Enzyme bilden eine komplexe Genfamilie, deren Wirkung in der Spaltung strukturell verwandter Peptide liegt, weshalb sich der Einfluss von DPP-4 auf die Entstehung verschiedenster Erkrankungen erklären lässt (28). Eines der am häufigsten untersuchten DPP-4 – Substrate ist GLP-1. Wegen seiner Wechselwirkung mit DPP-4 hat GLP-1 große Bedeutung in der Therapie von Diabetes mellitus. Durch Nahrungsaufnahme werden die endokrinen Darmzellen stimuliert, GLP-1 und GLP-2 zu sezernieren (29). GLP-1 fördert die Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas, wird jedoch zügig von DPP-4 gespalten und inaktiviert (28). Mittlerweile sind zur Behandlung von Diabetes mellitus neben GLP-1-Analoga (24) auch DPP-4-Inhibitoren im Einsatz, da sie die glukoseabhängige Insulinsekretion durch Unterdrückung des GLP-1-Abbaus fördern. Aufgrund der Tatsache, dass die Progredienz der NAFLD stark mit der Insulinresistenz assoziiert wird, die die Freisetzung von TNF- α sowie Interleukinen stimuliert, vermuteten Miyazaki et al., dass DPP-4 wegen der Glukosestoffwechselbeeinflussenden Aktivität eine zentrale Rolle im Entzündungsprozess der NAFLD einnehmen könnte. Nach Vergleich der mRNA-Expressionswerte von DPP-4 in Leberbiopsieproben von NAFLD-Patient*innen mit denen von Kontrolllebern, stellten sie die Hypothese auf, „dass hepatisches DPP-4 auf folgende Weise am Fortschreiten von NAFLD beteiligt ist: i) wenn NAFLD durch eine übermäßige Nährstoffzufuhr ausgelöst wird, erhöht die hepatische Entzündung die hepatische DPP-4-Expression; ii) der beschleunigte Abbau von GLP-1 durch DPP-4 hemmt die Insulinsekretion und führt zu Hyperglykämie; und iii) Hyperglykämie erhöht die DPP-4-Expression weiter, was zu einer weiteren Verschlechterung des Glukosestoffwechsels führt“ (30) . Darüber hinaus gewannen sie die Erkenntnis, dass die hepatische DPP-4-Expression bei NAFLD-Patient*innen erhöht war und somit eine mögliche Assoziation mit der Entstehung und/oder Progredienz der NAFLD gegeben sein könnte. Sie betonten die Notwendigkeit weiterer Studien zur Abklärung der physiologischen Rolle von DPP-4, unterstrichen jedoch die Möglichkeit eines neuen therapeutischen Targets zur Unterdrückung der

Progredienz dieser Lebererkrankung. Weiters beschrieben sie eine erhöhte hepatische DPP-4-mRNA Expression bei NAFLD-Patient*innen verglichen zu gesunden Proband*innen und meinten, dass eine vermehrte Glukosebelastung die DPP-4-Expression in HepG2-Zellen fördere. Zusätzlich behaupteten sie, dass eine Korrelation zwischen der DPP-4-Aktivität im Serum, der hepatischen DPP-4-Expression und dem NAFLD-Grading bestünde (30). Shirakawa et al. zeigten, dass Ratten mit einer DPP-4-Defizienz im Gegensatz zu Wildtyp-Ratten verminderte Konzentrationen an proinflammatorischen als auch profibrotischen Zytokinen und eine geringere Lebersteatose aufweisen, wodurch DPP-4 eine Schlüsselfigur im Prozess der Leberregeneration sein könnte (31, 32).

1.6 Ziel der Arbeit

Bei der Pathogenese der NAFLD handelt sich um ein komplexes Geschehen mit multifaktorieller Beteiligung exogener und endogener Einflüsse. Seitens der Arzneimittelforschung ist man bemüht, therapeutische Targets zu finden, die die Leberregeneration fördern und/oder die hepatische Degeneration minimieren. Wie beschrieben rücken die DPP-4 sowie das GLP-2 mit dem GLP-2R aufgrund ihrer in Studien beschriebenen hepatischen Aktivitäten und Expressionen in den Fokus aktueller Forschungen.

In dieser Arbeit wird daher untersucht, ob im Rahmen einer Leberschädigung die hepatische mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R als Ausdruck eines dynamischen Systems der Leberregeneration Veränderungen unterliegt und ob eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R gegeben ist.

Nach Grading und Staging der Gewebeproben entsprechend den Kriterien der beiden Bewertungsverfahren nach Kleiner und Bedossa erfolgt die Extraktion von RNA aus FFPE-Lebergewebe. Mittels quantitativer PCR und anschließender Auswertung wird das mRNA-Expressionsniveau der DPP-4 und des GLP-2R normalisiert auf das Housekeeping-Gen H6PDH ermittelt. Die statische Auswertung erfolgt durch nichtparametrischen Gruppenvergleich und Korrelationsanalysen.

2 Material und Methoden

2.1 Studieninformation

Diese Studie ist Teil des gegenständlichen Forschungsprojekts „Perioperative Inkretin Plasma Konzentrationsdynamiken und ihre Rolle im Rahmen der Leberregeneration“. Das Gesamtkonzept des Projekts wurde von der niederösterreichischen Ethikkommission beurteilt und freigegeben (GS1-EK-4/568-2018).

2.2 Patientenkollektiv

Beim Patientenkollektiv handelte es sich um eine heterogene Gruppe, die aufgrund unterschiedlicher maligner und benigner Indikationen einer Leberresektion zugeführt wurden. Die Datenerhebung geschah mittels CRF aus dem klinischen Patientenmanagementprogramms des LK Wiener Neustadt. Da diese Studie als Pilotstudie zu verstehen ist, wurde eine Kohorte von etwa 100 Patient*innen angestrebt. Die Stichprobengröße ergab sich aus der Menge an zugänglichem Material für die RNA-Extraktion. FFPE-Lebergewebe wurde aus dem Archivmaterial des Instituts für Pathologie und Molekularpathologie des LK Wiener Neustadts gewonnen.

2.3 Histologische Aufarbeitung und Prognosebewertung

Die Fixierung der operativ entnommenen Lebergewebe erfolgte unmittelbar nach Entnahme mit 4% gepuffertem Formalin für etwa 6 bis 12 Stunden. Von den in Paraffin-eingebetteten, archivierten Proben wurden neben einem etwa 2 μ m dicken Schnitt, der anschließend routinemäßige mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt wurde, weitere 10 Paraffinschnitte mit einer Stärke von etwa 2-3 μ m für spätere immunhistochemische Untersuchungen angefertigt.

Für das Grading und Staging der NAFLD zur Prognoseabschätzung wurden die HE-gefärbten Schnitte bei mittlerer Vergrößerung mikroskopiert. Zur Abgrenzung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung von der nicht-alkoholischen Steatohepatitis dient das Grading (5). Hierfür müssen histomorphologisch ballonierte Hepatozyten als Zeichen lobulärer Entzündung und Leberzellschädigung

nachgewiesen werden können. Mit dem Staging wird der Fibrosegrad beschrieben, der auf der Art und dem Ausmaß des fibrotischen Parenchymsumbaus beruht (33). Die zwei häufigsten angewandten Bewertungssysteme für Grading und Staging sind derzeit das vom Clinical Research Network (CRN) gesponserte NASH-System und der Steatose-Aktivität-Fibrose (SAF) – Score (34).

2.3.1 NASH-CRN-System

Das NASH-CRN-System setzt sich aus dem NAFLD Activity Score (NAS) und einem separaten Fibrose-Score zusammen (34).

Der NAFLD Activity Score (NAS) nach Kleiner et al. dient dem Grading und errechnet sich, wie in Abbildung 4 dargestellt, aus dem Verfettungsgrad (0-3), aus der azinären Entzündung (0-3) und der hepatozellulären Ballonierung (0-2). Abhängig vom jeweiligen Schweregrad werden Punkte vergeben und diese anschließend addiert, wodurch sich ein Summenscore zwischen 0 und 8 ergibt, der die Erkrankungsaktivität widerspiegelt (33).

