



Zuwendungsempfänger

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Thema der Förderung

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

Verantwortliche

Prof. Dr. Frank Tacke
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin
+49 30 450 553 022
frank.tacke@charite.de

PD Dr. Nikolaus Berndt
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin
+49 30 450 528 466
nikolaus.berndt@dhzc-charite.de

Förderkennzeichen

031L0258H

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Kurzbericht

1. Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Aufgabe des Teilprojekt (TP) Tacke umfasste hauptsächlich die Immunzellphänotypisierung im Lebergewebe auf Einzelzellebene. Dafür wurden hochkomplexe Methoden wie die Multiplex-Immunhistochemie und RNA-Einzelzellsequenzierung erfolgreich eingesetzt. Außerdem unterstützte das TP Tacke die Sammlung von humanen Proben (Leber-/Tumorgewebe, Blut etc), die allen anderen Teilprojekten und Arbeitspaketen zur Verfügung gestellt wurden.

Die Aufgaben des TP Berndt umfassten die Integration von Omics-Daten in kinetische Stoffwechselmodelle und Bereitstellung von zellulären Stoffwechselmodellen. Nikolaus Berndt arbeitete an Modellen des zentralen Leberstoffwechsels. Er entwickelte großskalige, molekular aufgelöste kinetische Modelle des zentralen Leberstoffwechsels, Gewebemodelle, die die kinetischen Modelle mit Struktur- und Blutflussmodellen koppeln, strukturelle Modelle des hepatischen Lipidtröpfchenstoffwechsels sowie kinetische Modelle der kurzfristigen hormonellen Signalgebung. Ein besonderer Schwerpunkt war die Anwendung dieser Modelle auf das HCC und die Zonierung der Leber.

2. Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen von DEEP-HCC bearbeitete das TP Tacke

WP C1 “Immunphänotypisierung in Nash und Nash-HCC” in den Arbeitspaketen DEL1,2, DEL4:

DEL	Beschreibung
1	Sammlung von HCC Tumorgewebe mit zugehörigen klinischen Daten zur Isolation von primären Hepatozyten, Tumorzellen und nicht-parenchymatösen Zellen mit nachfolgender tiefgehender Analyse
2	Bereitstellung von zusammengehörigen (“matching”) Proben für die 3D Histologie, sowie Analyse per Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Lipidomik
4	Bereitstellung von biologischen Proben zur Bestimmung von blutbasierten Biomarkern

WP C2 “Nutzung von Langzeitproben zur Identifizierung von prädiktiven Biomarkern” in den Arbeitspaketen DEL 2-3:

DEL	Beschreibung
2	Bereitstellung von Langzeit-Kohorten mit prädiagnostischen Proben
3	Validierung von Biomarker-Kandidaten zur Vorhersage von krankheitsrelevanten Ereignissen in den Kohorten aus DEL2

Im Rahmen von DEEP-HCC bearbeitete das TP Berndt das WP M2 “Kinetische Modellierung des Metabolismus” in den Arbeitspaketen DEL1-DEL4 und den folgenden Meilensteine (MS):

MS	Beschreibung
MS1.1	Organisation, Verwaltung der Proteindaten einschließlich der Auswahl der metabolischen Enzyme und Transporter, die für die Modellierung benötigt werden, der Qualitätskontrolle, der Datenkurierung und der Datenimputation
MS1.2	Benutzen der kuriierten und vervollständigten Proteindatensets für die Parametrisierung des kinetischen Modells zur Erstellung von zonenabhängigen Modellvarianten
MS1.3	Simulation verschiedener metabolischer Herausforderungen des Glukose-, Fett- und Aminoäurestoffwechsels zur Abschätzung der metabolischen Kapazitäten in den unterschiedlichen Zonen des humanen HCCs
MS1.4	Abschätzung der Unsicherheiten in den Modellergebnissen aufgrund der imputierten Daten
MS1.5	Modellerweiterungen durch Modellierung der in M1 und E2 identifizierten dysregulierten Stoffwechselwegen
MS2.1	Organisation und Verwaltung der Genexpressions-Daten einschließlich Auswahl der metabolischen Enzyme und Transporter, die für die Modellierung benötigt werden; Qualitätskontrolle, Datenkurierung und Datenimputation
MS2.2	Benutzen der kuriierten und vervollständigten Genexpressions-Datensets für die Parametrisierung des kinetischen Modells zur Erstellung von zonenabhängigen Modellvarianten
MS2.3	Simulation verschiedener metabolischer Herausforderungen des Glukose-, Fett- und Aminoäurestoffwechsels zur Abschätzung der metabolischen Kapazitäten in den unterschiedlichen Zonen des humanen HCCs basierend auf den Genexpressions-Daten
MS2.4	Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentellen metabolischen Profilen aus E5
MS3.1	Identifikation der wichtigsten veränderten Stoffwechselwege aufgrund der Simulationsergebnisse
MS3.2	Erzeugen von vereinfachten Modellen
MS4.1	Identifikation der regulatorisch wichtigsten Enzyme für die Regulation signifikant veränderter Stoffwechselwege

3. Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

TP Tacke hat erfolgreich Multiplex-Immunhistochemie panel etabliert und validiert und diese zur Analyse der gesammelten Proben verwendet (WP C1). Die gleichen Proben wurden ebenfalls per Einzelzell-RNA-sequenzierung unterzogen. In WP C2 gelang es TP Tacke, einen neuen serologischen Score (APAC score) zu entwickeln und zu validieren, welcher besonders frühe Stadien des HCC zuverlässig anzeigen kann. Dieser Score ist zudem signifikant zuverlässiger als bisher verwendete Scorings.

