

Gefördert vom



Zuwendungsempfänger: Universität Freiburg

Thema der Förderung:

**Ein systemmedizinischer Ansatz zur Früherkennung
und Prävention des hepatozellulären Karzinoms bei
Nicht-Alkoholischer Fettlebererkrankung - SMART-NAFLD**

Verantwortlich: Prof. Dr. Jens Timmer

Förderkennzeichen: 031L0256G

**Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim
Autor.**

Schlussbericht
**Ein systemmedizinischer Ansatz zur Früherkennung
und Prävention des hepatozellulären Karzinoms bei
Nicht-Alkoholischer Fettlebererkrankung - SMART-NAFLD**
Förderkennzeichen 031L0256G
Förderzeitraum: 01.07.2021 – 30.06.2024

Teil I

1. Aufgabenstellung

Weltweit führt die Zunahme von Fettleibigkeit zu einem alarmierenden Anstieg an Nicht-alkoholischen Lebererkrankungen (NAFLD), wovon bereits 25% der Weltbevölkerung betroffen sind. NAFLD kann zu schwerwiegenden Folgen wie Leberkrebs (HCC) führen, wobei innovative Strategien zur Früherkennung dringend benötigt werden. In SMART-NAFLD verfolgte ein interdisziplinäres Team einen systemmedizinischen Ansatz, der auf dynamischen Signalwegmodellen, Gewebemodellen und Technologien wie künstlicher Intelligenz basierte. Ein integratives mathematisches Modell sollte verwendet werden, um die Verknüpfung von Stoffwechselprozessen und Signaltransduktion zu ermöglichen und die Proliferation von Hepatozyten in NAFLD-Patienten zu verstehen. Ziel war die Früherkennung von HCC-Risiken durch die Charakterisierung von Veränderungen im Stoffwechsel und der Signaltransduktion. Durch das mathematische Modell sollten Vorhersagen über den Krankheitsverlauf ermöglicht werden. Ziele umfassten die Identifizierung tumorfördernder Veränderungen, den Vergleich von HCC mit und ohne Zirrhose und die Verknüpfung zellulärer Reaktionen mit strukturellen Gewebeveränderungen.

Für die Arbeitsgruppe Timmer im Speziellen ging es zum einen darum ein bestehendes mathematisches Modell, das die intrazelluläre Signaltransduktion für den Wachstumsfaktor der Leber (HGF) beschreibt, weiterzuentwickeln und zum anderen darum, Interaktionen dieses Signaltransduktionsnetzwerkes mit metabolischen Veränderungen zu identifizieren, die während der Entwicklung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung auftreten. Des Weiteren sollten Methoden zur Prozessierung und Analyse von Massenspektrometrie-Daten entwickelt werden, um diese Daten anschließend in mathematische Modelle integrieren zu können.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den Partnern aus SMART-NAFLD und C-TIPP-HCC durchgeführt. Eine besonders enge Kollaboration bestand mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ursula Klingmüller, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.

3. Planung und Ablauf des Versuchsvorhabens

Das Subprojekt SMART-NAFLD wurde antragsgemäß durch sechs Arbeitspakete/Meilensteine strukturiert, wobei wir in die Bearbeitung von vier Arbeitspaketen involviert waren. Insgesamt wurden die folgenden Themen abgearbeitet.

N. Netzwerkübergreifende Aktivitäten

MSN1 Klinische Datenaustauschplattform

MSN2 SOPs für OMICs Technologie und Entwicklung von Datenanalyse Pipelines

MSN3 Strategien für translationale Applikationen

AP2. Zelluläre Skala - Integrative Modellierung der Signaltransduktion und Metabolismus

MS2.4 Entwicklung von gezielter Massenspektrometrie-Methoden zur Analyse der Wachstumsfaktor- und Zytokin-induzierten Signaltransduktion

MS2.5 Draft eines vergrößerten Stoffwechselmodells und Konzeptentwicklung zur Verknüpfung mit Signaltransduktionsmodellen

MS2.7 Wachstumsfaktor- und Zytokin-Stimulationsexperimente mit PHHs der Krankheitsstadien, HepG2, Huh7 und kommerziell erhältlichen PHHs von NAFLD-Patienten und mathematische Modellierung der Signaltransduktion einschließlich Verbindung zu zellulären Antworten

MS2.8 Entwicklung und Validierung stadienspezifischer integrativer Modelle des Stoffwechsels und der Signaltransduktion, inklusive Weiterentwicklung des Draft Modells aus MS 2.5.

