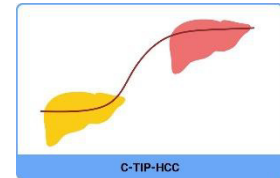


GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Zuwendungsempfänger:

Universität Heidelberg – Medizinische Fakultät Mannheim – II. Medizinische Klinik –
AG Molekulare Hepatologie

Thema der Förderung:

Systemmedizinisches Forschungsnetz zur Früherkennung und Prävention von Leberkrebs **LiSyM-Krebs**

Konsortialprojekt:

Mechanismus-basiertes Multiskalenmodell zur Dissektion des tipping points von Leberzirrhose zu Hepatozellulärem
Karzinom – **C-TIP-HCC**

Verantwortlicher:

Prof. Dr. Steven Dooley
Molekulare Hepatologie, II. Medizinische Klinik, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität
Heidelberg
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
D-68167 Mannheim
Tel.: +49 621/383-3768
Fax +49 621/383-1467
E-Mail: steven.dooley@medma.uni-heidelberg.de

Förderkennzeichen: 031L0257A

Förderzeitraum: Juli 2021 – 30. Juni 2024

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Sachbericht

Teil I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand

Leberkrebs (HCC) entwickelt sich überwiegend auf der Grundlage einer Leberzirrhose und hat in den letzten Jahrzehnten einen deutlichen Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen. C-TIP-HCC (Cirrhosis-TIPping-Point-HCC) nutzt die Systemmedizin, um das Fortschreiten der Zirrhose zu HCC zu verstehen und eine frühzeitige Erkennung und Prävention von Leberkrebs zu ermöglichen. Ein multiskaliges Modell identifiziert Hochrisikopatienten mittels nicht-invasiver Bluttests. Studien konzentrieren sich auf Tumorumgebungen, aktivierte hepatische Sternzellen (HSCs), krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs), Makrophagen-Phänotypen und TGF β -Signalwege vor und nach dem Auftreten von HCC. Daten aus Gewebe, Zellen und Modellen validieren Parameter und mathematische Modellierungen. Diese Erkenntnisse verfeinern Biomarker und prädiktive Bluttests und ermöglichen die Entwicklung präklinischer 2D-, 3D- und Tiermodelle. Ziel ist es, Biomarker für das HCC-Risiko bei Zirrhosepatienten zu identifizieren und Strategien zur Verzögerung des Fortschreitens zu entwickeln.

2. Ablauf des Vorhabens

Wir nahmen regelmäßig 14-tätig an den Meetings des Leadership Teams teil, um Themen im Zusammenhang mit LiSyM-Krebs zu besprechen und koordinierten wissenschaftliche Fortschritttreffen innerhalb des C-TIP-HCC-Konsortiums. Die Zusammenarbeit wurde durch strukturierte Nachverfolgungen verbessert. Ein netzwerkübergreifendes Joint Controller Agreement (JCA) gemäß DSGVO wurde in Zusammenarbeit mit den Rechts- und Datenschutzabteilungen entwickelt und abgeschlossen. Ethikgenehmigungen wurden für den Austausch von Patientenproben innerhalb des Konsortiums eingeholt.

Datenmanagement-Tools wie OMERO, Nextcloud, Open-BIS und RedCap wurden implementiert, um die Datenerfassung und den Austausch zu erleichtern. Kriterien für die Auswahl von Patientenproben wurden festgelegt, wodurch eine begrenzte Bereitstellung von retrospektiven und prospektiven Proben ermöglicht wurde. Experimentelle Analysen verwendeten HE-gefärbte Gewebeschnitte für räumliche OMICS-Untersuchungen. Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für Färbungen und bioinformatische Analysen wurden entwickelt.

Mausmodelle und menschliche Proben wurden auf strukturelle Merkmale, Signalwege und Parameter des Fortschreitens der Fibrose analysiert. Funktionale Erkenntnisse wurden durch In-vivo- und In-vitro-Experimente validiert, was zur Verfeinerung quantitativer Modelle und prädiktiver Rahmenwerke beitrug.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit

Moderne OMICS- und Bildgebungstechnologien identifizierten und modellierten TIP-Parameter bei Zirrhose und HCC, integrierten sie in den Krankheitsverlauf und validierten sie im Serum. Ein spatiotemporales multiskaliges Modell, das TIP-Parameter wie LAP, ECM1, TGF- β 1, GAS6, WISP1, COL1A1, FN1 und FGF23 einbezieht, zielt darauf ab, die HCC-Risikovorhersage bei Zirrhosepatienten am Ende von Phase 2 zu verbessern.

WP1: Gewebe- und Zellmarker wie Ki67, α SMA, ECM1 und TGF- β 1 wurden in menschlichen und murinen Lebergeweben quantifiziert, wobei neue TIP-Parameter wie COL1A1 und FN1

identifiziert und in das 3D-Modell integriert wurden. Präklinische Modelle (MDR2KO- und WD/CCL4-Mäuse) validierten diese Parameter. TIP-Kandidaten, einschließlich LAP, TGF- β 1 und ECM1, wurden in Serum- und Gewebeproben von Patienten mit Leberfibrose, Zirrhose und Zirrhose-HCC getestet. Ein gewebebasiertes Modell, das räumlich aufgelöste Parameter integriert, wurde entwickelt und bestätigte die Rolle von ECM1 als TIP-Parameter. Zusätzlich wurde ein digitales Zwillingsmodell für die Leberregeneration erstellt, das die Proliferation von Hepatozyten und das Leberwachstum simuliert und weiter für das Fortschreiten von HCC entwickelt wird.

WP2: Räumlich aufgelöste Transkriptom-Daten aus verschiedenen Regionen (HCC, Tumorrand, entfernte Zirrhose) von HCC-Patienten wurden erstellt, um verschiedene Zellpopulationen zu analysieren. Robuste TIP-Kandidaten wie COL1, FN1, TIMP1 und HMGA1 (unter anderem) sind in verschiedenen Ätiologien mit dem Krankheitsverlauf hochreguliert. COL1A1 und FN1 waren signifikant erhöht in HSCs, die im Tumorrand und in HCC-Regionen lokalisiert sind, im Vergleich zur Zirrhose. Der Verlust von ECM1 wurde als ein Schlüssel-Faktor für die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs identifiziert, der die HSC-Aktivierung und Fibrogenese beeinflusst. Ätiologiespezifische Gen-Deregulationen wurden ebenfalls beobachtet, wobei TGBR1 und SMAD1 nur in MASH-Proben gefunden wurden, während SERPINE1 und ALDH1A1 exklusiv in HBV- und HCV-Proben vorhanden waren. Zusätzlich wurde WISP1 als ein Faktor identifiziert, der die Fibrogenese und Karzinogenese in zirrhotischen Geweben fördert, während FGF23 als spezifisch für alkoholbedingte Lebererkrankungen identifiziert wurde, was den oxidativen Stress verstärkt. Die entwickelten Netzwerkmodelle beschreiben die Krankheitsdynamik sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen.

WP3: Funktionelle Studien zu TIP-Parametern: Es wurden die TGF- β - und GAS6-Signalwege in HSCs untersucht, wobei der Fokus auf dem Fortschreiten der Fibrose und der ECM-Produktion lag. TIP-Parameter wie Col1 und FN1 wurden durch TGF- β und GAS6 induziert, wobei das GAS6/Axl-Signal TGF- β -Effekte verstärkte (in Zusammenarbeit mit den Gruppen von Klingmüller und Saez-Rodriguez). Marker für frühes hepatozelluläres Karzinom (z. B. SERPINK4, DDK1, AXL, PLAUR) wurden hochreguliert, was darauf hindeutet, dass von LX-2-Zellen sekretierte Faktoren einen tumorigenen Phänotyp in HepaRG-Zellen fördern. In Mausmodellen erhöhte die Doxorubicin-Behandlung die Permeabilität von HCC-Zellen gegenüber Tumormarkern und verbesserte so die frühe Erkennung. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Hepatozyten Makrophagen-Phänotypen beeinflussen und proinflammatorische sowie regenerative Signale modulieren, die für die Leberregeneration essentiell sind (mit der Gruppe von Bode).

WP4: Modellintegration und Translation: TIP-Parameter wie ECM1, LAP und TGF- β wurden in präklinischen Modellen und Patientenproben validiert. Ein Kompartimentmodell wurde entwickelt, um die zellulären und molekularen Dynamiken während des Übergangs von Zirrhose zu HCC zu simulieren und diagnostische sowie therapeutische Ziele zu identifizieren. Dieses Modell zeigt, wie ECM1, insbesondere bei der Aktivierung von latentem TGF- β 1, als Schalter zwischen Krankheitsfortschritt und Leberhomöostase wirkt (in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Bode). Therapeutische Modulation von ECM1 wurde *in vitro* und *in vivo* getestet. Eine TIP-Signatur für den Krankheitsverlauf wurde aus räumlichen Omics-Daten extrahiert und wird derzeit in Patientenproben auf potenzielle diagnostische Nutzung validiert (mit Bantel und Bode).

Herausforderungen:

Begrenzte Probenverfügbarkeit, ethische Genehmigungen, unzureichende Validierungsdaten für TIP-Marker (z. B. ECM1, LAP) und der Bedarf an optimierten Testmethoden.

Zukünftige Perspektiven (Phase 2): In Phase 2 werden TIP-Parameter validiert, Modelle verfeinert und diagnostische Ziele definiert, mit intensiveren Experimenten, um Ergebnisse in die klinische Praxis zu übertragen und die Prävention von HCC bei Zirrhose zu unterstützen.

Sachbericht

Teil II Eingehende Darstellung

1. Ausführliche Darstellung der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten, insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung. Die Verwendung der Zuwendung sowie die erzielten Ergebnisse im Einzelnen müssen nachvollziehbar sein.

LiSyM-Krebs ist ein interdisziplinäres Forschungsnetzwerk, das mit einem integrativen systemmedizinischen Ansatz Modelle und Strategien zur Früherkennung und Prävention von Leberkrebs (HCC) für die klinische Anwendung entwickelt. Die Arbeitsgruppe des Partners Dooley bringt ihre Expertise mit humanen und murinen Leberzellen, Maus-Reporter- und Krankheitsmodellen, Laser-Scanning-Mikroskopie, quantitativer 2D/3D-Bildgebung, GeoMx-Bildgebung, räumlichem RNA-Profilung und Zeitraffer-Datenerstellung in das Projekt ein. Die erzielten Ergebnisse tragen maßgeblich zur Generierung und Validierung der mathematischen Modelle und der Entwicklung des TIP-Scores bei. Das Teilprojekt hat dazu beigetragen, die nachfolgend beschriebenen Meilensteine des Vorhabens C-TIP-HCC zu erreichen.

Projektmanagement, Administration

Die Projektkoordinatorin unterstütze den Koordinator und die Ko-Koordinatoren von C-TIP-HCC in allen administrativ-organisatorischen Angelegenheiten, insbesondere bei der Erstellung der jährlichen Zwischenberichte, des Executive Interim Reports für das SAB bis März 2023, der Zwischenevaluierung und Erstellung der Konzepte 2. Förderperiode inkl. Budgetorganisation und schließlich der Erstellung der Vorhabensbeschreibungen für die zweite Förderperiode u.a. durch die Erstellung von Vorlagen, Projektmanagement, Besprechungsorganisation. Sie koordinierte das Vertragsmanagement für den C-TIP Konsortialvertrag und das Joint Controller Agreement mit den Partnern und den zuständigen Fachabteilungen. Sie nahm regelmäßig an den Besprechungen des C-TIP-HCC Teams, des Leadership Teams (LT) und Programm-Managements teil und fungierte als Ansprechpartnerin sowohl für das LiSyM-Cancer Programm- und Datenmanagement und das PtJ mit denen sie in gutem und aktivem Austausch stand.

Wissenschaftskommunikation, Öffentlichkeitsarbeit

In Abstimmung mit der Kommunikationsmanagerin des LiSyM-Cancer Programm-Managements und einer Wissenschaftsjournalistin organisierte sie den Artikel zu C-TIP-HCC im Rahmen der "Nationalen Dekade gegen Krebs". Die Artikel sind in Laiensprache verfasst, um die deutsche Öffentlichkeit zu erreichen und sie über die Forschung im Rahmen des Bundesministeriums für Bildung und Forschung zu informieren. https://www.dekade-gegen-krebs.de/de/wir-ueber-uns/aktuelles-aus-der-dekade/_documents/forschungsnetzwerk_leberkrebs.html?nn=473182

Wissenschaftliche Arbeiten

Die im Aufstockungsantrag (09/2021) bewilligten Geräte und Technologien wurden erfolgreich etabliert und implementiert:

- Multi-Mode Dispenser MultiFlo FX - Modell MFXP2, Fa. Biotek
- IncuCyteS3 Module zur funktionellen Lebend-Zellanalyse Migration, Chemotaxis und Zell-Zell Kommunikation, Fa. Sartorius
- NanoString GeoMX Digital Spatial Profiler (DSP), Fa. Nanostring Die Geräte und Analysen werden für eine optimierte, verbesserte Erreichung diverser Meilensteine eingesetzt und stehen den Partnern von C-TIP-HCC sowie SMART-NAFLD und DEEP-HCC zur Verfügung.

Da sich die ersten Ergebnisse von Testanalysen mit der Einzelzellsequenzierung via 10x Genomics Chromium single cell RNA sequencing durch Fa. CeGaT GmbH (Dienstleistung) unerwartet als unbefriedigend erwiesen, wurde in Absprache und im Einvernehmen mit dem PtJ ein Methodenwechsel auf GeoMX Digital Spatial Profiling vorgenommen. Die neue Methode wurde mit dem über den Aufstockungsantrag angeschafften NanoString GeoMX Digital Spatial Profiler (DSP) durchgeführt und bringt erhebliche Vorteile bei der Datengenerierung (technisch und zeitlich) für die betreffenden Meilensteine. Wir haben die räumliche Transkriptomik mit GeoMX DSP an 3 FFPE-Schnitten etabliert, die von der AG Cramer, Aachen (FKZ031L0257E) zur Verfügung gestellt wurden. Auch die Probenvorbereitung für das sich anschließende Next Generation Sequenzierung (NGS) Verfahren, das in der Core Facility der Unimedizin Mannheim durchgeführt wird, wurde erfolgreich etabliert. Die Ergebnisse werden in WP1 und WP2 im Detail vorgestellt, einschließlich weiterer Patientenproben, die in Phase 2 verwendet werden sollen.