TP Berndt hat personalisierte kinetische metabolische Modelle individueller HCCs bei Menschen und in Tiermodellen erstellt. Wir haben 124 gepaarte menschliche Proben von HCC und nicht-krebsartigem Lebergewebe aus veröffentlichten Daten analysiert. Die Heterogenität verhindert einheitliche Therapiestrategien, ermöglicht aber eine Differenzierung von Patient:innen in Responder und Nicht-Responder (DEL1). Wir haben die Infrastruktur für die Analyse von Transkriptomdaten für Tiermodelle und menschliche Patient:innen eingerichtet (DEL2). Effektive Transferfunktionen für individuelle HCCs, basierend auf Proteom- und Transkriptomdaten wurden etabliert (DEL3). Darüber hinaus identifizierten wir metabolische Marker für Kohlenhydrate, Fettsäuren und Aminosäuren, die in Tracer-Experimenten verwendet werden können. Weiterhin identifizierten wir Proteom-Marker mit hoher Abundanz in HCC, die möglicherweise die Identifizierung von HCC durch Antikörper-Markierung ermöglichen (DEL4). Es erfolgte eine Zusammenarbeit mit den Gruppen von Prof. Cramer (Uniklinik RWTH Aachen), Dr. Matz-Soja und Dr. Höhme (Universität Leipzig), Prof. Pietzsch (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf) und Dr. Brosch (Universitätsklinikum Dresden).



Zuwendungsempfänger

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Thema der Förderung

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

Verantwortliche

Prof. Dr. Frank Tacke
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin
+49 30 450 553 022
frank.tacke@charite.de

PD Dr. Nikolaus Berndt
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin
+49 30 450 528 466
nikolaus.berndt@dhzc-charite.de

Förderkennzeichen

031L0258H

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Sachbericht

Eingehende Darstellung

1. Ausführliche Darstellung der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten, insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung.

TEILPROJEKT (TP) TACKE

Arbeitspaket C1 DEL1: Sammlung von HCC Tumorgewebe mit zugehörigen klinischen Daten zur Isolation von primären Hepatozyten, Tumorzellen und nicht-parenchymatösen Zellen mit nachfolgender tiefgehender Analyse

Die Sammlung von HCC-Resektaten und Isolation der parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellen verlief äußerst erfolgreich. Es konnten insgesamt über 50 Proben von HCC mit verschiedenen Etiologien für die Analyse der Durchflusszytometrie und Multiplex-Immunhistochemie eingesetzt werden. Sowohl die Proben selbst als auch die gewonnenen Daten stehen dem gesamten Konsortium zur Verfügung.

Arbeitspaket C1 DEL2: Bereitstellung von zusammengehörigen ("matching") Proben für die 3D Histologie, sowie Analyse per Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Lipidomik

Auch die Asservierung weiterer Proben verlief erfolgreich. Von den Proben aus DEL1 wurde PFA-fixiertes sowie frisch eingefrorenes Material asserviert. Gleichzeitig wurden auch Blut-, Plasma- und Serumproben von den gleichen Patient:innen gesammelt und asserviert. Diese Proben standen und stehen noch allen experimentellen Arbeitspaketen zur Verfügung. Außerdem wurden Proben von 10 Patient:innen mit NAFLD-assoziiertem HCC (neue Bezeichnung: MASLD-assoziiertes HCC) erfolgreich für die Einzellzellsequenzierung eingesetzt.

Arbeitspaket C1 DEL4: Bereitstellung von biologischen Proben zur Bestimmung von blutbasierten Biomarkern

Eine bereits am Zentrum verfügbare retrospektive Serumkohorte wurde genutzt, um einen neuen Serumbasierten Score zur Diagnose eines HCC zu entwickeln (s. C2 DEL3).

Arbeitspaket C2 DEL2: Bereitstellung von Langzeit-Kohorten mit prädiagnostischen Proben

Eine bereits am Zentrum verfügbare retrospektive Serumkohorte wurde genutzt, um einen neuen Serumbasierten Score zur Diagnose eines HCC zu entwickeln (s. C2 DEL3).