MS2.9 Stadienspezifische Entwicklung eines integrativen Modells des Stoffwechsels und der Signaltransduktion einschließlich zellulärer Antworten

MS2.10 Charakterisierung des Kippunktes in Richtung HCC

AP3. Gewebemaßstab - Modell für Leberregeneration in NAFLD

MS3.11 Integratives mechanismusbasiertes multiskalen Modell der NAFLD-Progression

AP4. Multiomik-Charakterisierung von Veränderungen, die für die NAFLD-Progression indikativ sind

MS4.2 Etablierung einer Pipeline zur Analyse proteomischer und metabolischer Veränderungen in PHHs und Gewebe verschiedener Krankheitsstadien, Etablierung des Datenmanagements

MS4.3 Messung sowie Analyse des Gesamtproteoms des Lebergewebes von WD Mäusen

MS4.4 Messung sowie Analyse des Gesamtproteoms und spezifischer Proteine der PHHs verschiedener Krankheitsstadien

MS4.5 Messung und statistische Analyse des Gesamtproteoms von retrospektiven Gewebeproben, sowie des Gesamtproteoms

MS4.7 Entwicklung einer Analyse-Pipeline für phosphoproteomische Daten, Datenmanagement

MS4.9 Etablierung einer Datenanalyse Pipeline für humane Serum- oder Plasmaproben

MS4.11 Identifizierung von frühen Veränderungen in longitudinalen Serumproben

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.

Eine Vielzahl der bei HCC fehlregulierten Signaltransduktionswege, wie die HGF/Met-Rezeptorachse, sind auch an der Leberregeneration beteiligt. HGF ist der Schlüsselwachstumsfaktor für Hepatozyten und führt im HCC durch eine Überexpression von Met, aktivierende Met-Mutationen oder erhöhte HGF-Sekretion zu einer Hyperaktivierung von PI3K/AKT, RAS/ERK und STAT3, was die Hepatozytenproliferation fördert. Die Auswirkungen der HGF/Met-Signaltransduktion auf metabolische Veränderungen im Zusammenhang mit der Progression von MASLD sind noch unbekannt.

Die dynamische Modellierung ist zu einem wertvollen Instrument geworden, da sie es Forschern ermöglicht, biologische Hypothesen in Gleichungen zu formalisieren und Vorhersagen zu treffen, die iterativ mit Daten überprüft werden können. Dies ermöglicht die Versuchsplanung über In-silico-Experimente zur effizienten Verfolgung biologischer Fragen. Darüber hinaus ermöglicht es eine statistisch fundierte Hypothesenprüfung und quantitative Entscheidungsfindung.

Die Entwicklung prädiktiver mechanismusgestützter Modelle erfordert hochwertige experimentelle Daten. Klingmüller, Partner in SMART-NAFLD, entwickelte SOPs für die Analyse von Signaltransduktionswegen in Hepatozyten, einschließlich quantitativem Immunoblotting und massenspektrometrischer Methoden zur Phosphorylierungsquantifizierung.

Eigene Vorarbeiten

Im Rahmen des LiSyM Konsortiums wurde in der Arbeitsgruppe von Timmer an der Universität Freiburg ein mathematisches Modell des HGF-Signalwegs entwickelt, das auf primäre menschliche Hepatozyten kalibriert wurde. Dieses Modell wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Klingmüller am DKFZ in Heidelberg entwickelt.

Die Software Data2Dynamics (D2D) wird seit über einem Jahrzehnt in der Arbeitsgruppe von Timmer kontinuierlich weiterentwickelt. Ihr Hauptzweck ist die Konstruktion, Simulation, Anpassung und Analyse nichtlinearer dynamischer Modelle in systembiologischen Zusammenhängen. Mit einem klaren Schwerpunkt auf der Unsicherheitsanalyse in dynamischen Systemen ist es besonders gut geeignet für die Daten-basierte Modellierung komplexer Systeme.

Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die fuer die Durchfuehrung des Vorhabens benutzt wurden

Nicht zutreffend.

Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Ausgewählte Veröffentlichungen sind unten aufgeführt:

