

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Zuwendungsempfänger:

Technische Universität Dresden

Thema der Förderung:

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

Konsortialprojekt:

Detaillierte Analyse der räumlichen Organisation der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (**DEEP-HCC**)

Verantwortliche:

Prof. Dr. Jochen Hampe

Medizinische Klinik 1
Universitätsklinikum Dresden
Fetscherstraße 74
01307 Dresden

+49 351-458-5643

Jochen.Hampe@uniklinikum-dresden.de

Dr. Lutz Bruschi

Zentrum für Informationsdienste
und Hochleistungsrechnen der TU
Dresden
Nöthnitzer Str. 46
01187 Dresden

+49 351-463-38553

lutz.bruschi@tu-dresden.de

Prof. Dr. med. Chavakis / Prof. Dr.
Coskun

Medizinische Fakultät Carl Gustav
Carus, Zentrum für
Membranbiochemie und
Lipidforschung
Fetscherstraße 74
01307 Dresden

+49 351 796-5340

uenal.coskun@tu-dresden.de

Förderkennzeichen: 031L0258A

Förderzeitraum: 01. 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, an den angeknüpft wurde

Ziel des Gesamtverbundes LiSyM-Cancer ist die Anwendung systembiologischer Verfahren auf klinische Fragestellungen des Hepatozellulären Karzinoms. Dabei baut das Netzwerk auf Erkenntnissen auf, die während des Vorgängerprojekts LiSyM gewonnen wurden. Der Verbund DEEP-HCC konzentriert sich auf Prozesse, die in der Frühphase der Karzinogenese stattfinden, wobei das Ziel Biomarker und andere Diagnosemethoden sind, die zu einer früheren Diagnose führen. Diese Krankheitsprozesse wurden multimodal erforscht und der Forschungsprozess innerhalb DEEP-HCC ist gekennzeichnet durch eine intensive Kooperation von Klinikern, Biologen und Modellierern.

Die an DEEP-HCC beteiligten Arbeitsgruppen an der TU Dresden verfügen über langjährige Expertise auf den Gebieten molekularer Charakterisierung von Geweben und Zellen, insbesondere durch den Einsatz moderner Hochdurchsatztechnologien wie Einzelzell-RNA-Sequenzierung und räumlicher Transkriptomanalyse (AG Hampe), mathematischer Modellierung biologischer Systeme insbesondere SBML-basierte Modellierungsworkflows und räumlich-zeitliche Strukturbildung (AG Bruschi) und der Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern, insbesondere im Bereich der Lipidomik (AG Chavakis/Coskun)

2. Ablauf des Vorhabens

Die AG Hampe bearbeitete vier Arbeitspakete. Die Arbeiten erfolgten planmäßig, wurden erfolgreich abgeschlossen. Die Ergebnisse werden zurzeit in einer Veröffentlichung zusammengefasst. Wir erwarten die Publikation in einem hochrangigen Journal.

Die AG Bruschi bearbeitete vier Arbeitspakete. Die Arbeiten erfolgten planmäßig, wurden erfolgreich abgeschlossen und die Ergebnisse publiziert.

Die AG Chavakis/Coskun bearbeitete drei Arbeitspakete. Die Arbeiten erfolgten planmäßig und wurden erfolgreich abgeschlossen. Die Ergebnisse führten zur Entwicklung standardisierter Methoden und Pipelines mit translationalem Potenzial. Die Ergebnisse werden derzeit in mehreren Publikationen zusammengefasst, von denen wir erwarten, dass sie in anerkannten Fachzeitschriften erscheinen.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

AG Hampe

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst mit den klinischen Partnern (Seehofer, Hinz/Schafmayer) eine Probensammelstrategie erarbeitet, die qualitativ hochwertige Proben ermöglicht. Von den zustimmenden Patienten wurden hierbei Proben vom Tumor, vom Grenzbereich zwischen Tumor und Normalgewebe, als auch von Normalgewebe entnommen und schnellstmöglich schockgefroren. Die Proben aus der Tumor- und Normalgeweberegion wurden einer Einzelkern-RNA-Sequenzierung unterzogen. Die Expression von zelltyp-spezifischen Markergenen wurde verwendet, um die Zelltypen zu annotieren. Nach Annotation der Hauptzelltypen wurden, die Zelltypen in Subcluster unterteilt, der Differenzierungsstatus der einzelnen Zellen bestimmt, relativ quantifiziert und somit die Zellkomposition des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe erstellt. Neben der Einzelsequenzierung wurde eine räumlich aufgelöste Transkriptomanalyse durchgeführt, wobei zwei unterschiedliche Strategien verfolgt wurden. Zum einen wurde Übergangsbereich zwischen Normalgewebe und Tumor mit Hilfe des 10x Visium Chips der Firma 10x Genomics analysiert und zum anderen mit Hilfe eines Laser Capture Mikrodisektions-Ansatz, bei dem die Grenzbereiche von Tumor- und Normalgewebe, sowie Bereiche aus dem Tumor und dem Normalgewebe ausgeschnitten wurden. Um den Crosstalk zwischen Tumor und Normalgewebe besser zu verstehen wurde zunächst eine Rezeptor-Liganden Analyse mit Hilfe der LCM-RNA-Seq Daten durchgeführt und die vielversprechendsten Signalwege anhand der 10x Visium Daten mit der höheren räumlichen Auflösung nachverfolgt. Bei der Analyse der Rezeptor-Liganden Validierung anhand des Visium ST Chips zeigte sich, dass sich die Hauptrezeptoren der Signalkaskaden in der Tumorkapsel befinden. Die Daten wurden Arbeitsgruppen Bruschi und Berndt zur räumlichen Modellierung zur Verfügung gestellt. Wir erwarten eine hochrangige Publikation zu Beginn 2025. Von den gleichen Proben, wurden Mikrodisektionen des Tumors, des Tumorgewebes an der Tumorkapsel, des Normalgewebes und des Normalgewebes an der Tumorkapsel angefertigt, die DNA isoliert und RRBS-Bibliotheken erstellt.

AG Bruschi

In verbundübergreifender Kooperation haben wir ein mathematisches Modell für den Gallenfluss im Leberläppchen weiterentwickelt, angewendet, analysiert und publiziert. Dieses Modell wurde zunächst an Patienten mit einer definierten Störung des Gallenflusses, Primäre Sklerosierende Cholangitis, kalibriert und daraufhin auf Daten angewendet, die aus Geweben von Leberkrebspatienten gewonnen wurde. Es stellte sich

heraus, dass selbst Lebergewebe fernab des Tumors schwerwiegende Veränderungen in der Struktur der Gallenkanalikuli aufweist. Das mathematische Modell belegte eine schwere Beeinträchtigung des Gallenflusses, verbunden mit einer erheblichen Erhöhung des Druckes im perizentralen Bereich des Leberläppchens.

Es wurde ein Referenzparametersatz in vivo für zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Apoptose, Ploidy in Zusammenarbeit mit den klinischen und experimentellen Partnern durch retrospektive Radiokohlenstoff (^{14}C)-Datierung von gesunden menschlichen Lebern erstellt. Wir haben diese Daten in die Mikroskopie-basierten Modelle integriert, ein Modell für das Hepatozelluläre Karzinom erstellt und die Ergebnisse in standardisierter und computerlesbarer MorpheusML Beschreibungssprache veröffentlicht.

In Kooperation mit den AGs Drasko und Höhme arbeiteten wir daran, Standards für zellbasierte Computermodelle über das gesamte Netzwerk hinweg zu vereinheitlichen. Damit gelang es, auch das Modell des Hepatozellulären Karzinoms der AGs Drasko und Höhme in derselben standardisierten Beschreibungssprache MorpheusML zu codieren und die Ergebnisse über das Netzwerk hinweg zu reproduzieren und zu integrieren.

Wir haben das open-source Modellierungs-Framework Morpheus so erweitert, dass nun nahtlos auch die effiziente Parameterschätzung mittels der open-source Software FitMultiCell möglich ist. Diese validierte Strategie wurde in Kooperation mit der AG Huch und weiterer Partner in DEEP-HCC auf Daten von patienten-spezifischen Organoiden angewendet.

AG Chavakis/Coskun

Das Teilprojekt B2 konzentrierte sich auf die Identifizierung leberspezifischer Biomarker für die zukünftige Integration in die klinische Routine. Die klinische Umsetzung von Lipidomik-Biomarkern erfordert die Standardisierung und Harmonisierung analytischer Protokolle und Tests. Jüngste Fortschritte in der Lipidomik haben eine Reihe standardisierter und validierter Methoden hervorgebracht, die auf einer breiten Palette biologischer Matrices angewendet werden. Zu diesem Zweck richtete das Projekt B2 darauf ab, verfeinerte Standardbetriebsprotokolle für die klinische Routine-MS-basierte Lipiddiagnostik hinsichtlich sowohl der präanalytischen als auch der analytischen Schritte zu entwickeln, die für die großen Kohortenstudien zur Identifizierung der Lipidomik-Signatur von HCC-Patienten unter Verwendung von Blutplasma als biologischer Matrix kann angewendet werden. Darüber hinaus sollte die Erkennung bioaktiver Lipidmediatoren, die von den verschiedenen Populationen von Leberzellen abgesondert werden, es ermöglichen, spezifische Signalwege der HCC-Pathologie zu identifizieren.

Zu diesem Zweck müssen neue Methoden entwickelt werden, die eine hohe Sensitivität und Spezifität der Erkennung ermöglichen, um diese selten vorkommenden Analyten zu erfassen. Schließlich müssen Standards für Datenverarbeitung, Qualitätskontrolle und Berichterstattung entwickelt und implementiert werden. Im Laufe des Projekts haben wir erfolgreich eine Reihe von Standardbetriebsprotokollen sowie Analyse- und Datenverarbeitungspipelines entwickelt, die bei der Identifizierung von Leber-HCC-Biomarkern implementiert wurden (Liefergegenstände 1 und 2). Die erzielten Ergebnisse ebneten den Weg zur Entwicklung eines robusten Tests mit hohem translationalem Potenzial. Neben der Anwendung von MS-basierten Methoden zur Erkennung von HCC-spezifischen Lipidomiksignaturen in zirkulierenden Bioflüssigkeiten (Blutplasma) wurde eine Reihe neuartiger Methoden zur Behandlung von sezernierten, in geringen Mengen vorhandenen Lipidmediatoren entwickelt und in Zellkulturexperimenten unter Verwendung verschiedener Modellsysteme leberspezifischer Zellpopulationen validiert (Liefergegenstand 3).