Arbeitspaket C2 DEL3: Validierung von Biomarker-Kandidaten zur Vorhersage von krankheitsrelevanten Ereignissen in den Kohorten aus DEL2

Die Kohorte bestand aus 267 Patient:innen mit Leberzirrhose, davon 122 Patient:innen mit HCC und 145 ohne HCC. In den Proben wurde die Expression von soluble platelet-derived growth factor receptor beta (sPDGFR β) bestimmt und mit klinischen Routineparametern mit Hilfe von logistischer Regression korreliert. Daraus ergab sich ein neuer Score, der APAP score, welcher die Parameter Alter, sPDGFR β , AFP und Kreatinin beinhaltet und Patient:innen mit HCC innerhalb der zirrhotischen Population identifizieren kann (AUC 0.9503). Dabei war die diagnostische Genauigkeit dieses scores deutlich besser als die des bisher verwendeten scores (GALAD). Dies war unabhängig von der Etiologie des HCC und konnte auch sehr frühe Stadien des HCC vorhersagen. Damit handelt es sich beim APAC score um einen neuen und sehr zuverlässigen Serumscore, der besonders frühe Stadien des HCC gut anzeigen kann. Da der neue score zuverlässiger ist als der bisher verwendete GALAD score, könnte er dazu genutzt werden um Risikopopulationen besser betreuen und Tumorerkrankungen schneller erkennen und behandeln zu können.

TP BERNDT

Arbeitspaket DEL1: Generierung personalisierter metabolischer Modelle von individuellen HCCs, mit dem Ziel metabolische Veränderungen in verschiedenen Tumorzonen zu identifizieren

Für den Bericht relevante Meilensteine (MS):

MS	Beschreibung
MS1.1	Organisation, Verwaltung der Proteindaten einschließlich der Auswahl der metabolischen Enzyme und Transporter, die für die Modellierung benötigt werden, der Qualitätskontrolle, der Datenkurierung und der Datenimputation
MS1.2	Benutzen der kurierten und vervollständigten Proteindatensets für die Parametrisierung des kinetischen Modells zur Erstellung von zonenabhängigen Modellvarianten
MS1.3	Simulation verschiedener metabolischer Herausforderungen des Glukose-, Fett- und Aminoäurestoffwechsels zur Abschätzung der metabolischen Kapazitäten in den unterschiedlichen Zonen des humanen HCCs
MS1.4	Abschätzung der Unsicherheiten in den Modellergebnissen aufgrund der imputierten Daten
MS1.5	Modellerweiterungen durch Modellierung der in M1 und E2 identifizierten dysregulierten Stoffwechselwegen

Die Erstellung personalisierter Stoffwechselmodelle von individuellen HCCs in Menschen und Tiermodellen wurden abgeschlossen (MS1.1/1.2). Die murinen HCC-Modelle mit und ohne mTOR-Knockout, die in der Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Cramer (Uniklinik RWTH Aachen, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Molekulare Tumorbiologie) analysiert wurden, lieferten wichtige Erkenntnisse über die Rolle von mTOR im Verhältnis zu diätetischen Risikofaktoren (high fat diet) (Kroh *et al.*, Neoplasia 2023, Berndt *et al.*, in Vorbereitung). Wir konnten zeigen, dass die Entwicklung von der gesunden Leber über NASH zu HCC metabolisch gesehen einer kontinuierlichen Verschlechterung der metabolischen Kapazitäten entspricht und nicht einer sprunghaften Veränderung im Übergang von NASH zu HCC. In vielerlei Hinsicht stellt NASH eine metabolische Zwischenstufe dar, so dass es möglich sein könnte, aufgrund metabolischer Veränderungen die Progression hin zu HCC abzuschätzen und damit einen Risiko-Score zu etablieren (falls sich die Ergebnisse im Menschen bestätigen lassen).

Stoffwechselveränderungen bei früher NASH wurden auch in einer pädiatrischen Kohorte analysiert (Berndt *et al.*, Int J Mol Sci. 2022). Außerdem fanden wir auch interessante Korrelationen zwischen der nicht-invasiven Leberbildgebung und der Stoffwechselfunktion in Kaninchenlebern gefunden haben (Shahryari *et al.*, Front. Bioeng. Biotechnol. 2023). Die Erforschung dieser Zusammenhänge in menschlichen Lebern wird eine der Aufgaben in der zweiten Förderperiode sein, da sie eine nicht-invasive Bewertung des Fortschreitens der Lebererkrankung auf der Grundlage von Stoffwechselveränderungen in Richtung HCC-Entwicklung ermöglichen könnte.

