

**Die Rolle des Adipokins Chemerin  
und seines Rezeptors CMKLR1 im Hepatozellulären  
Karzinom**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

**Elisabeth M. Haberl, geb. Meier**

aus Regensburg

im Jahr 2018

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

08. Mai 2018

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Unterschrift:

***Meiner Familie***

## Inhalt

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Pathogenese des HCCs</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Diagnose und Therapie des HCCs</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b>Chemerin und seine Rezeptoren</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Expression und Prozessierung von Chemerin</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Funktion von Chemerin</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Chemerin als Ligand verschiedener Rezeptoren</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Kit-Systeme</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.5.1</b>	<b>Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.5.2</b>	<b>Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.5.2.1</b>	<b>Puffer und Lösungen für SDS-PAGE</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.5.2.2</b>	<b>Puffer und Lösungen für Western Blotting</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.5.2.3</b>	<b>Puffer und Lösungen für die Antikörperfärbung</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.5.3</b>	<b>Puffer und Lösungen für ELISAs</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.5.4</b>	<b>Puffer und Lösungen für Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>27</b>

---

2.1.5.5	Puffer und Lösungen für die Sirius-Red-Färbung .....	27
2.1.6	Antikörper .....	28
2.1.6.1	Primäre Antikörper .....	28
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper .....	28
2.1.7	Oligonukleotide (Primer).....	29
2.1.7.1	Oligonukleotide für die semiquantitative Real-Time RT-PCR muriner Gene .....	29
2.1.7.2	Oligonukleotide für die semiquantitative Real-Time RT-PCR humaner Gene ...	30
2.1.7.3	Oligonukleotide für die Sequenzierung des TP53-Gens .....	30
2.1.8	Organismen .....	31
2.1.8.1	Mäuse .....	31
2.1.8.2	Viren.....	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Arbeiten mit humanen Proben .....	32
2.2.1.1	Patienten mit NASH-assoziiertem hepatozellulären Karzinom .....	32
2.2.1.2	Patienten mit Hepatitis-assoziiertem hepatozellulären Karzinom .....	33
2.2.2	Arbeiten mit Versuchstieren .....	34
2.2.2.1	Versuchstierhaltung .....	34
2.2.2.2	C3H/HeNRj-Mäuse .....	34
2.2.2.3	Tiermodelle: DEN-induziertes HCC bei C3H/HeNRj-Mäusen .....	35
2.2.2.3.1	NASH-assoziiertes HCC-Modell .....	35
2.2.2.3.2	AAV-vermittelte hepatische Überexpression von Chemerin156 im HCC .....	36
2.2.2.4	Präparation.....	37
2.2.2.5	Tumorquantifizierung .....	38
2.2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	38
2.2.3.1	Arbeiten mit DNA .....	38
2.2.3.1.1	DNA-Isolierung .....	38

---

2.2.3.1.2	Bestimmung der DNA-Reinheit und -Konzentration .....	39
2.2.3.1.3	Sequenzierung – Bestimmung des TP53-Status .....	39
2.2.3.2	Arbeiten mit RNA.....	42
2.2.3.2.1	RNA-Isolierung.....	42
2.2.3.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	43
2.2.3.2.3	RNA-Aufreinigung für Microarray-Analysen.....	43
2.2.3.2.4	cDNA-Synthese .....	43
2.2.3.2.5	Expressionsanalyse via semiquantitativer Real-Time RT-PCR .....	44
2.2.3.2.6	Etablierung der Analyse von Genen via semiquantitativer Real-Time RT-PCR..	46
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen .....	47
2.2.4.1	Arbeiten mit Gewebeproben.....	47
2.2.4.1.1	Proteinisolierung für Western Blot .....	47
2.2.4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
2.2.4.1.3	SDS-PAGE .....	49
2.2.4.1.4	Western Blotting.....	50
2.2.4.1.5	Proteindetektion.....	50
2.2.4.1.6	Coomassie-Färbung.....	51
2.2.4.1.7	Quantifizierung von Proteinbanden .....	51
2.2.4.1.8	Proteinisolierung und Immunpräzipitation (IP) von hepatischem Chemerin für die Massenspektrometrie .....	51
2.2.4.2	Arbeiten mit Serum/Plasmaproben.....	53
2.2.4.2.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	53
2.2.5	Messung des oxidativen Stresses in der Leber .....	55
2.2.6	Histologische Untersuchungen .....	55
2.2.6.1	Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E) .....	55
2.2.6.2	Sirius-Red-Färbung.....	56
2.2.7	Statistische Auswertung.....	57