N Netzwerkübergreifende Aktivitäten

		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
N	Netzwerkübergreifende Aktivitäten												
MSN1	Klinische Datenaustauschplattform												
MSN2	SOPs für OMICs Technologie und Entwicklung von Datenanalyse Pipelines												
MSN3	Strategien für translationale Applikationen												

MSN1 Klinische Datenaustauschplattform: Ein wesentlicher Aspekt der Aktivitäten war es, datenschutzrechtliche Gesetzmäßigkeit sowie klinisch-experimentelle Voraussetzungen für die Zusammenarbeit im Forschungsverbund zu schaffen. Zwischen den beteiligten Institutionen wurde ein Konsortialvertrag abgestimmt und eine Vereinbarung über die gemeinsamen Verantwortlichkeiten bei der Verarbeitung personenbezogener Daten im Sinne von Art. 26 der DSGVO zwischen den am Netzwerk beteiligten Institutionen abgeschlossen (Joint Controller Agreement).

MSN2 SOPs für OMICs Technologie und Entwicklung von Datenanalyse Pipelines. Von den Partnern (Bantel, Bode, Cramer) wurden humanen Leber FFPE-Proben sowie umfassende klinische und Labordaten von Patienten sowie Plasma-/Serumproben bereitgestellt und für den Einsatz in den Spatial-OMICS Analysen qualitätsbewertet. Etablierte SOPs für die Probenentnahme, - handhabung und -verteilung in den einzelnen Kliniken wurden im gesamten Konsortium ausgetauscht und harmonisiert. FFPE- und Gefrierproben wurden morphologisch phänotypisiert.

MSN3 Strategien für translationale Applikationen. Essays für die quantitative Messung von Zirrhose-HCC TIP-Kandidaten wurden entwickelt und mit Patientenserum getestet. Eine TIP-Signatur für Krankheitsprogression wurde aus den spatial omics Daten extrahiert, die in Phase 2

mit Patientenproben/Kohorten validiert werden kann. In Zusammenarbeit mit den Partnern wurden mehrere Schlüsselaktivitäten initiiert, um das Verständnis der HCC-Entwicklung (in der zirrhotischen Leber) zu verbessern. Zunächst wurden TIP-Kandidaten prospektiv in Patientenproben mit fortgeschrittener Leberfibrose/Leberzirrhose mit und ohne HCC validiert. Unter anderem wurden LAP und ECM1 im Serum der Patienten als TIP-Kandidaten in einer Kohorte mit Fibrose, Zirrhose und Zirrhose mit HCC getestet (Bantel, Bode, Dooley). Wir bewerteten kritisch die Qualität der Leberproben menschlicher Patienten für die verschiedenen Anwendungen. Qualitätskriterien wurden harmonisiert. Diese umfassen unterschiedliche Anforderungsprofile je nach Verfahren, umfassend Primärzellisolierung, Primärkultur (Hepatozyten), frische und gefrorene Lebern für die 3D-Bildgebung und für Proteomics. SOP-Verbesserung erfolgt iterativ durch Rückkopplung mit der experimentellen Datenqualität (MS2.7 und 3.1).

P Patientenproben und klinische Daten

		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
MSP1	Asserviertes humanes Lebergewebe ist kategorisiert und den HCC-Subgruppen zugeordnet. Klinische Daten sind in pseudonymisierter Form in der gemeinsamen Datenbank abgelegt												
MSP2	SOP für Gewebeschnittherstellung und Probenverteilung von asserviertem Material ist erstellt												
MSP3	SOP für Qualitätskontrolle und Probenverteilung des asservierten gefrorenen humanen Lebergewebes ist erstellt												
MSP4	SOP für Qualitätskontrolle, Asservierung und Bereitstellung von neu operierten Lebern ist erstellt; in das SOP wird integriert, dass Serumproben parallel asserviert werden												

MSP1 Asserviertes humanes Lebergewebe ist kategorisiert und den HCC-Subgruppen zugeordnet; Daten sind in pseudonymisierter Form in der gemeinsamen Datenbank abgelegt. Dooley, Saez-Rodriguez, Bantel, Bode und Cramer führten quantitative und räumlich

aufgelöste histopathologische Bildgebung und molekulare Profilerstellung an ausgewählten Proben durch. Eine begrenzte Anzahl von Serum- und Plasmaproben (Bantel) von Zirrhose-Patienten mit und ohne HCC wurden mit ELISA auf TGF β -Signaltransduktionsparameter untersucht. Dooley analysierte HE-gefärbte Scans mit Lebergewebschnitten von Paraffinblöcken, die von Bantel, Cramer und Bode zur Verfügung gestellt wurden auf Qualität und Eignung für die vorstehend beschriebenen Analysen. Die Definition von Untergruppen war aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von detaillierten klinischen Informationen für retrospektive Gewebeproben problematisch (Datenschutzproblematik). Das Fehlen eines Pathologen für die harmonisierte Kategorisierung von Leberkohorten auf der Grundlage der Pathomorphologie erschwerte die Klassifizierung weiter. 46 Gewebeproben von Patienten mit HCC aus einer retrospektiven Kohorte wurden Dooley von Glanemann zur Verfügung gestellt, um zu testen, ob zirrhotische Knötchen in diesem Kollektiv eingehender untersucht werden können. Einige frisch operierte Proben wurden asserviert. Einige wenige Gewebe- und Serumproben von Patienten mit Zirrhose mit und ohne HCC wurden asserviert, klinisch kategorisiert und waren für morphologische Analysen verfügbar (Bode, Dooley, Bantel). Objektträgerscans von HE- und Siriusrot Färbungen wurden erstellt. In Zusammenarbeit mit der AG Cramer haben wir weitere 20 HCC-Gewebe mit einer metabolischen Ätiologie ausgewählt. Da wir hier nicht zuverlässig zwischen NASH- und ASH-basiertem HCC unterscheiden können, haben wir vereinbart, diese Proben als MAFLD (Metabolic Associated Fatty Liver Disease) zusammenzufassen. Die AGs Cramer und Bantel stellten geeignetes formalinfixiertes, paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe in Form von Einzelobjektträgern für GeoMX DSP-Tests zur Verfügung (insgesamt n=8). Serum-/Plasmaproben wurden Dooley von Bantel für die Analyse von Fibrose-bezogenen Stoffwechselwegen zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus hat Bantel ganze Objektträger von H&E-gefärbten HCC-Gewebescans für quantitative histopathologische Analyse der AG Hoehme zur Bildverarbeitung bereitgestellt, die im Anschluß für das Gewebemodell der AG Drasdo weitergegeben werden. Für die Untersuchungen in C-TIP-HCC wurden folgende Patientenproben als relevant angesehen. (1) Longitudinale Serum/Blutproben von Fibrosepatienten aller Etiologien und aller Fibrose und Entzündungsstadien (2) Gefroren asservierte und frische OP-Leberproben von Patienten mit Fibrosegrad 3-4 und Zirrhose mit und ohne HCC, (3) Leberexplantate von Zirrhosepatienten.

MSP2 SOP für Gewebeschnittherstellung und Probenverteilung von asserviertem Material ist erstellt: Kriterien für die Auswahl retrospektiver Patientenproben wurden in enger Zusammenarbeit mit den klinischen Partnern (Bantel, Bode, Cramer und Glanemann) festgelegt.

MSP3 SOP für Qualitätskontrolle und Probenverteilung des asservierten gefrorenen humanen Lebergewebes ist erstellt: Die Auswahlkriterien, Qualitätskontrolle, Verarbeitung und Weitergabe von prospektivem gefrorenem Patientenmaterial (aus den AGs Bode, Cramer und Bantel) für Protein- und RNA-Analysen sind harmonisiert und wurden für Messungen im nCounter optimiert.

MSP4 SOP für Qualitätskontrolle, Asservierung und Bereitstellung von neu operierten Lebern ist erstellt; in das SOP wird integriert, dass Serumproben parallel asserviert werden: An prospektivem Patientenmaterial (Glanemann) wurden die 2D- und 3D-Färbungen etabliert. Ein Problem ist hier, dass die Anzahl der OPs in Homburg stark zurückgegangen ist, bzw. nur sehr kleine Gewebestücke aus den OPs resultieren. Qualitätskriterien für Matrisomuntersuchungen und Dezellularisierung wurden gesammelt. Protokolle für Hepatozyten- und Nichtparenchymzellisolierungen wurden gesammelt und ein Netzwerk umfassendes SOP wurde entwickelt; insbesondere für die Isolierung der Zellen in ausreichenden Mengen aus Zirrhosematerial bedarf es der Weiterentwicklung bestehender Protokolle, was aktuell immer noch durch die heruntergefahrte Anzahl an Leber OPs limitiert ist. Ein CTIPHCC übergreifender Austausch mit Kliniken des Netzwerks ist durch die Datenschutz- und Ethik-Problematik nur in Ausnahmefällen möglich. Kriterien für die Auswahl von retrospektiven Patientenserumproben wurden in zusammen mit den klinischen Partnern (AG Bantel, Bode und Cramer) festgelegt.

WP1 Multidimensionale Charakterisierung zellulärer und matrisomaler Parameter, die das TIP crossing von normaler zu maligner Gewebemikroarchitektur begünstigen

Progression von der Zirrhose zum HCC jeweils in einem Patienten abbilden zu können, wenn wir zirrhotische tumorfreie Kompartimente, Übergangsregionen von der Zirrhose zum HCC, sowie HCC-Regionen räumlich getrennt im selben Paraffinschnitt-Objektträger vergleichend analysieren. Wir erwarteten so verschiedene Progressionsstadien sowie deren Übergang (*tipping point*) bei jedem Patienten in einer Gewebeprobe identifizieren zu können. Dazu wurden Mikroskopie-gesteuert auffällige und den jeweiligen Regionen zugeordnete *regions of interest* (ROI) ausgewählt (Tumor mit und ohne Stroma, Entzündung, Zirrhose ohne und mit Tumor; je nach interessierender Zielstruktur variabel) mit Nanostring Technologie analysiert. Wir fokussierten dabei wie im Antrag beschrieben auf Veränderungen der Fibroblasten-, Makrophagen- und Hepatozyten-Phänotypen, sowie der Zusammensetzung des Matrisoms. Da derzeit zahlreiche Forschungsgruppen *single cell*- und *spatial omics*-Analysen durchführen, und große Datenmengen dazu vorliegen, sammeln und sammeln wir kontinuierlich aktuelle Literatur, die unterschiedliche Fibroblasten- und Makrophagenphänotypen, Matrisomale Proteine, die Tumor assoziiert auftreten, sowie Datensätze, die frühen Stadien der karzinogenen Hepatozytentransformation beschreiben. Wir benutzen diese für vergleichende Analysen und zur Auswahl der zu färbenden Zielstrukturen, die wir dann zur Bestimmung der ROI`s verwenden. So konnten bisher Fibroblasten- (HSC/MFB/CAF) und Makrophagenpopulationen (Mph, Typ1, Typ2, TAM), sowie Hepatozytenprofile in Zirrhoseregionen, in der HCC-Nachbarschaft und als HCC bei 8 Patienten (4 HBV/HCV- und 4 NASH-basierte Zirrhose) unter Verwendung der neuen Technologien für räumlich aufgelöste morphologische Studien (GeoMX, Nanostring) untersucht werden. Mit vier Antikörpern wurden Morphologiemarker für Fibroblasten (αSMA), Makrophagen (CD68), Hepatozyten oder HCC-zellen (CK8/18) und Zellkerne (Syto83) gefärbt (Abb. 1). In den 8 Patientenproben wurden insgesamt 304 ROI`s innerhalb des Tumors (T), an der zirrhotischen Tumorgrenze (CT) und innerhalb der entfernten tumorfreien Zirrhose (C) zelltypspezifisch extrahiert und mit *next generation sequencing* (NGS) profiliert. Die Analysen der ROI`s (WP2) schlagen eine Reihe von neuen TIP-Parametern vor, die in Phase II im Modell und experimentell getestet werden, sowie bestätigen sie bereits teilweise die von uns angenommenen TIP-Parameter (ECM1, Matrisomale Proteine, TGF-β, Axl). So weisen zB Fibroblasten im HCC signifikant höhere Werte von COL1A1 und FN1 auf als der Tumorrand und die vom Tumor entfernten Regionen. Zusätzlich wurden die Bilddaten von Hoehme weiterbearbeitet und von Drasdo zur Entwicklung des Gewebemodells verwendet. Leider konnten für die

Gewebemodellierung zwingend notwendige 3D-Bilddaten von humanen Leberproben (gesund bzw zirrhotisch mit und ohne HCC) aufgrund fehlender Technologie (Dooley) und fehlender Probenlage (Kliniker) bisher nicht generiert werden.

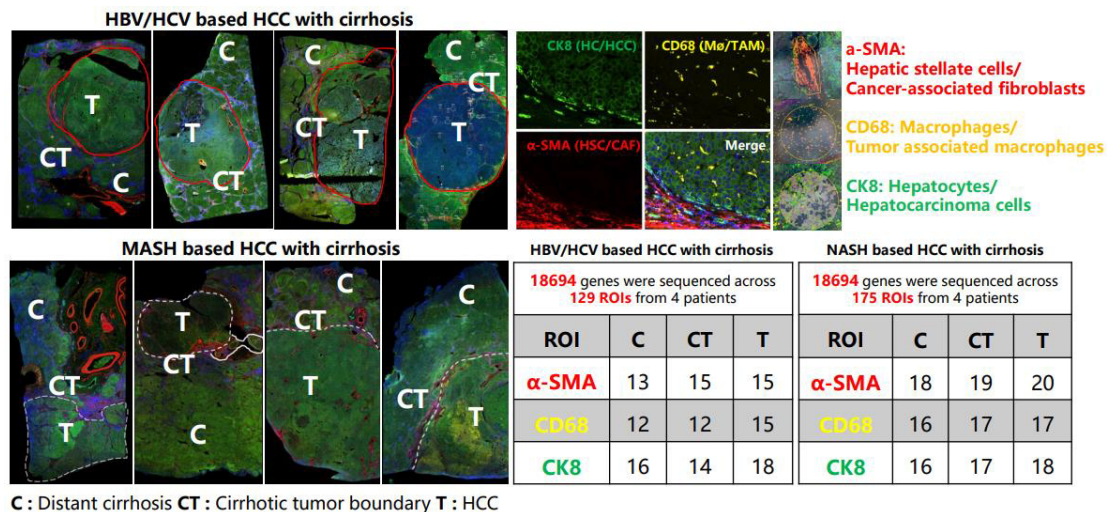


Abb. 1: GeoMX DSP-Analyse von Zirrhose eingebetteteten HCC-Lebern (Etiologien HBV/HCV- oder NASH). ROI's wurden zur Bestimmung von phänotypischen Zellveränderungen nach Färbung mit **aSMA** (Fibroblasten), **CD68** (Makrophagen) und **CK8/18** (Hepatozyten/HCC) mit NGS analysiert.