Die zusätzliche Zusammenarbeit mit Dr. Matz-Soja (Universität Leipzig, Rudolf-Schönheimer-Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät) hinsichtlich der Analyse eines groß angelegten Tiermodells, das eine 32-wöchige westliche Diät umfasst und die gesamte Progression der NAFLD von der Steatose bis zum HCC abdeckt, wurde fortgesetzt und die ersten Proben analysiert. Die Analyse der vollständigen Proben und deren Auswertung wird Teil der 2. Förderperiode des Projektes sein. Des Weiteren wurde mit der AG Matz-Soja eine große Studie zu diurnalen Rhythmen im Metabolismus der Leber in Mäusen unternommen, um die Variabilität über den Tag von krankheitsbedingten Veränderungen abgrenzen zu können (Matz-Soja *et al.*, eingereicht bei Metabolism, 2024). Dabei haben wir gezeigt, dass funktionsabhängig bis zu 30% der Variabilität metabolischer Funktionen tageszeitabhängig sind und interessanterweise einem 12h- und nicht einem 24h-Rhythmus entsprechen.

MS1.3 wurde abgeschlossen. Wir analysierten mehr als 100 gepaarte menschliche Proben von HCC und nicht-kanzerösem Lebergewebe aus veröffentlichten Daten (Jiang *et al.*, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0987-8). Die wichtigsten Ergebnisse sind, dass, obwohl die Heterogenität bei menschlichen Patient:innen die Heterogenität in Tierstudien bei weitem übersteigt, es aber auch im Menschen signifikante Unterschiede zwischen den Kapazitäten im Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsel sowie der Entgiftung in HCC im Vergleich zu nicht krebsartigem Gewebe gibt. Es wurden zusätzlich noch weitere Datensätze aus der Literatur untersucht (GSE115139, GSE193080), um verschiedene Ätiologien von HCC (nutritional vs. Infektion), sowie verschiedene Stadien der Lebererkrankung miteinander zu vergleichen. Erste Ergebnisse zeigen eine hohe

intraindividuelle Varianz bei Menschen und einen eher schwachen Zusammenhang der metabolischen Kapazitäten mit der histologischen Klassifizierung.

Um den Einfluss der Unsicherheiten in den Daten aufgrund der notwendigen Imputation abzuschätzen, haben wir drei Imputationsmethoden verwendet und die Ergebnisse verglichen (MS1.4). Bei der ersten werden fehlende Werte durch Mittelwerte der Kontrollgruppe abgeschätzt (konservative Methode, die wahrscheinlich metabolische Veränderungen im HCC konsequent unterschätzt). Alternativ ersetzen wir fehlende Werte durch Mittelwerte der HCC Gruppe. Zusätzlich wurde die Methode erweitert, um die Normierung der Proteinverteilung innerhalb einer Probe zu berücksichtigen. Dabei wurden Abschätzungen aufgrund der Normierung von Mittelwerten der Proteinabundanzen als auch von Gesamtproteinmengen (Counts) durchgeführt. Ein wesentlicher Unterschied in den Ergebnissen konnte nicht festgestellt werden (außer bei sehr wenigen Messwerten, was die betroffenen Proben unbrauchbar macht), so dass weiterhin die numerisch stabilste Methode genommen wird.

Aufgrund der Fülle von Veränderungen im Zentralstoffwechsel wurde von einer Modellerweiterung auf weniger relevante Stoffwechselwege verzichtet (MS1.5).

Arbeitspaket DEL2: Generierung zellulärer metabolischer Modelle des frühen HCCs basierend auf Transkriptomik

Für den Bericht relevante MS:

MS	Beschreibung
MS2.1	Organisation und Verwaltung der Genexpressions-Daten einschließlich Auswahl der metabolischen Enzyme und Transporter, die für die Modellierung benötigt werden; Qualitätskontrolle, Datenkurierung und Datenimputation
MS2.2	Benutzen der kurierten und vervollständigten Genexpressions-Datensets für die Parametrisierung des kinetischen Modells zur Erstellung von zonenabhängigen Modellvarianten
MS2.3	Simulation verschiedener metabolischer Herausforderungen des Glukose-, Fett- und Aminoäurestoffwechsels zur Abschätzung der metabolischen Kapazitäten in den unterschiedlichen Zonen des humanen HCCs basierend auf den Genexpressions-Daten
MS2.4	Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentellen metabolischen Profilen aus E5

Wir haben die notwendige Infrastruktur für die Analyse von Transkriptomdaten für Tiermodelle (Maus, Ratte) und menschliche Patient:innen eingerichtet (MS2.1/2.2/2.3) und haben angefangen, Genexpressionsdaten in Zusammenarbeit mit Dr. Mario Brosch (Universitätsklinikum Dresden, Medizinischen Klinik I, Fachbereich Gastroenterologie und Hepatologie) und AG Matz-Soja auszuwerten.

Der Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentellen metabolischen Profilen aus E5 (MS2.4) konnte nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Arbeiten in der Gruppe von Dr. Meritxell Huch (Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG), Dresden) in die zweite Förderperiode verschoben wurden und die metabolischen Profile für unseren Meilenstein daher nicht verfügbar waren.