Insgesamt werden die erzielten Ergebnisse die Bewertung und Harmonisierung von Tests, die routinemäßig im biomedizinischen Bereich verwendet werden, zur Validierung und Qualifizierung von Biomarkern und zum Zugang zum klinischen Nutzen der identifizierten Biomarker erheblich verbessern. Die Arbeit wird in enger Zusammenarbeit mit Partner Nr. 13 (Lipotype) durchgeführt.

Sachbericht

Teil II Eingehende Darstellung

Arbeitspaket E2 Hampe

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. (maximal 20 Seiten)

Von der AG Hampe wurden vier Arbeitspakete (AP) bearbeitet, die hier im Einzelnen dargestellt werden.

AP 1: Definition der zellulären Landschaft und des genomischen Programms von Tumor- und normalem Lebergewebe mittels Einzelzell- und Einzelkern-RNA-Seq

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst mit den klinischen Partnern (Seehofer, Hinz/Schafmayer) eine Probensammelstrategie erarbeitet, die qualitativ hochwertige Proben ermöglicht (**Abb. 1**). Von den zustimmenden Patienten wurden hierbei Proben vom Tumor, vom Grenzbereich zwischen Tumor und Normalgewebe, als auch von Normalgewebe entnommen und schnellstmöglich (<60 sec) schockgefroren.

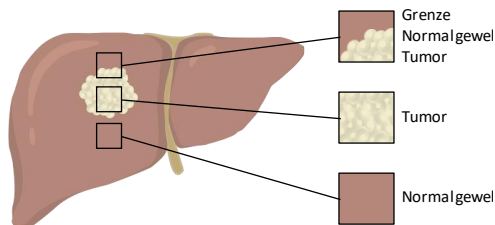


Abb. 1: Schematische Darstellung der Probensammelstrategie

Die Proben aus der Tumor- und Normalgeweberegion wurden einer Einzelkern-RNA-Sequenzierung unterzogen, wobei auf den ursprünglich geplanten Vergleich zwischen

Einzelzellsequenzierung und Einzelkernsequenzierung verzichtet wurde, da entsprechende Vergleiche bereits publiziert wurden und die Daten aus eigenen Sequenzierungen zeigten, dass eine sehr gute Annotation der Zellen und die weiterführende Analyse von Zellkernen sehr gut möglich ist. Die erhaltenen Daten wurden zunächst auf das Genom aligned, anschließend wurden Kerne mit wenigen detektierbaren Transkripten, Kerne mit einem hohen Gehalt an mitochondrialen Transkripten sowie Dubletten (zwei Kerne in einem Reaktionsvolumen) aus der Analyse ausgeschlossen. Nach dem Filtern der Daten erhielten wir N= 334.463 Kerne für das Tumorgewebe und N=277.580 Kerne für das Normalgewebe, die für die weitere Analyse verwendet wurden. Die Genexpressionsdaten wurden anschließend auf die Größe der Sequenzierbibliothek normalisiert und einer Hauptkomponentenanalyse mit den 2000 variabelsten Genen unterzogen. Die Nachbarn wurden anhand der ersten 30 Hauptkomponenten identifiziert. Die anschließende Cluster-Analyse erfolgte mit dem Louvain-Algorithmus mit den 20 nächsten Nachbarn pro Zelle. Die identifizierten Cluster wurden danach einer UMAP-Projektion unterzogen.

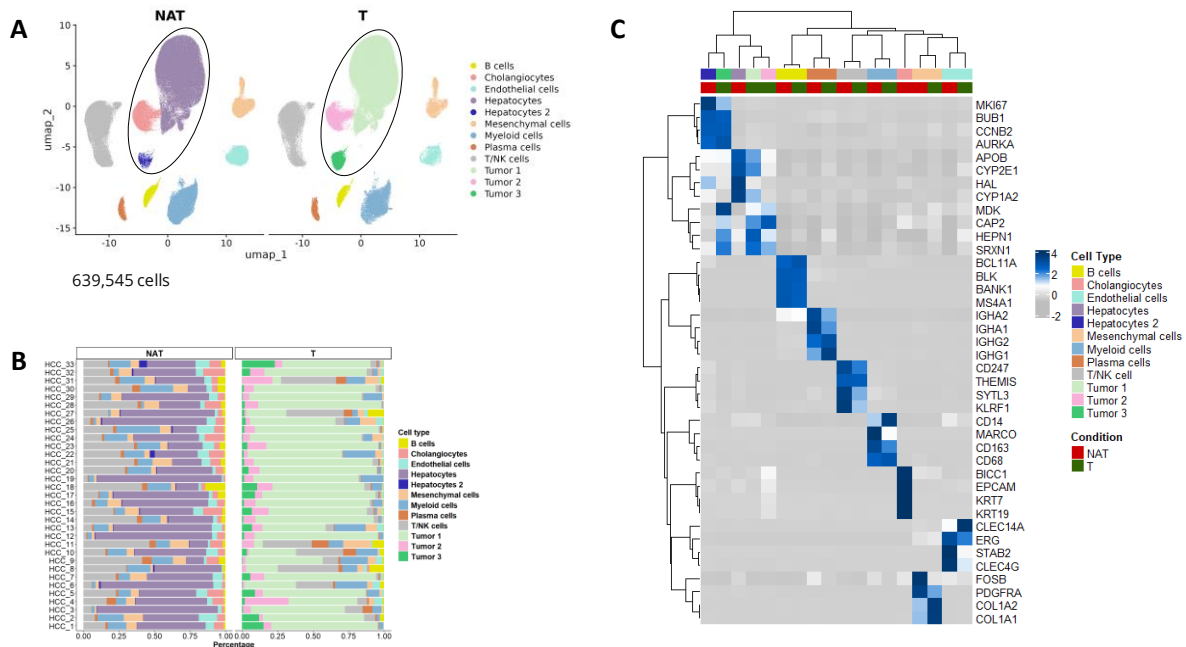


Abb. 2: Analyse der zellulären Landschaft des hepatozellulären Karzinoms. A) UMAP aller Zellen im normalen angrenzenden Gewebe (NAT) und des Tumors nach Qualitätskontrolle. B) Relativer Anteil der einzelnen Zelltypen je Probe. C) Heatmap der Genexpression von Zellmarker- und Tumormarkergenen.

Die Expression von zelltyp-spezifischen Markergenen wurde verwendet, um die Cluster zu annotieren (**Abb. 2**). Nach Annotation der Hauptzelltypen wurden, die einzelnen Haupt-Zelltypen in Subcluster unterteilt, der Differenzierungsstatus der einzelnen Zellen bestimmt, relativ quantifiziert und somit die Zellkomposition des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe definiert.

AP 2: Erstellung einer Transkriptionskarte von Tumor, Mikroumgebung und Lebergewebe

Bei der Erstellung der Transkriptionskarte verfolgten wir zwei Strategien. Zum einen wurde der Übergangsbereich zwischen Normalgewebe und Tumor mit Hilfe des 10x Visium Chips der Firma 10x Genomics analysiert und zum anderen mit Hilfe eines Laser Capture Mikrodisektions-Ansatz, bei dem die Grenzbereiche von Tumor- und Normalgewebe, sowie Bereiche aus dem Tumor und dem Normalgewebe ausgeschnitten wurden. Die Analyse mit Hilfe des Chips ermöglicht eine höhere räumliche Auflösung als der LCM-Ansatz, lässt allerdings nur die Analyse von 2.000-3.000 Transkripten zu, während der LCM-Ansatz bei schlechterer räumlicher Auflösung die Analyse des kompletten Transkriptom zulässt.

Nach erfolgter Optimierung der Lyse für das Tumorgewebe wurden N=20 Proben mit Hilfe des 10x Visium Chips analysiert und sequenziert, sowie N=33 Proben mit Hilfe der LCM-RNA-Seq. Die Qualitätskontrolle ergab, dass alle sequenzierten Proben für die weitere Analysen genutzt werden können.

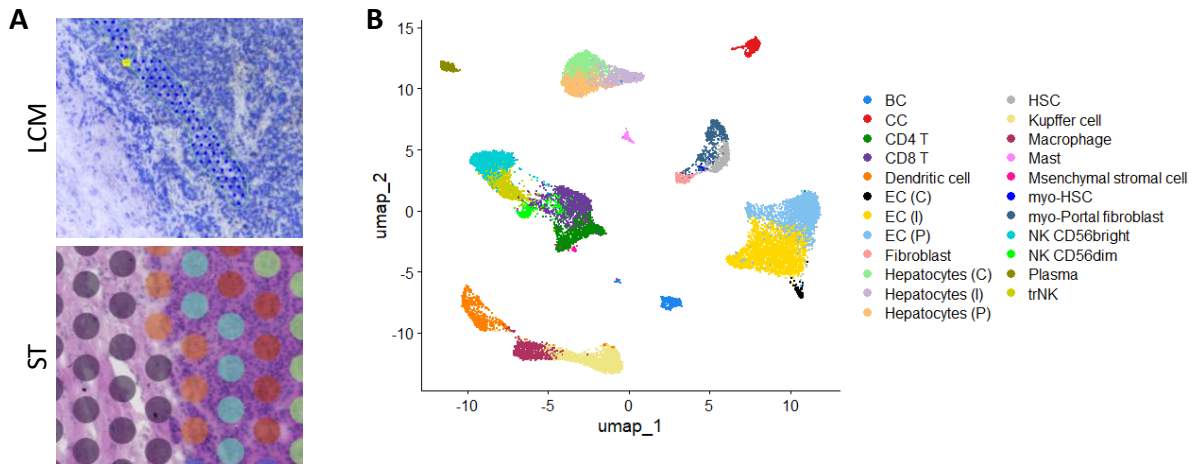


Abb. 4: Transkriptionskarte des Normalgewebes und der Mikroumgebung.: A) Darstellung der Laser Capture Mikrodisektion (LCM) und der sequenzierten Bereiche mit Hilfe des 10x Visum Chips. B) Dekonvolution der Spots des Visiums Chips und Annotation der Zelltypen.