Kategorie	Kriterium	Score
Verfettung	<5%	0
	5–33%	1
	>33–66%	2
	>66%	3
Azinäre Entzündung	Keine	0
	<2 Foci/mittlere Vergrößerung (MPF, Vergr. 200:1)	1
	2–4 Foci/MPF	2
	>4 Foci/MPF	3
Hepatozelluläre Ballonierung	Keine	0
	Wenige Hepatozyten	1
	Zahlreiche Hepatozyten/prominente Ballonierung	2

Abbildung 4 NAFLD Activity Score (NAS) nach Kleiner et al. (5)

Anhand des ermittelten Summenscores erfolgt das Grading der NAFLD in:

- NAS 0-2 Keine Steatohepatitis
- NAS 3-4 Nicht beweisend für eine Steatohepatitis (Borderline)
- NAS ≥5 (max. 8) Manifeste Steatohepatitis

„Ein Summenscore ≤ 2 schließt die Diagnose einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis aus, wohingegen ein Score ≥ 5 die Diagnose einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis rechtfertigt. Entsprechend sind NAS-Werte von 3 bzw. 4 als grenzwertig anzusehen. Hier wird die Diagnose einer Leberverfettung mit geringer entzündlicher Aktivität empfohlen, da erste Untersuchungen nur eine geringe Progressionstendenz ergeben haben und daher die Kategorisierung als „Steatohepatitis“ nicht gerechtfertigt erscheint“ (5).

Das Staging nach Kleiner et al. beschreibt die Art und das Ausmaß des fibrotischen Parenchymsumbaus und wird unabhängig mittels separaten Fibrose-Scores (F0-F4) bewertet. Die Untergliederung der einzelnen Stadien der Steatohepatitis anhand der Fibrose zeigt Abbildung 5 (33).

Stadium	Fibrose
0	Keine
1A	Mild, Zone 3, perisinusoidal
1B	Mäßig, Zone 3, perisinusoidal
1C	Portal/periportal ohne perisinusoidale Komponente
2	Perisinusoidale und portale/periportale Fibrose
3	Septen- /brückenbildende Fibrose
4	Zirrhose

Abbildung 5 Staging der Steatohepatits nach Kleiner et al. (5)

2.3.2 SAF-Score nach Bedossa

Der Steatose-Aktivität-Fibrose-Score (SAF-Score) ist ein dem NAS ähnliches Grading-System. Laut jüngsten Studien gilt er in der klinischen Praxis als zuverlässiger und reproduzierbarer als der NAS. Anhand eines einfachen Algorithmus, der in Abbildung 6 und 7 dargestellt ist, ermöglicht er die semiquantitative Evaluierung der Steatose (S0-S3), der hepatozellulären Ballonierung (0-2), der lobulären Entzündung (A0-A2) und des Fibrorestadiums (F0-F4) (35). Im Gegensatz zum NAS, der laut Kritikern zu sehr auf die Steatose ausgelegt ist, beurteilt der SAF-Score Steatose und Aktivität getrennt voneinander, weshalb er besser zur Differenzierung von NAFL und NASH geeignet sein soll (34).

Histologic Feature	Score	Definition
Steatosis	0	<5%
	1	5–33%
	2	34–66%
	3	>66%
Steatosis score (S 0–3)		
Hepatocyte ballooning	0	None
	1	Clusters of round hepatocytes with pale cytoplasm
	2	Same as previously mentioned with enlarged hepatocytes (>2 times than normal)
+		
Lobular inflammation	0	None
	1	<2 foci per 20 X field
	2	>2 foci per 20 X field
Activity score (A 0–4)		
Fibrosis	0	No fibrosis
	1a	Zone 3 mild perisinusoidal fibrosis
	1b	Zone 3 moderate perisinusoidal fibrosis
	1c	Portal or portal fibrosis only
	2	Zone 3 + portal/periportal fibrosis
	3	Bridging fibrosis
	4	Cirrhosis
Fibrosis score (F 0–4)		

Abbildung 6 Steatosis-Activity-Fibrosis-Score (SAF) nach Bedossa (34)

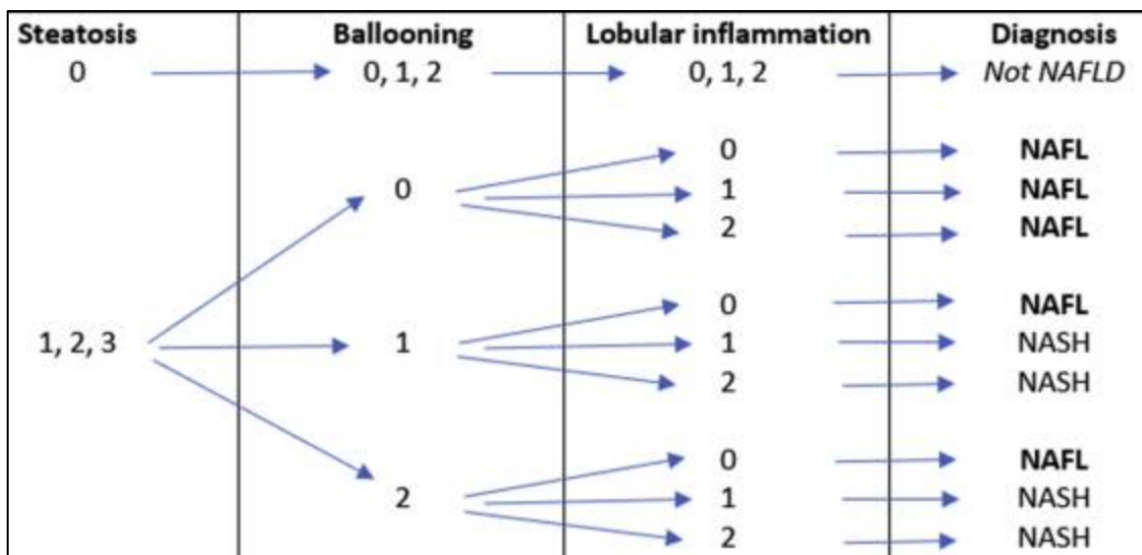


Abbildung 7 Algorithmus des SAF-Scores (34)

Für sämtliche Gewebeproben wurden entsprechend der Kriterien des NASH-CRN-System der NAS und dazugehörig der separate Fibrose-Score sowie der SAF-Score nach Bedossa ermittelt. Die Stratifizierung des Patientenkollektivs im Zuge der statistischen Auswertung erfolgte hingegen ausschließlich mit den Daten des NASH-CRN-Systems.

2.4 Molekulargenetische Expressionsanalyse

Nach Extraktion von RNA aus tumorfernen FFPE-Lebergewebe von OP-Präparaten konnten mittels rtPCR die mRNA-Expressionen der DPP-4 und des GLP-2R untersucht und anschließend quantifiziert werden.

2.4.1 Extraktion der RNA aus FFPE-Gewebe

Die Ermittlung und Markierung des für die molekulare Diagnostik relevanten Normalgewebes erfolgte am HE-gefärbten Schnitt. Die Gesamt-RNA wurde aus FFPE-Gewebe halbautomatisch mittels MagNA Pure FFPE Buffer Set am MagNA Pure 24 Instrument extrahiert. Nach dem Vorlegen von 300µl des Deparaffinization Reagent in einem Eppendorf-Tube konnte der korrespondierende Bereich zum markierten Areal am HE-gefärbten Schnitt vom Paraffinblock mit einem Skalpell abgekratzt werden. Nach Überführung des FFPE-Gewebes in das mit Deparaffinization Reagent vorbereitete Eppendorf-Tube wurde dieses verschlossen und anschließend für 5 Minuten bei 56°C und 2000rpm auf einem Heizblock inkubiert. Währenddessen wurde in einem separaten Eppendorf-Tube die Lysis Solution aus 200µl Lysis Buffer und 20µl Proteinase K hergestellt. Nach Beendigung des Deparaffinierungsschritts wurde das Eppendorf-Tube abgespinn, danach geöffnet, 200µl der Lysis Solution dazupipettiert, verschlossen, kurz gevortext und dann bei 56°C und 300rpm über Nacht auf dem Thermoblock inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation des Lysats bei 80°C für 30 Minuten ohne Schüttel. Nach dem Abspinnen des Tubes war die Phasentrennung sichtbar: die obere Phase enthielt das Deparaffinization Reagent, in der unteren Phase befand sich die Lysis Solution mit den Nukleinsäuren. Anschließend wurde die untere Phase vorsichtig abpipettiert und in die gerätespezifische Processing-cartridge übergeführt. Nach Bestückung des Gerätes mit den notwendigen

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien erfolgte die Extraktion der Nukleinsäuren am Gerät.