Arbeitspaket DEL3: Bereitstellung metabolischer Submodule, die in den räumlichen Modellen von frühen HCCs verwendet werden können

Für den Bericht relevante MS:

MS	Beschreibung
MS3.1	Identifikation der wichtigsten veränderten Stoffwechselwege aufgrund der Simulationsergebnisse
MS3.2	Erzeugen von vereinfachten Modellen

Die Identifikation der wichtigsten veränderten Stoffwechselwege wurde abgeschlossen (MS3.1). Obwohl Ethanoldetoxifizierung und der Fruktosemetabolismus die stärkste Regulation aufweisen, ist die Effektstärke des Lipidmetabolismus auf den Gesamtleberstoffwechsel (glucose-handling, Verfettung, Energiestoffwechsel) am größten. Zur weiteren Analyse und Evaluierung des Potenzials von Radiotracern wurden Proteom-Daten aus Zellproben der Gruppe von Prof. Pietzsch (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Radiopharmazeutische und Chemische Biologie) untersucht. In zwei

Tumorzelllinien (HepG2, Hep3B) wurden durch Adipozyten-konditioniertes Medium signifikant regulierte Proteine identifiziert, wobei der Fokus auf positiv regulierte Proteine gelegt wurde, da negativ regulierte Proteine für Radiotracer ungeeignet sind. Besonders hervorzuheben sind AKAP12 und CA9, die in HepG2-Zellen am stärksten reguliert wurden. Weitere Analysen sollen ein klinisch relevantes Target bestätigen und die Rolle von adipozytär sezernierten Proteinen bei der Regulation dieser Targets klären. Auf funktionaler Ebene wurden signifikante Unterschiede im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel zwischen den Zelllinien sowie in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung festgestellt, die potenziell zur bildgebenden Charakterisierung der Zellen mittels Tracer-Technologie beitragen können.

Effektive Transferfunktionen für die verschiedenen metabolischen Leberfunktionen werden bei Bedarf zur Verfügung gestellt (MS3.2). Zusätzlich befinden wir uns mit Dr. Stefan Höhme (Universität Leipzig, Interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik) im Austausch über die Anforderungen zur Kombination von unseren metabolischen Modellen und den Gewebemodellen der AG Höhme.

Arbeitspaket DEL4: Identifikation potentieller Targets, die als Biomarker geeignet sind

Für den Bericht relevante MS:

MS	Beschreibung
MS4.1	Identifikation der regulatorisch wichtigsten Enzyme für die Regulation signifikant veränderter Stoffwechselwege

MS4.1 wurde abgeschlossen. Wir haben für alle Stoffwechselwege (Kohlehydrate, Fettstoffwechsel, Energiestoffwechsel, Aminosäurestoffwechsel, Entgiftung) Kandidatenlisten mit der metabolischen Funktion jeweils signifikant assoziierten Proteinen erstellt. Die Kontrollanalyse hat gezeigt, dass die tatsächliche Relevanz der verschiedenen Proteine stark von der metabolischen Umgebung abhängt, so dass eine allgemeingültige Antwort nicht gegeben werden kann. Wir haben allerdings die Strukturen entwickelt, um bei gegebenen Metabolitkonzentrationen eine komplette individuelle Liste von regulatorischen Proteinen zu den verschiedenen Funktionen zu erstellen.

2. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Teilprojekt H (AG Tacke & AG Berndt) gehörte zum LiSyM-Krebs - Phase 1 - Verbundprojekt: "DEEP-HCC - Detaillierte Analyse der räumlichen Organisation der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms". LiSyM-Krebs, ein multidisziplinäres Forschungsnetzwerk aus Molekular- und Zellbiolog:innen, klinischen Forscher:innen sowie Expert:innen für mathematische Modellierung, hatte zum Ziel, die Entstehung von Leberkrebs aus Vorerkrankungen wie der nichtalkoholischen Fettleber oder Leberzirrhose zu untersuchen, um relevante Biomarker für die frühzeitige Diagnose und Prävention des HCC zu identifizieren.

Während die anderen zwei Verbundprojekte von LiSyM-Krebs den Übergang von NAFLD zum HCC (SMART-NAFLD) und den Übergang von Leberzirrhose zu HCC (C-TIP-HCC) untersuchten, ging es bei DEEP-HCC um die multidimensionale Charakterisierung des frühen HCC. Das Teilprojekt H bestand aus einem klinischen Partner (AG Tacke) und einem Modellierungspartner (AG Berndt). Im Mittelpunkt der Arbeiten des TP Tacke standen die Probensammlung von HCC Patient:innen und die Immunphänotypisierung der Proben. Im Mittelpunkt der Arbeiten des TPs Berndt standen die Integration von Omics-Daten in kinetische Stoffwechselmodelle und Bereitstellung von zellulären Stoffwechselmodellen.

Das Teilprojekt H war damit in das Gesamtprogramm von LiSyM-Krebs gut eingepasst und stellte sowohl wertvolle humane Proben als auch Stoffwechselmodelle für das Konsortium zur Verfügung.