Die räumlichen Transkriptomanalysen mit Hilfe des 10x Genomics-Verfahren beruhen auf der Sequenzierung von Bereichen mit 50µm Auflösung, somit werden ca. 3-4 Zellen gleichzeitig detektiert und sequenziert (**Abb. 4A**). Um die Auflösung zu erhöhen wurden mit Hilfe der Einzelkernsequenzierungen Dekonvolutionen durchgeführt, um den relativen Anteil der einzelnen Zellen im sequenzierten Bereich abschätzen zu können (**Abb. 4B**). Um den Crosstalk zwischen Tumor und Normalgewebe besser zu verstehen wurde zunächst eine Rezeptor-Liganden Analyse mit Hilfe der LCM-RNA-Seq Daten durchgeführt und die vielversprechendsten Signalwege anhand der 10x Visium Daten mit der höheren

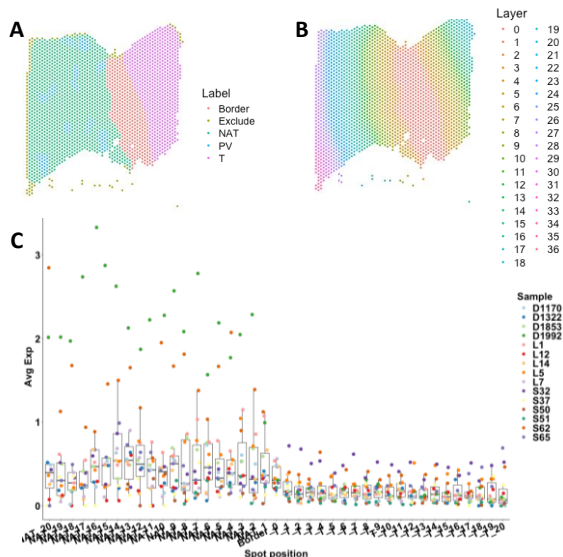


Abb. 3: Darstellung der Analyse des Grenzbereichs des Tumors. A) manuelle Annotation. B) automatische Annotation der Ebene. C) Beispielhafte Darstellung der Genexpression

räumlichen Auflösung und der Abdeckung der Tumorkapsel nachverfolgt. Dazu wurden im nächsten Schritt die Spots auf den Visium ST Chips manuell annotiert und den Bereichen Tumorkapsel, Tumor und Normalgewebe zugeordnet. Anschließend wurden automatisch verschiedene Ebenen in Entfernung zum Tumor definiert und die mittlere Expression aller Gene je Ebene kalkuliert (**Abb. 3**). Bei der Analyse der Rezeptor-Liganden Validierung anhand des Visium ST Chips zeigte sich, dass sich die Hauptrezeptoren der Signalkaskaden in der Tumorkapsel befinden. Aus diesem Bereich wurden Marker extrahiert, die für AP4 genutzt wurden. Die Daten wurden den Arbeitsgruppen Bruschi und Berndt zur räumlichen Modellierung zur Verfügung gestellt. Wir erwarten eine hochrangige Publikation zu Beginn 2025.

AP 3: Ergänzung der transkriptionellen Karte durch eine räumlich aufgelöste DNA-Methylierungskarte und die Definition von unterschiedlich methylierten ENCODE-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Von den gleichen Proben, die in AP2 bearbeitet wurden, wurden Mikrodissektionen des Tumors, des Tumorgewebes an der Tumorkapsel, des Normalgewebes und des Normalgewebes an der Tumorkapsel angefertigt, die DNA isoliert und RRBS-Bibliotheken erstellt. Die Sequenzierungsdaten haben alle Qualitätsmerkmale erfüllt und werden derzeit einer differentiellen Methylierungsanalyse unterzogen, um die unterschiedlich methylierten ENCODE-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu definieren.

AP 4: Tiefenanalyse der frühen HCC-Nische mit Immuno-LCM RNA-Seq

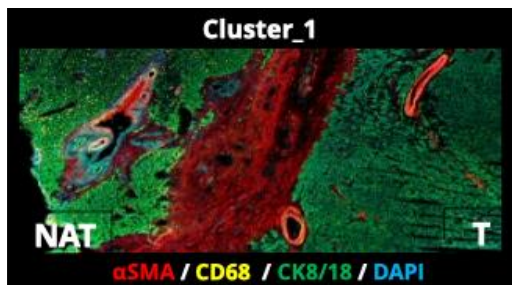


Abb. 5: Darstellung der verwendeten Marker in der Tumor-Normalgewebe Transitionsregion

Wie sich in den Analysen der Transkriptionskarte in AP2 gezeigt hat, ist die höchste Expression von Rezeptoren und Liganden in der Tumorkapsel zu finden. Wir verwendeten die identifizierten Marker (Epithelmarker CK8, Makrophagenmarker CD68 und dem hepatischen Stellat-Zellmarker α -SMA (AP2), um von den gleichen Proben die HCC Nische genauer zu analysieren. Die RNA wurde isoliert und Bibliotheken erstellt. Die Sequenzierungsdaten haben alle Qualitätsmerkmale erfüllt. Zurzeit

werden die Daten analysiert und integriert. Wir erwarten Ergebnisse, die das Verständnis des Crosstalks zwischen Tumor und Normalgewebe besser verstehen lassen und bieten derzeit eine Publikation in einem hochrangigen Journal vor.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

(Siehe separate Zuarbeit von Frau Fink.)

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wir sehen die hier erhobenen Daten, vor allen Dingen in Verbindung mit den vorhandenen klinischen Daten als wertvolle Ressource für das weitere Verständnis des hepatozellulären Karzinoms, zum einen in seiner Entstehung und des Weiteren in der Therapie. Bisher ist uns kein umfassenderer Datensatz bekannt. Wir gehen davon aus, dass dieser multidimensionale Datensatz noch viele weitere Fragen beantworten wird und dabei hilft, Hypothesen für Therapien zu entwickeln.

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

Kurzfristig (1-5 Jahre) sehen wir die erhobenen Ergebnisse als Erkenntnisgewinn über die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms als auch über dessen Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe. Die

Verwertung erfolgt zunächst über wissenschaftliche Publikationen. Die Ergebnisse werden und wurden jedoch ständig auf einen eventuellen wirtschaftlichen Nutzen der Daten überprüft und patentiert, insofern ein wirtschaftlicher Nutzen absehbar ist.

Mittel- und langfristig (5-12 Jahre und darüber hinaus) ist ein Nutzen der Ergebnisse schwer absehbar. Der biomedizinische Markt ist sehr dynamisch und die Therapieentwicklung sehr kostspielig und ohne industrielle Partner schwer durchführbar. Sollte sich aus den Daten ein Patent ergeben, werden wir an industrielle Partner herantreten, und entsprechend der Risikoabschätzung des Partners handeln.

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

Es sind keine Fortschritte bei anderen Stellen bekannt.

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

Forschungsartikel (peer-reviewed)

1. Mayer C, Nehring S, Kücken M, Repnik U, Seifert S, Sljukic A, Delpierre J, Morales-Navarrete H, Hinz S, Brosch M, Chung B, Karlsen T, Huch M, Kalaidzidis Y, Bruschi L, Hampe J, Schafmayer C, Zerial M. Apical bulkheads accumulate as adaptive response to impaired bile flow in liver disease. *EMBO Rep.* 2023 Jul 31:e57181. doi: 10.15252/embr.202357181
2. Thangapandi VR, Knittelfelder O, Brosch M, Patsenker E, Vvedenskaya O, Buch S, Hinz S, Hendricks A, Nati M, Herrmann A, Rekhade DR, Berg T, Matz-Soja M, Huse K, Klipp E, Pauling JK, Wodke JA, Miranda Ackerman J, Bonin MV, Aigner E, Datz C, von Schönfels W, Nehring S, Zeissig S, Röcken C, Dahl A, Chavakis T, Stickel F, Shevchenko A, Schafmayer C, Hampe J, Subramanian P. Loss of hepatic Mboat7 leads to liver fibrosis. *Gut.* 2021 May;70(5):940-950. doi: 10.1136/gutjnl-2020-320853. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32591434; PMCID: PMC8040158.
3. Buch S, Innes H, Lutz PL, Nischalke HD, Marquardt JU, Fischer J, Weiss KH, Rosendahl J, Marot A, Krawczyk M, Casper M, Lammert F, Eyer F, Vogel A, Marhenke S, von Felden J, Sharma R, Atkinson SR, McQuillin A, Nattermann J, Schafmayer C, Franke A, Strassburg C, Rietschel M, Altmann H, Sulk S, Thangapandi VR, Brosch M, Lackner C, Stauber RE, Canbay A, Link A, Reiberger T, Mandorfer M, Semmler G, Scheiner B, Datz C, Romeo S, Ginanni Corradini S, Irving WL, Morling JR, Guha IN, Barnes E, Ansari MA, Quistrebart J, Valenti L, Müller SA, Morgan MY, Dufour JF, Trebicka J, Berg T, Deltenre P, Mueller S, Hampe J, Stickel F. Genetic variation in TERT modifies the risk of hepatocellular carcinoma in alcohol-related cirrhosis: results from a genome-wide case-control study. *Gut.* 2023 Feb;72(2):381-391. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327196. Epub 2022 Jul 4. PMID: 35788059; PMCID: PMC9872243.

4. Innes H, Nischalke HD, Guha IN, Weiss KH, Irving W, Gotthardt D, Barnes E, Fischer J, Ansari MA, Rosendahl J, Lin SK, Marot A, Pedergrana V, Casper M, Benselin J, Lammert F, McLauchlan J, Lutz PL, Hamill V, Mueller S, Morling JR, Semmler G, Eyer F, von Felden J, Link A, Vogel A, Marquardt JU, Sulk S, Trebicka J, Valenti L, Datz C, Reiberger T, Schafmayer C, Berg T, Deltenre P, Hampe J, Stickel F, Buch S. The rs429358 Locus in Apolipoprotein E Is Associated With Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. *Hepatol Commun*. 2022 May;6(5):1213-1226. doi: 10.1002/hep4.1886. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34958182; PMCID: PMC9035556.
5. Subramanian P, Gargani S, Palladini A, Chatzimike M, Grzybek M, Peitzsch M, Papanastasiou AD, Pyrina I, Ntafis V, Gercken B, Lesche M, Petzold A, Sinha A, Nati M, Thangapandi VR, Kourtzelis I, Andreadou M, Witt A, Dahl A, Burkhardt R, Haase R, Domingues AMJ, Henry I, Zamboni N, Mirtschink P, Chung KJ, Hampe J, Coskun Ü, Kontoyiannis DL, Chavakis T. The RNA binding protein human antigen R is a gatekeeper of liver homeostasis. *Hepatology*. 2022 Apr;75(4):881-897. doi: 10.1002/hep.32153. Epub 2021 Dec 5. PMID: 34519101.
6. 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.