- L.A. D'Alessandro, R. Samaga, T. Maiwald, S.-H. Rho, S. Bonefas, A. Raue, N. Iwamoto, A. Kienast, K. Waldow, R. Meyer, M. Schilling, J. Timmer, S. Klamt, U. Klingmüller. [Disentangling the Complexity of HGF Signaling by Combining Qualitative and Quantitative Modeling](#). *PLoS Computational Biology* **11**, 2015, e1004192
- S. Mueller, J. Huard, K. Waldow, X. Huang, L.A. D'Alessandro, S. Bohl, K. Börner, D. Grimm, S. Klamt, U. Klingmüller, M. Schilling. [T160-phosphorylated CDK2 defines threshold for HGF dependent proliferation in primary hepatocytes](#). *Molecular Systems Biology* **11(3)**, 2015, 795
- U. Klingmüller, A. Bauer, S. Bohl, P.J. Nickel, K. Breitkopf, S. Dooley, S. Zellmer, C. Kern, I. Merfort, T. Sparna, J. Donauer, G. Walz, M. Geyer, C. Kreutz, M. Hermes, F. Götschel, A. Hecht, D. Walter, L. Egger, K. Neubert, C. Borner, M. Brulport, W. Schormann, C. Sauer, F. Baumann, R. Preiss, S. MacNelly, P. Godoy, E. Wiercinska, L. Ciucan, J. Edelmann, K. Zeilinger, M. Heinrich, U.M. Zanger, R. Gebhardt, T. Maiwald, R. Heinrich, J. Timmer, F. von Weizsäcker and J.G. Hengstler. [Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways](#). *IEE Proc. Systems Biology* **153**, 2006, 433-447
- L. Adlung, S. Kar, M.-C. Wagner, B. She, S. Chakraborty, J. Bao, S. Lattermann, M. Boerries, H. Busch, P. Wuchter, A.D. Ho, J. Timmer, M. Schilling, T. Höfer, U. Klingmüller.

[Protein abundance pattern of AKT and ERK pathway components governs cell-type-specific regulation of proliferation.](#) *Molecular Systems Biology* **13**, 2017, 904

- A. Raue, M. Schilling, J. Bachmann, A. Matteson, M. Schelker, D. Kaschek, S. Hug, C. Kreutz, B.D. Harms, F.J. Theis, U. Klingmüller, J. Timmer. [Lessons learned from quantitative dynamical modeling in systems biology.](#) *PLoS ONE* **8**, 2013, e74335
- A. Raue, C. Kreutz, T. Maiwald, J. Bachmann, M. Schilling, U. Klingmüller, J. Timmer. [Structural and practical identifiability analysis of partially observed dynamical models by exploiting the profile likelihood.](#) *Bioinformatics* **25**, 2009, 1923-1929
- A. Raue, B. Steiert, M. Schelker, C. Kreutz, T. Maiwald, H. Hass, J. Vanlier, C. Tönsing, L. Adlung, R. Engesser, W. Mader, T. Heinemann, J. Hasenauer, M. Schilling, T. Höfer, E. Klipp, F. Theis, U. Klingmüller, B. Schöberl, J. Timmer. [Data2Dynamics: a modeling environment tailored to parameter estimation in dynamical systems.](#) *Bioinformatics* **31**, 2015, 3558-3560
- L. Schmiester, Y. Schälte, F.T. Bergmann, T. Camba, E. Dudkin, J. Egert, F. Fröhlich, L. Fuhrmann, A.L. Hauber, S. Kemmer, P. Lakrisenko, C. Loos, S. Merkt, W. Müller, D. Pathirana, E. Raimundez, L. Refisch, M. Rosenblatt, P.L. Stapor, P. Städter, D. Wang, F.-G. Wieland, J. Banga, J. Timmer, A.J. Villaverde, S. Sahle, C. Kreutz, J. Hasenauer, D. Weindl. [PEtab - Interoperable specification of parameter estimation problems in systems biology.](#) *PLoS Computational Biology* **17**, 2021, e1008646

1. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Für dieses Projekt haben wir größtenteils mit folgenden Personen zusammengearbeitet

- Prof. Dr. Ursula Klingmüller, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.
- Prof. Dr. Thomas Berg, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig.
- Dr. Madlen Matz-Soja, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig.
- Prof. Dr. Katrin Hoffmann, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg.
- Prof. Dr. Almut Schulze, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.
- Prof. Dr. Daniel Seehofer, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig.
- Dr. Georg Damm, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig.
- Prof. Dr. Jan G. Hengstler, Technische Universität Dortmund, Dortmund.
- Prof. Dr. Ahmed Ghallab, Technische Universität Dortmund, Dortmund
- Dr. Ralf Steuer, Humboldt Universität Berlin, Berlin.