---

2.2.8	Versuche in Kooperationen bzw. Auftragsarbeiten .....	57
2.2.8.1	Bereitstellung humaner Leberproben .....	57
2.2.8.2	Massenspektrometrie von Proteinen .....	57
2.2.8.3	Massenspektrometrie von Lipiden .....	58
2.2.8.4	Sequenzierung von gDNA .....	58
2.2.8.5	Microarray-Analysen.....	58
2.2.8.6	Bestimmung der <i>ex vivo</i> -Bioaktivität von Serum-Chemerin mit Hilfe des Tango Assays .....	59
3	<b><u>Ergebnisse</u></b> .....	60
3.1	Chemerin in der murinen NASH.....	60
3.1.1	Versuchsablauf des NASH-HCC-Mausmodells .....	61
3.1.2	Körperliche Konstitution der Versuchstiere .....	61
3.1.3	Untersuchung der hepatischen Steatose .....	64
3.1.4	Untersuchung des Lipid- und Cholesterinmetabolismus.....	65
3.1.5	Untersuchung der hepatischen Fibrose und des oxidativen Stresses .....	68
3.1.6	Hepatische Chemerin- und CMKLR1-Expression.....	69
3.1.7	Quantifizierung und Bioaktivitätsmessung von Serum-Chemerin .....	71
3.1.8	Messung von Serum-Adiponektin und Quantifizierung der Tumore .....	72
3.1.9	Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 in Normal- und Tumorgeweben.....	73
3.2	Chemerin im murinen HCC .....	75
3.2.1	Versuchsablauf des HCC-Mausmodells .....	75
3.2.2	Körperliche Konstitution der Versuchstiere .....	76
3.2.3	Systemische und hepatische Chemerin-Expression .....	77
3.2.4	Einfluss von Ch156 auf die Anzahl und Größe von Hepatomen.....	78
3.2.5	Hepatische Chemerin-Expression in Normal- und Tumorgeweben .....	79

---

3.2.6	Einfluss von Ch156 auf die hepatische CMKLR1-Expression in Normal- und Tumorgeweben.....	81
3.2.7	Messung der <i>ex vivo</i> -Bioaktivität von Serum-Chemerin .....	82
3.2.8	Analyse der Chemerin-Isoformen im hepatischen Tumorgewebe.....	83
3.2.9	Einfluss von Ch156 auf die Expression von Entzündungs- und Immunzellmarkern.....	84
3.2.10	Einfluss von Ch156 auf die Expression von Fibrosemarkern.....	86
3.2.11	Einfluss von Ch156 auf die Expression von Genen für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese.....	88
3.2.12	Einfluss von Ch156 auf den Lipid- und Cholesterinmetabolismus .....	90
3.3	Untersuchungen im humanen HCC .....	97
3.3.1	Expression von Chemerin und CMKLR1.....	97
3.3.2	Expression und Sequenzanalyse des Tumorsuppressors TP53 .....	100
3.3.3	Analyse der Lipidzusammensetzung .....	106
3.3.3.1	Analyse der Phosphoglyzeride und Cholesterinester.....	107
3.3.3.2	Analyse der Sphingolipide .....	110
4	<u>Diskussion</u> .....	115
4.1	Chemerin in der murinen NASH.....	115
4.2	Chemerin im murinen HCC .....	119
4.3	Chemerin im humanen HCC.....	127
5	<u>Zusammenfassung</u> .....	134
6	<u>Anhang</u> .....	136
6.1	Publikationen und Kongressbeiträge .....	136
6.2	Publikationen .....	136
6.2.1	Erstautorenschaften .....	136