Arbeitspaket M3 Brusch

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. (maximal 20 Seiten)

Von der AG Brusch wurden vier Arbeitspakete (AP) bearbeitet, die hier im Einzelnen dargestellt werden.

AP 1: Modell für Gallenumsatz und -transport in geschädigtem Gewebe in der Nähe von HCC-Klonen

Grundsätzlich ist der ungehinderte Abfluss der gebildeten Galle aus einem Leberläppchen durch ein Netzwerk aus Gallenkanälchen essentiell für die Leberfunktion. Dieser Abfluss ist, wie wir durch unsere Modellierung herausfanden, durch das Tumorstadium erheblich eingeschränkt. Wir wendeten unser biophysikalisch fundiertes Modell für Gallentransport, das im Rahmen von LiSyM entwickelt wurde (Segovia-Miranda et al. 2019, *Nature Medicine*, <https://seek.lisym.org/publications/192>) auf neue 3D-Gewebearchitekturdaten von Patienten mit erkrankten Lebern an, die in enger Zusammenarbeit zwischen DEEP-HCC und den AGs Zerial und Hampe gewonnen wurden. Das Modell nutzt die Erhaltung von Flüssigkeitsvolumen und Osmolytmass zusammen mit dem Darcy-Gesetz, um die Erhöhung des Gallendrucks vorherzusagen. Aufgrund der radialen Symmetrie können die dreidimensionalen Gleichungen auf ein eindimensionales Randwertproblem für den Volumenstrom, die Osmolytkonzentration und das Druckprofil in den Gallenkanälchen (BC) reduziert werden, das mit einem Schießverfahren effizient gelöst wird. Diese Aufgabe wurde wie geplant bearbeitet und mit Vortrag auf LiSyM-Krebs Status Seminar, 28.-29.3.2023 in Dresden, sowie Publikation (Mayer et al., 2023, *EMBO Rep*, <https://seek.lisym.org/publications/372>) abgeschlossen. Hervorzuheben ist, dass die hochpräzise

Bildquantifizierung des Zerial-Labors für den BC-Radius, den BC-Volumenanteil, die BC-Netzwerkonnektivität und die apikale Membranoberflächendichte des BC-Netzwerks in 10 räumlichen Zonen, die von perizentral bis periportal reichen, als Inputdaten in das mechanistische Modell einfließt und für die betrachteten erkrankten Leberläppchen nicht trivial zu erhalten ist. Die Geometrie der Gallenkanälchen (Bile Canaliculi) ist selbst in Gewebeproben entfernt vom HCC, aber im selben Leberlappen wie der HCC, beeinträchtigt, insbesondere ist das Netz der Gallenkanälchens nicht mehr gut verbunden, was sich in den Computersimulationen als ein sehr deutlich erhöhter perizentraler Druck widerspiegelt. Dieser räumliche Bezug kann mit mechanischen Wechselwirkungen zwischen dem expandierenden HCC und den in der Umgebung des HCC verlaufenden und dadurch komprimierten Gallenkanälen (Bile Ducts) erklärt werden. Interessanter Weise liegt eine ähnliche Veränderung der Mikroanatomie der Gallenkanälchen (Bile Canaliculi) auch bei ausgeprägter Konstriktion der Gallenkanäle (Bile Ducts) durch primär sklerosierende Cholangitis (PSC) vor. In beiden Fällen sagen unsere Modellsimulationen einen viel höheren perizentralen Gallendruck im Vergleich zu normalen Kontrollpatienten und davon ausgehende Komplikationen voraus.

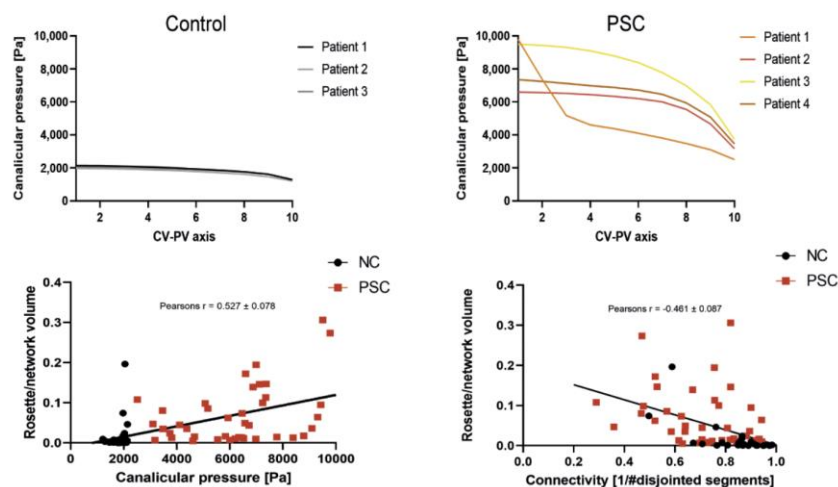


Abb. 6: Modelresultate für den intralobulären Druckverlauf für eine Kontrollgruppe (oben links) und PSC Patienten (oben rechts). Veränderungen in der kanalikulären Architektur durch Rosetten korrelieren positiv mit dem kanalikulären Druck (unten links) und negativ mit der Konnektivität des kanalikulären Netzwerks (unten rechts).

Ein moderat erhöhter Gallendruck bewirkt dann eine Veränderung der Leberzellmorphologie hin zur Ausbildung von stabilisierenden apikalen Strukturen, sogenannter Bulkheads. In Patienten mit zu starkem Gallenrückstau wurde bei zu hohem Gallendruck dann wiederum ein Verlust der apikalen Bulkheads sowie nachfolgend ein Gewebeumbau mit dem Auftreten von Leberzellrosetten entdeckt (Mayer et al., 2023, EMBO Rep, <https://seek.lisym.org/publications/372>).

AP 2: Modellentwicklung zur frühen HCC-Bildung aus multiskaligen Bilddaten und multimodalen Datensätzen

Der Referenzparametersatz für in vivo zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Apoptose, Ploidy wurde in Zusammenarbeit mit den klinischen und experimentellen Partnern durch retrospektive Radiokohlenstoff

(14C)-Datierung von gesunden menschlichen Lebern erstellt. Wir stellten fest, dass menschliche Hepatozyten in der erwachsenen menschlichen Leber bis zum Alter unserer HCC-Proben eine kontinuierliche und lebenslange Zellerersetzung aufweisen, so dass die Leber normalerweise ein junges Organ mit einem Durchschnittsalter von weniger als 3 Jahren bleibt und die Proliferation in diploiden Hepatozyten am schnellsten ist (Heinke et al. 2022, Cell Systems, <https://seek.lisym.org/publications/342>). Diese in vivo Daten der menschlichen Leber haben wir mit unseren Mikroskopie-basierten Modellen integriert und ein Modell für die dynamische Entstehung von HCC entwickelt. Dieses Modell verwendet ähnliche Annahmen wie ein bereits publiziertes Modell der AGs Drasko und Höhme im LiSyM-Krebs Netzwerk und wurde mit unserer Software Morpheus in standardisierter MorpheusML Beschreibungssprache implementiert und veröffentlicht. Das AP2 wurde damit wie geplant bearbeitet und mit Vorträgen auf LiSyM-Krebs Status Seminaren, 28.-29.3.2023 in Dresden und 15.-16.5.2024 in Leipzig, sowie Veröffentlichung standardisierter Morpheus-Modelle (<https://identifiers.org/morpheus/M9148>) abgeschlossen.

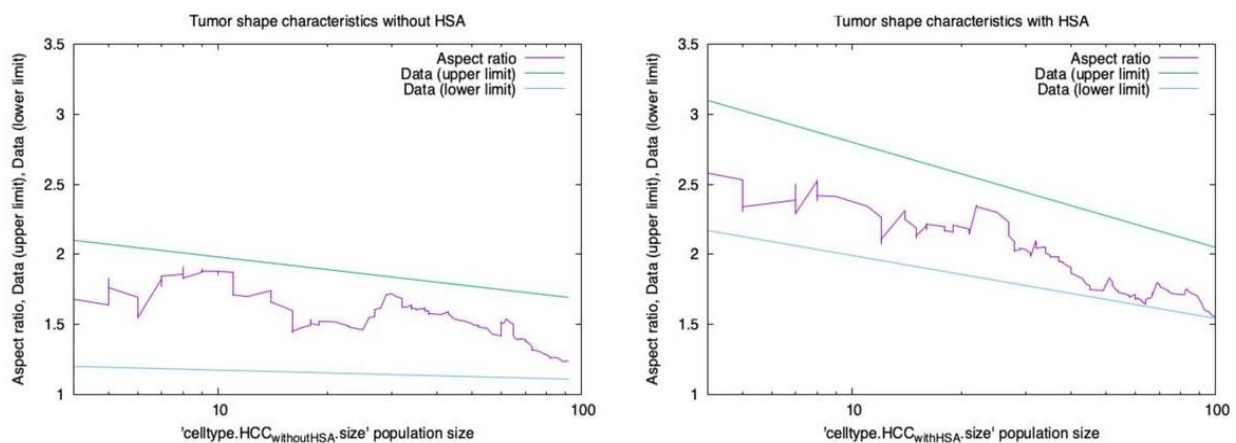


Abb. 7: Modellresultate (violette Kurven) ergeben mit Beobachtungen (Maxima und Minima als Geraden) konsistente Ergebnisse für die Tumorform sowohl mit (rechts) als auch ohne (links) dem Hepatozyten-Sinusoid-Ausrichtungseffekt (HSA).

AP 3: Verbesserung der Reproduzierbarkeit von Simulationen und der gemeinsamen Nutzung von Modellen durch Erweiterung unserer weltweit führenden und vollständig deklarativen multizellulären Modelldefinitionssprache, die das zentrale Datenmanagement-Framework unterstützt

Wir haben mehrere Sessions zur Standardisierung von multizellulären mechanistischen Modellen auf der HARMONY-Tagung (24.-27.4.2023 in Seattle, USA, <https://seek.lisym.org/events/80>) und auf der COMBINE-Tagung (5.-8.10.2023 an der University of Connecticut in Farmington, CT, USA, <https://seek.lisym.org/events/84>) vorbereitet und geleitet, als Fortsetzung eines früheren von uns organisierten Workshops zur Standardisierung (<https://seek.lisym.org/events/59>). Zur Weiterentwicklung effizienter Simulationsmethoden für komplexe multiskalige Krankheitsprozesse in biologischen Geweben co-organisierten wir zudem den internationalen Workshop „Simulating tissue dynamics with cellular Potts models“ am Lorentz-Center in Leiden, NL (18.-22.12.2023, <https://seek.lisym.org/events/86>). Die

Ergebnisse sind online verfügbar (<https://fairsharing.org/4402>) und werden für den weiteren Austausch standardisierter computergestützter Lebermodelle über LiSyM-SEEK genutzt. Damit wurde das zentrale DM unterstützt und AP3 planmäßig bearbeitet und erfolgreich abgeschlossen.