2.4.2 Quantifizierung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA geschah mit dem Qubit™ RNA HS Assay Kit am Qubit™ 4 Fluorometer (Fa. ThermoFisher Scientific). Zunächst wurde die Qubit™ working solution hergestellt und das Qubit™ RNA HS Reagent 1:200 mit dem Qubit™ HS Buffer verdünnt. Die Gerätekalibrierung erfolgte mit den im Kit mitgelieferten Standards STD1 und STD2. Die Standards wurden in Qubit™-Tubes 1:20 mit der Qubit™ working solution verdünnt, die Proben jeweils im Verhältnis 1:99, sodass das Endvolumen 200µl betrug. Für die anschließende Messung der Proben in ng/µl wurde das am Fluorometer vorinstallierte Protokoll „RNA High Sensitivity“ verwendet.

2.4.3 mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR

Die reverse Transkription erfolgte mit dem SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific. Für die cDNA-Synthese wurden 4µl 5X VILO™ Reaction Mix, 2µl 10X SuperScript™ Enzyme Mix und 12µl RNA (50ng) eingesetzt. Nach kurzem Vortexen wurde das Tube zunächst bei 25°C für 10 min, anschließend bei 42°C für 60 min und zur Beendigung der Reaktion bei 85°C für 5 min inkubiert. Die quantitative Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR) in Echtzeit wurde am QuantStudio 5 System unter Verwendung des TaqMan™ Gene Expression Master Mix von ThermoFisher Scientific durchgeführt. Die qPCR Primer für GLP-2R (Hs00173688_m1) und DPP-4 (Hs00897391_m1), die den Großteil der humanen GLP-2R- oder DPP-4-Kodierungsregionen umfassen, und das Housekeeping-Gen H6PDH (Hs00997739_m1) stammten ebenfalls von ThermoFisher Scientific. Das totale PCR-Volumen betrug 20µl. Es wurden 5µl cDNA, 10µl TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X), 1µl Primer-Mix und 4µl Nuclease-freies Wasser eingesetzt. Die Analyse der Proben für jedes Gen erfolgte im Duplikat. Hierfür wurden die Samples einer Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C und 50 Amplifikationszyklen mit einer Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und einem Annealing für 1 Minute bei 60°C unterzogen.

2.4.4 Analyse der ermittelten Daten

Für die Quantifizierung wurde der Mittelwert der Duplikate für jedes analysierte Gen errechnet, die DPP-4- und GLP-2R-Expression auf das Housekeeping-Gen H6PDH normalisiert und mittels relativer Quantifizierung ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode) das Expressionsniveau und die Korrelation der beiden Gene zueinander analysiert.

3 Ergebnisse

Mit Hilfe deskriptiver Statistik konnte das Patientenkollektiv charakterisiert werden. Hierfür wurden die mittels Grading und Staging erhobenen Daten herangezogen. Gemäß den Kriterien des NAFLD Activity Scores ergaben sich die Subgruppen NAS 1-3, Steatosisgrad 0-3, Fibrosegrad 0-4, Inflammationsgrad 1-2. Anschließend wurde die Expression der mRNA von GLP-2R und DPP-4 unter Verwendung der Softwareplattform IBM® SPSS Statistics miteinander verglichen, statistisch berechnet sowie grafisch dargestellt.

3.1 mRNA-Expression bei NAS 1-3

In den histologisch nach den Kriterien des NAFLD Activity Scores beurteilten FFPE Präparaten zeigten n=26 einen NAS 1; n=52 einen NAS 2; sowie n=15 einen NAS 3. Nach Ermittlung der Gesamtexpression von GLP-2R für jede Gruppe und Berechnung des Mittelwerts wurde die relative mRNA-Expression normiert auf die mRNA Expression von NAS 1 bestimmt. Wie in Abbildung 8 dargestellt konnte mittels nichtparametrischen Gruppenvergleich kein statistisch signifikanter Unterschied in der GLP-2R-mRNA-Expression zwischen den Gruppen NAS 1-3 erkannt werden; $p=0,602$. Dieselben Berechnungen wurden im Vergleich für die DPP-4-Expression bei NAS 1 (n=23), NAS 2 (n=54) und NAS 3 (n=15) durchgeführt. Auch hier lag kein statistisch signifikanter Unterschied vor; $p=0,252$.

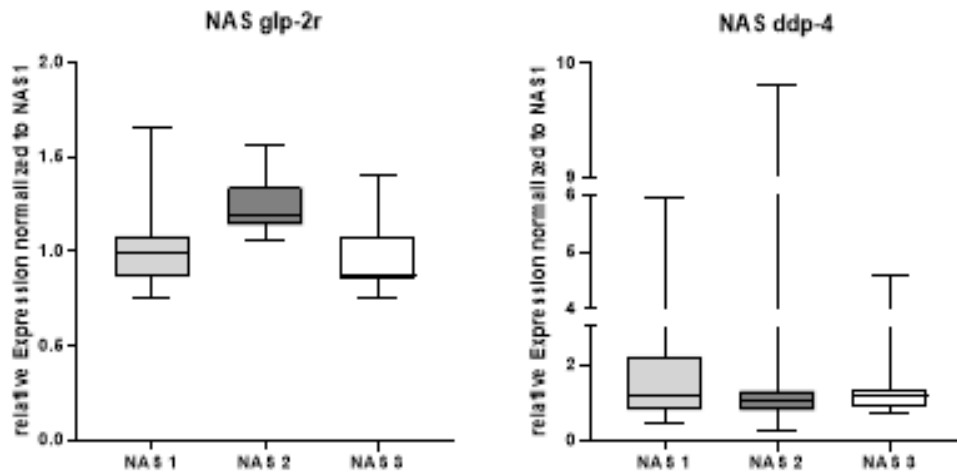


Abbildung 8 mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei NAS 1-3

Ratio der relativen RNA-Expression, normiert auf die mRNA-Expression von NAS 1; Nicht-parametrischer Gruppenvergleich nach Kruskal Wallis; Statistische Signifikanz $p < 0,005$;

3.2 mRNA-Expression bei Steatosegrad 0-3

In der Kohortengruppe Steatosegrads 0-3 wurde ebenso die Gesamtexpression und der Mittelwert von GLP-2R für Grad 0-3 errechnet, anschließend die relative mRNA-Expression normiert auf die mRNA-Expression von Steatose Grad 0 bestimmt (Abb. 9). Hier zeigte sich in der Subkategorie des Steatosegrads 0-3 im Gruppenvergleich weder ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Grad 0 (n=30); Grad 1 (n=36); Grad 2 (n=23); Grad 3 (n=4) in der GLP-2R-Expression; $p = 0,127$; noch in der Expression der hepatischen DPP-4-mRNA (Grad 0: n=26; Grad 1: n=38; Grad 2: n=22; Grad 5: n=5); $p = 0,663$.