MS1.2 Etablierung von RNAscope und IHC/IF Färbeprotokollen von neuen Markern für Krebs-assoziierte Fibroblasten, Tumor-assoziierte Makrophagen, Hepatozyten, Matrisom in Human- und Mausleber, in der 2. Phase Kandidaten aus WP2/3 Färbungen: Daten basiert (MS1.1), sowie Literatur basiert wurden Färbeprotokolle für TIP-Parameter-Kandidaten für weitere quantitative morphologische IF-Mikroskopie in 2D etabliert (Dooley, Bantel und Bode; CD31, Arginase-1, Ki-67, gespaltene Caspase 3, ECM1, LAP, CD3, CD4, CD8, Col I, cCol I, Col III, Col IV, Laminin, CD45RO, Granzym B, FOXP3, p16 CD206, Mac2, GS, F4/80 und CD11b), sowie RNA Scope ISH-Protokolle für TGFβ3, Smad7, TGFβ2, TGFβ1 and ECM1 für den morphologisch-zelltypspezifischen Nachweis der RNA-Produktion. Weitere TIP-Kandidaten Zielstrukturen wurden auf der Grundlage der räumlichen GeoMx-Profilierung ausgewählt, Färbeprotokolle sind jedoch noch nicht etabliert (Phase 2; HGF, YAP, DDR1, pAKT, unter anderem). Die etablierten Parameter wurden bisher mit einer begrenzten Anzahl von Patientenproben analysiert, wie auch die neuen Parameter, werden sie in Phase II auf statistische Signifikanz erhöht, bevor sie der Bildanalyse unterzogen und in das Gewebsmodell integriert

werden. Protokolle für GeoMX wurden von Dooley erstellt, die für das nachfolgende Multiplex-*imaging* von Bantel und Bode verwendet wurden. Mit Bantel wurde die LAP-Färbung etabliert, quantifiziert und mit den Serumspiegeln von LAP korreliert.

Eine erste 3D-Rekonstruktion der gesunden menschlichen Leber (Proben von Glanemann) wurde von Dooley, Drasdo und Hoehme auf der Grundlage von CD31 (Sinusoidalmarker), CK19 (Gallengangsmarker) und α -SMA (Fibroblasten) durchgeführt, die allerdings aufgrund von fehlender Technologie aktuell nur eine Tiefe von 25-40 μ m in der Z-Achse erreicht. Iterationen mit (DEEP-HCC) werden in Phase 2 unter Verwendung von neu bereitgestellter Technologie durchgeführt mit dem Ziel, die Tiefe der Auflösung auf 100 μ m oder mehr zu erweitern, um das Gewebemodell möglichst nah an der Realität zu entwickeln. Ein Zwei-Photonen-Mikroskop ist dafür erforderlich, welches in 2025 zur Verfügung steht.

Ein weiterer TIP-Kandidat, der in der Zirrhose erhöht vorliegt und im Blut nachweisbar ist, ist der Wachstumsfaktor FGF23. Im Rahmen seiner Validierung als TIP-Parameter untersuchten wir in Zusammenarbeit mit einer südkoreanischen Forschungsgruppe dessen Beitrag zum Fortschreiten der alkoholischen Steatose-Lebererkrankung (ALD). Der Beitrag konnte bestätigt werden und eine Signalkaskade über den CB1-Rezeptor (CB1R) - Östrogenrezeptor g (ERRg) - FGF23-Achse - CYP2E1 mit Bezug zur Erhöhung der Sensitivität der Hepatozyten auf metabolischen Stress konnte nachgewiesen werden (Jung et al., 2024). Auf der Grundlage dieser Daten werden wir FGF23 auch weiterhin als TIP-Parameter beobachten.

MS1.4 Frische Lebern der Mausmodelle stehen zur Datenanalyse zur Verfügung Blut- und Leberproben von MDR2KO-Mäusen, die die Präkanzerose (fibrotisches Stadium; 60 Wochen alt) und das HCC-Stadium (80-100 Wochen alt) repräsentieren, wurden gesammelt für longitudinale Bestimmungen von ausgewählten TIP-Parametern während der Progression der Erkrankung. In Zusammenarbeit mit Bode haben wir WT-Mäuse mit *Western diet* mit und ohne zusätzliche CCl4 Schädigung behandelt, bei denen sich HCC in einem fortgeschrittenen Fibrosestadium von NASH entwickelt. Anhand dieses WD/CCl4-Mausmodells wurden zeitlich und räumlich aufgelöste Datensätze zu Fibrose (Siriusrot), Proliferation (PCNA), Zelltod (IgG) und Aktivierung von HSC (α SMA), vor und nach der Entwicklung von HCC erstellt. Im WD Mausmodell legen wir ein bestimmtes Augenmerk auf die Makrophagenpopulationen und die Bedeutung des TGF- β -Signalwegs. Mit Bode, Saez-Rodriguez und Klingmüller konnten wir zeigen, dass TGF- β bestimmte Makrophagenpopulationen favorisiert und aktiviert, die das Proliferationsverhalten der

Hepatozyten regulieren (Wolf et al. 2023). Beide Mausmodelle werden mit weiteren genetisch manipulierten Mausmodellen in Phase 2 für die funktionelle Validierung von TIP-Parametern verwendet (WP4).

MS1.5 Erster Satz morphologische Daten, die für die räumlich-zeitliche Modellierung benötigt werden, sind generiert und verfügbar: Ein erster Satz morphologischer Daten von Maus und menschlicher Leber wurde von Dooley, Bantel, Hengstler und Bode erstellt und für die Bildanalyse bereitgestellt. Die ersten Schritte zu deren Integration in das Modell sind erfolgt und entsprechende ausgewählte Gewebesbereiche (Tumor- und Zirrhoseknoten; ROIs) wurden für die räumlich aufgelöste omics-Analyse verwendet (Analyse in WP2). Eine netzwerkübergreifende Zusammenarbeit mit Berg, Damm und Matz-Soja zum Erhalt einer SOP und von Leberschnitten für Färbungen von zirrhotischen HCC-Patienten wurde diskutiert, scheiterte aber an den Auflagen der Ethikkommission, die den Austausch von Patientenproben aus Leipzig für Untersuchungen in C-TIP-HCC untersagt. Für die Etablierung des 3D *imaging* menschlicher Lebern verwendeten wir zwei mehr oder weniger gesunde humane Leberproben von Glanemann. Es wurde CD31 (Endothelsystemmarker), CK19 (Gallengangsmarker; PV-Kompartiment), α SMA (aktivierte HSC/CAF-Marker) und DAPI/Draq5 (nukleare Färbung) für die Bildgebung verwendet. Mit der zu dieser Zeit verfügbaren Technologie konnte eine Penetration und Auflösung der Gewebeschnitte bis zu 40 μ m Tiefe (Z-Achse) gescannt werden. Davon ausgehend hat Höhme ein sogenanntes *tile*-Modell etabliert, um ein Leberläppchen in 3D (XY-Achsen) zu simulieren.

MS1.8 Morphologische Datengenerierung mit neuen Markern (pSmad2/3, Smad2/3, CAF, TAM, Hepatozyten, Matrisom) mit Patientenmaterial und Mausproben: Dooley, Bantel und Bode generierten räumlich/zeitlich aufgelöste quantitative morphologische Daten mit neue etablierten Zielstrukturen unter Verwendung von Patientenmaterial und Mausproben. Bei Mäusen identifizierte und bestätigte TIP-Kandidaten (i.e. cCol 1, Filliol et al. 2022) wurden an menschlichen HCC- Patientenproben getestet. Hoehme und Drasdo beginnen, ein "typisches" zirrhotisches Leberknotengewebe Modell unter Verwendung unserer experimentellen Daten von Menschen und einer Fail-Safe-Strategie aus der Literatur (Segovia-Miranda et al., 2019) zu entwickeln. Weiter haben wir miteinander, unter Einbeziehung der Lebermikrostruktur sowohl ein mathematisches Modell der Leberregeneration nach Medikamenten-induzierter Schädigung der perizentralen Hepatozyten (Zhao et al. 2023) bzw. nach Hepatektomie (Hoehme et al. 2022)

entwickelt. Diese Modelle simulieren Interaktionen verschiedener Zelltypen während der Leberregeneration. Die Modellparameter aus den Modellen akuter Leberschädigung wurden in einem nächsten Schritt zur Etablierung eines digitalen Zwillings für Leberfibrose verwendet (Zhao et al., 2024; Preprint). Schließlich wurde ein *multiple parameter compartment*-Modell entwickelt, das die matrisomale Titrierung von ECM1 Spiegel und LTGFB-Aktivierung als Parameter zur Unterscheidung zwischen Leberregeneration und Krankheitsprogression integriert (Link et al., 2024). Diese etablierten Modelle dienen als Grundlage zur Entwicklung des erweiterten Zirrhose-HCC-Gewebemodells. Bildparameter für CAF, TAM-, Hepatozyten- und Tumorzellen wurden quantifiziert und mit einer begrenzten Stichprobengröße (n=8) räumlich aufgelöst. Kollagen 1a1 und FN1 wurden etabliert, und werden in Phase 2 mit Bantel räumlich zugeordnet und quantitativ ausgewertet. Die GeoMX DSP-Analyse (MS1.2) ermöglichte die räumliche Auflösung und Quantifizierung von neu etablierten Markern (LAP, Col 1) Hepatozyten/HCC-Zellen, HSC/CAF und Makrophagen/TAM-Populationen über verschiedene Regionen (HCC, Tumorgrenze, Fernzirrhose; siehe auch WP2) von bisher zwei Patientenproben. Die Anzahl der Probenanalysen wird in Phase 2 entsprechend erhöht. 3D-Rekonstruktionen von gesundem menschlichem Lebergewebe wurden mit CD31 (sinusförmiger Marker), CK19 (Gallengangsmarker) und α SMA (CAF) durchgeführt. Färbungen von longitudinalen Leberproben aus Mausmodellen mit oder ohne HCC (Bode) wurden mit PSR, IgG, PCNA und Bodipy gefärbt und die Bilder für die Bildverarbeitung (Hoehme) verwendet und werden in Phase 2 in das Gewebemodell (Drasdo) integriert. Mit den gesammelten Humanleber-Daten hat Drasdo ausgewählte Parameter wie Hepatozyten mit unterschiedlichen Volumina, dabei gesunde und steatotische Hepatozyten unterscheidend, sowie sinusoidale Gerüste in ein erstes humane Leber-Gewebemodell integriert (Abb. 2). Dabei wurden auch die Erkenntnisse aus einem publizierten Gewebsmodell (Segovia-Miranda et al. 2019) berücksichtigt. Dieses Modell dient als Referenz in Phase 2, wo nun weitere Zelltypen/Untertypen und Strukturen, wie cancer-associated fibroblasts (CAF), tumor-associated macrophages (TAM), extrazelluläre Matrix (ECM) und weitere Hepatozytenunterarten (prämalig, gestreßt, entartet) integriert werden. Für die Erweiterung des Modells werden Daten aus 2D und 3D-Bildgebung von Gewebestücken mit Volumina größer 100 μ m verwendet, die mit Multiplex-Akoya (Bantel, Hoehme), GeoMX-DSP-Daten (Dooley, Hammad, Hoehme) und dem neuen *single-photon* Laser Scanning Mikroskop von zirrhatischen Mensch- und Maus-Lebern mit und ohne HCC generiert wurden und werden.

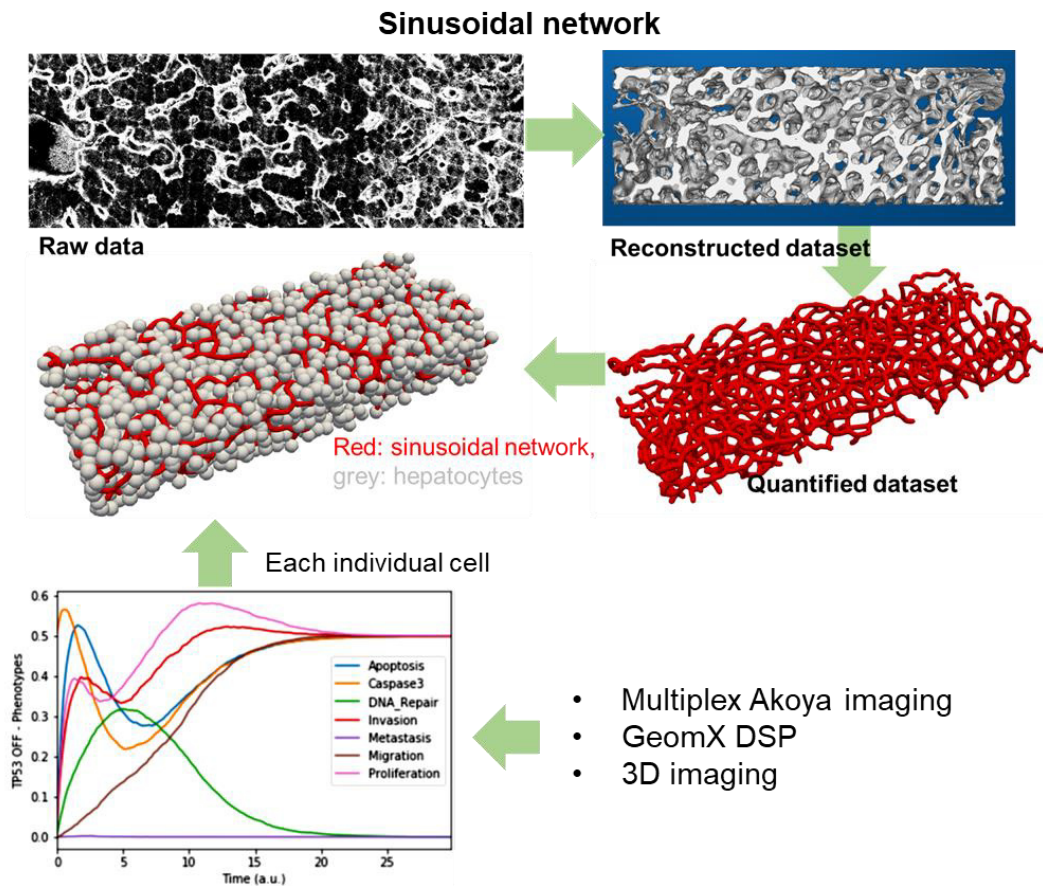


Abb. 2: Eigene und publizierte (Segovia-Miranda et al. 2019) Datensätze von humanen Lebern wurden zur Rekonstruktion der Sinusoide und Hepatozyten eines Referenz-Gewebsmodells verwendet. Der Datensatz oben links zeigt ein konfokales Mikroskop-Rohbild des sinusoidalen Netzwerks der menschlichen Leber zwischen Zentralvene und Portalvene. Oben rechts ist dasselbe Bild nach Rekonstruktion von 300 Bildschnitten in der Z-Achse. Das sinusoidale Netzwerk wurde quantifiziert (mittig rechts) und als Gerüst für Hepatozyten verwendet (mittig links). In Phase 2 werden wir räumliche Protein- und RNA-Informationen für jede Zelle der Zelltypen Hepatozyt, HSC, und Makrophage sowie für die ECM integrieren.