---

<b>6.2.2</b>	<b>Koautorenschaften .....</b>	<b>136</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Koautorenschaften - Übersichtsartikel .....</b>	<b>138</b>
<b>6.3</b>	<b>Kongressbeiträge .....</b>	<b>138</b>
<b>6.3.1</b>	<b>Vorträge .....</b>	<b>138</b>
<b>6.3.2</b>	<b>Poster .....</b>	<b>139</b>
<b>6.4</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>6.5</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>141</b>
<b>6.6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>6.7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>6.8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>161</b>

## 1 Einleitung

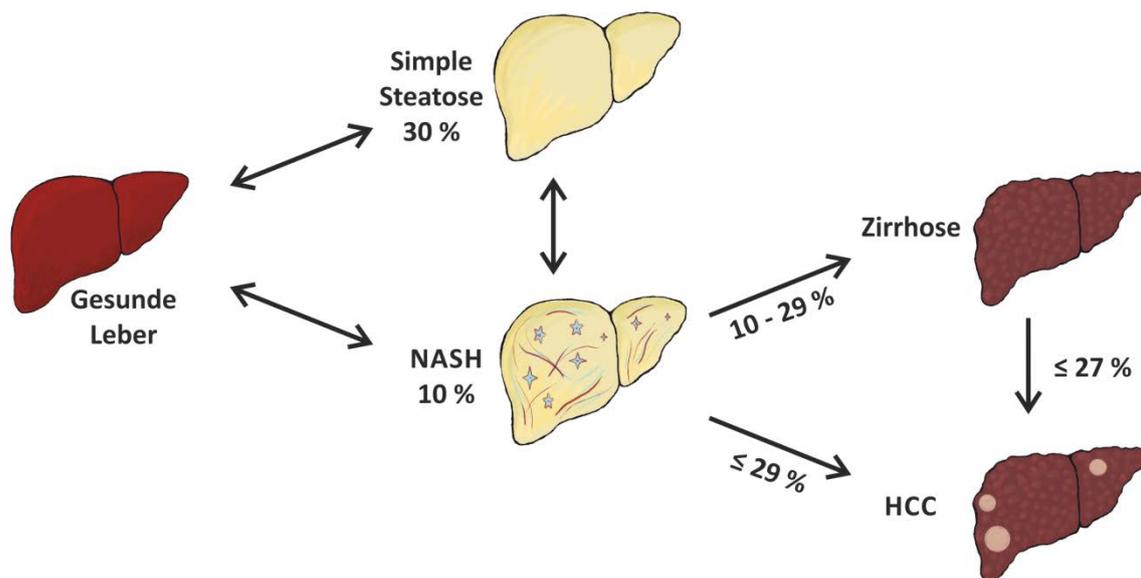
### 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

#### 1.1.1 Pathogenese des HCCs

Das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) ist mit weltweit jährlich einer halben Million Neuerkrankungen [1, 2] eine der am häufigsten auftretenden Tumorerkrankungen, wobei die Zahl der Neuerkrankungen ansteigt [3-6]. Dabei geht jeder dritte krebsbedingte Todesfall auf ein HCC zurück [1]. Es gibt verschiedene Ursachen, die die Entstehung eines HCCs begünstigen. Diese treten je nach geographischer Lage mit unterschiedlicher Häufigkeit auf, treiben jedoch gleichermaßen den Fortschritt zum HCC voran. Als Hauptursachen gelten Alkoholabusus, die chronische Infektion mit Hepatitis B/C-Viren sowie Übergewicht [2, 7].

Durch die ungesunde Lebensweise und die damit einhergehende zunehmende Fettleibigkeit der Bevölkerung [8] ist die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) inzwischen die häufigste Lebererkrankung, sowohl in der westlichen Bevölkerung als auch weltweit [9, 10]. Das Spektrum der NAFLD reicht von der simplen Hepatosteatose über die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) bis hin zum HCC, wobei die Übergänge der einzelnen Stadien fließend sind (Abbildung 1) [7, 11-13].