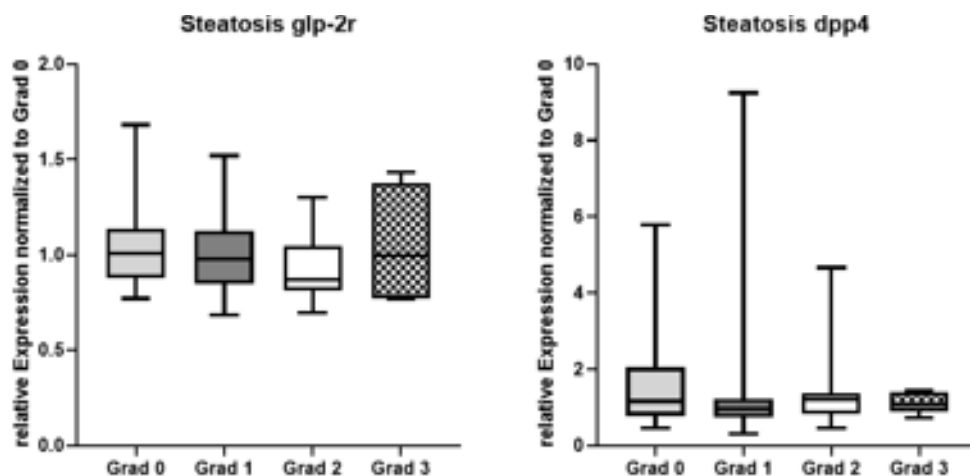


Abbildung 9 mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Steatose 0-3

Ratio der relativen RNA-Expression, normiert auf die mRNA-Expression von Steatose Grad 0; Nicht-parametrischer Gruppenvergleich nach Kruskal Wallis; Statistische Signifikanz $p < 0,005$;

3.3 mRNA-Expression bei Fibrosegrad 0-4

Wie Abbildung 10 zeigt, konnte auch durch den Vergleich der GLP-2R und DPP-4 mRNA-Expression in den Fibrosegraden 0-4 kein Unterschied in der exprimierten GLP-2R mRNA-Konzentration festgestellt werden (F0: n=2; F1: n=71; F2: n=18; F3: n=3; F4: n=2); $p=0,953$; Die DPP-4-Expression war ebenso ohne statistisch signifikantem Unterschied in den unterschiedlichen Fibrotestadien (F0: n=4; F1: n=70; F2: n=14; F3: n=6; F4: n=3); $p=0,471$.

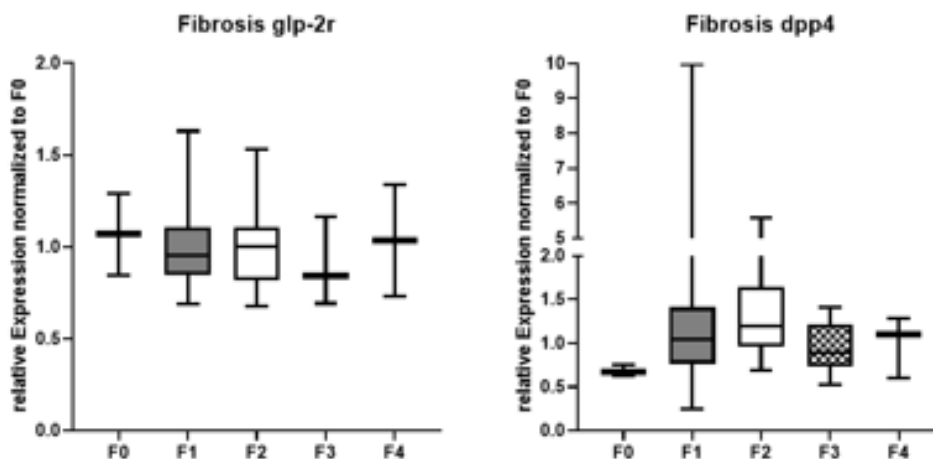


Abbildung 10 mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Fibrose 0-4

Ratio der relativen RNA-Expression, normiert auf die mRNA-Expression von Fibrose Grad 0; Nicht-parametrischer Gruppenvergleich nach Kruskal Wallis; Statistische Signifikanz $p<0,005$;

3.4 mRNA-Expression bei Inflammationsgrad 1-2

Die histologisch beurteilte hepatische Inflammation im Rahmen der NAS-Klassifikation zeigte, wie Abbildung 11 belegt, in ihren Ausprägungen ebenfalls keine Unterschiede in der GLP-2R und DPP-4 mRNA-Expression (n=76 und n=16); $p=0,715$; und (n=74 und n=16); $p=0,160$.

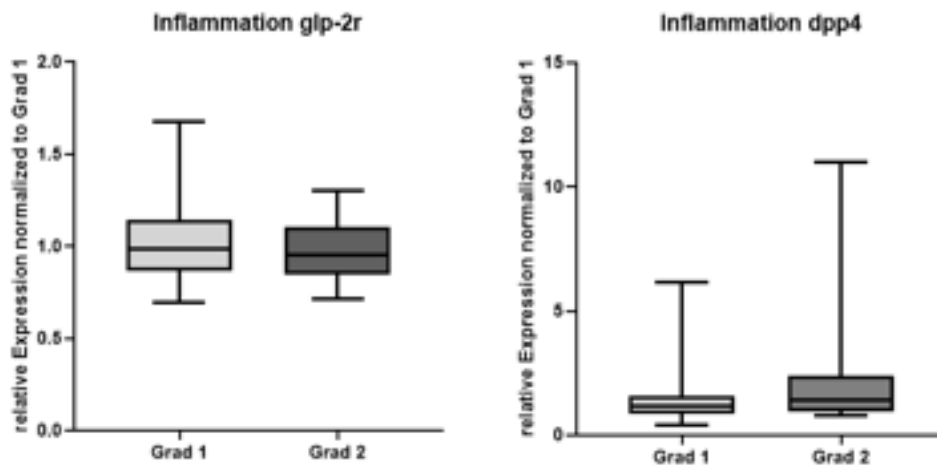


Abbildung 11 mRNA-Expression von GLP-2R und DPP-4 bei Inflammation 1-2

Ratio der relativen RNA-Expression, normiert auf die mRNA-Expression von Inflammation Grad 1; Nicht-parametrischer Gruppenvergleich nach Kruskal Wallis; Statistische Signifikanz $p < 0,005$;

3.5 Korrelationsanalyse der mRNA-Expressionen

Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression des GLP-2R und jener der DPP-4 ($p = 0,000$; $R = 0,455$) (Abb. 12).

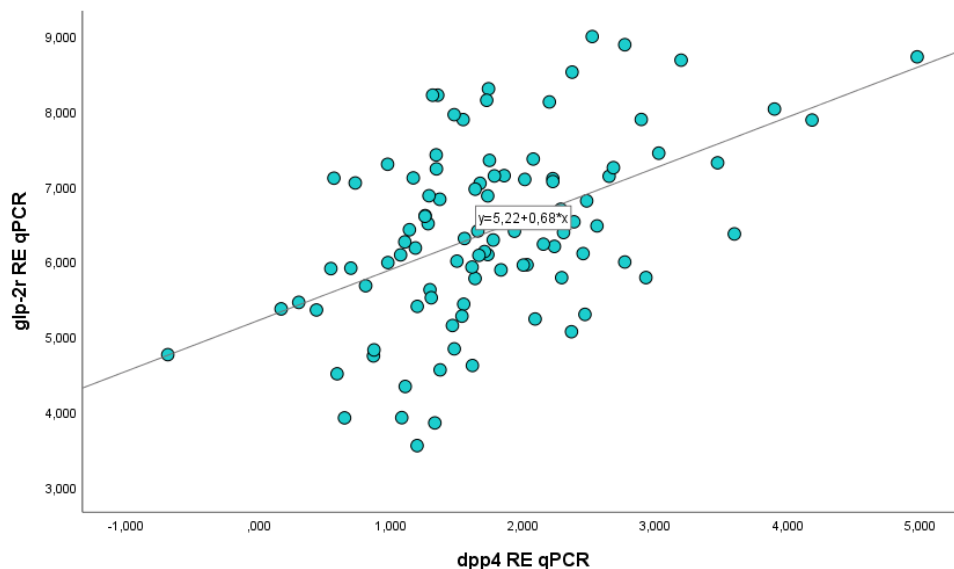


Abbildung 12 Korrelation der mRNA-Expressionen von GLP-2R und DPP-4

Lineare Korrelation für die relative mRNA-Expressionen von GLP-2R und DPP-4; Spearman Korrelation; $R = 0,455$; $p = 0,000$;