WP2 Integrative Multi-omics-Analyse von Regenerationsknoten, die aus Leber von Patienten mit einer Zirrhose mit und ohne HCC isoliert wurden

		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
WP2	Integrative Multi-omics-Analyse von Regenerationsknoten, die aus Leber von Patienten mit einer Zirrhose mit und ohne HCC isoliert wurden												
MS2.7	Generierung von SOP's für die Isolation von Zellpopulationen (Makrophagen, HSC/CAF und Hepatozyten) aus Regeneratknoten für scRNA und Proteomics Analysen												
MS2.9	(sc)RNA-Seq und Proteom-Analyse von HSC/CAF, Makrophagen/TAM und Hepatozyten												

MS2.7 Generierung von SOP's für die Isolation von Zellpopulationen (Makrophagen, HSC/CAF und Hepatozyten) aus Regeneratknoten für scRNA und Proteomics Analysen.

Dooley und Bode haben SOPs für die Isolierung von HSC, LSEC, Makrophagen und Hepatozyten aus der Leber von Mäusen bereitgestellt. Um hepatische Sternzellen/CAFs, Makrophagen und Hepatozyten durch scRNA-Seq und Proteomanalyse zu charakterisieren, asservierten Dooley und Bode Zellen, Plasma und Gewebe von AAV8-TGFβ1-, sowie WD, WD-plus CCl4 sowie CCl4 behandelten Mäusen. Die histopathologische Untersuchung der chronisch mit TGFβ1 behandelten Lebern zeigt eine Aktivierung der hepatischen Stellatzellen, eine Hochregulierung der Lamininexpression und die Entwicklung einer entarteten Basalmembran in perivenösen, periportalen und sinusoidalen Kompartimenten. Weitere Auffälligkeiten sind die Störung der Zonierung mit dem Verlust von etwa einem Drittel der Glutaminsynthetase-exprimierenden Hepatozyten und die Vermehrung E-Cadherin-positiver Zellen, sowie Kapillarisierung der Sinusoide und Narbenbildung (Hammad A, et al. Monitoring TGF-β1 effects on liver cells in vivo. *Z Gastroenterol* 2023; 61(01): e11-e12). Um die beobachteten Veränderungen der Makrophagenpopulationen in den beiden WD-Modellen im Zeitverlauf aufzuklären, hat Bode eine CITE-scRNAseq-Analyse der Gewebeproben durchgeführt, was die gleichzeitige Analyse der Oberflächenproteinexpression und der RNA-Expression auf Einzelzellebene mit Hilfe von Barcode-markierten Antikörpern ermöglicht. Dooley, Bode und Saez-Rodriguez identifizierten so Parameterkonstellationen, mit denen sich vier verschiedene Makrophagenpopulationen unterscheiden lassen, und konnten deren Veränderung während der NASH-Progression verfolgen (Wolf SD, et al. *Progression of MASLD goes along with significant changes of a recruited and TGFβ-sensitive macrophage population. Z Gastroenterologie* 2024; 62 (01), P3. 04)

Die Makrophagenprofile wurden mit räumlichen *transcriptomics* Untersuchungen (Dooley) CD68-positiver Makrophagen bei HCC-Patienten mit Zirrhose in verschiedenen Geweberegionen verglichen.

MS2.9 (sc)RNA-Seq und Proteom-Analyse von HSC/CAF, Makrophagen/TAM und Hepatozyten. Eine Kombination von RNA- und Protein-Immunfluoreszenzfärbung von FFPE Gewebeschnitten wurde an Zirrhosepatienten-Lebergewebe mit und ohne HCC durchgeführt, um molekulare Signaturen der Zelltypen und Matrixkomponenten in verschiedenen Gewebekompartimenten (Zirrhose, präneoplastische Regionen, vs. Zirrhose mit HCC) zu vergleichen. Aufgrund der geringen Zugänglichkeit zu entsprechenden frischen menschlichen Lebergewebeproben, der qualitativen Mängel der Probenanalysen durch die Partnerfirma, sowie der datenschutzrechtlichen/ethischen Einschränkungen für Probenaustausch innerhalb des Netzwerks stellten wir unsere Analysen von scRNASeq aus frischem Gewebe auf die GeoMX DSP-Analyse mit FFPE-Lebergewebe um. So konnten drei ausgewählte zirrhotische HCC-Proben von Cramer und Bantel (WP1) entsprechend mit *spatial* RNASeq bearbeitet und bioinformatisch ausgewertet werden (Saez-Rodriguez). Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile von Hepatozyten/HCC-Zellen, HSC/CAF (Abb. 3) und Makrophagen/TAM, je nach Lokalisation innerhalb des Tumors, an der Tumorgrenze oder im entfernten/nichttumoralen zirrhotischen Gewebe. Eine deutliche Veränderung der Subpopulationen von Fibroblasten, Makrophagen und Hepatozyten von der Zirrhose zum Tumor wurde deutlich und beinhaltet den von uns gesuchten TIP. So fanden wir zB für HSCs, dass Kollagen1a1 und FN1 im Vergleich zu Fernzirrhose und Zirrhose am Tumorrand in hohem Maße exprimiert werden (Tong C, et al. Spatial Analysis of α -SMA-Positive Hepatic Stellate Cells and CD68-Positive Macrophages Reveals Altered Phenotypes during the Transition from Cirrhosis to HCC. Abstract book of HCC 2023).

HSC/CAF

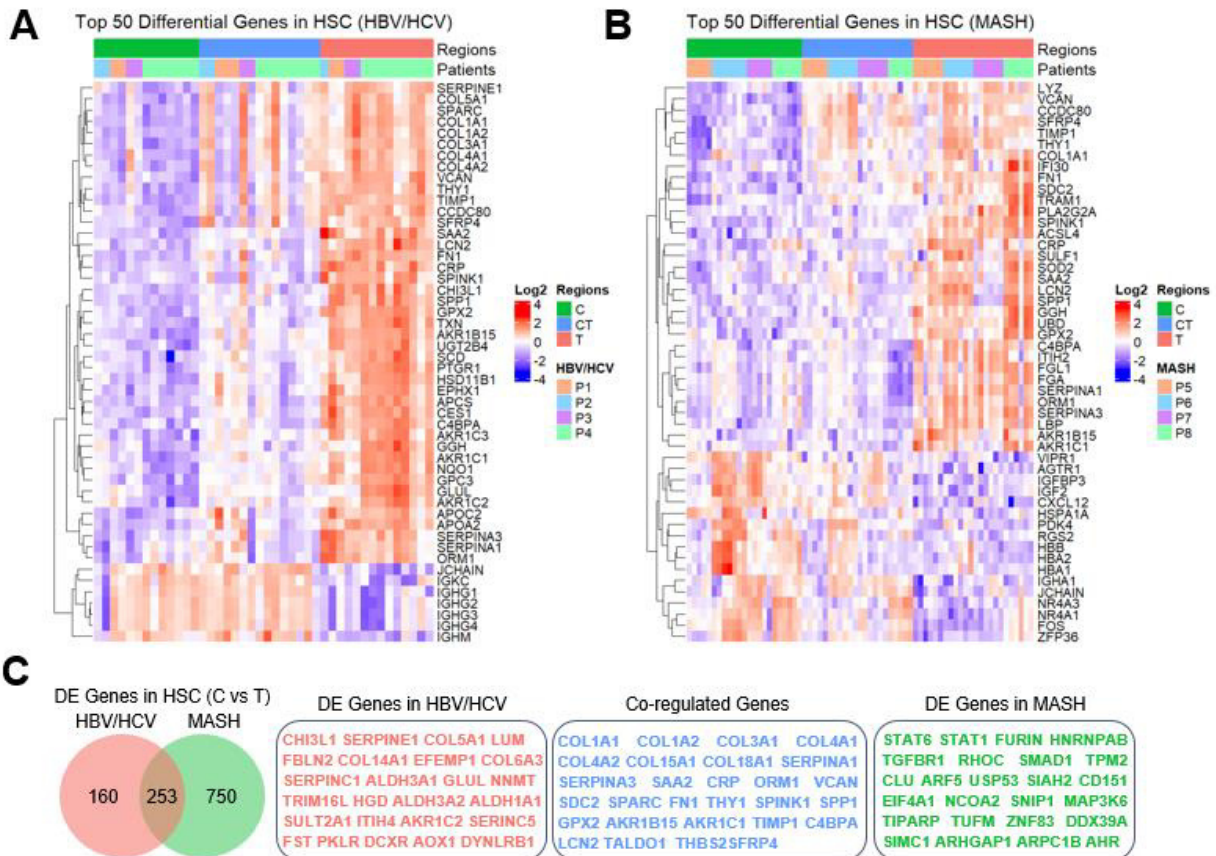


Abb. 3. Räumliche Analyse von HSC/CAF in 8 Patienten mit HCC-basierter Zirrhose (A. Viral und B. MASH). C. Überlappende und Ätiologiebezogene Gene in HSC/CAF im Vergleich zwischen Zirrhose- und Tumorregionen.

In einer longitudinalen Analyse von Gewebe- und Serumproben zur Identifikation von frühen Veränderungen und entsprechenden TIP Parameterkandidaten, untersuchten Dooley, Bantel, Klingmüller, und Hengstler frühe und fortgeschrittene Progressionsstadien im chronischen CCl₄-Modell. Aus den Expressionssignaturen konnten wir drei Phasen der Gewebsantwort auf den chronischen Schaden durch wiederholte CCl₄ Gaben identifizieren. (i) Eine Initiationsphase mit Reaktion auf den akuten (erstmaligen) Leberschaden mit Wundheilung und Ansammlung von reparativen Makrophagen, sowie Herunterregulation metabolischer Enzyme. (ii) Eine Progressionsphase, einhergehend mit einer Stabilisierung bzw. leichter Verstärkung aller

Parameter. (iii) Eine Toleranzphase, bei der keine Reaktion auf weitere CCl₄-Gaben beobachtet wird. Die Toleranzphase konnten wir mit 13 separaten spezifischen „Modulen“ differenziell regulierter Gene, Proteine und Nachbarschaftsverhältnisse definieren (Abb. 4), wobei milde Entzündungen und die Ablagerung kleiner Lipidtröpfchen sowie die Dysregulation des Krebsweges die Hauptmodule in der Toleranzphase der Schädigung sind. Die Ergebnisse im Mausmodell konnten teilweise mit Patientenproben korreliert werden, um einen Spitzenparameter zu identifizieren, der in der Toleranzphase (Kompensationsphase) der chronischen Leberschädigung durchgängig hochreguliert ist (Hammad et al. 2023).

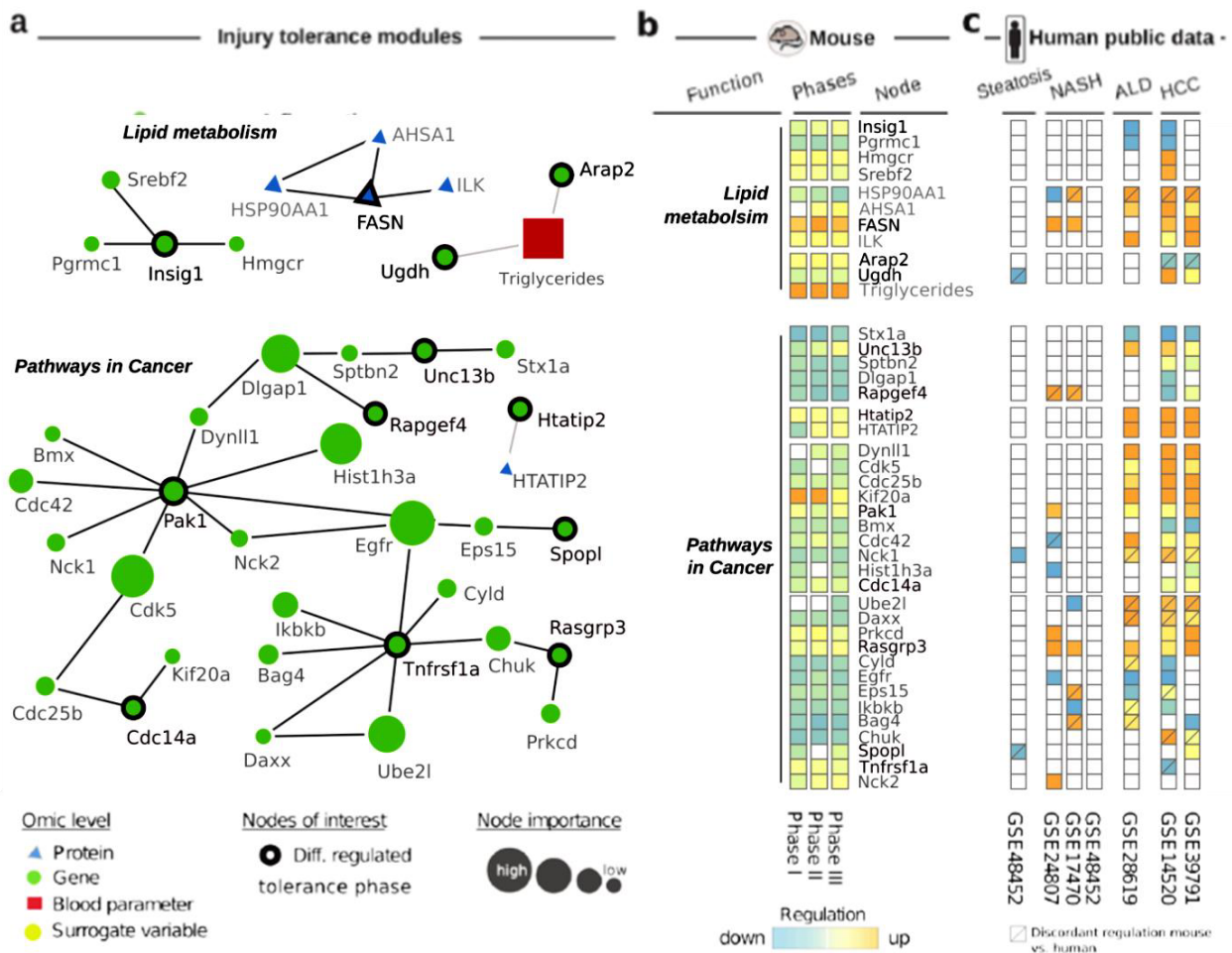


Abb. 4. a. Aus dem multi-omischen Fibrosenetzwerk konnten wir 13 separate Toleranzphase-spezifische Module differenziell regulierter Gene, Proteine und Nachbarschaftsverhältnisse extrahieren.