In Industrieländern ist bei circa 30 % der Bevölkerung eine exzessive Speicherung von Triglyzeriden in den Hepatozyten nachweisbar [14]. Geht die Fetteinlagerung in der Leber aufgrund der Schädigung der Hepatozyten mit Entzündung und Fibrose einher, so entwickelt sich daraus eine NASH [11]. Dies ist bei circa 10 % der Patienten mit Hepatosteatose der Fall [15]. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es infolge des Wundheilungsprozesses der Hepatozyten zur Vernarbung des Gewebes, die mit einem zunehmenden Funktionsverlust der Leber einhergeht [16, 17]. Dies führt bei 10 - 29 % der Patienten zu einer Leberzirrhose, die bei bis zu gut einem Viertel der Betroffenen ( $\leq 27\%$ ) in einem HCC resultiert [7, 13]. Bei bis zu 29 % der HCC-Patienten entsteht das HCC hingegen in der nicht-zirrhosen Leber [18-20]. Welche Faktoren die Progredienz der NASH zum HCC fördern, ist noch nicht genau bekannt [13]. Derzeit werden verschiedene Faktoren wie oxidativer Stress, Adipokine, Zytokine, aber auch der Einfluss der Umwelt sowie des genetischen Hintergrunds diskutiert [21-24].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Progression der NAFLD zum HCC.** Das erste Stadium der NAFLD ist die Steatose, die durch die Akkumulation von Triglyzeriden und weiteren Lipiden in den Hepatozyten charakterisiert ist. Wird die Steatose von Entzündungsreaktionen und Fibrose begleitet, so schreitet die Krankheit voran zur NASH. In der NASH-assoziierten Zirrhose ist die Funktion der Leber zunehmend beeinträchtigt. Letztlich können sich in der zirrhotischen, aber auch in der nicht-zirrhotischen Leber, Tumore ausbilden. Weltweit gesehen, entsteht so pro Jahr bei circa 500.000 Menschen ein HCC. (NAFLD, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; NASH, Nicht-alkoholische Steatohepatitis; HCC, Hepatozelluläres Karzinom). (Abgeändert nach [13]).

In vielen verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorerkrankungen wie das HCC oftmals mit Übergewicht assoziiert sind. Dabei liegt der Fokus der Arbeiten häufig auf Adipokinen, wie dem Appetit-zügelnden Leptin und dem protektiv-wirkenden Adiponektin, welche bei Übergewicht erhöht bzw. erniedrigt sind [25-27]. Das Zusammenspiel dieser beiden Adipokine führt zum einen zur Aktivierung inflammatorischer Signalwege wie z. B. Akt/mTOR, zum anderen zum Fortschreiten der NAFLD und zur Tumorentstehung [28]. Chemerin ist ein weiteres Adipokin, dessen Serumspiegel positiv mit dem *Body-Mass-Index* (BMI) [29] sowie mit erhöhten inflammatorischen Proteinen korreliert [30]. Der Anstieg des Serum-Chemerins geht dabei primär auf eine gesteigerte Chemerin-Synthese im Fettgewebe zurück [29-32]. In verschiedenen Tumorerkrankungen [33-37] – darunter auch im HCC – ist das Adipokin Chemerin im Tumorgewebe im Vergleich zum angrenzenden gesunden Gewebe niedriger exprimiert und damit einhergehend mit einer schlechten Prognose assoziiert [38].

Genetische Veränderungen, die in der Pathogenese des HCCs eine Rolle spielen, betreffen häufig das Tumorsuppressorgen TP53 (TP, Tumorprotein). Das Protein p53 reguliert den Zellzyklus, die DNA-Reparatur und die Apoptose. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass seine Expression im HCC induziert ist und dies mit einer schlechten Prognose einhergeht [39-41]. Bei Aflatoxin B1-induziertem HCC gilt der Nachweis mutierter TP53-DNA im Plasma sogar als HCC-Biomarker [42].