Wir hatten häufige persönliche und virtuelle Diskussionen mit Prof. Dr. Klingmüller und ihren Teammitgliedern. Wir tauschten neue Ergebnisse mit den anderen klinischen, experimentellen und Modeling-Partnern aus dem SMART-NAFLD Konsortium sowie dem gesamten LiSyM-Cancer Netzwerk aus. Dies geschah im Rahmen von virtuellen Meetings und auf Treffen des gesamten Netzwerkes wie den Status Seminaren. Die Diskussionen waren sehr fruchtbar und brachten das Projekt zu erfolgreichen Ergebnissen.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Entlang der Liste der Teilaufgaben auf Seite 2 und 3 wurden folgende Ergebnisse erzielt

N. Netzwerkübergreifende Aktivitäten

MSN1 - Klinische Datenaustauschplattform

Mit RedCAP wurde eine Plattform für die Speicherung und den Austausch klinischer Daten entwickelt. Sie ermöglicht die Verknüpfung von humanen Proben mit Barcodes für eine sicherere und nachhaltigere Dokumentation. In Zusammenarbeit mit dem zentralen Datenmanagement wurde eine Schnittstelle zu OpenBIS etabliert, um eine automatisierte Verknüpfung zu den molekularen Daten zu gewährleisten. Für die effiziente und offene Teilung klinischer und experimenteller Daten zwischen allen Partnern wurde ein Joint Controller Agreement aufgesetzt, das dank der engen Zusammenarbeit aller Netzwerkpartner am 04.05.2023 in Kraft trat.

MSN2 - SOPs für OMICs Technologie und Entwicklung von Datenanalyse Pipelines Eine SOP für die Aufbereitung von humanem Lebergewebe wurde entwickelt. Mit dieser SOP können sowohl proteomische als auch metabolische Analysen aus dem selben Ausgangsmaterial durchgeführt werden. Dies garantiert ein homogenes Bild des Gewebes und eine bessere Vergleichbarkeit der OMICs-Daten. Die SOP wurde mit dem gesamten Konsortium in der LiSyM-Cancer NextCloud geteilt und wird für die Entwicklung von OMICs-Analysepipelines verwendet.

MSN3 - Strategien für translationale Applikationen

Für die Anwendung der Ergebnisse in der Klinik wurden folgende Strategien entwickelt und als Meilensteine für die zweite Förderperiode ausgearbeitet: In longitudinalen Serumproben von Patienten sollen durch Proteomik und Metabolomik Alarmsignaturen identifiziert werden, die als Indikatoren für HCC dienen. In Kooperation mit Unternehmen sollen Antikörper-basierte Assays entwickelt werden, um ihre Anwendung in der Klinik zu ermöglichen. Gleichzeitig wird die klinische Proteomikpipeline mit Hilfe von Diagnostikunternehmen weiterentwickelt werden, um einen schnellen und standardisierten Nachweis von Markerproteinen sicherzustellen. Ein mechanistisches Modell zur Vorhersage des HCC-Rezidivrisikos wird mittels Risikomodellierung in einer klinischen Umgebung evaluiert, um die Qualität der Therapieentscheidungen zu bestimmen.

AP2. Zelluläre Skala - Integrative Modellierung der Signaltransduktion und Metabolismus

MS2.4 - Entwicklung von gezielter Massenspektrometrie-Methoden zur Analyse der Wachstumsfaktor- und Zytokin-induzierten Signaltransduktion

Die Detektion von Proteinen, die in der Signaltransduktion involviert sind, wurde in Zusammenarbeit mit der AG Klingmüller durch die Etablierung der datenunabhängiger Akquisition (DIA) verbessert. Im Vergleich zur herkömmlichen datenabhängigen Akquisition (DDA) ermöglichte DIA die Identifikation von 50% mehr membrangebundenen Proteinen in Zelllinien- und Lebergewebeproben. Dies wurde durch die Identifizierung geeigneter Peptide für die massenspektrometrische Quantifizierung ermöglicht. Zur absoluten Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie wurden Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für die Herstellung von isotope markierten (schwer markierten) Proteinen (N15) etabliert, erfolgreich für MET, AKT und SK6 angewendet und als Spike-in-Proteine für die absolute Quantifizierung durch Parallel Reaction Monitoring (PRM) genutzt. Diese absolute Quantifizierung ermöglicht eine präzise Schätzung der Parameter mathematischer Modelle, verkürzt die Bearbeitungszeit und verbessert die Identifizierbarkeit der Parameter.

MS2.5 - Draft eines vergrößerten Stoffwechselmodells und Konzeptentwicklung zur Verknüpfung mit Signaltransduktionsmodellen

In Zusammenarbeit mit Klingmüller, Steuer und Schulze wurde ein Modellierungskonzept für die Verknüpfung von Signaltransduktion und Metabolismus entwickelt. Dieses Konzept basiert auf dem experimentell identifizierten Einfluss von AKT auf den Stoffwechsel und der Wirkung von Metaboliten auf den Signaltransduktionsregulator mTOR.

MS2.7 - Wachstumsfaktor- und Zytokin-Stimulationsexperimente mit PHHs der Krankheitsstadien, HepG2, Huh7 und kommerziell erhältlichen PHHs von NAFLD-Patienten und mathematische Modellierung der Signaltransduktion einschließlich Verbindung zu zellulären Antworten.