Netzwerkknoten sind nur dann verbunden, wenn statistisch signifikante Effekte nachgewiesen werden. Die Knotengröße beschreibt deren Relevanz und die Stärke der Effekte der CCl₄-Behandlung. **b.** Funktionelle Annotation und Regulation der Netzwerkknoten in den jeweiligen Initiations-, Progressions- und Toleranzphasen. Signifikante (FDR < 0,05) Herunterregulierung (blau) und Hochregulierung (rot) sind in der Heatmap dargestellt. Fett gedruckte Knotennamen zeigen eine einzigartige differenzielle Regulation innerhalb der Toleranzphase an. **c.** Signifikant (FDR < 0,05) differenziell exprimierte Gene des Mausmodells wurden mit den Ergebnissen aus sieben humanen Studien zu Fettlebererkrankung (Steatose), nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NASH), alkoholischer Lebererkrankung (ALD) und hepatozellulärem Karzinom (HCC) verglichen.

WP3 Aufklärung von Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation und Matrisomkomponenten in der Zirrhose, die den Übergang zum HCC fördern

		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
WP3	Aufklärung von Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation und Matrisomkomponenten in der Zirrhose, die den Übergang zum HCC fördern												
MS3.1	SOP für die Isolierung von Nichtparenchymzellen und Hepatozyten aus Mausmodellen und humanen Leberproben												
MS3.4	Integratives dynamisches Signalwegmodell der GAS6- und TGFβ-induzierten Signaltransduktion ist kalibriert, einschließlich der Auswirkungen von ECM1 und Bemcentinib												
MS3.5	Anpassung des integrativen Modells der GAS6- und TGFβ-induzierten Signaltransduktion an die Situation in Patienten												
MS3.7	Modell—basierte Vorhersage und Validierung von Interventionsstrategien												
MS3.8	SOPs für die Quantifizierung zellulärer Reaktionen in Monokulturen und Co-Kulturen einschließlich, Matrisomparameter und zellbasierte Assay Daten mit primären Zellen												
MS3.9	Veränderungen in der Kommunikation von Tumor assoziierten Makrophagen, Krebs-assoziierten Fibroblasten und Hepatozyten bei der Progression zum HCC sind charakterisiert												

MS3.1 SOP für die Isolierung von Nichtparenchymzellen (NPC) und Hepatozyten aus Mausmodellen und humanen Leberproben: Aufgrund des Mangels an Leberresektionen (iwg. Corona-Maßnahmen) und ausstehender Ethikvoten wurden bisher ausschließlich Mauslebern verwendet, um NPC auf der Grundlage des im LiSyM-Cancer Projekt festgelegten SOP zu isolieren. Bantel, Bode, Dooley, Cramer und Canbay erstellten SOPs für die Isolierung primärer

Zellen aus Lebergewebeproben von Mensch und Maus und stellten sie dem LiSyM-Cancer Netzwerk zur Verfügung.

MS3.4 Integratives dynamisches Signalwegmodell der GAS6- und TGF- β -induzierten Signaltransduktion ist kalibriert, einschließlich der Auswirkungen von ECM1 und Bemcentinib:

Experimente von Klingmüller zur Entwicklung des integrativen dynamischen Signalwegmodells der TGF- β - und GAS6/AXL Signaltransduktion, einschließlich der Effekte der Inhibitoren ECM1 und Bemcentinib wurden mit den funktionellen Experimenten von Dooley harmonisiert. Die dynamischen Signalwegmodelle in Hepatomzellen und hepatischen Sternzellen sind unterschiedlich, die grundsätzliche Modellstruktur wurde beibehalten. Es wurde ein gezielter Proteomics Ansatz entwickelt, um Signalwegs-Komponenten absolute zu quantifizieren (MS3). In Phase 2 werden die Ergebnisse der Proteomdaten in die funktionellen und mechanistischen Untersuchungen von Dooley integriert. Zusammen mit Klingmüller wurde rekombinantes ECM1-Protein in größeren Mengen hergestellt und die Funktionalität des Proteins bzgl. Hemmung der TGF- β -Aktivierung validiert. Die Expression von LTGF- β 1-Aktivatoren in der Leber von ECM1-KO-Mäusen und kultivierten HSCs (primäre Human- und Maus- sowie LX2-Zellen) wurde untersucht; sie war nach Schädigung bzw. Zellaktivierung konsistent hochreguliert. Dabei sind die Protease-Expressionsniveaus mit den ECM1-Expressionsniveaus gegenreguliert. In HSCs wurde die ECM1-Verstärkung und der Funktionsverlust getestet. Es wurden Protein-Protein-Interaktionsassays durchgeführt und eine physikalische Interaktion zwischen ECM1, LTGFB und 5 LTGFB-aktivierenden Proteasen gezeigt. ECM1 wurde als entscheidend für die Induktion des TGF- β -Signalwegs, die HSC Aktivierung und die fibrogene Genexpression, einschließlich Col1 befunden. TIMP1 und Fibronectin sind wichtige nachgeschaltete Komponenten, die die Biomechanik der ECM bestimmen. Die experimentellen Ergebnisse wurden durch ein computergestütztes Kompartimentmodell (Drasdo) validiert (Link et al. 2024). Die beschriebenen TGF- β -Effekte auf Col1 und FN werden durch parallele Gas6/Axl-Signale verstärkt. Damit haben wir bzgl. der bisher untersuchten Modell-(TIP)-Parameter konsistente Daten in den kultivierten Zellen (WP3), den Zirrhose-HCC Patientenproben (WP1, WP1), sowie den Interventions-Mausmodellen (WP4), die von dem TGF- β /Gas6/Axl-Modell gestützt werden.

MS3.5 Anpassung des integrativen Modells der GAS6- und TGF- β -induzierten Signaltransduktion an die Situation in Patienten: Die Erstellung räumlicher Profile (spatial

profiling) zeigte, dass die HSCs einen myofibroblastoiden Phänotyp entwickeln, der durch die Expression bestimmter Biomarker charakterisiert ist, insbesondere Col1, FN1, Timp1. GAS6 und TGF- β -Behandlung gemeinsam fördert genau diesen Phänotyp in kultivierten LX2- Zellen. Das von HSCs produzierte Matrisom beeinflusst die Hepatozyten und bestimmte Subpopulationen fördern die Zelltransformation. Dieses in Patienten identifizierte Szenario wurde in Zellkulturexperimenten simuliert, um mit zeitaufgelösten quantitativen Daten das Signaling Modell zu verfeinern und an die Gegebenheiten im Menschen anzupassen. Das Setup umfasst Ko-Kulturexperimente, Zellkulturüberstand-Behandlungen, Zellkulturexperimente mit dezellularisierter ECM, sowie solche mit 3D artifizieller ECM, die mit Col1 und FN angereichert ist.

MS3.7 Modell—basierte Vorhersage und Validierung von Interventionsstrategien: Um zu untersuchen, ob spezifisch aktivierte hepatische Sternzellen (HSCs) den Phänotyp von HC/HCC verändern können, wurden Experimente mit LX2- und HepaRG-Zellen durchgeführt. Wir kultivierten die Hepatozyten-Zelllinie (HepRG) mit konditioniertem Medium von LX2 und zeigten, dass beide Komponenten im Vergleich zu normal beschichteten Kulturschalen die Hepatozytentransformation (EMT; Abnahme der CDH1-Expression, Zunahme der Vimentin-Expression) begünstigten und die Zellproliferation (Ki67) induzierten. Darüber hinaus wurde der Transkriptionsfaktor HMGA1 (vorhergesagt durch GeoMX-Analyse) in LX2 sowie in primären HSCs aus menschlichen Lebern (erhalten von AG Glanemann) induziert. (*Tong C, et al. Spatial Analysis of α -SMA-Positive Hepatic Stellate Cells and CD68-Positive Macrophages Reveals Altered Phenotypes during the Transition from Cirrhosis to HCC. Abstract book of HCC 2023*).

Tiefgehendere Untersuchung zur TGF- β -Aktivierung wurden durchgeführt. Mit biochemischen Bindungsstudien identifizierten wir für die ECM1-Bindung kritische Peptidregionen in den Proteasen (**Abb. 4**). Synthetische Peptide der Regionen wurden hergestellt und dann sowohl in Zellkulturexperimenten, sowie in Mausmodellen (WP4) verwendet, um die Effekte des ECM1-Proteins zu modulieren und dessen kritische Rolle für die Krankheitsprogression funktionell zu validieren. Der TGF- β Signalweg wurde in MFB-F11-TGF- β /SMAD-Reporterzellen zB durch

Zugabe von LTGF- β 1 plus jeweils rekombinantes (r) Thrombospondin-1 (TSP-1), rADAMTS1, rMMP-2 oder rMMP-9 aktiviert, und dann der Effekt des KTFR Peptids gemessen. Nach der Inkubation wurde der konditionierte Überstand gesammelt, um die Konzentration des aktiven TGF- β mit dem SEAP-Assay zu bestimmen. Zusätzlich wurde bei LX-2 HSCs ECM1 mit siRNA ausgeschaltet, gefolgt von einer Behandlung mit KTFR oder KQFK Peptiden. Die Zelllysate wurden gesammelt, um die Expression von Fibroseparametern zu bestimmen. Die mechanistischen Daten aus den Zellkulturexperimenten wurden in präklinischen Studien mit Mäusen *in vivo* bestätigt und damit gezeigt, dass ein entsprechendes targeting therapeutische Bedeutung hat (*Link et al. 2024*; Abb. 5A, B). Um die Komplexität der Zusammenhänge des Geschehens während der Progression einer chronischen Lebererkrankung in einem Modell hinreichend abzubilden, entwickelten wir zusätzlich zu dem Gewebemodell ein sogenanntes Kompartimentmodell, das den TGF- β Signalweg und das ECM1-Protein als zentrale Komponenten (TIP-Parameter) enthält. Das Modell beschreibt ein Interaktionsnetzwerk der relevanten Zelltypen und Signale innerhalb der und zwischen den Zellen. Das Modell kann die Auswirkungen der Variation einer einzelnen Komponente (hier: ECM1) im Kontext des gesamten Netzwerks von Komponenten (zB ausgelöst durch Schäden an Hepatozyten) simulieren. Eine Erweiterung des Kompartimentmodells wird perspektivisch, durch Integration von quantitativ bestimmten Netzwerkkomponenten und deren Veränderungen, basierend auf Literatur- und eigens generierten Daten, die Krankheitsprozesse vollständig beschreiben (*digital twin*), und die Auswirkungen der Modulation eines oder mehrerer Parameter können damit simuliert, besser verstanden und vorhergesagt werden. Wir haben das Modell verwendet, um den Fibroseprozess zu simulieren und vorhergesagt, dass die Verfügbarkeit von ECM1 tatsächlich ein Wendepunkt sein könnte, der die Entscheidung zwischen progressiver Fibrose und Regeneration entscheidend beeinflusst (Abb. 5C; *Link et al. 2024*). Das Kompartiment-Modell erlaubt somit eine viel schnellere qualitative Testung von Modellparametern.

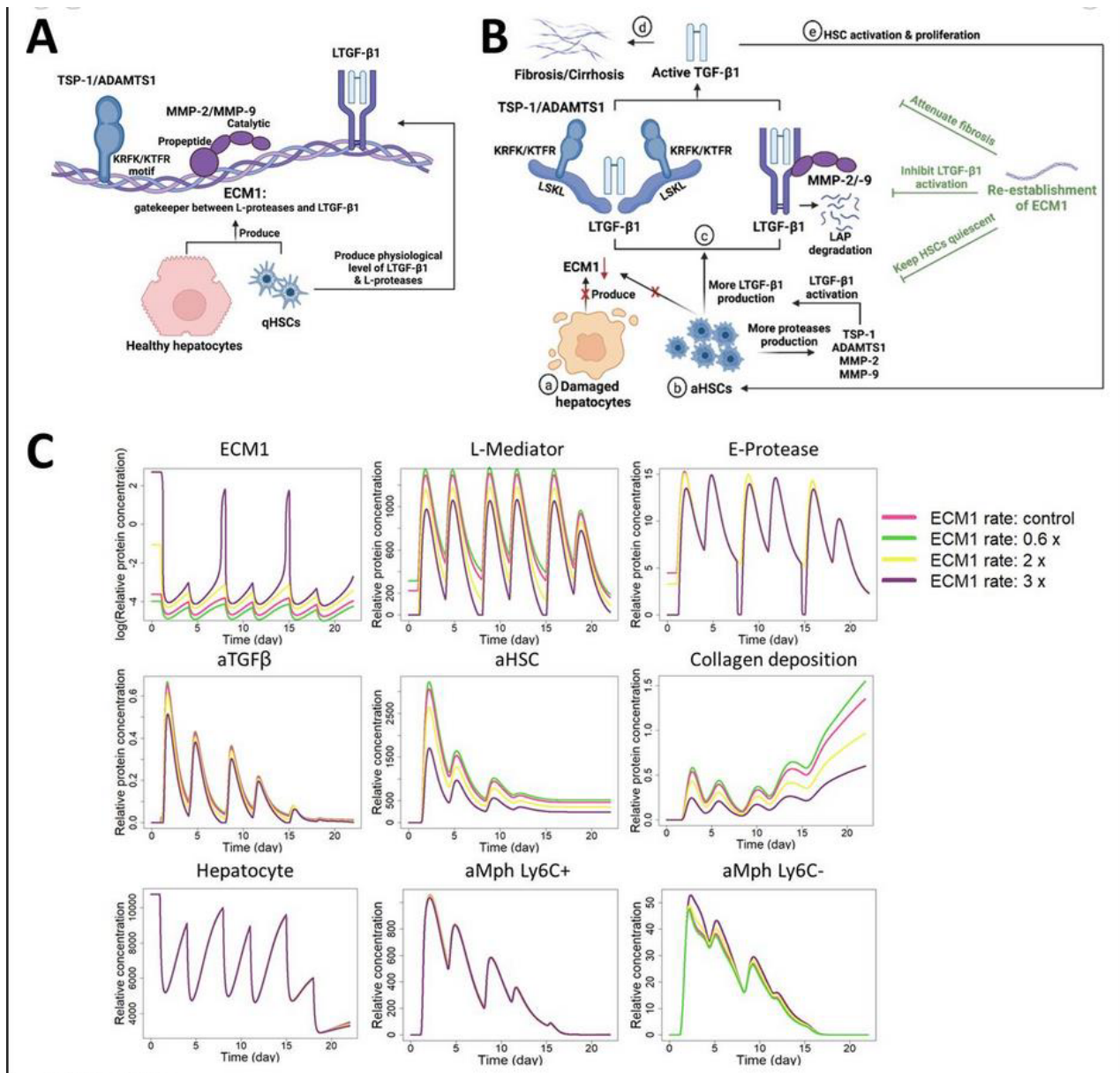
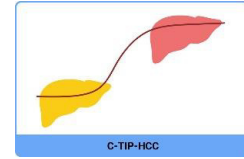