Die Expression bzw. Stabilisierung des Transkriptionsfaktors p53 wird unter anderem über die E3 Ubiquitin Ligase MDM2 reguliert (MDM2/HDM2, *murine/humane Double Minute 2*) [43-45], welche entscheidend zur p53-Akkumulation im Tumorgewebe beiträgt [45]. In der gesunden Zelle wird p53 durch MDM2 inhibiert, indem es zum einen durch die MDM2-Bindung blockiert wird, zum anderen simultan dazu ubiquitinyliert und abgebaut wird oder alternativ aus dem Kern transportiert wird. Liegt hingegen eine Schädigung der DNA vor, so wird p53 phosphoryliert und MDM2 kann nicht binden. Auf diese Weise wird p53 stabilisiert und kann den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur einleiten. MDM2 selbst wird wiederum über p53-spezifische *response*-Elemente induziert, sodass beide Proteine über den MDM2-p53-*feedback loop* reguliert werden. Durch diesen komplexen Regelkreis entsteht ein Gleichgewicht zwischen p53 und MDM2. Wird dieser *feedback loop* gestört, z. B. durch mutiertes p53, so akkumuliert mutiertes p53-Protein [43]. In der Regulation von p53 sind neben MDM2 noch viele weitere Proteine wie z. B. MDM4, ARF (*ADP ribosylation factor*) und Proteine der Bcl-2-Familie involviert (Bcl, *B-cell lymphoma*) [43, 44]. In der Leber und im HCC spielt der MDM2-p53-*feedback loop* wohl auch eine Rolle, wobei der genaue Mechanismus, der zur p53-Akkumulation führt, noch nicht geklärt ist [43].

Ein weiteres gut beschriebenes HCC-assoziiertes Gen ist das *Fatty Acid-Binding Protein 5* (Fabp5). Es wird in verschiedenen Tumorgeweben, darunter auch im HCC-Gewebe [46], im Vergleich zum parakarzinomatösen Gewebe überexprimiert [47-52]. Es fördert das Tumorwachstum und die Metastasierung. Zudem ist Fabp5 positiv mit einer hohen Rückfallquote und schlechten Prognose für den Patienten assoziiert. Der Grund hierfür liegt in der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die Fabp5 bewirkt [46]. Bei der EMT verlieren Epithelzellen ihre Polarität und erlangen mesenchymale Eigenschaften, wie z. B.

die Fähigkeit zur Migration und zur Sekretion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. In der Embryogenese, der Organbildung oder der Wundheilung ist dieser Prozess essentiell, jedoch kann eine dysregulierte EMT auch die Fibrosierung von Geweben sowie die Invasion und Metastasierung von Tumoren fördern [53, 54].

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen gesunden und Tumorzellen wird in deren Lipidom deutlich [55]. Lipide und Fettsäuren übernehmen viele wichtige Aufgaben im Organismus. So dienen beispielsweise Fettsäuren, die als Triglyzeride gespeichert werden, als Energiereservoir für den Körper [56]. Sterole, Sphingolipide und Phosphoglyzeride hingegen sind die Hauptstrukturkomponenten der Zellmembranen [57, 58]. Des Weiteren können Lipide die Funktion von Signalmolekülen in Form von *second messengern* oder Hormonen einnehmen [59]. Alles in Allem hat die Zusammensetzung der Lipide Effekte auf die Funktionalität der Zellmembranen, auf die Zellproliferation, aber auch auf den Zelltod. In Tumorzellen kommt es zu Veränderungen des Lipidmetabolismus und folglich zu Beeinträchtigungen der Energiehomöostase, der Signalwege und der Membranstruktur. Letztlich sind auch Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen aufgrund der Lipidzusammensetzung beeinflusst [60, 61]. Der Leber kommt im Lipidstoffwechsel eine große Bedeutung zu, da in ihr die *de novo* Lipogenese, die Lipoproteinsynthese und verstärkt die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zur Energiegewinnung stattfindet. Bei der *de novo* Lipogenese spielen unter anderem SREBP-1c, FAS und SCD1 eine Rolle (SREBP-1c, *Sterol regulatory element-binding protein-1*; FAS, *Fatty Acid Synthase*; SCD1, *Stearyl-CoA-Desaturase 1*) [62].

Bei der Entstehung des HCCs findet bereits in einem frühen Stadium der Pathogenese eine Veränderung des Lipid- und Cholesterinstoffwechsels statt, um den erhöhten Energiebedarf des Tumors decken zu können [63]. Eine gängige Methode, die Lipidzusammensetzung in Normal- und Tumorgewebe zu quantifizieren, ist die Massenspektrometrie [64, 65]. Ihr Prinzip beruht auf der Ionisierung der Moleküle und der damit einhergehenden Erzeugung von Ionen. Diese können dann entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses in einem Magnetfeld aufgetrennt und so das spezifische Massenspektrum aufgezeichnet werden [66]. Auf diese Weise können die einzelnen Moleküle nachgewiesen und quantifiziert werden und etwaige Unterschiede ermittelt werden.