AP 4: Modellkalibrierung gegen Perturbationsdaten inkl. humaner Organoidkultur, Parameterschätzung, Modellvorhersagen für bildgebende Biomarker

Wir haben das open-source Modellierungs-Framework Morpheus so erweitert, dass nun nahtlos auch die effiziente Parameterschätzung mittels der open-source Software FitMultiCell möglich ist (<https://gitlab.com/fitmulticell/fit/>) (**Abb. 8 links**). Morpheus wurde im Berichtszeitraum als Open-Source-Version 2.3.5 released (<https://morpheus.gitlab.io/download/2.3.5/>).

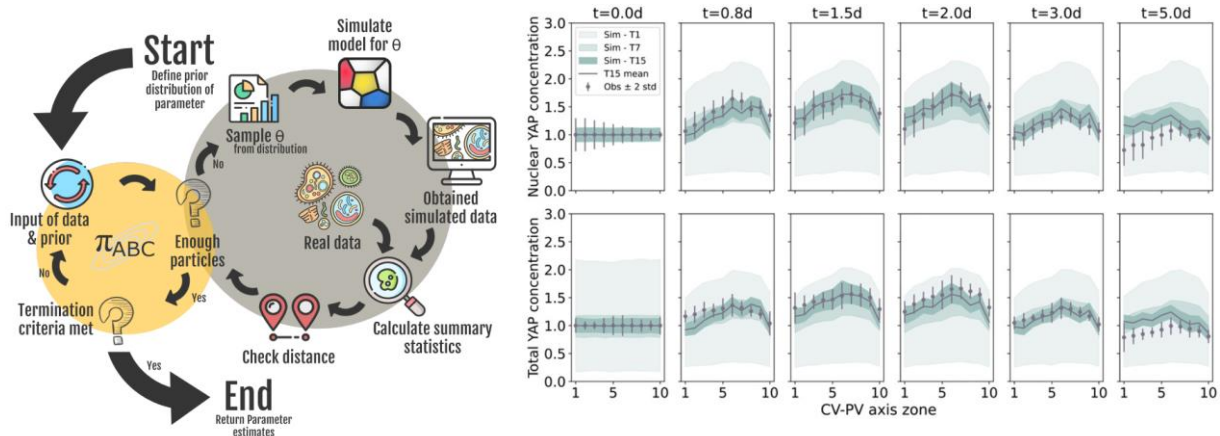


Abb. 8: Links: FitMultiCell ist eine datengetriebene integrierte Plattform zur Modellierung von stochastischen zellulären Prozessen. Sie kombiniert Morpheus (grau, wiederholte Ausführung) und die robuste Parameterschätzungsmethode pyABC (orange, konvergiert über mehrere Epochen der Anwendung). Rechts: Ergebnisse der Parameterschätzung für räumliches Morpheusmodell (Kurven mit Streuintervall) an experimentelle Daten (Symbol emit Fehlerbalken).

Diese neuen Methoden wurden erfolgreich für die Kalibrierung unserer Leber-Modelle eingesetzt (**Abb. 8 rechts**), und publiziert (Alamoudi et al., 2023, Bioinformatics, <https://seek.lisym.org/publications/411>). Diese validierte Strategie wurde danach in Kooperation mit der AG Huch und weiterer Partner in DEEP-HCC auf Daten von Organoiden angewendet, siehe **Abbildung 9** für Modellsimulationen der Organoide. Das aus den Modellergebnissen abgeleitete Verständnis wurde auf dem LiSyM-Krebs Status Seminar 15.-16.5.2024 in Leipzig präsentiert und diskutiert.

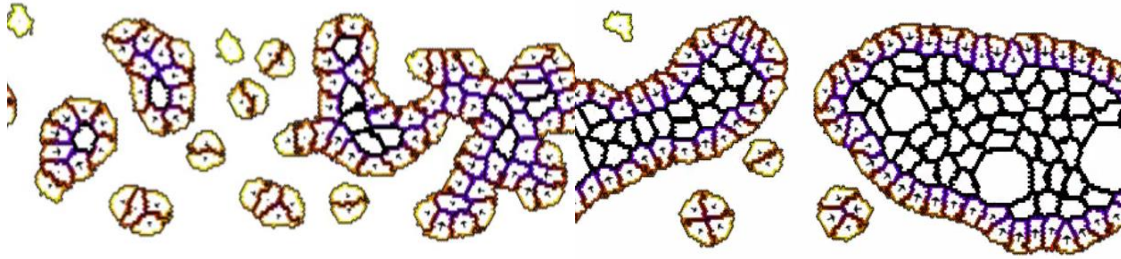
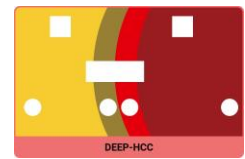


Abb. 9: Modellsimulation einer Organoidkultur mit dynamischer Zellpolarisierung und Lumenbildung.

Aufbauend auf diesen parametrisierten Modellen und unter Nutzung von Patientendaten hin zur Identifizierung von Biomarkern haben wir Methoden zur Analyse multimodaler medizinischer Datensätze entwickelt. Um unsere Methoden zu evaluieren, haben wir sie auf Daten der AG Berg angewandt, die von Patienten mit unklarer Leberpathologie stammen. Damit haben wir Kombinationen von Polymorphismen ermittelt, die mit Veränderungen von Blutmarkern einhergehen. Insbesondere haben wir Polymorphismenpaare identifiziert, die mit erhöhter Alanin-Transaminase (ALT), Aspartat-Transaminase (AST), Gamma-GT (GGT) und Bilirubin assoziiert sind (Schumacher et al., 2023 und Schumacher et al., 2024, Manuscript in preparation). Damit wurde AP4 planmäßig bearbeitet und erfolgreich abgeschlossen.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

(Siehe separate Zuarbeit von Frau Emprich bzw. Frau Fink.)

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Systembiologische Verfahren ermöglichen es, klinische Daten zu integrieren und dadurch mechanistische Hypothesen zur Pathogenese zu entwickeln und Kandidaten für Krankheitsmarker zu finden, die in der Praxis zum Wohle des Patienten angewendet werden können. Der Hauptteil der Projektkosten wurde als Personalmittel verwendet, wie für den Erfolg des Projekts notwendig und angemessen.

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

Die Nutzung der hier entwickelten, standardisierten und bereitgestellten Methoden zur kooperativen und reproduzierbaren systemmedizinischen Forschung ermöglicht es wie gezeigt, diagnostische Marker zur HCC-Früherkennung zu identifizieren.

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

Die Standardisierung der Modellformalismen ist über Konferenzbeiträge und Expertendiskussionen international eingebettet (siehe AP 3). Darüber hinaus sind keine Fortschritte bei anderen Stellen bekannt.

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

Forschungsartikel (peer-reviewed)

1. C. Mayer, S. Nehring, M. Kücken, U. Repnik, S. Seifert, A. Sljukic, J. Delpierre, H. Morales-Navarrete, S. Hinz, M. Brosch, B. Chung, T. Karlsen, M. Huch, Y. Kalaidzidis, L. Bruschi, J. Hampe, C. Schafmayer, M. Zerial: Apical bulkheads accumulate as adaptive response to impaired bile flow in liver disease, *EMBO Rep.* e57181, 2023. doi: 10.15252/embr.202357181.
2. P. Heinke, F. Rost, J. Rode, P. Trus, I. Simonova, E. Lázár, J. Feddema, T. Welsch, K. Alkass, M. Salehpour, A. Zimmermann, D. Seehofer, G. Possnert, G. Damm, H. Druid, L. Bruschi, O. Bergmann: Diploid hepatocytes drive physiological liver renewal in adult humans, *Cell Systems* 13(6):499-507. e12, 2022. doi: 10.1016/j.cels.2022.05.001
3. E. Alamoudi, Y. Schälte, R. Muller, J. Starruss, N. Bundgaard, F. Graw, L. Bruschi, J. Hasenauer: FitMultiCell: simulating and parameterizing computational models of multi-scale and multi-cellular processes, *Bioinformatics* 39(11):btad674, 2023. doi: 10.1093/bioinformatics/btad674.
4. J. Schumacher, T. Herta, T. Berg, F. Lammert, L. Bruschi, S. Weber, M. Kücken, M. Matz-Soja, J. Fischer, M. Casper, A. Böhlig, I. Lambert. A High-performance Computing Analysis of Cholestasis-associated Gene Variants in Patients with Cholestasis Phenotype of Unclear Etiology. *Hepatology* 78 (S1), S2129, 2023. doi: 10.1097/HEP.0000000000000580
5. J. Schumacher, M. Kücken, J. Fischer, M. Matz-Soja¹, A. Böhlig, M. Casper, S. Weber, I. Lambert, F. Lammert, L. Bruschi, T. Herta, T. Berg: A high-performance computing analysis of cholestasis-associated gene variants in patients with cholestasis phenotype of unclear etiology, *Manuskript in Vorbereitung*

Konferenzpräsentation

1. J. Schumacher, M. Kücken, J. Fischer, M. Matz-Soja¹, A. Böhlig, M. Casper, S. Weber, I. Lambert, F. Lammert, L. Bruschi, T. Herta, T. Berg: A high-performance computing analysis of cholestasis-associated gene variants in patients with cholestasis phenotype of unclear etiology, *The Liver Meeting: Boston, Massachusetts, November 10-14, 2023*

Software

1. J. Starruß, M. Kücken, D. Jahn, R. Müller, L. Bruschi, Erweiterung und Optimierung der Modellierungs- und Simulationsplattform Morpheus, <https://morpheus.gitlab.io/>
2. E. Alamoudi, Y. Schälte, R. Muller, J. Starruss, N. Bundgaard, F. Graw, L. Bruschi, J. Hasenauer: FitMultiCell, <https://gitlab.com/fitmulticell/fit/>

Modelle

1. Morpheusimplementierung eines Modells für Hepatozelluläres Karzinom, <https://identifiers.org/morpheus/M9148>

Arbeitspaket B2 Chavakis/Coskun

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. (maximal 20 Seiten)

Das Teilprojekt B2 konzentrierte sich auf die Identifizierung leberspezifischer Biomarker für die zukünftige Integration in die klinische Routine. Die Arbeit wurde zusammen mit Partner Nr. 13 (Lipotype) durchgeführt, wobei sich ZML (Chavakis/Coskun) speziell auf die Ergebnisse (DEL) 1, 2 und 3 konzentrierte.