Abb. 5: Die Rolle von ECM1 bei der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase in gesunden Lebern und seine Dysregulation bei chronischen Lebererkrankungen. (A) In gesunden Lebern verhindert ECM1, das von gesunden Hepatozyten und ruhenden hepatischen Sternzellen (HSCs) produziert wird, eine übermäßige Aktivierung von latentem TGF- β 1 (LTGF- β 1) durch TSP-1 und ADAMTS1. Dies geschieht durch die Interaktion mit ihren jeweiligen KRFK- und KTFR-Motiven und die Bindung an MMP-2 und MMP-9, wodurch deren enzymatische Aktivität eingeschränkt und TGF- β 1 in seinem im ECM abgelagerten latenten Komplex (LTGF- β 1) inaktiv gehalten wird. (B) Bei chronischen Lebererkrankungen (CLD) führt (a) der Ausfall geschädigter Hepatozyten, ECM1 aufrechtzuerhalten und zu produzieren, zu (b) einer erhöhten und schädlichen Aktivierung von LTGF- β 1 durch (c) konformationelle Änderungen im LAP-Molekül, hervorgerufen durch TSP-1 und ADAMTS1, oder durch direkte Proteolyse des LAP-Moleküls durch MMP-2 und MMP-9. Erhöhte Mengen an aktivem TGF- β 1 fördern (d) die Ansammlung übermäßiger



extrazellulärer Matrix und bewirken (e) die Aktivierung der HSCs, was letztlich zu (fortschreitender) hepatischer Fibrose führt. Interessanterweise hemmt eine ektopische ECM1-Expression (rECM1/v-ECM1) die durch TSP-1, ADAMTS1, MMP-2 und MMP-9 vermittelte LTGF- β 1-Aktivierung und mildert die nachfolgende hepatische Fibrose (rechts in grün). (C) Simulation einer chronischen Leberschädigung: nach 4 Gaben von CCl₄ (an den Tagen 1, 4, 8 und 11), über einen Zeitraum von 15 Tagen unter vier verschiedenen ECM1-Produktionsraten (Kontrollrate k1HC, k1HH, das 0,6-fache der Kontrolle (0,6 \times k1HC, 0,6 \times k1HH), das 2-fache der Kontrolle (2 \times k1HC, 2 \times k1HH) und das 3-fache der Kontrolle (3 \times k1HC, 3 \times k1HH). Die erste Dosis CCl₄ wird am Tag 1 injiziert, wenn sich das System in einem gesunden Gleichgewichtszustand befindet. Dargestellt sind die relativen Konzentrationen von ECM1, L-Mediator (aktiviert LTGF- β 1) und E-Protease (baut ECM1 ab), aktivem TGF- β 1 (aTGF- β 1), aktivierten HSC (aHSC) und Kollagenablagerung, Hepatozyten (gesund: HH, geschädigt: HC), Ly6C⁺- und Ly6C⁻-Makrophagen (aMph) als Funktion der Zeit für vier unterschiedliche ECM1-Produktionsraten.

MS3.8 SOPs für die Quantifizierung zellulärer Reaktionen in Monokulturen und Co-Kulturen einschließlich Matrisomparameter und zellbasierte Assay Daten mit primären Zellen:

Mit dem Live-Cell-Imaging Modul wurden zellbasierte assays mit der humanen HSC Zelllinie LX2, primären Mauszellen (Hepatozyten und HSC) sowie humanen Hepatozyten und Tumorzelllinien durchgeführt und Daten für die Modelle generiert, sowie Parameter aus WP1 und WP2 funktionell und mechanistisch überprüft. Primäre humane Zellen konnten aus den vorstehend genannten Gründen nicht umfassend eingesetzt werden. Die verwendeten assays umfassen Proliferation, Matrixproduktion, Reporteraktivierung, Zelltod, Migration, Invasion und EMT. Zur Validierung des Matrisomproteins ECM1 als TIP-Parameter behandelte Dooley LX2 Zellen sowie primäre menschliche HSCs mit rekombinantem menschlichem ECM1 oder mit ECM1-Expressionsplasmiden mit/ohne rekombinanten Proteinen für die LTGF β aktivierenden Proteasen TSP1, ADAMTS1, MMP2 oder MMP9. Sämtliche Proteaseaktivitäten wurde durch rhECM1 oder dessen ektopische Expression in den Zellen gehemmt. Dies wurde sowohl auf Ebene von TGF- β -*signaling* Reporter- als auch auf Expressionsebene für Fibrose- und HSC-Aktivierungsmarker (COL1, α -SMA, COL3 und TIMP1) nachgewiesen (Link et al. 2024). Primäre Maushepatozyten (MPH) und AML12 Maushepatozyten, sowie vereinzelt humane Hepatozyten wurden eingehend untersucht um die Regulation der Expression von ECM1 zu prüfen. Die Hepatozyten wurden in Kultur zB mit EGFR siRNA transfiziert und anschließend mit EGF inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausschaltung des Egfr-Signals die EGF-induzierte ECM1-Expression verhindert. Komplementär dazu wurde (WP4) die ECM1-Expression auf RNA- und Proteinebene in WT-Mäusen unterdrückt, nachdem diese mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib

durch intraperitoneale (i.p.) Injektion behandelt wurden. Bemerkenswert ist, dass die EGFR-Inaktivierung in den Mäusen auch die STAT1-Phosphorylierung im Lebergewebe verringerte, was eine Bestätigung des von uns in kultivierten Zellen aufgedeckten Mechanismus bedeutet. Auch IFN γ , welches als negativer Regulator der ECM1-Expression von uns identifiziert wurde, wurde den Mäusen durch i.p. Injektion verabreicht, und auch hier war sowohl die ECM1- und EGFR-Expression deutlich reduziert, was unsere in vitro Daten phänokopiert. Schließlich bestätigten Immunfluoreszenz-Bilddaten von Gewebeproben der behandelten Mauslebern dass die IFN γ -Behandlung zu NRF2-Kerntranslokation führt, ebenso wie wir es in den Zellkulturexperimenten zeigen konnten (Li Y, et al. **bioRxiv 2024**)

MS3.9 Veränderungen in der Kommunikation von Tumor assoziierten Makrophagen, Krebs assoziierten Fibroblasten und Hepatozyten bei der Progression zum HCC sind charakterisiert:

Aus den GeoMX-DSP Experimenten ging hervor, dass α SMA-positive Zellen je nach räumlicher Verteilung im zirrhotischen HCC-Gewebe unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen, dh sich in Subpopulationen mit verschiedenen Phänotypen verändern. Die Veränderungen der Fibroblasten entsprechen denen in Mäusen mit HCC, wo gleichermaßen Zytokin-produzierende Populationen mit HGF-Expression als dominanten Biomarker und mit eher reparativer Funktion in zirrhotischen Regionen dominierten, wohingegen Col1 und Fibronectin produzierende Myofibroblasten als „bad guys“ assoziiert mit HCC-Gebieten auftraten. Es wurden Genlisten erstellt, die die Zellpopulationen in den zirrhotischen (Cirrhosis, C), HCC-benachbarten (Cirrhosis-Tumor, CT) und innerhalb des HCC (Tumor, T) charakterisieren, unterschieden nach gleichermaßen niedrig oder hoch exprimiert bzw von C über CT nach T hoch bzw herunterreguliert. Die bisherigen Daten zeigen zum Einen eine hohe Konsistenz in verschiedenen Patienten unabhängig von der Krankheitsetiologie (HCV, HBV, NASH, Alkohol). Insbesondere auffällig sind die signifikant höheren Werte für COL1A1 und FN1 im HCC, im Vergleich mit dem Tumorrand und die vom Tumor entfernten Regionen. Unsere darauf aufbauende Hypothese, die wir in Phase 2 im Gewebemodell verankern möchten, umfasst Veränderung der Biomechanik in der ECM durch das von den Fibroblasten sekretierte COL1A1 und FN1, dadurch Aktivierung von Integrin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Hepatozyten, Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen für Proliferation, phänotypische Veränderungen, Polaritätsverlust und Zelltransformation. Mit der Validierung der vorstehenden Hypothese wurde in funktionellen Studien mit kultivierten Mono- und Kokulturen begonnen. SOPs für die Quantifizierung zellulärer

Assays wie Proliferation, Migration, Zellschaden, phänotypische Veränderungen und Bestimmung der Matrix-Zusammensetzung wurden begonnen, wobei die Konzentration der Matrix gemäß den Empfehlungen von CB500 und NANOVEA festgelegt wurde.

Um quantitative real time Verlaufsdaten zu generieren, verwendeten wir wo immer möglich die IncuCyte Technologie. Wir verwendeten dafür LX2, HepaRG, primäre Maushepatozyten und HSCs, sowie verschiedene HCC-Zelllinien. Primäre menschliche Zellen konnten bisher nur vereinzelt eingesetzt werden, da es bei den Klinischen Partnern Engpässe in der Leber-OP-Situation gab, bzw. nur minimale Gewebestücke aus den OPs verfügbar waren, bei einem Partner ein Ortswechsel stattfand und es Ethikkommission basierte Probleme des Austauschs von Proben innerhalb des Gesamtnetzwerks gab. Wir haben bisher HepaRG/Huh/HLE/HLF mit LX-2-Überstand stimuliert, wobei wir den Einfluß des Sekretoms auf den Hepatozyten/HCC-Phänotyp der LX2 nach Stimulation mit und ohne TGF- β vergleichend betrachteten. Wir analysierten RNA und Protein der Hepatozyten und führten funktionelle Studien durch. Nach Behandlung der HepaRG mit Überstand von TGF- β behandelten LX-2 Zellen kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Expression von Ki67, was einen erhöhten Proliferationsstatus der HepaRG-Zellen bedeutet. Umgekehrt ist die Expression von CDH1 (E-Cadherin) deutlich verringert, was ein Hinweis auf Polaritätsverlust und mesenchymale Transdifferenzierung ist. Die Hochregulierung von Vimentin unterstützt diesen Trend. Auch die Expression von Integrinrezeptoren ITGA2, ITGA5 und ITGAV ist nach Behandlung erhöht, was eine Sensibilisierung der Hepatozyten für ECM-Signale bedeutet. Diese Ergebnisse konnten in einem Transwell-Co-Kultur-System der beiden Zelltypen bestätigt werden. Weitere Auffälligkeiten, die wir in Phase 2 weiterverfolgen möchten ist die beobachtete Induktion einiger bekannter früher Marker des hepatozellulären Karzinoms (SERPINK4, DDK1, AXL, PLAUR). Um den ECM-Beitrag für die Ergebnisse zu zeigen haben wir in einem alternativen Ansatz die Kulturschalen der LX2-HSCs mit und ohne TGF- β -Stimulation dezellularisiert und dann die Matrix für die Kultivierung von Hepatozyten verwendet. Die so erhaltenen (patho)physiologischen ECM-Gerüste wurden in weiteren Ansätzen mit unseren TIP-Kandidaten Fibronektin (FN1), Kollagen Typ I (COL1A1), cleaved (c)Col1A1 und ECM1 angereichert. Das System wurde nach Beacham et al., 2007 soweit etabliert und entsprechende Untersuchungen sind Gegenstand von Phase 2. Auf der Grundlage der Ergebnisse von Klingmüller bzgl des crosstalks und der Dynamik der TGF β - und GAS6/AXL-Signaltweg und deren Auswirkungen auf das LX2-HSC Transkriptom und Proteom, sollen

Kostimulationsexperimente mit TGF- β und Gas6 in die vorstehenden Experimente sowie in die Gewebsmodellierung integriert werden. Experimente zu Veränderungen in der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen wurden mit Bode gemeinsam durchgeführt. Es wurde dazu ein entsprechendes Kokultursystem etabliert für das hochaufgereinigten Hepatozyten und CD68-Makrophagen separat kultiviert wurden, jedoch der Austausch löslicher Mediatoren möglich war (Wolf SD, et al. Progression of MASLD goes along with significant changes of a recruited and TGF β -sensitive macrophage population. Z Gastroenterologie 2024; 62 (01), P3. 04).

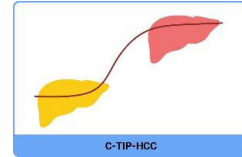
TGF- β ist ein zentraler Parameter in unseren Modellen. Um dessen Auswirkungen auf Hepatozyten, die durch eine metabolische Dysfunktion assoziierte steatotische Lebererkrankung (MASLD) metabolischem Stress ausgesetzt sind, zu spezifizieren, untersuchten wir den Einfluss der TGF- β Behandlung auf Hepatozyten mit erhöhtem oder depletiertem Cholesteringehalt. Wir fanden heraus, dass TGF- β die mRNA-Expression mehrerer regulatorischer Gene für den Cholesterinstoffwechsel in AML12 und Maus-Hepatozyten unterdrückt. Diese Ergebnisse wurden in der Leber von Mäusen bestätigt, denen AAV8-TGF- β 1 injiziert wurde. Der Gesamtcholesterinspiegel und die Akkumulation von Lipidtröpfchen waren nach der Behandlung mit TGF- β 1 sowohl in AML12-Hepatozyten und in Lebergewebe reduziert (Wang et al. 2023, Link et al. 2024; Li Y, et al. bioRxiv 2024). Biophysikalische Studien zeigten, dass der Cholesterinmangel (*cholesterol depletion*, CD) gestört wurde, während seine Anreicherung (*cholesterol enrichment*, CE) die Bildung des TGF- β -Rezeptors I (T β RI)/T β RII-Komplexes verstärkte (Roohi et al. 2023, Link et al. 2024; Li Y, et al. bioRxiv 2024). Die Smad2/3-Phosphorylierung nach TGF- β 1-Behandlung war nach CD leicht erhöht, während die TGF- β 1-vermittelte AKT-Phosphorylierung durch CE gehemmt wurde. Darüber hinaus schützte CE AML12-Zellen vor verschiedenen Effekten, die durch TGF- β 1 vermittelt wurden, einschließlich EMT, Aktinpolymerisation und Apoptose. CD ahmte das Ergebnis einer langfristigen TGF- β 1-Verabreichung nach, ein Effekt, der durch einen Inhibitor des Typ-I-TGF- β 1-Rezeptors blockiert werden konnte, was die nachrangige Beteiligung des TGF- β Rezeptorkomplexes bei dem CD-Effekt bestätigte. Zusätzlich hemmte bzw. förderte der Überstand von CE- oder CD-behandelten AML12-Zellen die Aktivierung von LX-2-hepatischen Sternzellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β 1 den Cholesterinstoffwechsel hemmt, während Cholesterin die nachgelagerten Wirkungen von TGF- β in Hepatozyten abschwächt. Die Modulation des

Gleichgewichts zwischen TGF- β -Signalweg zu Smad2/3 vs. pAkt hat potenzielle Auswirkungen auf Lebererkrankungen und Malignome. Basierend auf diesen Ergebnissen werden sowohl die Cholesterin- als auch die heptozytäre AKT- und SMAD2/3-Phosphorylierung in Phase 2 als wichtige TIP-Kandidatenparameter, sowohl für das dynamischen Signalwegsmodell in Hepatozyten als auch in das Zirrhose-HCC Gewebemodell integriert.