### 1.1.2 Diagnose und Therapie des HCCs

Das HCC wird meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da in den frühen Stadien beim Patienten keine Symptome auftreten. Diese zeigen sich erst, wenn sich das HCC auf große Teile der Leber ausgebreitet hat. Allerdings kann dann nur noch unzureichend therapiert werden [28]. Aus diesem Grund ist eine frühe Diagnose für das Überleben des Patienten entscheidend [67].

Der am häufigsten zur Diagnose herangezogene HCC-Marker ist der Serummarker  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) [68]. AFP spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine Rolle [69], seine Expression ist im Erwachsenenalter jedoch reprimiert [70]. Als HCC-Serummarker kann AFP verwendet werden, da es von Hepatomzellen vermehrt exprimiert und ins Blut abgegeben wird. Ab einer AFP-Serumkonzentration von 20 ng/ml wird eine positive HCC-Diagnose gestellt. Die Spezifität und Sensitivität dieses Markers ist jedoch nicht hoch genug, um insbesondere als Biomarker für kleine Tumore verwendet werden zu können [71]. Eine weitere Einschränkung ist, dass Patienten mit chronischer Hepatitis oder Zirrhose ein erhöhtes AFP-Level haben können und daher der AFP-Wert zu einer falsch-positiven HCC-Diagnose führen kann [70, 72]. Eine höhere Sensitivität und Spezifität zeigt die Untersuchung der AFP-L3-Isoform (*lens culinaris agglutinin-reactive fraction of AFP*), da diese die häufigste AFP-Isoform im Serum von HCC-Patienten ist [70, 73]. Maligne Leberzellen produzieren bereits in frühen HCC-Stadien diese Isoform und AFP-L3-positive Hepatome deuten auf einen aggressiven Verlauf der Erkrankung hin [70, 74].

Ein weiterer Serummarker, der zur HCC-Diagnose herangezogen wird, ist Des- $\gamma$ -Carboxy Prothrombin (DCP). DCP ist eine anormale, funktionslose Variante des Gerinnungsfaktors Prothrombin, die von der Leber synthetisiert wird [70]. Was zum DCP-Anstieg bei HCC-Patienten führt ist jedoch noch nicht geklärt [70, 75, 76]. Im Vergleich zu AFP scheint DCP im Hinblick auf die Früherkennung kleinerer Hepatome bei NASH-Patienten sensitiver zu sein [77].

Einige Studien zeigen eine höhere HCC-Detektionsrate, sofern mehrere der Marker AFP, AFP-L3 oder DCP kombiniert untersucht werden [78-81]. Eine der Studien konnte anhand der Kombination der Serummarker sogar Rückschlüsse auf die Tumorprogression, das

*Staging* des Tumors und das Überleben des Patienten ziehen [79]. Dies konnte jedoch nicht in allen Studien beobachtet werden [82].

Mit Hilfe von Ultraschall-Untersuchungen können die Steatose und die Fibrose beurteilt und auch Tumore in der Leber nachgewiesen werden. Diese werden bei Patienten mit Leberzirrhose in der Regel alle sechs Monate durchgeführt, um mögliche Hepatome frühzeitig zu erkennen [83, 84]. Zur HCC-Diagnose können weitere nicht-invasive Verfahren, wie die Kontrastmittelsonographie (*contrast-enhanced ultrasound*, CEUS), Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT), herangezogen werden [85]. Dabei treten die Hepatome aufgrund des veränderten Kontrastverhaltens des Tumorgewebes im Vergleich zum gesunden Lebergewebe in Erscheinung.

Als Goldstandard zur Sicherung der Diagnose gilt dennoch weiterhin die Gewebebiopsie (*fine-needle biopsy*, FNB). Die dabei entnommenen Gewebeproben werden für histologische und molekularbiologische Nachweisverfahren verwendet [83, 84].