Arbeitsplan:

DEL1 (ZML + Lipotype): SOP-Erstellung für klinische Lipiddiagnostik und Präanalytik

DEL2 (ZML + Lipotype): Schaffung einer zusätzlichen schnellen in silico-Validierungsressource

DEL3 (ZML + Lipotype): Bewertung des Lipidsekretoms von HCC-Organoiden für E5

DEL4 (Lipotype): Qualitätskontrollierte Integration der DEEP-HCC-Kohorten auf die Lipotype-Plattform

DEL5 (Lipotype): Validierung der identifizierten Biomarker auf klinischer Ebene unter Verwendung robuster Messsysteme für die aus dem Modell abgeleiteten Kandidatenlipide

DEL1: SOP-Erstellung für klinische Lipiddiagnostik und Präanalytik

Für die Analyse von Blutplasma- und Leberproben wurden SOPs für die klinische Lipiddiagnostik einschließlich präanalytischer Schritte entwickelt. Lipoprotein- und Metaboliten-Panels in menschlichem Blutplasma können mithilfe der zerstörungsfreien Kernspinresonanzplattform (NMR) analysiert werden, die am Institut für Klinische Chemie und Labormedizin (CHAVAKIS) verfügbar ist. Quantitative NMR-basierte Stoffwechselprofile werden mithilfe des 600 MHz Ascend™ 600-Instruments (Bruker) unter Verwendung der Protokolle Bruker IVDr Lipoprotein Subclass Analysis (B.I. LISA) und Bruker Quantification in Plasma/Serum (B.I. Quant PS) erstellt. Die B.I. Das LISA-Protokoll ermöglicht die Quantifizierung von bis zu 115 Lipoprotein-bezogenen Parametern, darunter Lipoprotein-Subpopulationen (z. B. 6 LDL-Populationen), Partikelzahl pro Dichteverteilung und partikelspezifische Verteilung von Triglyceriden, Cholesterylestern, freiem Cholesterin und Phospholipiden sowie Apo-A1-, Apo-A2- und Apo-B100-Proteinen. Das B.I. Quant PS-Protokoll liefert quantitative Werte (Konzentrationen) für bis zu 41 Metabolite, darunter Alkohole, Aminosäuren, Carbonsäuren, essentielle Nährstoffe, Ketosäuren und Zucker. Die etablierten SOPs erfordern nur 350 µl Blutplasmamaterial, 15 Minuten pro Probennahme und können vollautomatisch durchgeführt werden.

Für die massenspektrometrie (MS)-basierte Lipidomik-Analyse von Blutplasma (Maus und Mensch) und Gewebe (Mäuseleber) wurden SOPs für die Präanalytik und die Flüssigchromatographie (LC) - MS-Analyse

etabliert (Coskun). Eine detaillierte Beschreibung aller notwendigen Schritte für die quantitative Profilierung der Lipidome von Interesse wurde erstellt und an verschiedenen biologischen Materialien validiert. Das resultierende Protokoll wurde als Empfehlung für eine genaue Lipidannotation und semi-absolute Quantifizierung aus LC-MS/MS-Datensätzen veröffentlicht (**Abb. 10**; Wölk und Fedorova, 2025). SOPs für Lipidextraktionen wurden entwickelt und validiert, einschließlich aller präanalytischen Überlegungen (optimales Gewebe-/Plasmagewicht/-volumen pro Extraktionslösungsmittelvolumen, Zusammensetzung und Menge isopenmarkierter interner Standards, Probenhandhabung wie Temperatur und Zugabe von Antioxidantien in den Extraktionslösungsmitteln, optimale Röhrchen und Pipettenspitzen usw.). Probenrandomisierung und verschiedene Arten von Qualitätskontrollproben (Leerwert-QC, Batch-QC usw.) sowie die Verwendung von Harmonisierungsmaterial wurden beschrieben. Darüber hinaus werden Überlegungen zur Datenverarbeitung einschließlich Isotopenkorrekturen, Korrekturen für In-Source-Fragmentierung und Bildung differenzieller Addukte beschrieben. LC-MS/MS-basierte Methoden zur genauen Identifizierung und Quantifizierung von Lipiden wurden auf den UHPLC Vanquish Horizon übertragen, online gekoppelt mit einem Orbitrap-basierten Massenspektrometer Exploris 240.

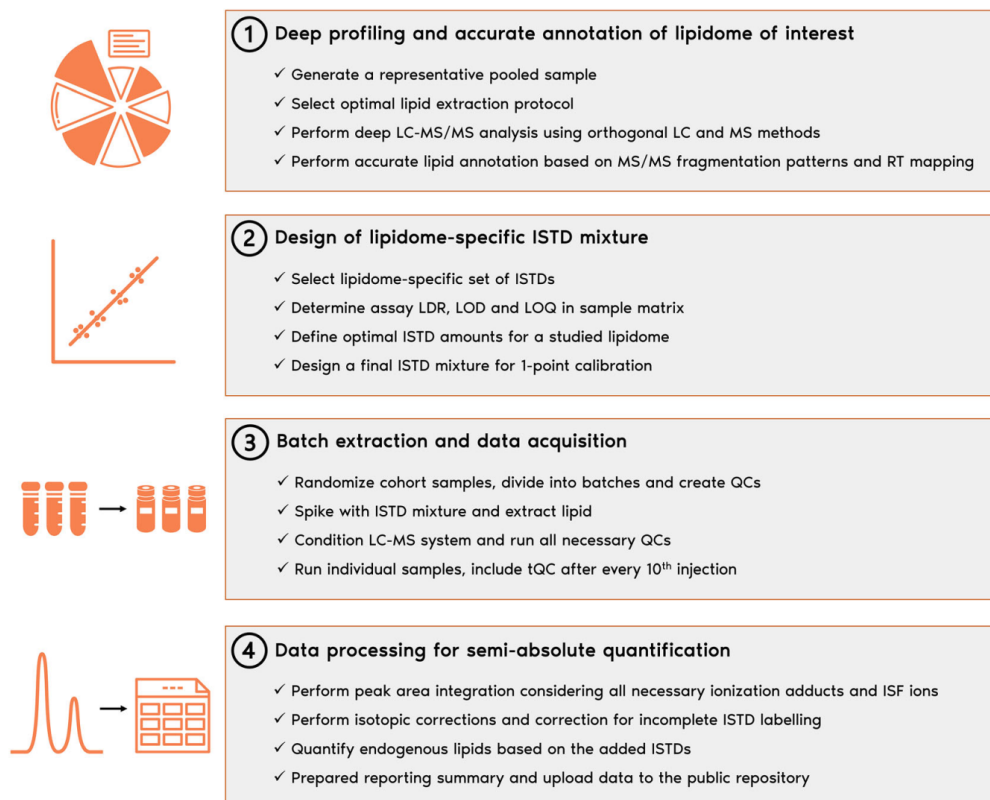


Abb. 10: Schematische Übersicht über die vier Hauptschritte im analytischen Arbeitsablauf zur genauen Lipidannotation und semiabsoluten Quantifizierung aus LC-MS/MS-Datensätzen, einschließlich (1) Deep Profiling und genauer Annotation des Lipidoms von Interesse, (2) Design einer lipidomspezifischen ISTD-Mischung, (3) Batch-Extraktion und Datenerfassung und (4) Datenverarbeitung zur semiabsoluten Quantifizierung.

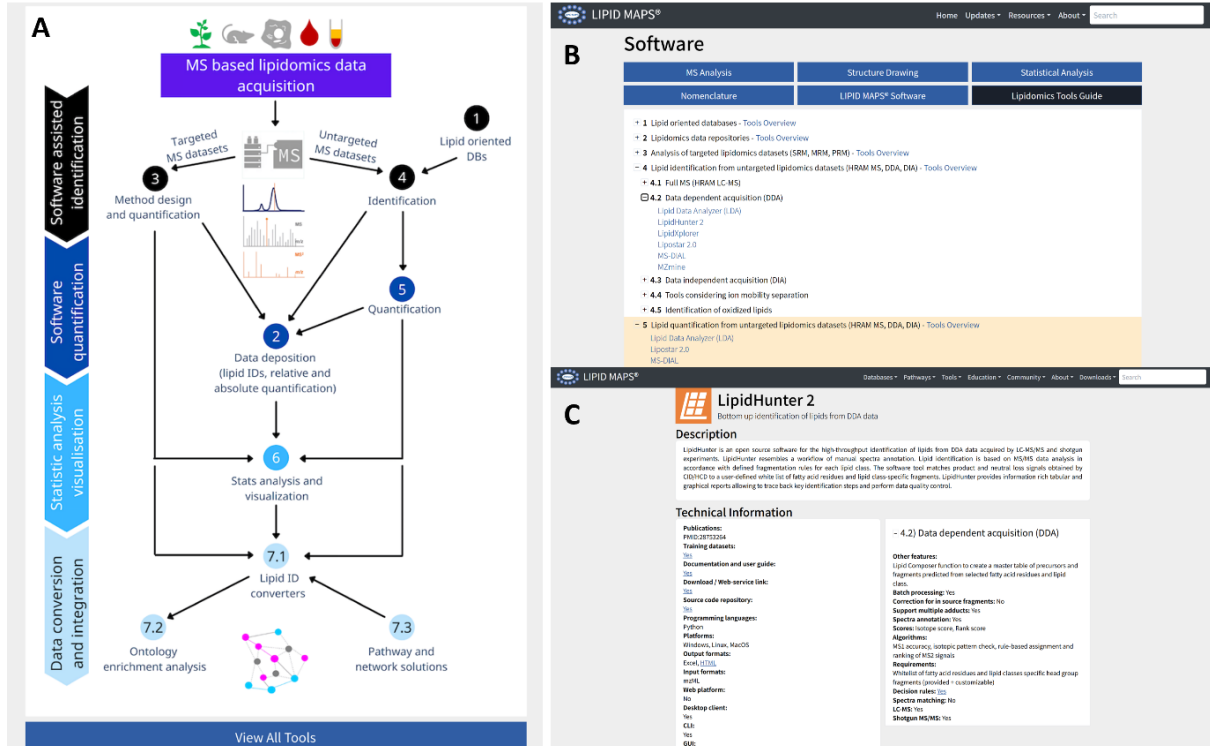
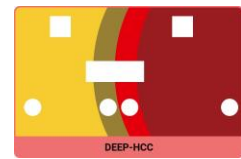


Abb. 11: Leitfaden zu Lipidomics-Tools (A) Übersicht und detaillierte (B) Beschreibung einzelner Softwaretools zur Verarbeitung komplexer Lipidomics-Datensätze. (C) Abbildung der vom Fedorova-Labor entwickelten LipidHunter-Softwareseite.