In Kooperation mit Klingmüller wurden zeitlich aufgelöste HGF-Stimulationsexperimente an Hepatomzelllinien durchgeführt. Mithilfe quantitativen Immunoblottings wurden die Auswirkungen von Metabolitenentzug auf die HGF-induzierte Signaltransduktion untersucht. Es konnte ein starker Effekt auf AKT beobachtet werden. Dies ist besonders interessant, da die HGF-induzierte Signaltransduktion auch über AKT die Glykolyse reguliert und somit wiederum zu Veränderungen im zellulären Energiehaushalt führt. Um die Bedeutung dieser Achse zwischen Signaltransduktion und Stoffwechsel zu verstehen, wurde das bestehende HGF-Modell um zentrale Stoffwechselwege erweitert und auf den gemessenen Daten neu kalibriert. Um den Einfluss von AKT auf den Stoffwechsel weiter zu untersuchen, wurden AKT Inhibitor Experimente durchgeführt. Diese Daten bestätigten die Verknüpfung und konnten zudem verwendet werden, um

den Zusammenhang im Modell noch besser zu informieren. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der Ausgangsmetaboliten analysiert, um den Ausgangszustand des Systems zu charakterisieren.

MS2.8 - Entwicklung und Validierung stadienspezifischer integrativer Modelle des Stoffwechsels und der Signaltransduktion, inklusive Weiterentwicklung des Draft Modells aus MS2.5.

Um das Zusammenspiel von Fettsäuremetabolismus, Glukosestoffwechsel und Redoxbiologie zu verstehen, wurden in Zusammenarbeit mit Klingmüller und Schulze die Effekte von Metaboliten wie Glukose, Fruktose, Fettsäuren und Aminosäuren auf die von HGF induzierte Signaltransduktion untersucht. Die dabei gewonnenen Daten wurden verwendet, um das mathematische Modell iterativ um relevante Prozesse zu erweitern.

MS2.9 - Stadienspezifische Entwicklung eines integrativen Modells des Stoffwechsels und der Signaltransduktion einschließlich zellulärer Antworten

Gemeinsam mit Höhme und Steuer wurde untersucht wie die zelluläre Antwort am besten mit dem integrativen Modell verknüpft werden kann. Aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge ist diese Verknüpfung nicht komplett mechanistisch, sondern enthält auch korrelative Komponenten, die die Modelleigenschaften mit Prozessparametern wie zum Beispiel Proliferationsparameter verbinden.

MS2.10 - Charakterisierung des Kipppunktes in Richtung HCC

Das integrative, auf Mechanismen basierende Modell, wird zur Vorhersage und Quantifizierung des Abstandes zum Kipppunkt von HCC eingesetzt. Konkret wird in Zusammenarbeit mit Klingmüller die metabolische Plastizität und die Verbindung zur proliferativen Signaltransduktion untersucht, um mögliche irreversible Veränderungen zu bestimmen.

AP3. Gewebemaßstab - Modell für Leberregeneration in NAFLD

MS3.11 - Integratives mechanismusbasiertes multiskalen Modell der NAFLD-Progression

Das humane Gewebemodell wird iterativ zu einem integrativen Mechanismus-basierten Multi-Skalen-Modell der MASLD-Progression erweitert. Dazu werden die identifizierten Verknüpfungspunkte zwischen den intrazellulären Signaltransduktions- und Metabolismus Modellen in das 3D Modell von Höhme integriert.

AP4. Multiomik-Charakterisierung von Veränderungen, die für die NAFLD-Progression indikativ sind

MS4.2 - Etablierung einer Pipeline zur Analyse proteomischer und metabolomischer Veränderungen in PHHs und Gewebe verschiedener Krankheitsstadien, Etablierung des Datenmanagements

Zur standardisierten qualitativen und quantitativen Analyse von proteomischen Daten wurde die Software MSPipeline basierend auf DDA Daten entwickelt. Anschließend wurde diese Pipeline für die Analyse von Daten, die im datenunabhängigen Akquisitionsmethode (DIA) gemessen wurden, erweitert. Somit kann auch dieser neue Datentyp statistisch auf eine reproduzierbare Art analysiert werden.

MS4.3 - Messung sowie Analyse des Gesamtproteoms des Lebergewebes von WD Mäusen

Das Proteom von Mäusen, die mit einer fett- und glukosereichen Diät gefüttert wurden und bei denen eine partielle Hepatektomie durchgeführt wurde, wurde auf Veränderungen untersucht. Dazu wurden 64 murine Lebergewebeproben von Matz-Soja zur Verfügung gestellt und von Klingmüller aufbereitet und massenspektrometrisch im DIA-Modus gemessen. Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe der entwickelten MSPipeline durchgeführt.