4 Diskussion und Zusammenfassung

Bis dato steht für das Erkrankungsspektrum der NAFLD kein definitiver medikamentöser Therapieansatz zur Verfügung. Die hohe Prävalenz und die relativ schlechte Prognose erfordern dringend wirksame Behandlungen. Die Therapie des Kurzdarmsyndroms mit abbauresistenten GLP-2-Analoga, die die Signalübertragung des GLP-2R anhaltend verstärken, wirft die Frage auf, ob trotz der überwiegenden Lokalisierung der Wirkung des GLP-2 im Darm, eine extraintestinale Expression von GLP-2R und eine mögliche Wirkung der Analoga außerhalb des GI-Trakts gegeben ist (26). Darüber hinaus ist an der Progredienz der NAFLD zur NASH maßgeblich die Insulinresistenz beteiligt. Da DPP-4-Inhibitoren erheblich die hepatische als auch die periphere Insulinresistenz verbessern, gelten DPP-4-Inhibitoren als neue Kandidaten in der Behandlung der NAFLD (36).

Die Assoziation der DPP-4-Expression mit der NAFLD wurde bereits mehrfach untersucht. Durch die rasche Spaltung von GLP-1 ist sie maßgebend an der Entstehung der Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt, zu deren Hauptkomplikation die Entwicklung der NAFLD zählt (27). Miyazaki et al. konnten demonstrieren, dass die hepatische mRNA-Expression der DPP-4 bei NAFLD-Patient*innen signifikant höher als bei gesunden Proband*innen war. Sie vermuteten eine DPP-4-Beteiligung an der Progredienz der NAFLD aufgrund der DPP-4-Eigenschaft, T-Zell-vermittelte Entzündungsprozessen zu regulieren. Neben der Analyse der hepatischen mRNA-Expressionswerte der DPP-4 mittels Echtzeit-PCR von Leberbiopsien von 17 NAFLD-Patient*innen und 10 Gesunden verglichen sie das DPP-4-Expressionsniveau mit Stoffwechselfaktoren, inklusive Insulinresistenz, Body-Mass-Index und Cholesterin- sowie Triglyceridwerten. Außerdem zeigten sie, dass ein vermehrter Glukosegehalt in HepG2-Zellen sich stimulierend auf die Expression der DPP-4 auswirkt und diese signifikant erhöht. Darüber hinaus hoben sie die mögliche Korrelation zwischen Stoffwechselfaktoren, einschließlich der Insulinresistenz und die Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels bei dieser chronischen Erkrankung hervor (30). Aufbauend auf den Erkenntnissen von Miyazaki et al., dass die „hepatische DPP-4-mRNA-Expression bei NAFLD-Patient*innen signifikant höher als bei Kontrollpersonen war“ (30), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die hepatische

mRNA-Expression der DPP-4 mit fortschreitender Fibrose, Entzündung und Steatose im Verlauf der NAFLD als Ausdruck der Leberschädigung zunimmt. Hierfür wurde das Patientenkollektiv zunächst in die Subkategorie NAS1-3 gruppiert. Mittels nichtparametrischen Gruppenvergleich konnte in dieser Kohortengruppe jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen NAS1, NAS2 und NAS3 festgestellt werden. Aufgrund dessen erfolgte entsprechend den Kriterien des NAFLD Activity Scores die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem Steatosegrad (0-3), dem Fibrosegrad (0-4) und dem Inflammationsgrad (1-2), um einen Überblick über die Auswirkung des Krankheitsprogresses innerhalb der einzelnen an der Berechnung des NAS-beteiligten Parameter zu bekommen und um gegebenenfalls ein entsprechendes mRNA-Expressionsmuster identifizieren zu können. Auch hier entsprachen die Ergebnisse jenen der Subgruppe NAS1-3. Es konnte ebenso kein Unterschied in der mRNA-Expression der DPP-4 festgestellt werden.

Während die Beteiligung der DPP-4 an der Pathogenese der NAFLD vielfach in Studien analysiert wurde, ist über die Expression und Aktivität des GLP-2R in der Leber nur wenig bekannt. Hauptwirkungsort von GLP-2 ist vorwiegend der Darm. Aufgrund der proliferativen und zytoprotektiven Wirkung stimuliert GLP-2 die Vergrößerung der Schleimhautoberfläche, wodurch die Nahrungsaufnahme erleichtert wird. Dieser Effekt wird therapeutisch beim Kurzdarmsyndrom ausgenutzt, indem abbauresistente GLP-2-Analoga die Signalübertragung über den GLP-2R stimulieren und somit den Bedarf an parenteraler Ernährung minimieren. Basierend auf dem Wissen der protektiven Eigenschaft von GLP-2 versuchten Fuchs et al. die Expression von GLP-2R in der Leber zu identifizieren, mit dem Ziel die hepatische Wirkung von GLP-2 klären zu können. Im Mausmodell demonstrierten sie, dass durch den Verlust von GLP-2R die Lebersteatose erhöht und gleichzeitig die Leberzytokine und Biomarker für Leberentzündungen vermehrt exprimiert wurden (26). Wie schon bei der mRNA-Expressionsanalyse der DPP-4 wurde bezugnehmend auf das Wissen von Fuchs et al. das hepatische mRNA-Expressionsmuster des GLP-2R analysiert und untersucht, ob einerseits eine Verminderung der GLP-2R Expression eine Verschlechterung der NAFLD verursacht oder andererseits eine erhöhte Expression ebenso als Ausdruck einer gesteigerten Regeneration zu verstehen sein kann. Ident zur Analyse der DPP-4

wurde zur Ermittlung des mRNA-Expressionsniveaus des GLP-2R anfangs das Patientenkollektiv in NAS1-3 unterteilt, um einen Überblick über das mRNA-Expressionsmuster des GLP-2R in den einzelnen NAFLD-Stadien zu erhalten. Das Ergebnis entsprach jenem der DPP-4. Es konnte kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression mit Fortschreiten der NAFLD zwischen den Gruppen NAS1-NAS3 erkannt werden. Die Gruppierung des Patientenkollektiv nach Steatosegrad (0-3), Fibrosegrad (0-4) sowie Inflammationsgrad (1-2) und die anschließende statistische Auswertung der mRNA-Expression verlief auch erfolglos. Es konnte ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression des GLP-2R im Lebergewebe nachgewiesen werden.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus einer heterogenen Gruppe zusammen, die aufgrund unterschiedlicher maligner und benigner Indikationen einer Leberresektion zugeführt wurde. Infolgedessen handelte es sich beim vorliegenden Untersuchungsmaterial um FFPE-Gewebe, das zum Teil schon mehrere Jahre archiviert wurde. Formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe ist eine wertvolle Quelle für molekulare Analysen in der Forschung und der klinischen Diagnose. Neben dem molekularen Nachweis von tumorbedingten Genmutationen zur pathologischen Diagnose hat FFPE-Material einen hohen Stellenwert in der retrospektiven Genforschung und zunehmend in der molekularen Tumorbilogie (37). Anfangs wurde der Fokus auf molekulargenetische Analysen aus DNA gelegt, mittlerweile haben Expressionsanalyse aus RNA von FFPE-Material mindestens denselben Stellenwert, um Expressionsveränderungen der mRNA, die unter anderem während des Krankheitsverlaufs auftreten, beurteilen zu können (38). Die Analyse der RNA-Expression bildet die Grundlage, um zelluläre Funktionen und Veränderungen bewerten zu können (39). Die Identifizierung hoch- und herunterregulierter Gene mittels Expressionsanalysen erfordert qualitativ hochwertige RNA (38). Es ist bekannt, dass die molekulare Diagnostik von DNA und insbesondere von RNA aus FFPE-Gewebe aufgrund des Proteinabbaus und der Fragmentierung eine Herausforderung darstellen kann (39). Da es sich beim FFPE-Material um eine Form der Konservierung handelt, muss das Nativgewebe vor der Paraffineinbettung mit Formaldehyd fixiert werden. Die optimale Fixierungszeit von Gewebe spielt eine zentrale Rolle in der Präanalytik der histologischen Gewebeverarbeitung und im weiteren Sinn in der molekularen Diagnostik.