WP4 Modellintegration, präklinische Validierung und klinische Translation

		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
WP4	Modellintegration, präklinische Validierung und klinische Translation												
MS4.1	Charakterisierung der Zellprozessparameter für das Gewebemodell in Zelllinien und primären Zellen, einzeln und in Co-Kultur sind abgeschlossen												
MS4.2	Vorhersage und präklinische Validierung von Kombinationsbehandlungen zu MS4.1, zur Vermeidung oder Verlangsamung des Überschreitens des TIP zum HCC												
MS4.3	Organoidmodell mit Patientenmaterial ist etabliert												
MS4.4	3D-Gewebezellkulturmodell aus Patientenmaterial ist etabliert												
MS4.5	Experimentelle Testung von Modellparametern im Organoidmodell und im 3D-Gewebezellkulturmodell												
MS4.6	Experimentelle Testung von Modellparametern in Mausmodellen												
MS4.7	Indikative Modellparameter werden in longitudinalen Serum- und Biopsieproben geprüft												
MS4.12	Präklinische Validierung des TIP anhand von Maus- und zirrhotischen 3D-Gewebe-Modellen												

MS4.1 Charakterisierung der Zellprozessparameter für das Gewebemodell in Zelllinien und primären Zellen, einzeln und in Co-Kultur sind abgeschlossen: Wir implementierten Module der IncuCyte S3 Live-Cell-Imaging-Plattform für verschiedene *live cell assays*, einschließlich Einzelzell-Analysen, Migrations- und Chemotaxis assays unter verschiedenen Bedingungen (z.B.



nach Modulation der Integrin-Rezeptor Expression oder Kultivierung der Hepatozyten/HCC-Zellen auf zB LX2-dezellularisierter Matrix, um zB die Migrationsfähigkeit der HepRG-Zellen in Echtzeit zu quantifizieren. Die Bildanalyse zur Dynamik der Wundschließung wurde zeitaufgelöst an lebenden Zellen quantifiziert. Auch das Modul für Organoide wurde mit Cramer erfolgreich etabliert.

MS4.3 Organoidmodell mit Patientenmaterial ist etabliert: Organoide von Hepatozyten und von HCCs sind bei Cramer etabliert und wurden asserviert, es wurden jedoch noch keine 3D funktionelle real time Studien damit durchgeführt (Phase 2). Bisher wurden diese ausschließlich, aber dafür eingehend mit Hepatozyten, HCC-Zelllinien und HSCs in 2D-Kultur- und Kokultur-Modellen.

MS4.4 3D-Gewebezellkulturmodell aus Patientenmaterial ist etabliert: Aufgrund von Engpässen in den Kliniken frisches OP-Material in ausreichender Menge bereitzustellen, insbesondere von „vermeintlich“ gesunden Lebern einerseits, und andererseits fehlender Technologie unsererseits, um 3D Bilddaten in ausreichender Tiefe zu generieren (40 μm statt erforderliche 100 μm), wurde das Gewebemodell vorerst mit Bilddaten von Mäusen begonnen, die mit westlicher Diät ($\pm\text{CCI4}$) gefüttert wurden (Bode). Das Modell wurde von Drasdo für den gesamten Krankheitsverlauf ausgelegt, umfassend Steatose-, NASH-, fortgeschrittene Fibrose- und HCC-Stadium. Zusammen mit Bode erstellten wir die für das Modell verwendeten 2D- und 3D-Bilddatensätze, die dann von Höhme präzisiert wurden. Weitere 3D-Bilddatensätze von menschlichen Patienten wurden von Berg (SMART-NAFLD) für die Integration in das Modell bereitgestellt. Ein entsprechendes Referenzstadium-Modell wurde durch Iterationen zwischen Bilddatenanalyse (Hoehme) und Modellierung (Drasdo) begonnen.

MS4.5 Experimentelle Testung von Modellparametern im Organoidmodell und im 3D-Gewebezellkulturmodell Live-Cell-Imaging von Monokulturen, Co-Kulturen und organoiden Modulen wird mit Hilfe von Zelllinien durchgeführt. Es wurden Versuche durchgeführt LX2-Zellen in die Hepatozytenorganoide zu implementieren.

MS4.6 Experimentelle Testung von Modellparametern in Mausmodellen. Verschieden TIP-Parameter wurden von uns funktionell in Mausmodellen überprüft, bzw. wurden entsprechende Tieranträge dafür gestellt und genehmigt. Dies betrifft insbesondere die Modellparameter

ECM1/TGF- β und deren Einfluß auf ECM-Produktion, Krankheitsprogression und Hepatozytenphänotyp-Veränderung. So wurde ein Peptid synthetisiert, das die Funktion von ECM1 bzgl der LTGF- β Aktivierung phänokopiert und nachfolgend in Mausmodellen für chronische Lebererkrankungen getestet, wobei die kritische Rolle dieses Parameters und das Potenzial als therapeutische Zielstruktur bestätigt werden konnten. Es zeigte sich deutlich, dass die kritische Funktion des ECM1 Protein in der Leber mit der Aktivierung des TGF- β -Signalwegs verbunden ist (Fan et al. 2019; Li et al. 2021; Link et al. 2024). Ebenfalls in Mausmodellen wurden die mit bioinformatischen Verfahren und Netzwerkmodellierung zu Zell-Zellkommunikation (Zytokin und Rezeptor) vorhergesagten, dann in Zellkulturexperimenten nachgewiesenen *upstream*-Signale, der ECM1 Expressionsregulation durch Zytokin- oder Signalwegsinhibitor-Behandlung bestätigt. Gesunde Mäuse wurden dazu mit dem EGF/HGF-Inhibitor Erlotinib behandelt und wir konnten zeigen, dass EGFR-Aktivierung, pStat1S727 und ECM1 Expression herunterreguliert wurden. Komplementär dazu konnten wir mit IFN γ -Behandlung der Mäuse zeigen, dass oxidativer Stress induziert wurde, NRF2 in den Zellkern der Hepatozyten transloziert wurde und ECM1-Expression verringert wurde (Li Y, et al. bioRxiv 2024, preprint; Abb.6). Es wurden ECM1-tomato knock-in-Mäuse generiert, sowie ein TGF- β -Smad3-Signaling-Reportermausstamm eingeführt und mit der Zucht begonnen. Für beide Mausmodelle wurden bereits Tierversuchsanträge genehmigt (35-9185.81/G-144/22 und 35-9185.81/G-15/24).

Mit dem Ziel die Nachweisbarkeit von HCC-generierten, sekretierten TIP-Parametern im Blut zu erhöhen, haben wir Mäuse mit einem HCC mit Doxorubizin behandelt, um die Sekretion von zB AFP aus den Tumorzellen zu erhöhen. Dies gelang eindrucksvoll (Schmithals et al., 2024) und kann später für die Surveillance der Zirrhosepatienten mit hohem HCC-Risiko erwogen werden, um die Nachweisbarkeit der TIP Parameter zu verbessern.

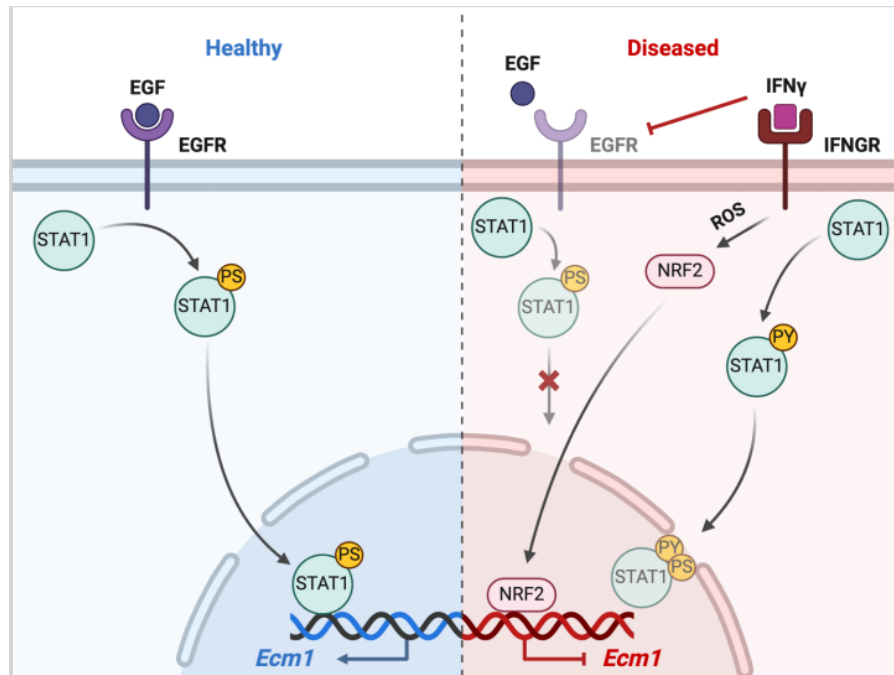


Abb. 6. Schema zur Regulation der ECM1-Expression in Hepatozyten in gesundem und erkranktem Lebergewebe. Im physiologischen Zustand (linkes Panel) wird die ECM1-Expression in Hepatozyten durch den EGF/EGFR/p-STAT1 S727-Signalweg aufrechterhalten. Signal-phosphoryliertes STAT1 S727 transloziert in den Zellkern und bindet an den Promotor des Ecm1-Gens, um dessen Expression zu gewährleisten. In geschädigten Hepatozyten erkrankter Lebern (rechtes Panel) wirkt das durch Entzündungen hochregulierte IFN γ in Hepatozyten über den IFNGR und unterbricht den EGF-Signalweg auf dreierlei Weise: (1) durch die Herunterregulierung der EGFR-Expression, (2) durch die Y701-Phosphorylierung von STAT1, welche die Bindung von S727-phosphoryliertem STAT1 an den Promotor des Ecm1-Gens hemmt, und (3) durch die Induktion der nukleären Akkumulation von NRF2, der direkt an den Ecm1-Genpromotor bindet und diesen negativ reguliert. Alle drei Mechanismen führen primär zu einer Reduktion der ECM1-Expression und sekundär zur Aktivierung von LTGF- β , zur Aktivierung hepatischer Sternzellen und zur Fibrogenese. (Abbildung erstellt mit BioRender.com).

MS4.7 Indikative Modellparameter werden in longitudinalen Serum- und Biopsieproben geprüft. In seiner inaktiven Version verbleibt TGF- β als Vorläufer (Latent TGF- β) in der ECM gespeichert. ECM1 schützt dabei LTGF- β vor dessen Aktivierung, zB durch Proteasen (Li Y et al. 2021; Fan W et al. 2019; Link F, et al. 2024). Die vollständige Depletion von ECM1, zB in *knock out* Mäusen, bewirkt folglich eine spontane und massive TGF- β -Aktivierung. Nach Spaltung und Aktivierung entstehen Spaltprodukte, die nachweisbar und somit von diagnostischer und prädiktiver Relevanz sind. Das Spaltfragment LAPL59 wird dabei freigesetzt und kann im Blut als Marker für die Menge an aktiviertem TGF- β gemessen werden. Ein weiteres Spaltfragment des Komplexes, LAPR58 bleibt in der ECM verankert und kann durch Färbung im Gewebe lokalisiert

und damit die TGF- β Aktivierung räumlich lokalisiert und quantifiziert werden. Wir haben damit begonnen die LAP- und ECM1-Spiegel in Seren von Patienten mit verschiedenen Fibrosestadien oder Leberzirrhose mit oder ohne HCC zu messen, wobei wir kommerziell verfügbare ELISAs verwendeten. Wir untersuchten in einer bisher noch zu geringen Anzahl von Patienten, ob diese Marker, die mit der TGF- β -Aktivierung assoziiert sind, zwischen verschiedenen Stadien der Fibrose und Zirrhose unterscheiden können und somit zur Risikostratifizierung von Patienten mit einer Progression der Lebererkrankung in Richtung HCC dienen könnten. Wir fanden einen schrittweisen Anstieg der ECM1-Spiegel in Seren von Patienten mit signifikanter Fibrose bis hin zu Leberzirrhose und HCC. Die LAP-Spiegel waren in Seren von Zirrhose-Patienten signifikant höher als bei Patienten mit niedrigeren Fibrose-Stadien. Im Vergleich zu Zirrhose-Patienten sanken die Spiegel beim HCC jedoch wieder, was auch durch Färbung von LAPR58 im Lebergewebe beobachtet werden konnte. Mit Bantel wurden diese ELISAs (ECM1, LAP), sowie weitere für indikative Modellparameter (TGF β 1, TIMP1, K18, K19) etabliert und in den gleichen Fibrose-Patientenproben gemessen. Die Anzahl der Patientenproben ist noch zu gering, um hier zu eindeutigen Schlussfolgerungen zu kommen, was in Phase 2 erfolgen soll.

MS4.12 Präklinische Validierung des TIP anhand von Maus- und zirrhotischen 3D-Gewebe-Modellen. Die Überstände von kultiviertem HCC-Gewebe wurden auf spezifische Wachstumsfaktoren untersucht und mit tumorfreiem Lebergewebe als Kontrolle verglichen. ECM1 und LAP wurden von der AG Bantel gemessen und mit den Färbedatensätzen (WP1) korreliert, wobei eine positive Korrelation zwischen den beiden Parametern festgestellt wurde. Abschließend wurde ECM1 und seine Interaktionen in das Kompartimentmodell von AG Drasdo (Link et al., 2024) integriert. Diese Integration ermöglicht eine detailliertere Simulation der molekularen Dynamik und zellulären Verhaltensweisen im Lebermikroenvironment, was tiefere Einblicke in die Rolle von ECM1 bei der Progression von Lebererkrankungen und mögliche therapeutische Zielstrukturen bietet.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

2.1 Personalkosten

Für die Ausführung der Arbeiten wurde wissenschaftliches und technisches Personal eingesetzt:
0812 Wissenschaftliches Personal

- Postdoc E13 100% 07/2021 bis 05/2023, E13 50% ab 06/2023 bis einschließlich 06/2024 (211.478,04 €)
- Doktorandin E13 50% ab 08/2021 bis einschließlich 12/2021 (16.663,96 €)
- Postdoc E13 50% ab 06/2023 bis 12/2023, E13 100% ab 01/2024 bis einschließlich 06/2024 (58.001,84 €)
- Projektkoordinatorin 26% E13 ab 08/2023 bis einschließlich 06/2024 (19.988,58 €)

Die wissenschaftlichen Arbeiten wurden zusätzlich von einem Doktoranden unterstützt, der nicht im Projekt finanziert wurde.