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

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

TP Tacke: Eine direkte kommerzielle Verwertung der verwendeten Methoden (Multiplex-Immunhistochemie, scRNA-Sequencing) ist zunächst nicht geplant. Insgesamt sehen die DEEP-HCC-Partner:innen dieses Projekt als eine Schlüsselinvestition in die langfristige Entwicklung einer klinisch

orientierten Präventionsstrategie. Die Identifikation leicht zugänglicher Biomarker sowie neuer Kontrastmittel sind besonders für Pharmapartner:innen interessant. Der Pharmamarkt ist aufgrund seiner Größe, Wachstumsgeschwindigkeit und relativen Unabhängigkeit besonders attraktiv. NASH (oder heutzutage MASH) verfügt über keine von der EMA zugelassene Therapie; derzeit befinden sich aber über 100 Präparate in verschiedenen Stadien der präklinischen und klinischen Entwicklung für die Indikation „Fettleber“, „NASH“ und/oder „Leberfibrose“. Daraus lässt sich abschätzen, wie viele Wirkstoffe initial untersucht werden. Durch die sich daraus ergebende und immer größer werdende Belastung von Gesundheitssystemen weltweit stellt auch die Entwicklung von Präventionsstrategien (z. Bsp. Präparate, die eine Progression der NASH zum NASH-HCC verhindern oder neuartige Kontrastmittel, die die Früherkennung erleichtern) eine hochinteressante Strategie für Pharmafirmen dar.

TP Berndt: Die charakteristischen Stoffwechseleränderungen der Leber bieten potenzielle kommerzielle Anwendungen, insbesondere als Biomarker für die Diagnose, Klassifikation und Überwachung des Fortschreitens von MASH (*metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*) und HCC. Die Bewertung dieser metabolischen Veränderungen ermöglicht eine patientenspezifische pharmakologische Intervention, die in algorithmusbasierten Systemen zur automatisierten Medikamentenverabreichung oder bei der Entwicklung neuer Therapeutika eingesetzt werden kann.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

TP Tacke: Die Sammlung von HCC-Resektaten und die dazugehörige Datenerhebung verliefen äußerst erfolgreich, insgesamt konnten über 50 Proben gesammelt und analysiert werden. Außerdem konnte mithilfe einer retrospektiven Kohorte ein neuer serumbasierter Score für die Diagnose eines HCC, besonders in frühen Stadien, entwickelt und validiert werden. Die wissenschaftlichen Ergebnisse wurden bereits in Teil II beschrieben. Derzeit wird die Vermarktung durch Veröffentlichung der Ergebnisse vorangetrieben. Das erfolgt über geplante Publikationen in biotechnologischen, immunologischen und medizinischen Zeitschriften. Darüber hinaus ist geplant, die Ergebnisse in Form von Postern und Vorträgen einem breiten wissenschaftlichen Publikum zugänglich zu machen. Dafür bieten sich Kongresse wie das Jahrestreffen der EASL (European Association for the study of the liver) oder der AASLD (American Association for the study of liver diseases) an.

TP Berndt: Die entwickelten Computermodelle erweitern nicht nur unser Verständnis der molekularen und mechanistischen Prozesse, die Lebererkrankungen zugrunde liegen, sondern können potentiell auch die Diagnose und Therapieplanung in der klinischen Praxis verbessern. Daher haben wir die Modelle mit realen Patientendaten aus dem Klinikalltag parametrisiert und validiert.

Die hier verwendeten Modelle des hepatischen Stoffwechsels sind universell einsetzbar. Im Verlauf des Projekts entstanden zahlreiche weitere Kooperationen in verschiedenen Anwendungsbereichen. So wurden die Modelle beispielsweise eingesetzt, um die Rolle von Diäten bei der Progression von MASH zu untersuchen, potenzielle Effekte von Pharmaka zu evaluieren, HCC zu charakterisieren und circadiane Rhythmen in der Leber zu analysieren.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

TP Tacke: Wir beabsichtigen, die Ergebnisse über verschiedenen Wegen zu verbreiten und hinsichtlich ihrer Verwertbarkeit mit verschiedenen Stakeholdern zu prüfen:

- Regelmäßige Information und Austausch mit Projektbegleiter:innen.
- Präsentation in Workshops
- Frühe Erprobung von Ansätzen mit Kunden wie Boehringer Ingelheim, Merck, Roche, Idorsia, Dynamic 42 GmbH.
- Veröffentlichung der Projektergebnisse.

TP Berndt: Das entwickelte Modell zur personalisierten Modellierung sowie zahlreiche potenzielle Anwendungen wurden veröffentlicht, beispielsweise in Berndt *et al.*, Nat Commun. 2018. In

Zusammenarbeit mit Novartis wurde das Modell für die pharmazeutische Forschung im Rahmen eines Forschungsauftrags genutzt. Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, können die entwickelten Methoden auch auf andere Krankheitsbilder fächerübergreifend angewandt werden, so dass sie eine vielversprechende Basis für weitere Drittmittelanträge und künftige Industrieaufträge darstellen.

4. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

TP Tacke: Es sind keine Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind.

TP Berndt: Es sind keine Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind.

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

TP Tacke:

Subramanian P, Hampe J, Tacke F, Chavakis T. Fibrogenic Pathways in Metabolic Dysfunction Associated Fatty Liver Disease (MAFLD). *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 23;23(13):6996. doi: 10.3390/ijms23136996. PMID: 35805998; PMCID: PMC9266719.

Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol.* 2022 Oct;77(4):1136-1160. doi: 10.1016/j.jhep.2022.06.012. Epub 2022 Jun 22. PMID: 35750137.

Vonderlin J, Tacke F. A complex triad determining metabolic health: diet, host, and microbiome interaction. *Am J Clin Nutr.* 2022 Oct 6;116(4):848-850. doi: 10.1093/ajcn/nqac180. PMID: 36055963; PMCID: PMC9535543.

Cai X, Tacke F, Guillot A, Liu H. Cholangiokines: undervalued modulators in the hepatic microenvironment. *Front Immunol.* 2023 May 16;14:1192840. doi: 10.3389/fimmu.2023.1192840. PMID: 37261338; PMCID: PMC10229055.

Eschrich J, Kobus Z, Geisel D, Halskov S, Roßner F, Roderburg C, Mohr R, Tacke F. The Diagnostic Approach towards Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma-State of the Art and Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 1;15(1):301. doi: 10.3390/cancers15010301. PMID: 36612297; PMCID: PMC9818385.

Guillot A, Winkler M, Silva Afonso M, Aggarwal A, Lopez D, Berger H, Kohlhepp MS, Liu H, Özdirik B, Eschrich J, Ma J, Peiseler M, Heymann F, Pendem S, Mahadevan S, Gao B, Diehl L, Gupta R, Tacke F. Mapping the hepatic immune landscape identifies monocytic macrophages as key drivers of steatohepatitis and cholangiopathy progression. *Hepatology.* 2023 Jul 1;78(1):150-166. doi: 10.1097/HEP.000000000000270. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36630995.

Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023 Jul 3. doi: 10.1038/s41575-023-00807-x. Epub ahead of print. PMID: 37400694.

Kaur S, Kidambi S, Ortega-Ribera M, Thuy LTT, Nieto N, Cogger VC, Xie WF, Tacke F, Gracia-Sancho J. In Vitro Models for the Study of Liver Biology and Diseases: Advances and Limitations. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023;15(3):559-571. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.11.008. Epub 2022 Nov 26. PMID: 36442812; PMCID: PMC9868680.

Kohlhepp MS, Liu H, Tacke F, Guillot A. The contradictory roles of macrophages in non-alcoholic fatty liver disease and primary liver cancer-Challenges and opportunities. *Front Mol Biosci.* 2023 Feb 10;10:1129831. doi: 10.3389/fmolb.2023.1129831. PMID: 36845555; PMCID: PMC9950415.

Lan T, Guillot A, Tacke F. Somatic mutant clone screening: scan for novel NASH target genes in mouse liver. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Aug 25;8(1):319. doi: 10.1038/s41392-023-01572-8. PMID: 37620333; PMCID: PMC10449783.