DEL2: Schaffung einer zusätzlichen schnellen in silico-Validierungsressource

Die im Rahmen des Projekts gewonnenen NMR-basierten Metabolomik- und LC-MS/MS-Datensätze stellen eine datenreiche Ressource dar, die nicht nur für die anfängliche Datenanalyse (z. B. Identifizierung von Metaboliten und Lipiden) verwendet wird, sondern auch in eine In-silico-Validierungsressource (CHAVAKIS) umgewandelt werden kann. So werden NMR-Spektren, die mit den Protokollen B.I. LISA und B.I. Quant PS gewonnen wurden, gespeichert und für die erneute Auswertungen sowie für den Abgleich mit entsprechenden Lipidomics-Daten zur Verfügung gestellt. Die Analyse von Lipidomics-Datensätzen ist zeitaufwändiger und erfordert die Anwendung von Computerprogrammen für die Identifizierung und Quantifizierung von Lipiden, die statistische Analyse, die Anreicherung mit Ontologien und die Kartierung von Stoffwechselwegen und -netzen. Dr. Ni und Dr. Fedorova leiteten die von der Gemeinschaft getragene Initiative zur Sammlung und Kombination von Bioinformatiklösungen und -tools für Lipidomik-Forschungsanwendungen, die zur Erstellung des Lipidomics Tools Guide führte (**Abb. 11**; Ni Z et al. Nat Methods 2022). Der Lipidomics Tools Guide ist nun eine öffentlich zugängliche Ressource, die von der Lipid Maps Initiative (https://www.lipidmaps.org/resources/tools?page=flow_chart) gehostet wird und von der Gemeinschaft für die In-silico-Abfrage von Lipidomics-Datensätzen frei genutzt werden kann. Dieses Fachwissen wird nun mit der Arbeit des COSUKUN-Labors an der Verarbeitung von Lipidomics-Daten kombiniert und für das gesamte Konsortium verfügbar gemacht.

DEL3: Bewertung des Lipidsekretoms von HCC-Organoiden für E5

Die Identifizierung und Validierung von HCC-Biomarkern im menschlichen Blutplasma ist die am wenigsten invasive Methode der Molekulardiagnostik. Allerdings ist die Identifizierung solcher Biomarker aufgrund der extrem hohen molekularen Komplexität des menschlichen Blutplasmas eine Herausforderung. Daher ist die Analyse des Sekretoms von HCC-Organoiden, die als Stellvertreter für HCC-Tumoren dienen, ein nützliches Instrument zum Nachweis von Biomarkern, die möglicherweise in den Blutkreislauf gelangen. Allerdings werden auch hier die von den Organoiden abgesonderten Lipide durch die Bestandteile des Kulturmediums maskiert. Um diese Herausforderung zu überwinden, haben wir eine neue LC-MS/MS-Methode entwickelt, die auf der AcquireX-Technologie basiert, die für das hochauflösende MS-Gerät Exploris 240 verfügbar ist. Das AcquireX-Protokoll ermöglicht die Erstellung einer Liste von Lipidsignalen auf der Grundlage der Erfassung des reinen Kulturmediums, die von der nachfolgenden Analyse des konditionierten Mediums aus Zellkultur-/Organoidexperimenten ausgeschlossen werden. Es ermöglicht den Nachweis und die Identifizierung (auf der Grundlage der MS/MS-Spektren) der einzigartigen Zusammensetzung der sekretierten Lipide.

Um außerdem in geringem Maße vorhandene Lipidmediatoren zu untersuchen, die als Signalmoleküle fungieren und bestimmte pathologische Prozesse initiieren können, haben wir ein neues Analyseprotokoll entwickelt, mit dem zwei Hauptklassen bioaktiver Lipide – Lysophospholipide und Oxylipine – nachgewiesen und quantifiziert werden können. Verschiedene Extraktionsprotokolle, die auf einer Kombination aus Flüssig-Flüssig-Extraktion, Proteinfällung und Festphasenextraktion basieren, wurden auf die Rückgewinnung der interessierenden Analyten und Matrixeffekte getestet. Derzeit wurde das neue Protokoll entwickelt, das die gleichzeitige Extraktion von Lysophospholipiden und Oxylipinen unter Verwendung eines einheitlichen Festphasenextraktionsprotokolls ermöglicht. Für die genaue und empfindliche Erkennung sezernierter Lipide wurde eine gezielte Massenspektrometriemethode auf Grundlage der Überwachung mehrerer Reaktionen implementiert, die die Analyse von etwa 100 bioaktiven Lipiden in Zellkultur-/Organoidüberständen ermöglicht (**Abb. 12**). Die Methoden wurden anhand regulärer Zellkulturexperimente (COSKUN) validiert und sind bereit für die Analyse von Lipiden, die von HCC-Organoiden sezerniert werden.

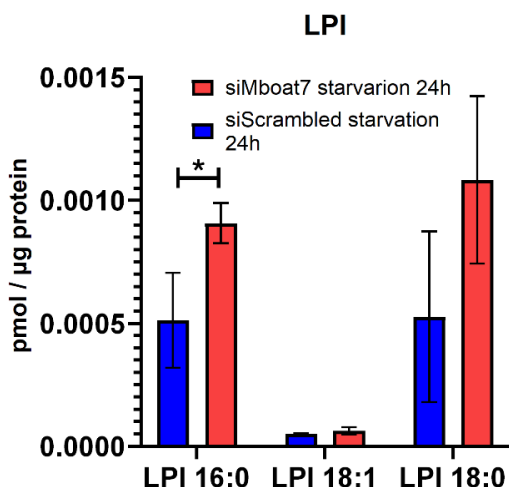


Abb. 12: Beispiel für die spezifische und sensitive Quantifizierung bioaktiver Lipidmediatoren (hier gezeigt am Beispiel von Lysophosphatidylensitolen, LPI) im Sekretom hepatischer Sternzellen.

DEL4: Qualitätskontrollierte Integration der DEEP-HCC-Kohorten auf die Lipotype-Plattform

Eine Beschreibung der Arbeit finden Sie im Lipotype-Bericht.

DEL 5: Validierung der identifizierten Biomarker auf klinischer Ebene unter Verwendung robuster Messsysteme für die aus dem Modell abgeleiteten Kandidatenlipide

Eine Beschreibung der Arbeit finden Sie im Lipotype-Bericht.

Um die zelluläre Wechselwirkung in einer komplexen Gewebeumgebung zu untersuchen und zellspezifische Lipidomsignaturen bereitzustellen, die mit dem Beginn und der Entwicklung von HCC in Zusammenhang stehen, wird die räumliche Verteilung von Lipidmediatoren mithilfe einer Massenspektrometrie-Bildgebungsplattform (MSi) überwacht, die derzeit in der Fedorova-Gruppe entwickelt wird. Interessanterweise sind PI- und LPI-Lipide zwar nicht ohne weiteres durch eine herkömmliche, auf Elektrospray-Ionisation basierende LC-MS/MS-Analyse gemessen werden und erfordern die Anwendung gezielter Methoden (wie oben beschrieben), diese Lipide sind jedoch mithilfe der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI), die üblicherweise für MSI verwendet wird, leicht nachweisbar. Daher werden benachbarte Abschnitte der Leber und/oder Organoide für die histochemische Färbung und MSI vorbereitet. Für MSI werden entsprechende Abschnitte auf ITO-beschichtete Objektträger aufgetaut, mithilfe eines ultrafeinen pneumatischen Sprühsystems mit Matrix besprüht und MS-Daten erfasst. Nach der MS-Erfassung wird der Gewebeabschnitt zur Koregistrierung mit histochemischen Bildern H&E-gefärbt. Wichtig ist, dass wir zusammen mit der Hampe-Gruppe (E2) derzeit einen innovativen Ansatz entwickeln, der die Erfassung sowohl räumlicher Transkriptomik als auch Lipidomik auf demselben Gewebeschnitt ermöglicht (**Abb. 13**), wodurch wir erstmals eine direkte Korrelation der Transkriptomik- und Lipidomik-Signaturen von Leber-HCC durchführen können. Darüber hinaus können MSI-Daten zusätzlich mit spezifischen Zelltypidentitäten überlagert werden, die aus Multiplex-Immunhistochemie-Bildgebung abgeleitet werden.

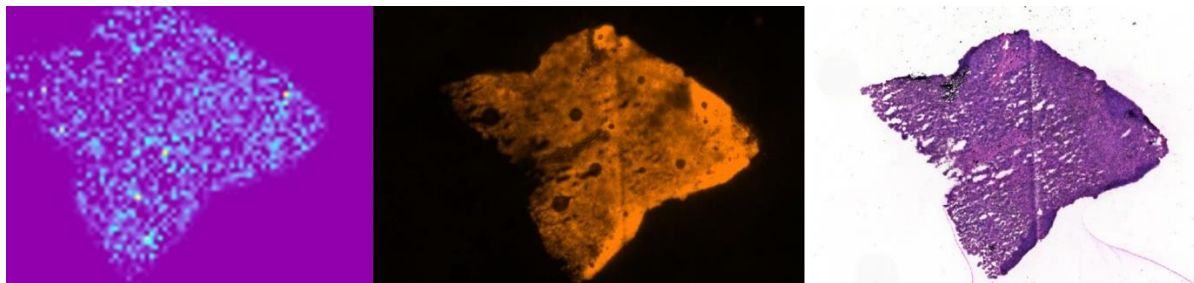


Abb. 13: Proof-of-Principle-Experiment zur Veranschaulichung der gleichzeitigen räumlichen Lipidomik (linkes Feld: gezeigtes Signal, das dem Lipid PE O-38:6 entspricht), räumlichen Transkriptomik (mittleres Feld; cDNA singla) und H&E-Statusanalyse (rechtes Feld) einer menschlichen Leberprobe, die auf dem Visium-Objektträger zur räumlichen Gewebeatmung abgelegt wurde.