Formaldehyd ist die kleinste sauerstoffhaltige Verbindung mit hoher Reaktivität, die mit Hydroxyl-, Thiol- oder Aminogruppen von Molekülen in Wechselwirkung tritt, wodurch es zur Quervernetzung von Molekülketten kommt und Konsequenzen für die DNA- und RNA-Länge hat. Eine zu lange Fixierung des Gewebes mit Formaldehyd hat die Bildung von Methylen-Vernetzungsbrücken zwischen den Makromolekülen zur Folge, die zur Fragmentierung der DNA- und RNA-Stränge führt. In der Tat kommt es bei Lagerung des FFPE-Materials über einen längeren Zeitraum zum verstärkten Abbau und zur vermehrten Fragmentierung der Nucleinsäuren. Infolgedessen haben Yi et al. die Auswirkungen auf Reinheit und Konzentration von DNA und RNA aus FFPE-Gewebe nach Langzeitlagerung untersucht. Sie kamen zum Ergebnis, dass zwar die DNA- und RNA-Degradierung erhöht und die Menge der extrahierten Nucleinsäuren vermindert ist, jedoch die jahrelange Lagerung keinen signifikanten Unterschied in der Reinheit von DNA und RNA zur Folge hat. Zusammenfassend betonten sie, dass FFPE-Gewebe, die bis zu 8 Jahre gelagert wurden, für die Amplifikation von Zielfragmenten kleiner als 300bp verwendet werden können (37). Da das Patientenkollektiv in dieser Studie unter anderem FFPE-Material bis aus dem Jahr 2011 beinhaltete, war man mit der Problematik der verminderten RNA-Qualität und der gesteigerten Degradierung konfrontiert. Man stellte Überlegungen an, welche Faktoren ausschlaggebend seien, um falsch negative Ergebnisse bei der Expressionsanalyse wegen hochgradig eingeschränkter RNA-Qualität umgehen zu können. Aufgrund der Tatsache, dass ein Bioanalytiker zur qualitativen Beurteilung der Nucleinsäuren nicht zur Verfügung stand, wurde der Hauptfokus zur Qualitätssicherung der Ergebnisse auf die PCR gelegt. Hauptkriterium für die Auswahl der genspezifischen TaqMan Assays war die Amplikonlänge. Zum einen sollte sich die Amplikonlänge für die drei Gene DPP-4, GLP-2R und H6PDH in einer ähnlichen Größenordnung bewegen, zum anderen war der Anspruch an die Primer, möglichst kurze Amplikons zu generieren, um den Degradierungs- und Fragmentierungseffekt des FFPE-Gewebes zu umgehen. Deshalb wurden für GLP-2R Primer gewählt, die Amplikons mit einer Länge von 79bp generierten, DPP-4-Amplikons hatten eine Größe von 84bp und jene von H6PDH 81bp, wodurch für die Targets und das Housekeeping-Gen die identen Amplifikationsbedingungen sichergestellt werden konnten. Obwohl die Amplifikation des Housekeeping-Gens H6PDH vorrangig für die Normalisierung der DPP-4- und GLP-2R-mRNA-Expression diente, wurde H6PDH als zusätzlicher,

qualitätssichernder Parameter herangezogen. Bei Patientenproben, welche bei der Real-Time PCR in den Genen GLP-2R und DPP-4 keine Ct-Werte zeigten, jedoch das H6PDH-Gen amplifiziert wurde, konnte mit Hilfe des Housekeeping-Gens die RNA-Qualität als ausreichend belegt und somit falsch negative Ergebnisse der Expressionen von GLP-2R und DPP-4 ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden alle Patientenproben ausschließlich im Duplikat gemessen, für die Quantifizierung die Mittelwerte für jedes analysierte Gen errechnet, die DPP-4- und GLP-2R-Expression auf das Housekeeping-Gen H6PDH normalisiert und mittels relativer Quantifizierung ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode) das Expressionsniveau und die Korrelation der beiden Gene zueinander analysiert.

Aufgrund der Tatsache, dass nicht geklärt ist, welche Faktoren am Übergang zu aggressiveren Krankheitsverläufen beteiligt sind und aus vorangegangenen Studien bekannt ist, dass am Regenerationsprozess der Leber DPP-4 als auch der GLP-2R beeinflussend agieren können, wurde in der vorliegenden Arbeit neben den Expressionsniveaus der DPP-4 und des GLP-2R bei fortschreitender NAFLD zusätzlich untersucht, ob es im Lebergewebe eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression der DPP-4 als Ausdruck einer Leberschädigung im Sinne einer NAFLD mit jener des GLP-2R gibt. Mittels Korrelationsanalyse nach Spearman konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang der mRNA-Expression von DPP-4 und GLP-2R dargestellt werden. In welchem kausalen Zusammenhang diese Korrelation steht, kann mit dem jetzigen Wissensstand jedoch nicht beantwortet werden. Eine zentrale Rolle spielen mit großer Wahrscheinlichkeit der Lipid- und Glukosestoffwechsel. Ein pathophysiologischer Mechanismus, der die Expression von DPP-4 und GLP-2R induziert, scheint vorzuliegen. In der Tat erschwert die Diskussion und vor allem die Interpretation dieses Ergebnisses erheblich der Umstand, dass man trotz zahlreicher Studien bislang nur wenig über die genaue zelluläre Lokalisierung des hepatischen GLP-2R weiß. Angeregt durch widersprüchliche Daten zur Wirkung von GLP-2 in der Leber befassten sich Fuchs et al. mit der Beteiligung der GLP-2R – Expression in der Leber. Sie betonten, dass zum einen der Zusammenhang zwischen dem Verlust der GLP-2R-Aktivität und der erhöhten Fettansammlung bislang nicht geklärt ist, zum anderen die Auswirkung des Fehlens des GLP-2R auf die Inflammation und hepatische Insulinsensitivität ebenso unklar ist und es deswegen weiterer Untersuchungen bedarf (26). Das