- Laschtowitz A, Lambrecht J, Puengel T, Tacke F, Mohr R. Serum CXCL5 Detects Early Hepatocellular Carcinoma and Indicates Tumor Progression. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 10;24(6):5295. doi: 10.3390/ijms24065295. PMID: 36982370; PMCID: PMC10049661.
- Puengel T, Tacke F. Efruxifermin, an investigational treatment for fibrotic or cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Expert Opin Investig Drugs.* 2023 Jul 4:1-11. doi: 10.1080/13543784.2023.2230115. Epub ahead of print. PMID: 37376813.
- Tacke F, Puengel T, Loomba R, Friedman SL. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatol.* 2023 Apr 14:S0168-8278(23)00218-0. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.038. Epub ahead of print. PMID:
- Vonderlin J, Chavakis T, Sieweke M, Tacke F. The Multifaceted Roles of Macrophages in NAFLD Pathogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023;15(6):1311-1324. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.03.002. Epub 2023 Mar 11. PMID: 36907380; PMCID: PMC10148157.
- Wiering L, Tacke F. Treating inflammation to combat non-alcoholic fatty liver disease. *J Endocrinol.* 2022 Dec 12;256(1):e220194. doi: 10.1530/JOE-22-0194. PMID: 36259984.
- Heymann F, Mossanen JC, Peiseler M, Niemietz PM, Araujo David B, Krenkel O, Liepelt A, Batista Carneiro M, Kohlhepp MS, Kubes P, Tacke F. Hepatic C-X-C chemokine receptor type 6-expressing innate lymphocytes limit detrimental myeloid hyperactivation in acute liver injury. *Hepatol Commun.* 2023 Mar 24;7(4):e0102. doi: 10.1097/HC9.000000000000102. PMID: 36972392; PMCID: PMC10503691.
- Ait Ahmed Y, Lafdil F, Tacke F. Ambiguous Pathogenic Roles of Macrophages in Alcohol-Associated Liver Diseases. *Hepat Med.* 2023 Sep 21;15:113-127. doi: 10.2147/HMER.S326468. PMID: 37753346; PMCID: PMC10519224.
- Peiseler M, Tacke F. Bile duct-associated macrophages enter the spotlight in inflammatory cholestatic liver disease. *Hepatology.* 2023 Aug 22. doi: 10.1097/HEP.0000000000000576. Epub ahead of print. PMID: 37607726.
- Tilg H, Adolph TE, Tacke F. Therapeutic modulation of the liver immune microenvironment. *Hepatology.* 2023 Nov 1;78(5):1581-1601. doi: 10.1097/HEP.0000000000000386. Epub 2023 Apr 17. PMID: 37057876.
- Niemietz P, Peiseler M, Kohlhepp M, Horn P, Matchett K, Wang Y, Haas L, Zhang T, Bruneau A, Guillot A, Berger H, Liepelt A, Warzecha K, Demske C, Möckel D, Lammers T, Henderson N, Heymann F, Tacke F. C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) regulates hepatic CD8 + T cell homeostasis and response to acute liver injury. *Hepatology.* 2024 Jan 17. doi: 10.1097/HEP.0000000000000757. Epub ahead of print. PMID: 38231043.
- Puengel T, Tacke F. Cell type-specific actions of thyroid hormones in nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Liver Int.* 2024 Feb;44(2):275-278. doi: 10.1111/liv.15783. PMID: 38289588.
- Loosen SH, Benz F, Mohr R, Reuken PA, Wirtz TH, Junker L, Jansen C, Meyer C, Praktiknjo M, Wree A, Reißing J, Demir M, Gu W, Vucur M, Schierwagen R, Stallmach A, Kunstein A, Bode J, Trautwein C, Tacke F, Luedde T, Bruns T, Trebicka J, Roderburg C. Soluble urokinase plasminogen activator receptor levels predict survival in patients with portal hypertension undergoing TIPS. *JHEP Rep.* 2024 Mar 4;6(5):101054. doi: 10.1016/j.jhepr.2024.101054. PMID: 38681861; PMCID: PMC11053213.

TP Berndt:

- Berndt et al., Effect of mTOR knockout on hepatic metabolic functions in MASH-HCC, in Vorbereitung
- Kulow VA, Roegner K, Labes R, Kasim M, Mathia S, Czopek CS, Berndt N, Becker PN, Ter-Avetisyan G, Luft FC, Enghard P, Hinze C, Klocke J, Eckardt KU, Schmidt-Ott KM, Persson PB, Rosenberger C, Fähling M. Beyond hemoglobin: Critical role of 2,3-bisphosphoglycerate mutase in kidney function and injury. *Acta Physiol (Oxf).* 2024 Oct 18:e14242.
- Matz-Soja M*, Körner C*, Ott F, Fischer J, Marbach-Breitrück E, Hofmann U, Sales S, Shevchenko A, Wallach I, Gebhardt R, Berg T, Berndt. Modeling the Dynamics of Hepatic Metabolism: The

Predominance of 12-Hour Rhythmicity in Metabolic Adaptation. Eingereicht bei Metabolism, 2024

Wegner LH, Berndt N, Holzhütter HG. Metabolism in hepatocellular carcinoma: reduced collective control compared to healthy liver cells A quantitative analysis of weak emergence in liver metabolism. Eingereicht bei Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2024

Guo J, Krehl K, Safraou Y, Wallach I, Braun J, Meierhofer D, Sack I, Berndt N. Pregnancy alters fatty acid metabolism, glucose regulation, and detoxification of the liver in synchrony with biomechanical property changes. *Heliyon*. 2024;10:e39674. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e39674.

Kroh A, Walter J, Fragoulis A, Möckel D, Lammers T, Kiessling F, Andruszkow J, Preisinger C, Egbert M, Jiao L, Eickhoff RM, Heise D, Berndt N, Cramer T, Neumann UP, Egners A, Ulmer TF. Hepatocellular loss of mTOR aggravates tumor burden in nonalcoholic steatohepatitis-related HCC. *Neoplasia*. 2023 Dec;46:100945. doi: 10.1016/j.neo.2023.100945.

Shahryari M, Keller S, Meierhofer D, Wallach I, Safraou Y, Guo J, Marticorena Garcia SR, Braun J, Makowski MR, Sack I and Berndt N. On the relationship between metabolic capacities and in vivo viscoelastic properties of the liver. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Jan 9;10:1042711.

Berndt N*, Hudert CA*, Eckstein J, Loddenkemper C, Henning S, Bufler P, Meierhofer D, Sack I, Wiegand S, Wallach I, Holzhütter HG. Alterations of Central Liver Metabolism of Pediatric Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 21;23(19):11072. doi: 10.3390/ijms231911072