MS4.4 - Messung sowie Analyse des Gesamtproteoms und spezifischer Proteine der PHHs verschiedener Krankheitsstadien

Experimente mit primären humanen Hepatozyten (PHHs) von Patienten aus unterschiedlichen MASDL Stadien wurden durchgeführt, um Veränderungen im Proteom und in der metabolischen Aktivität zu untersuchen. Aufgrund der verzögerten Ausstellung des Gesamt-JCAs wurde dieser Meilenstein in die zweite Förderphase verlängert, um Proben von mehr Patienten sammeln zu können und damit statistisch signifikante Analysen durchführen zu können. Erste Ergebnisse deuten auf Unterschiede in der basalen Phosphorylierung der AMP-Kinase bei fettigen im Vergleich zu nicht-fettigen PHHs hin. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, müssen jedoch weitere Proben gesammelt werden.

MS4.5 - Messung und statistische Analyse des Gesamtproteoms von retrospektiven Gewebeproben, sowie des Gesamtproteoms

30 Lebergewebeproben wurden von Damm zur Verfügung gestellt, Proben von 10 "gesunden" und von 10 HCC-Patienten mit MASLD und geringer Fibrose (10 tumorfreie und 10 tumorhaltige Proben), wurden in Zusammenarbeit mit Klingmüller mit den etablierten Methoden (MS4.1 und MS4.2) analysiert. Dabei konnten 6925 Proteine identifiziert werden, wovon 6462 Proteine in allen Proben identifiziert und quantifiziert werden konnten. Ein quantitativer und statistischer Vergleich der Expression dieser Proteine zwischen allen Proben wurde durchgeführt.

MS4.7 - Entwicklung einer Analyse-Pipeline für phosphoproteomische Daten, Datenmanagement

Die für die Analyse des globalen Proteoms etablierte MSPipeline wurde für die Anwendung auf das Phospho-Proteom erweitert. Dies ermöglicht eine standardisierte Prozessierung und Analyse von Phospho-Proteom Daten.

MS4.9 - Etablierung einer Datenanalyse Pipeline für humane Serum- oder Plasmaproben

Die Verfügbarkeit von humanen Plasma Proben ist sehr begrenzt, da der klinische Standard für Leberpatienten Serum ist. Daher haben wir beschlossen mit Serum Proben fortzufahren. Erste Analysen basierend auf der MSPipeline wurden durchgeführt. Es werden weitere Proben gesammelt, um eine automatisierte Prozessierung der Plasma Daten zu etablieren.

MS4.11 - Identifizierung von frühen Veränderungen in longitudinalen Serumproben

Es wurden erste Analysen an den von Berg zur Verfügung gestellten longitudinalen Serumproben von MASLD Patienten mit Zirrhose und ohne Zirrhose, die während des Beobachtungszeitraumes HCC entwickelt haben, durchgeführt. Sie sollen mit Hilfe der optimierten massenspektrometrischen Pipeline genauer charakterisiert werden, um Hinweise für Serummarker für die HCC-Früherkennung erhalten, die auch für C-TIP-HCC von hoher Relevanz sind.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

Von den insgesamt bewilligten 221.620,00 Euro wurden 216.864,80 Euro verausgabt.

2.1 Personalkosten

Die bewilligte Stelle konnte während der gesamten Projektlaufzeit vom 01.07.2021 bis zum 30.06.2024 besetzt werden. Die bewilligten Personalmittel von 218.620,00 Euro wurden mit den tatsächlichen Ausgaben von 214.363,30 Euro nicht überschritten.

2.2 Investitionen

Es wurden keine Investitionsmittel beantragt.

2.3 Verbrauchsmaterial

Es wurden keine Verbrauchsmittel beantragt.