humane Lebergewebe besteht aus zwei Zelleinheiten, den parenchymalen Zellen und den nicht-parenchymalen Zellen. Während die Hepatozyten zu den parenchymalen Zellen gehören und 60-70% der gesamten Leberzellen ausmachen, zählen zur Fraktion der nicht-parenchymalen Zellen die Kupferzellen (KC), Leberendothelzellen (LEC) und die hepatischen Sternzellen (HSC). Die Aufgaben der Hepatozyten liegen in metabolischen Leberfunktionen, in der Biotransformation und im Energiestoffwechsel. Die heterogene Gruppe der nicht-parenchymalen Zellen hat eine bedeutende Funktion bei physiologischen Leberprozessen inne und ist darüber hinaus bei akuten als auch chronischen Leberschäden, wie der Leberzirrhose, beteiligt (40). Bislang konnte nicht vollends geklärt werden, welcher Zelltyp den GLP-2R exprimiert. Zum einen war es Fuchs et al. durch Zellfraktionierung möglich, GLP-2R in den HSC zu detektieren (26), zum anderen lokalisierten Jamal et al. GLP-2R in den primären Hepatozyten. Mittels Immunfärbungen versuchten sie mehr Aufschluss über die Expression zu gewinnen, jedoch blieb dieses Vorhaben aufgrund mangelnder Spezifität der insgesamt sechs verwendeten Antikörper erfolglos (23). Weiters kamen Fuchs et al. zur Erkenntnis, dass der Verlust des GLP-2R Signals mit der Aktivierung der HSC und ernährungsbedingten Leberschädigungen in engem Zusammenhang steht (26). Die HSC befinden sich im perisinusoidalen Disse'schen Raum und liegen zwischen dem fenestrierten Leberendothel und den Hepatozyten. Während ruhende HSC neben extrazellulären Matrixproteinen gleichzeitig matrixabbauende Enzyme sezernieren und somit die dreidimensionale Architektur der Leber gewährleisten, führt eine Störung dieser Homöostase aufgrund von Stoffwechselkrankheiten, Leberinfektionen etc. zu ihrer Aktivierung. In weiterer Folge differenzieren die HSC zu Myofibroblasten, was eine desorganisierte Ansammlung von extrazellulärer Matrix und Leberfibrose mit Zirrhose sowie Leberversagen zur Folge hat (41). Aufgrund des mangelnden und teils nicht gesicherten Wissens über die hepatische GLP-2R-Expression ist es verständlich, dass es nicht möglich ist, eine Aussage über die Relevanz des GLP-2R in der Pathogenese der NAFLD zu treffen. Da man mittlerweile erkannt hat, dass die Zell-Zell-Interaktion zwischen den einzelnen Leberzellpopulationen eine Schlüsselfigur im physiologischen Gleichgewicht aber auch bei pathologischen Prozessen darstellt, fokussiert man sich in der Wissenschaft zunehmend auf die nicht-parenchymalen Zellen und deren Zell-Zell-Kommunikation (40). Zur Isolierung der

einzelnen Zelltypen existieren heutzutage optimierte Protokolle, die neben der Auftrennung der Populationen mittels FACS und Durchflusszytometrie zusätzlich den Zweck der Anreicherung für weiterführende Expressions- als auch Inhibitionsstudien haben.

Während wenig über die Lokalisation des GLP-2R in der humanen Leber bekannt ist, hat man einen guten Überblick über die hepatische DPP-4-Expression. Balaban et al. untersuchten an Leberbiopsien von Patient*innen, deren Transaminasen trotz Änderung des Lebensstils bis aufs Doppelte erhöht blieben, nach Klassifizierung der NASH gemäß den Kriterien von Brunt die hepatische Expression von CD26 mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie. Die CD26-Expression war bei allen NASH-Patient*innen in unterschiedlicher Intensität auf Hepatozyten, Kapillarendothelien und stromalen Fibroblasten vorhanden. Außerdem zeigten sie, dass die Immunreaktion mit CD26 auf Hepatozyten ausschließlich auf der apikalen (biliären) Seite auftrat, die basolaterale (sinusoidale) Seite kein CD26 exprimierte und die Intensität von Zone 3 in Richtung Zone 1 abnahm. Die zonale CD26-Expression wurde unter anderem mit einem unterschiedlichen Stoffwechselbedarf, einer Umgebungsheterogenität sowie der zonalen Ausscheidung eines unbekanntes Substrats gemeinsam mit der DPP-4 in die Galle argumentiert. Außerdem konnte demonstriert werden, dass aufgrund einer Zirrhose das zonale Verteilungsmuster wegen des Architekturverlusts verloren geht und sich die CD26-Expression von der biliären auf die basolaterale Seite verlagert. Sie betonten, dass zwar die Färbintensität in Zone 3 höher als in Zone 1 war, dieser Unterschied jedoch nach Auswertung mittels nicht-parametrischen Tests statistisch nicht signifikant sei. Weiters erwähnten sie die T-Zell-aktivierende Eigenschaft von CD26 und die potenzielle Wirkung auf das proinflammatorische Zytokin TNF- α , das an der Entstehung der Leberschädigungen bei NASH maßgeblich beteiligt ist. Interessanterweise hoben sie die Eigenschaft von DPP-4 hervor, als Rezeptor zwischen aktivierten T-Zellen, HSC und Hepatozyten zu agieren. (36).

Wie bereits erwähnt ist die Beteiligung und Bedeutung der DPP-4 an der Pathogenese der NAFLD gut erforscht. Durch zahlreiche Studien weiß man, dass NAFLD-Patient*innen erhöhte DPP-4-mRNA-Werte in der Leber aufweisen und das in engem Zusammenhang mit dem Stadium der Lebersteatose insbesondere bei

fettleibigen Personen steht. Baumeier et al. zeigten, dass eine fettreiche Diät bei Mäusen die Überexpression von DPP-4 in den Hepatozyten induziert und die Entwicklung einer Fettleber stimuliert (18). Als expressionsfördernder Faktor ist offenbar die Hyperglykämie einzustufen (42). Zwischen der NAFLD und Diabetes mellitus Typ 2 besteht eine enge Assoziation. Die wichtigste Verbindung ist die Insulinresistenz, die „als eine suboptimale Reaktion auf Insulinfunktionen in verschiedenen Geweben definiert ist“ (43). Es besteht sozusagen eine bidirektionale Interaktion zwischen NAFLD und Diabetes mellitus Typ 2. Einerseits fördert die Leber die Entstehung der Insulinresistenz, die die NAFLD und Diabetes mellitus Typ 2 zur Folge hat, andererseits kommt es durch das Vorliegen einer NAFLD zu Diabetes mellitus Typ 2-Komplikationen. Die Insulinresistenz wird bei der NAFLD durch eine Reihe von Entzündungsprozessen stimuliert. Weiters führen ein verstärkter Transport freier Fettsäuren zur Leber, eine herabgesetzte Oxidation, eine gesteigerte Triglyceridsynthese zur Induktion einer Hyperinsulinämie, da die β -Zellen des Pankreas versuchen, diese Zustände zu kompensieren, wodurch es nachweislich zur hepatozellulären Ballonierung und lobulären Inflammation kommt. Da wegen dieser Mechanismen die NAFLD als auch Diabetes mellitus Typ 2 in enger Wechselwirkung zueinander stehen und DPP-4-Inhibitoren zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden, gelten diese nun als neue Kandidaten in der medikamentösen Therapie der NAFLD (43). Neben der hepatischen mRNA-Expression steht die Bedeutung der Serum-DPP-4-Aktivität immer mehr im Fokus aktueller Studien. Neue Erkenntnisse unterstreichen nämlich die potentielle Eigenschaft der DPP-4-Serumkonzentration als neuen prognostischen und diagnostischen Marker der NAFLD. Es wurde gezeigt, dass bei NAFLD-Patient*innen eine erhöhte DPP-4-Aktivität im Plasma vorlag, die unter anderem auf die hepatozytenspezifische DPP-4-Überexpression zurückzuführen war (18). Darüber hinaus wies man eine positive Korrelation der DPP-4-Serumaktivität mit den Leberparametern γ GT und ALT (Alanin-Aminotransferase) nach, was ebenfalls bestätigte, dass der Serumüberschuss der DPP-4 hepatischen Ursprungs war (44). Diesen Effekt konnten Balaban et al. ebenso darstellen, indem sie eine erhöhte DPP-4-Aktivität im Serum bei NASH-Patient*innen im Gegensatz zur Kontrollgruppe detektierten (36). In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2021 belegten Barchetta et al. aufs Neue die Koexistenz erhöhter DPP-4-Konzentrationen und -Aktivität im Plasma bei NAFLD-Patient*innen (45). In Summe