Die bewilligten 257.733,72 € für eine Postdoc-Stelle 100% für 36 Monate wurden durch Umwidmung von Mittel der Position 817 verstärkt. Die Besetzung der bewilligten Technischen Assistenz-Stelle mit einer geeigneten Person erwies sich als schwierig, deshalb wurde eine vorhandene Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Pioronska) für die Aufgaben eingesetzt. Zudem wurde eine Projektkoordinatorin (Eckerle) mit den umgewidmeten Mitteln finanziert. Letztlich waren 306.935,97 € für wissenschaftliches Personal budgetiert. Insgesamt belaufen sich die Ausgaben für Wissenschaftliches Personal auf 306.132,42 €.

0817 Technisches Personal

- Technische Assistentin E7 77,92% ab 01/2022 bis einschließlich 05/2022 (14.100,22 €)
- Technische Assistentin E8 50% ab 15.09.2023 bis einschließlich 06/2024 (22.010,71 €)
- Technische Assistentin E9a 80% ab 01/2024 bis einschließlich 06/2024 (21.099,18 €)
- Technischer Assistent E9b 100% ab 01/2024 bis einschließlich 06/2024 (34.488,48 €)
- Technische Assistentin E9b 38,9% ab 01/2024 bis einschließlich 06/2024 (13.288,39 €)

Da die bewilligte Stelle E9, 100%, 36 Monate lange nicht besetzt werden konnte, wurde ein Anteil der zur Verfügung stehenden 154.002,54 € auf Position 812 umgewidmet (s.o.).

Nach den beschriebenen Umwidmungen standen 104.800,29 € zur Verfügung. Die Ausgaben für Technisches Personal belaufen sich auf insgesamt 104.986,98 €.

In Summe belaufen sich die Personalausgaben auf 411.119,40 € und entsprachen damit den bewilligten Personalmitteln in Höhe von 411.736,26 €.

2.2 Investitionen

Insgesamt wurden 588.213,30 € für Investitionen bewilligt, 587.168,80 € wurden in die Anschaffung folgender Geräte investiert:

- Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Slide Scanner Aperio VERSA 8 Brightfield, 161.700,73 €
- BioTek Instruments GmbH, MultiFlo FXDispenser Vorführgerät, 17.078,88 €
- Nanostring Technologies, GeoMx DSP Analysis Instrument, 356.000,40 €
- Sartorius Lab Instruments GmbH & Co, Incucyte Imagelock 96-well Platten, Incucyte Clearview 96 Well Platten, Incucyte Organoid Software Module, Incucyte Cell by Cell Software Modul, Incucyte Chemotaxis Software Module, Incucyte Cell Migration Kit, 52.388,79 €

Diese Geräte sind weiterhin verfügbar und werden verwendet, um die Meilensteine von C-TIP-HCC im Rahmen von LiSyM-Cancer II zu erreichen.

Die Mittel für die Vergabe von Aufträgen wurden umgewidmet in Verbrauchsmaterial, da sich die ursprünglich geplante Sequenzierung von Einzelzellen durch einen externen Dienstleister frühzeitig als nicht zielführend erwies. Aus dem Budget von 5.402,60 € wurden 2.618,00 € für eine Test-Probenanalyse durch CeGaT GmbH verausgabt.

2.3 Verbrauchsmaterial

Inklusive der Umwidmung der Mittel für die Vergabe von Aufträgen waren 264.698,00 € für Sachkosten budgetiert. Verausgabt wurden insgesamt 271.085,64 €.

2.4 Reisekosten

Die wissenschaftlichen Mitarbeiter und der Projektleiter nahmen an den jährlichen Netzwerkveranstaltungen - Status Seminare, Scientist Retreats und der SBMC 2022 - teil. Von den zur Verfügung stehenden 5.000,00 € wurden insgesamt 1.839,40 € Dienstreisen verbraucht.

2.5 Sonstige unmittelbare Vorhabenkosten

Nichtzutreffend.

2.6 FE-Fremdleistungen

Nichtzutreffend.

2.7 Gemeinkosten

Nichtzutreffend.

2.8 Gesamtkosten

Insgesamt wurden 1.273.831,24 € aus dem Budget von 1.275.050,16 € (Angaben exklusive Projektpauschale) investiert.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die beschriebenen Experimente und Arbeitsschritte waren notwendig und angemessen, um das Projekt durchzuführen und die Projektziele (Meilensteine) wie geplant und oben beschrieben zu erreichen. Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse wurden bereits teilweise veröffentlicht. Weitere Publikationen in Zusammenarbeit mit C-TIP-HCC und LiSyM-Krebs Partnern sind in Vorbereitung. Auf das erwerbene technische know-how, die gesammelten Proben, die Erkenntnisse und Ergebnisse wird in der zweiten Förderperiode aufgebaut.

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

Die in dieser Förderperiode erzielten Erkenntnisse werden im Rahmen des Folgeverbundprojektes LiSyM-Krebs-Phase-II in entsprechenden Patientenkohorten weiter überprüft und in einer prospektiven Studie evaluiert, um nachfolgend in der Praxis Anwendung zu finden. Die Entwicklung eines TIP-Parameter-basierten Scores hat hohe klinische und sozioökonomische Relevanz Diese ergibt sich aus der weiten Verbreitung chronischer Lebererkrankungen und ihrer Progression zu fortgeschrittener Fibrose/Leberzirrhose mit dem Risiko

der HCC-Entwicklung. Es ist anzunehmen, dass durch geeignete Marker/Scores bei Patienten mit Leberzirrhose die HCC-Entwicklung frühzeitig nachgewiesen werden kann. Die verbesserte nicht-invasive Erkennung präkanzeröser Veränderungen bei fortgeschrittener Fibrose/Zirrhose ermöglicht eine Risikostratifizierung und verbesserte Überwachungsstrategie, sowie frühzeitige therapeutische Interventionen mit kurativem Ansatz und ist somit von hoher gesundheitsökonomischer Relevanz.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Uns sind keine Veröffentlichungen oder neue Erkenntnisse zur Thematik zur Kenntnis gelangt, die das Vorhaben grundlegend in Frage stellen würden. Die im Förderzeitraum veröffentlichten neuen Erkenntnisse im Bereich Leberzirrhose und Leberkrebs wurden in die Versuchsplanung und Diskussion der Ergebnisse einbezogen. Es wurden zB Daten publiziert, die zeigen, dass der Gewebsparameter Viskoelastizität neben und mehr noch als die Steifheit der EZM in der Zirrhose für die Zelltransformation und HCC-Bildung ausschlaggebend ist (Fan et al.; Nature 2024). Deshalb halten wir es für außerordentlich wichtig, die Messung dieses Parameters in unseren Proben durchzuführen und in unseren Modellen zu berücksichtigen (zweite Förderperiode).

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

In Preparation, in Submission, Under Review Articles

1. Yujia Li, Frederik Link, Weiguo Fan, Zeribe C. Nwosu, Weronika Pioronska, Kerry Gould, Christoph Meyer, Ye Yao, Seddik Hammad, Rilun Feng, Hui Liu, Chen Shao, Bing Sun, Huiguo Ding, Roman Liebe, Matthias P. A. Ebert, Hong-Lei Weng, Peter ten Dijke, Steven Dooley, Sai Wang. EGF/STAT1 signals to maintain ECM1 expression in hepatic homeostasis are disrupted by IFN γ /NRF2 in chronic liver disease. bioRxiv 2024.02.17.580798; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.17.580798>
2. Jieling Zhao, Seddik Hammad, Mathieu de Langlard, Pia Erdoesi, Yueni Li, Paul Van Liedekerke, Andreas Buttenschoen, Manuel Winkler, Sina W. Kürschner, Philipp-Sebastian Reiners-Koch, Niels Grabe, Stephanie D. Wolf, Johannes Bode, Jan G. Hengstler, Matthias P. Ebert, Steven Dooley, Dirk Drasdo. The interplay between biomechanics and cell kinetics explains 2 fibrotic scar pattern formation in liver fibrosis.

Published articles

3. [A liver digital twin for in silico testing of cellular and inter-cellular mechanisms in regeneration after drug-induced damage.](#) Zhao J, Ghallab A, Hassan R, Dooley S, Hengstler JG, Drasdo D. iScience. 2023 Sep 28;27(2):108077. doi: 10.1016/j.isci.2023.108077. PMID: 38371522
4. [Digital twin demonstrates significance of biomechanical growth control in liver regeneration after partial hepatectomy.](#) Hoehme S, Hammad S, Boettger J, Begher-Tibbe B, Bucur P, Vibert E, Gebhardt R, Hengstler JG, Drasdo D. iScience. 2022 Dec 5;26(1):105714. doi: 10.1016/j.isci.2022.105714. PMID: 36691615
5. [Direct Ingestion of Oxidized Red Blood Cells \(Efferocytosis\) by Hepatocytes.](#) Zheng C, Li S, Lyu H, Chen C, Mueller J, Dropmann A, Hammad S, Dooley S, He S, Mueller S. Hepat Med. 2024 Sep 3;16:65-77. doi: 10.2147/HMER.S469990. PMID: 39247515
6. [ECM1 attenuates hepatic fibrosis by interfering with mediators of latent TGF- \$\beta\$ 1 activation.](#) Link F, Li Y, Zhao J, Munker S, Fan W, Nwosu ZC, Yao Y, Wang S, Huang C, Liebe R, Hammad S, Liu H, Shao C, Gao C, Sun B, Török NJ, Ding H, Ebert MP, Weng H, Ten Dijke P, Drasdo D, Dooley S, Wang S. Gut. 2024 Oct 24:gutjnl-2024-333213. doi: 10.1136/gutjnl-2024-333213. PMID: 39448254
7. [ERRy-inducible FGF23 promotes alcoholic liver injury through enhancing CYP2E1 mediated hepatic oxidative stress.](#) Jung YS, Radhakrishnan K, Hammad S, Müller S, Müller J, Noh JR, Kim J, Lee IK, Cho SJ, Kim DK, Kim YH, Lee CH, Dooley S, Choi HS. Redox Biol. 2024 May;71:103107. doi: 10.1016/j.redox.2024.103107. PMID: 38479224
8. [Hepatocytes reprogram liver macrophages involving control of TGF- \$\beta\$ activation, influencing liver regeneration and injury.](#) Wolf SD, Ehling C, Müller-Dott S, Poschmann G, Petzsch P, Lautwein T, Wang S, Helm B, Schilling M, Saez-Rodriguez J, Vucur M, Stühler K, Köhrer K, Tacke F, Dooley S, Klingmüller U, Luedde T, Bode JG. Hepatol Commun. 2023 Jul 24;7(8):e0208. doi: 10.1097/HC9.000000000000208. PMID: 37486964
9. [Retinoic acid generates a beneficial microenvironment for liver progenitor cell activation in acute liver failure.](#) Wang S, Link F, Munker S, Wang W, Feng R, Liebe R, Li Y, Yao Y,

- Liu H, Shao C, Ebert MPA, Ding H, Dooley S, Weng HL, Wang SS. *Hepatology*. 2024 Jul 18;8(8):e0483. doi: 10.1097/HCG.0000000000000483. PMID: 39023343
10. [Role of WISP1 in Stellate Cell Migration and Liver Fibrosis.](#) González D, Campos G, Pütter L, Friebel A, Holland CH, Holländer L, Ghallab A, Hobloss Z, Myllys M, Hoehme S, Meindl-Beinker NM, Dooley S, Marchan R, Weiss TS, Hengstler JG, Godoy P. *Cells*. 2024 Sep 29;13(19):1629. doi: 10.3390/cells13191629. PMID: 39404393
 11. [TGF \$\beta\$ 1 inhibition drives hepatocellular carcinoma proliferation through induction of toll-like-receptor signalling.](#) Mohamed FEZA, Dewidar B, Lin T, Ebert MP, Dooley S, Meindl-Beinker NM, Hammad S. *Int J Exp Pathol*. 2024 Apr;105(2):64-74. doi: 10.1111/iep.12501. PMID: 38328944
 12. [The Interplay of TGF- \$\beta\$ 1 and Cholesterol Orchestrating Hepatocyte Cell Fate, EMT, and Signals for HSC Activation.](#) Wang S, Link F, Han M, Chaudhary R, Asimakopoulos A, Liebe R, Yao Y, Hammad S, Dropmann A, Krizanac M, Rubie C, Feiner LK, Glanemann M, Ebert MPA, Weiskirchen R, Henis YI, Ehrlich M, Dooley S. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2024;17(4):567-587. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.12.012. PMID: 38154598
 13. [The TGF- \$\beta\$ 1 target WISP1 is highly expressed in liver cirrhosis and cirrhotic HCC microenvironment and involved in pro- and anti-tumorigenic effects.](#) Dropmann A, Alex S, Schorn K, Tong C, Caccamo T, Godoy P, Ilkavets I, Liebe R, Gonzalez D, Hengstler JG, Piiper A, Quagliata L, Matter MS, Waidmann O, Finkelmeier F, Feng T, Weiss TS, Rahbari N, Birgin E, Rasbach E, Roessler S, Breuhahn K, Tóth M, Ebert MP, Dooley S, Hammad S, Meindl-Beinker NM. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024 Nov 5;732:150409. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.150409. PMID: 39033550
 14. [Tolerance of repeated toxic injuries of murine livers is associated with steatosis and inflammation.](#) Hammad S, Ogris C, Othman A, Erdoesi P, Schmidt-Heck W, Biermayer I, Helm B, Gao Y, Piorońska W, Holland CH, D'Alessandro LA, de la Torre C, Sticht C, Al Aoua S, Theis FJ, Bantel H, Ebert MP, Klingmüller U, Hengstler JG, Dooley S, Mueller NS. *Cell Death Dis*. 2023 Jul 12;14(7):414. doi: 10.1038/s41419-023-05855-4. PMID: 37438332
 15. [Transforming growth factor \$\beta\$ latency: A mechanism of cytokine storage and signalling regulation in liver homeostasis and disease.](#) Li Y, Fan W, Link F, Wang S, Dooley S.

JHEP Rep. 2021 Nov 18;4(2):100397. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100397. PMID: 35059619

16. [Tumour-specific activation of a tumour-blood transport improves the diagnostic accuracy of blood tumour markers in mice.](#) Schmithals C, Kakoschky B, Denk D, von Harten M, Klug JH, Hintermann E, Dropmann A, Hamza E, Jacomin AC, Marquardt JU, Zeuzem S, Schirmacher P, Herrmann E, Christen U, Vogl TJ, Waidmann O, Dooley S, Finkelmeier F, Piiper A. EBioMedicine. 2024 Jul;105:105178. doi: 10.1016/j.ebiom.2024.105178. PMID: 38889481