2.4 Reisekosten

Von den bewilligten 3.000,- Euro wurden 2.501,50 Euro verausgabt.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das geleisteten Arbeiten waren notwendig, um die Ziele von SMART-NAFLD und des LiSyM-Cancer-Konsortiums zu erreichen und damit die Früherkennung von NAFLD/MASLD-Patienten, die einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von HCC ausgesetzt sind, erheblich zu verbessern. Es bildet zudem die Basis für die Bewertung des Regenerationspotenzials der Leber einzelner Patienten, um in Fällen von krebsartigen Läsionen eine chirurgische Resektion zu erleichtern. Hierfür wurde ein völlig neues Modellierungskonzept entwickelt, um die einzigartige Integration von Signaltransduktion und Stoffwechsel zu ermöglichen, was entscheidend ist, um tumorfördernde Mechanismen in NAFLD/MASLD zu definieren. Das Projekt ist sehr ehrgeizig und birgt ein hohes Potenzial für zukünftige translationale Anwendungen, befindet sich jedoch noch in der Entdeckungsphase und kann nicht auf Grundlage der Ressourcen durch die einzelnen Konsortiumsmitglieder durchgeführt werden. Daher ist eine staatliche Förderung erforderlich, um zukünftige klinische und kommerzielle Nutzung zu ermöglichen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen des LiSyM-Cancer-Konsortiums wurden bedeutende Fortschritte erzielt, die einen vielversprechenden Nutzen für die klinische Umsetzung und Unternehmen in der medizinischen Software- und Diagnostikentwicklung versprechen. Die Entwicklung eines Klassifikators, inklusive der Validierung der Alarm-Signatur in klinischen Kohorten und der Einreichung eines Patents für einen minimalen Satz von Serummarkern, legt den Grundstein für einen innovativen Ansatz zur Krebsdiagnose. Dies verbessert nicht nur die Genauigkeit der Diagnosen, sondern eröffnet auch neue Perspektiven für personalisierte Therapieansätze.

Die geplante Anwendung der Proteomik-Marker in einem ELISA-Assay sowie die Erwägung eines zusätzlichen Patents unterstreichen die Verwertbarkeit dieser Entwicklungen im Bereich der klinischen Diagnostik. Die sorgfältige Vergleichsanalyse mit klinischen Scores stärkt die Validität und Zuverlässigkeit des entwickelten Systems. Die langfristige Forschung zur Etablierung als medizinisches Gerät eröffnet die Möglichkeit, den Markt für medizinische Software und Diagnostik nachhaltig zu beeinflussen. Die bereits bekundete Zusammenarbeit mit Roche unterstreicht das Interesse der Industrie an diesen bahnbrechenden Entwicklungen.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es ist wichtig anzumerken, dass während der Umsetzung des Projekts Fortschritte in der Fettleber-Forschung auch an anderer Stelle gemacht wurden. Dabei wurde eine präzisere und patientenzentriertere Terminologie für Fettlebererkrankungen eingeführt. Der übergeordnete Begriff "steatotische Lebererkrankung" (Steatotic Liver Disease – SLD) wurde als allumfassende Bezeichnung für sämtliche Fettlebererkrankungen festgelegt, unabhängig von ihrer Ursache. Die bisher als "nicht-alkoholische Fettlebererkrankung" (Nonalcoholic Fatty Liver Disease – NAFLD) bekannte Krankheit wird nun als "Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease" (MASLD) bezeichnet. Diese Neubenennung und Kategorisierung unter SLD eröffnen die Möglichkeit, zukünftig die Aufmerksamkeit für Lebererkrankungen zu steigern, die Diagnostik zu verfeinern und Patienten frühzeitig einer entsprechenden Überwachung zuzuführen. Die Einführung des neuen Begriffs MASLD betont die enge Verknüpfung zwischen hepatischen und metabolischen Faktoren der Erkrankung. Zudem unterstreicht dies die Notwendigkeit einer interdisziplinären Betreuung durch Hepatologen und Stoffwechselfachleute.

6. Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

S. Burbano de Lara, S. Kemmer, I. Biermayer, S. Feiler, A. Vlasov, L. A. D'Alessandro, B. Helm, C. Moelders, Y. Dieter, A. Ghallab, J. G. Hengstler, C. Koerner, M. Matz-Soja, C. Goetz, G. Damm, K. Hoffmann, D. Seehofer, T. Berg, M. Schilling, J. Timmer, U. Klingmueller. [Basal MET Phosphorylation is an Indicator of Hepatocyte Dysregulation in Liver Disease](#). *Molecular Systems Biology* **20**, 2024, 187 - 216

S. Kemmer, S. Bang, M. Rosenblatt, J. Timmer, D. Kaschek. [BlotIt - Optimal alignment of western blot and qPCR experiments](#). *PLoS ONE* **17(8)**, 2022, e0264295

S. Heming, P. Hansen, A. Vlasov, F. Schwörer, S. Schaumann, P. Frolovaite, W.D. Lehmann, J. Timmer, M. Schilling, B. Helm, U. Klingmüller. [MSPipeline: a python package for streamlined data analysis of mass spectrometry-based proteomics](#) *Bioinformatics Advances* **2**, 2022, vbac004

I. Biermayer, L.A. D'Alessandro, S. Kemmer, D. Lill, S. Burbano de Lara, M. Schilling, J. Timmer and U. Klingmüller. [Molecular Alterations in Fatty Liver Disease Progression](#). Preprint mit kumulativer Doktorarbeit von Dr. Svenja Kemmer publiziert

Teil III: Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B. des Förderprogramms – (ggf. unter Angabe des Schwerpunktes) – soweit dies möglich ist

Der von uns entwickelte Ansatz zur Identifizierung von frühen Markern für NAFLD/MASLD im Hinblick auf HCC Entwicklung trägt maßgeblich zum förderpolitischen Ziel der Früherkennung und Prävention von Leberkrebs bei.

2. Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wissenschaftlichen Erfahrungen

In diesem Projekt haben wir ein bestehendes mathematisches Modell des HGF-Signalwegs erfolgreich durch metabolische Reaktionen erweitert und somit das Zusammenspiel zwischen Signaltransduktion und Metabolismus im Verlauf der NAFLD/MASLD Entstehung aufgelöst. Basierend auf diesem Modell konnten wir einen sehr vielversprechenden Marker zu Einschätzung der Lebergesundheit identifizieren.

3. Die Fortschreibung des Verwertungsplans. Dies soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des Zuwendungsempfängers brauchen nicht offenbart zu werden)

3.1 Schutzrechtsanmeldungen

Nicht erfolgt.

3.2 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Für das multiskalige Modell ergeben sich vielversprechende wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende. Die fortlaufende Entwicklung, insbesondere die Simulation von Patientenverhalten und retrospektive Validierung in klinischen Umgebungen, erhöht die Erfolgswahrscheinlichkeit bei der Implementierung als medizinische Software in klinischen Praxen. Die Perspektive, das Modell als sicheres medizinisches Gerät gemäß den Standards zu etablieren, innerhalb von drei Jahren zu erreichen, eröffnet Möglichkeiten für eine breite kommerzielle Nutzung. Insbesondere im Kontext der HCC-Früherkennung bei NAFLD/MASLD-Patienten könnte das multiskalige Modell einen signifikanten Beitrag zur Verbesserung der Patientenversorgung leisten. Die geplante Gründung eines Spin-off-Unternehmens oder die Lizenzierung der Technologie würden eine rasche und effiziente Kommerzialisierung

ermöglichen. Dies würde nicht nur einen entscheidenden Schritt in Richtung Innovation in der Medizintechnik darstellen, sondern auch vielversprechende wirtschaftliche Perspektiven für die Beteiligten und potenzielle Investoren bieten.

3.3 Wissenschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Bisherige Ansatz zur Identifizierung von diagnostischen Biomarker für die Früherkennung von NAFLD/MASLD basierten größtenteils auf dem systematischen Sannen zum Beispiel durch Machine Learning von potentiellen Markern im Blut von Patienten. Trotz intensiver Forschung und Investitionen haben die identifizierten Biomarker bisher wenig Nutzen gebracht und können eine Leberbiopsie nicht ersetzen. Der im Rahmen von LiSyM-Cancer entwickelte Ansatz Biomarker zu identifizieren basiert auf zellulären und intrazellulären Mechanismen, die sich im Laufe der NAFLD/MASLD Progression verändern. Dieser innovative Ansatz zeigt bislang sehr vielversprechende Ergebnisse, er einen umfassenderen Einblick in die Pathophysiologie der Erkrankung ermöglicht. Dadurch leistet er einen bedeutenden Beitrag zur Entwicklung personalisierter Therapieansätze.

3.4 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase

Die Anschlussfähigkeit des Projekts wird durch die Fortführung der Entwicklung des Multiskalenmodells in der zweiten Finanzierungsphase betont. Geplante retrospektive Validierungen und Simulationen des Patientenverhaltens erhöhen die Erfolgswahrscheinlichkeit bei der Integration des Modells in die klinische Praxis. Die angestrebte Umsetzung als sicheres medizinisches Gerät in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften eröffnet Möglichkeiten für eine wissenschaftliche Weiterentwicklung und Integration in den klinischen Alltag. Die geplante Einreichung eines technischen Dossiers gemäß den Standards für medizinische Geräte schafft die Grundlage für eine wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit, sei es durch die Gründung eines Spin-off-Unternehmens oder die Lizenzierung an Unternehmen, die medizinische Software entwickeln, wie beispielsweise HMS Analytical Software.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die Verfügbarkeit von humanen Plasma Proben ist sehr begrenzt. Deswegen wurde die Analyse von löslichen Markern auf Serumproben von Patienten beschränkt.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Nicht erfolgt.

6. Die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgaben- und Zeitplanung konnte größtenteils eingehalten werden. Einige Meilensteine wurden wie beschrieben aufgrund der Verzögerung des Joint Controller Agreements in die zweite Förderperiode verlängert.

IV. Berichtsblatt

Die Berichtsblätter wurden ausgefüllt.