scheinen diese Ergebnisse vielversprechend zu sein und unterstreichen das Potential der Serum-DPP-4-Aktivität als neuartigen Biomarker für das Krankheitsgeschehen der NAFLD. Die Messung der zirkulierenden DPP-4-Konzentration stellt möglicherweise in Zukunft eine kostengünstige, nicht-invasive Methode sowohl zur Risikostratifizierung für die NAFLD als auch zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und zum Monitoring des Therapieansprechens dar. Darüber hinaus könnte diese Methode Verwendung in der Unterscheidung zwischen Steatose und Steatohepatitis finden, vorausgesetzt weitere Studien belegen, dass die DPP-4-Konzentrationsänderung Konsequenz der NASH-spezifischen Leberschädigung ist.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Studie kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R als Ausdruck der Leberschädigung und/oder Regeneration im Sinne eines dynamischen Prozesses dargestellt. Mittels Korrelationsanalyse wurde zwar ein Zusammenhang zwischen der hepatischen mRNA-Expression der DPP-4 und des GLP-2R beschrieben, jedoch ist die Interpretation dieses Ergebnisses mit dem heutigen Wissensstand nicht möglich. Eine zentrale offene Frage, die es in zukünftigen Studien zu beantworten gilt, stellt die hepatische Expression des GLP-2R dar, um in weiterer Folge seine Bedeutung in der Pathogenese der NAFLD aufschlüsseln zu können. Weiters ist es nötig, die Rolle der HSC in der Pathophysiologie dieser chronischen Leberkrankheit zu beschreiben, da in Studien sowohl die Interaktion der DPP-4 mit den HSC erwähnt wurde, als auch mittels Expressionsanalysen der Nachweis von GLP-2R auf HSC gelang. Darüber hinaus bedarf es ebenso das Potential der zirkulierenden DPP-4 als Biomarker für Prognose, Diagnose und Monitoring im Krankheitsgeschehen der NAFLD zu klären. Aufgrund der Komplexität der pathophysiologischen Mechanismen, dem Mitwirken exogener sowie endogener Faktoren braucht es in Zukunft noch viele Studien, um einen Überblick über das Krankheitsgeschehen der NAFLD zu bekommen.

5 Literaturverzeichnis

1. European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
2. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20.
3. Henryk Dancygier O. Arzneimitteltherapie - Nichtalkoholische Fettleber 2009 [Available from: <https://www.arzneimitteltherapie.de/heftarchiv/2009/04/nichtalkoholische-fettlebererkrankungen.html>].
4. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15080.
5. Longerich T, Flechtenmacher C, Schirmacher P. [Quality and quantity in hepatopathology. Diagnostic and clinically relevant grading for non-tumourous liver diseases]. *Pathologe.* 2008;29(1):15-26.
6. Lazarus JV, Palayew A, Carrieri P, Ekstedt M, Marchesini G, Novak K, et al. European 'NAFLD Preparedness Index' - Is Europe ready to meet the challenge of fatty liver disease? *JHEP Rep.* 2021;3(2):100234.
7. Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2019;70(2):711-24.
8. Grander C, Grabherr F, Moschen AR, Tilg H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Cause or Effect of Metabolic Syndrome. *Visc Med.* 2016;32(5):329-34.
9. Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(11):901-10.
10. Roeb E, Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol.* 2019;57(4):508-17.
11. Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut.* 2017;66(6):1138-53.

12. Shabalala SC, Dludla PV, Mabasa L, Kappo AP, Basson AK, Pheiffer C, et al. The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110785.
13. Kemas AM, Youhanna S, Lauschke VM. Non-alcoholic fatty liver disease - opportunities for personalized treatment and drug development. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development.* 2022;7(1):39-49.
14. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):197-211.
15. Jonas W, Schurmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Mol Metab.* 2021;50:101111.
16. Del Campo JA, Gallego-Duran R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
17. Sharpton SR, Schnabl B, Knight R, Loomba R. Current Concepts, Opportunities, and Challenges of Gut Microbiome-Based Personalized Medicine in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2021;33(1):21-32.
18. Baumeier C, Schluter L, Saussenthaler S, Laeger T, Rodiger M, Alaze SA, et al. Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 2017;6(10):1254-63.
19. Lafferty RA, O'Harte FPM, Irwin N, Gault VA, Flatt PR. Proglucagon-Derived Peptides as Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:689678.
20. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature.* 1983;304(5924):368-71.
21. Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev.* 2015;95(2):513-48.
22. Baldassano S, Amato A. GLP-2: what do we know? What are we going to discover? *Regul Pept.* 2014;194-195:6-10.
23. El-Jamal N, Erdual E, Neunlist M, Koriche D, Dubuquoy C, Maggiotto F, et al. Glucagon-like peptide-2: broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(3):G274-85.

24. Gadgaard S, van der Velden WJC, Schiellerup SP, Hunt JE, Gabe MBN, Windelov JA, et al. Novel agonist and antagonist radioligands for the GLP-2 receptor. Useful tools for studies of basic GLP-2 receptor pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2022;179(9):1998-2015.
25. Drucker DJ. Glucagon-like peptide 2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1759-64.
26. Fuchs S, Yusta B, Baggio LL, Varin EM, Matthews D, Drucker DJ. Loss of Glp2r signaling activates hepatic stellate cells and exacerbates diet-induced steatohepatitis in mice. *JCI Insight*. 2020;5(8).
27. Taher J, Baker C, Alvares D, Ijaz L, Hussain M, Adeli K. GLP-2 Dysregulates Hepatic Lipoprotein Metabolism, Inducing Fatty Liver and VLDL Overproduction in Male Hamsters and Mice. *Endocrinology*. 2018;159(9):3340-50.
28. Elmansi AM, Awad ME, Eisa NH, Kondrikov D, Hussein KA, Aguilar-Perez A, et al. What doesn't kill you makes you stranger: Dipeptidyl peptidase-4 (CD26) proteolysis differentially modulates the activity of many peptide hormones and cytokines generating novel cryptic bioactive ligands. *Pharmacol Ther*. 2019;198:90-108.
29. Suzuki R, Brown GA, Christopher JA, Scully CCG, Congreve M. Recent Developments in Therapeutic Peptides for the Glucagon-like Peptide 1 and 2 Receptors. *J Med Chem*. 2020;63(3):905-27.
30. Miyazaki M, Kato M, Tanaka K, Tanaka M, Kohjima M, Nakamura K, et al. Increased hepatic expression of dipeptidyl peptidase-4 in non-alcoholic fatty liver disease and its association with insulin resistance and glucose metabolism. *Mol Med Rep*. 2012;5(3):729-33.
31. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. Dipeptidyl peptidase-4: a key player in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2013;19(15):2298-306.
32. Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, et al. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011;60(4):1246-57.
33. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
34. De A, Duseja A. Natural History of Simple Steatosis or Nonalcoholic Fatty Liver. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(3):255-62.

35. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
36. Balaban YH, Korkusuz P, Simsek H, Gokcan H, Gedikoglu G, Pinar A, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DDP IV) in NASH patients. *Ann Hepatol*. 2007;6(4):242-50.
37. Yi QQ, Yang R, Shi JF, Zeng NY, Liang DY, Sha S, et al. Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. *J Int Med Res*. 2020;48(6):300060520931259.
38. Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 2001;195(1):66-71.
39. Choi Y, Kim A, Kim J, Lee J, Lee SY, Kim C. Optimization of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks for Targeted Next-Generation Sequencing. *J Breast Cancer*. 2017;20(4):393-9.
40. Kegel V, Deharde D, Pfeiffer E, Zeilinger K, Seehofer D, Damm G. Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *J Vis Exp*. 2016(109):e53069.
41. Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):68-74.
42. Baumeier C, Saussenthaler S, Kammel A, Jahnert M, Schluter L, Hesse D, et al. Hepatic DPP4 DNA Methylation Associates With Fatty Liver. *Diabetes*. 2017;66(1):25-35.
43. Padda J, Khalid K, Khedr A, Tasnim F, Al-Ewaidat OA, Cooper AC, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Association With Diabetes Mellitus. *Cureus*. 2021;13(8):e17321.
44. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Feher J, Ghyczy D, Wichmann B, et al. Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One*. 2010;5(8):e12226.
45. Barchetta I, Ceccarelli V, Cimini FA, Barone E, Sentinelli F, Coluzzi M, et al. Circulating dipeptidyl peptidase-4 is independently associated with the presence and severity of NAFLD/NASH in individuals with and without obesity and metabolic disease. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(5):979-88.