Aufbauend auf unseren Ergebnissen und um die Übertragung der erzielten Ergebnisse auf klinische Anwendungen zu verbessern, wenden wir eine entwickelte gezielte Methodik zur Quantifizierung bioaktiver Lipide an, wobei wir uns auf spezifische Molekülarten konzentrieren, die während des Projekts in der Leber und im Blutplasma von HCC-Patienten identifiziert wurden. Dies wird es uns ermöglichen, die Anwendbarkeit von Blutplasmaspiegeln spezifischer Lipidmediatoren als diagnostischer und/oder prognostischer Marker für Leber-HCC zu validieren.

Andere wesentliche Ereignisse

Im Jahr 2022 wurde die Forschungsgruppe von Dr. Maria Fedorova an die TUD angegliedert, und das ergänzende Fachwissen ihrer Gruppe im Bereich tiefgehende Lipidomik Profilierung und Quantifizierung wurde erfolgreich in das Projekt integriert (Lange M und Fedorova M, Anal Bioanal Chem. 2020; Lange M et al. Cell Rep Med. 2021; McDonald JG et al. Nat Metab. 2022; Criscuolo A et al. Nat Commun. 2022).

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

(Siehe separate Zuarbeit von Frau Fink.)

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Arbeit der AG Chavakis/Coskun im Teilprojekt B2 hat bedeutende Fortschritte bei der Identifizierung leberspezifischer Biomarker erzielt, die eine Integration in die klinische Routine ermöglichen könnten. Standardisierte SOPs und moderne Technologien wie NMR-Lipidomik und LC-MS/MS-Analysen gewährleisten eine hohe Datenqualität und Reproduzierbarkeit. Die Ergebnisse adressieren gezielt die Projektziele und schaffen eine Grundlage für diagnostische und therapeutische Anwendungen, wobei die eingesetzten Ressourcen und die Expertise der AG entscheidend waren.

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

Das Vorhaben hat wesentlich zum Verständnis von HCC und der Biologie des Lebergewebes beigetragen und neue Lipidmarker identifiziert, die in die aktuelle Leberkrebsforschung integriert wurden. Durch die im Projekt entwickelten Methodiken zur tiefen Lipidomik-Profilierung und Analyse sezernierter Lipide wurden Technologien geschaffen, die nicht nur für HCC, sondern auch für andere Gewebe übertragbar sind. Dies ebnet den Weg zur Erstellung eines menschlichen Lipidom-Atlas und zur Identifikation bioaktiver Lipide in komplexen Proben.

Die entwickelten Open-Source-Tools (z. B. LipidHunter, LipidLynxX, LPtigger2) sind öffentlich zugänglich und fördern den wissenschaftlichen Austausch, während ihre potenzielle kommerzielle Nutzung durch Lizenzierung für industrielle Anwendungen zukunftsweisend ist. Diese Werkzeuge bieten funktionale Vorteile gegenüber konkurrierenden Ansätzen durch höhere Präzision und breitere Anwendbarkeit.

Mittelfristig könnten die identifizierten Biomarker und Methoden zur Entwicklung klinischer Diagnostika und Therapien beitragen. Langfristig ermöglichen die veröffentlichten Datensätze, analytischen Protokolle und Tools die Integration in Multi-Omics-Ansätze, was eine intensivere Zusammenarbeit mit Forschungszentren und Unternehmen ermöglicht. Die entwickelten Technologien und Erkenntnisse sind wertvolle Ressourcen für die biomedizinische Forschung und potenzielle industrielle Anwendungen.

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

Es sind keine Fortschritte bei anderen Stellen bekannt.

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

Forschungsartikel (peer-reviewed)

1. Wölk M, Fedorova M. Recommendations for Accurate Lipid Annotation and Semi-absolute Quantification from LC-MS/MS Datasets. *Methods Mol Biol.* 2025;2855:269-287. doi: 10.1007/978-1-0716-4116-3_16.
2. Torta F, Hoffmann N, Burla B, Alecu I, Arita M, Bamba T, Bennett SAL, Bertrand-Michel J, Brügger B, Cala MP, Camacho-Muñoz D, Checa A, Chen M, Chocholoušková M, Cinel M, Chu-Van E, Colsch B, Coman C, Connell L, Sousa BC, Dickens AM, Fedorova M, Eiríksson FF, Gallart-Ayala H, Ghorasaini M, Giera M, Guan XL, Haid M, Hankemeier T, Harms A, Höring M, Holčapek M, Hornemann T, Hu C, Hülsmeier AJ, Huynh K, Jones CM, Ivanisevic J, Izumi Y, Köfeler HC, Lam SM, Lange M, Lee JC, Liebisch G, Lippa K, Lopez-Clavijo AF, Manzi M, Martinefski MR, Math RGH, Mayor S, Meikle PJ, Monge ME, Moon MH, Muralidharan S, Nicolaou A, Nguyen-Tran T, O'Donnell VB, Orešič M, Ramanathan A, Riols F, Saigusa D, Schock TB, Schwartz-Zimmermann H, Shui G, Singh M, Takahashi M, Thorsteinsdóttir M, Tomiyasu N, Tournadre A, Tsugawa H, Tyrrell VJ, van der Gugten G, Wakelam MO, Wheelock CE, Wolrab D, Xu G, Xu T, Bowden JA, Ekroos K, Ahrends R, Wenk MR. Concordant inter-laboratory derived concentrations of ceramides in human plasma reference materials via authentic standards. *Nat Commun.* 2024 Oct 3;15(1):8562. doi: 10.1038/s41467-024-52087-x.
3. Parchem K, Letsiou S, Petan T, Oskolkova O, Medina I, Kuda O, O'Donnell VB, Nicolaou A, Fedorova M, Bochkov V, Gladine C. Oxylipin profiling for clinical research: Current status and future perspectives. *Prog Lipid Res.* 2024 Jul;95:101276. doi: 10.1016/j.plipres.2024.101276. Epub 2024 Apr 30.
4. Wölk M, Prabutzki P, Fedorova M. (2023) Analytical Toolbox to Unlock the Diversity of Oxidized Lipids. *Acc Chem Res.* 56(7):835-845. DOI: 10.1021/acs.accounts.2c00842.

5. Ni Z, Wölk M, Jukes G, Mendivelso Espinosa K, Ahrends R, Aimo L, Alvarez-Jarreta J, Andrews S, Andrews R, Bridge A, Clair GC, Conroy MJ, Fahy E, Gaud C, Goracci L, Hartler J, Hoffmann N, Kopczyński D, Korf A, Lopez-Clavijo AF, Malik A, Ackerman JM, Molenaar MR, O'Donovan C, Pluskal T, Shevchenko A, Slenter D, Siuzdak G, Kutmon M, Tsugawa H, Willighagen EL, Xia J, O'Donnell VB and Fedorova M. (2023) Guiding the choice of informatics software and tools for lipidomics biomedical research applications. *Nat Methods*. 20(2):193-204. DOI: 10.1038/s41592-022-01710-0.

Konferenzpräsentation

1. Zhixu Ni „LPptiger 2 enhanced epilipid-centric workflow“ 12th International Singapore Lipid Symposium (iSLS 11) Singapore. 5-8.03.2024
2. Maria Fedorova “Lipidomics measures of human health: focus on tissue lipidomes”, DIASyM research core. Online. 6.12.2023
3. Maria Fedorova “Lipidome plasticity in stress responses”, 18th GERLI Meeting in Paris, France. 17.10.2023
4. Maria Fedorova “Lipidome dynamics at the crossroad between survival and cell death”, 8th Lipidomics Forum, Vienna, Austria. 28.08.2023;
5. Zhixu Ni “Advancing Epilipid Identification with LPptiger 2: Enhanced Workflow with Extended Coverage”, 4th EpiLipidNET General Action meeting in Toulouse , 10.07.2023
6. Maria Fedorova “Deep dive into human lipidome: discovery of tissue specific lipid collectives”, German Society of Mass Spectrometry meeting, Dortmund, Germany, 14-17.05.2023;
7. Gabriele Lombardi Bendoula, “Bioactive lipid mediators in cell-cell communications”, HNE Club meeting, 10-11.10.2024, Genoa, Italy
8. Maria Fedorova, “Lipids at the crossroad
9. between Cell Life And Death”, Gordon research Conference “Mechanism and Consequences of Redox Signalling”, 14-19.07.2024, Barcelona, Spain
10. Maria Fedorova, “Lipid Modifications In Cell Life And Death”, Gordon research conference “Towards Functional Lipidomics”, 5-10.05.2024, Lucca, Italy

Verbreitung in Bildung und Gesellschaft

1. Maria Fedorova, Bildungs-Webinar (aufgezeichnet) für das Early-Career Members Network der Metabolomics Society (<https://metabolomicssociety.org/resources/multimedia/emn-webinars-2024/>).
2. Maria Fedorova, Vortrag zur Master Students retreat der Fakultät für Biologie, TU Dresden “Lipid Quality Control”
3. Maria Fedorova, “Epilipidomics technology”, FEBS Advanced Course “Redox biochemistry: cellular responses and disease relevance”, 30.09-6.10,2024, Spetses, Greece.

4. Maria Fedorova, “Uncovering the complexity and dynamics of natural lipidomes”, Kolloquium an der Freien Universität Berlin, 11.12.2024
5. Maria Fedorova, “Exploring molecular details of lipid metabolism:
6. lipidomics perspectives”, Life Science Campus Summer Conference TUD, 29.08.2024
7. Michele Wölk, “Skyline for lipidomics” Skyline tutorial webinar #24
8. Michele Wölk, “Targeted lipidomics” pädagogischer Workshop bei BMSS-BSPR meeting, University of Warwick, UK.

Steakhalter-Outreach

1. Maria Fedorova, “Lipidomics solution for health challenges”, Ausarbeitungstreffen „Bridging Lipids and Society“ bei der COST Association in Brüssel, bei dem Wissenschaftler und Experten des Netzwerks mit Interessenvertretern und EU-Entscheidungsträgern zusammenkommen (<https://www.cost.eu/bridging-lipids-epilipidnet/>).