Ist das HCC diagnostiziert, können je nach dessen Ausmaß und dem Zustand des Patienten verschiedene Therapieoptionen herangezogen werden [86, 87]. Sofern das HCC singular oder oligonodulär ist, also nur ein kleiner Teil der Leber betroffen ist, empfiehlt die *European Association for the Study of the Liver* (EASL) eine kurative Therapie [86]. Bei einem chirurgischen Eingriff kann der tumoröse Teil der Leber durch eine Leberresektion vollständig entfernt werden, wobei der funktionsfähige Teil der Leber zurückbleibt. Die 5-Jahres-Prognose bei Patienten mit kleineren Hepatomen liegt bei 63 %, mit größeren Hepatomen bei knapp 40 % [88]. Bei zirrhotischen Patienten hingegen ist die Resektion meist nicht möglich, da das verbleibende Lebergewebe die Organfunktion nicht aufrecht erhalten kann oder eine hohe Rückfallquote besteht [89]. Folglich ist bei zirrhotischen HCC-Patienten die Lebertransplantation oftmals die beste Therapieform, da dabei auch die Zirrhose, also die zugrundeliegende Lebererkrankung, therapiert wird. Durch eine Transplantation kann im Vergleich zur Resektion die 5-Jahres-Prognose von 51 % auf 60 % gesteigert werden [89]. Voraussetzung hierbei ist jedoch, dass der Tumor noch nicht gestreut hat und im besten Fall uni- oder binodulär ist [90].

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit bei oligonodulärem HCC stellt die Lokalablation dar, bei welcher das Tumorgewebe durch Erhitzen auf über 100 °C zerstört wird. Bei der Radiofrequenzablation (RFA) wird die Hitzeentwicklung mit Hilfe einer Sonde, die Radiofrequenzwellen aussendet, bewirkt [91]. Das vollständige Entfernen des Tumorgewebes wirkt sich dabei positiv auf das Überleben des Patienten aus [92]. Die Rückfallquote kann reduziert werden, indem nicht nur das Tumorgewebe, sondern auch umliegendes Gewebe mit möglichen Mikrometastasen oder mikrovaskulärer Invasion zerstört wird [85]. In einer Studie mit 1170 HCC-Patienten konnte durch mehrfache RFA-Therapie eine Überlebensrate von 96 % nach einem Jahr, von 80 % nach drei Jahren und von über 27 % nach 10 Jahren erreicht werden. Dabei ist der Erfolg der RFA entscheidend von der Tumorgröße und -anzahl abhängig. Bei früh-diagnostizierten HCCs ist die RFA daher eine der ersten Therapieansätze [93]. Die Wirksamkeit der RFA bei kleineren Tumoren ist mit der Leberresektion vergleichbar [94].

Kann ein Tumor aufgrund seiner Größe oder Multinodularität weder operativ noch lokalablativ entfernt werden, so wird häufig auf die Transarterielle Chemo-Embolisation (TACE) zurückgegriffen [86]. Diese Therapie kombiniert das Prinzip der Chemotherapie mit der Embolisation, also dem Verschluss der tumorversorgenden Blutgefäße [95]. Hierbei ist von Bedeutung, dass das Tumorgewebe fast ausschließlich über die Leberschlagader (*Arteria hepatica*) versorgt wird, gesundes Gewebe hingegen vor allem über die Pfortader [96]. Bei der TACE werden durch die gezielte Injektion kleiner Kunststoffkügelchen die tumorversorgenden Gefäße verschlossen, sodass dessen Blutversorgung zusammenbricht und dieser abstirbt. Zeitgleich wird bei der TACE ein Chemotherapeutikum direkt in den Tumor injiziert, das ebenfalls das Absterben des Tumors hervorruft [97]. Bei nicht-operablen HCCs wird auch eine kombinierte Therapie aus TACE und anschließender RFA angewandt [98, 99]. In einer Kohorte zirrhotischer HCC-Patienten konnte durch diese Therapie eine Überlebensrate von knapp 90 % nach 6 Monaten bzw. von 50 % nach 28 Monaten erreicht werden [98]. Die EASL empfiehlt derzeit TACE für HCC-Patienten mit intermediärem HCC-Status [86].

Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Transarterielle Radioembolisation (TARE) bzw. Selektive Interne Radiotherapie (SIRT). Hierbei werden Kügelchen, die radioaktiv strah-

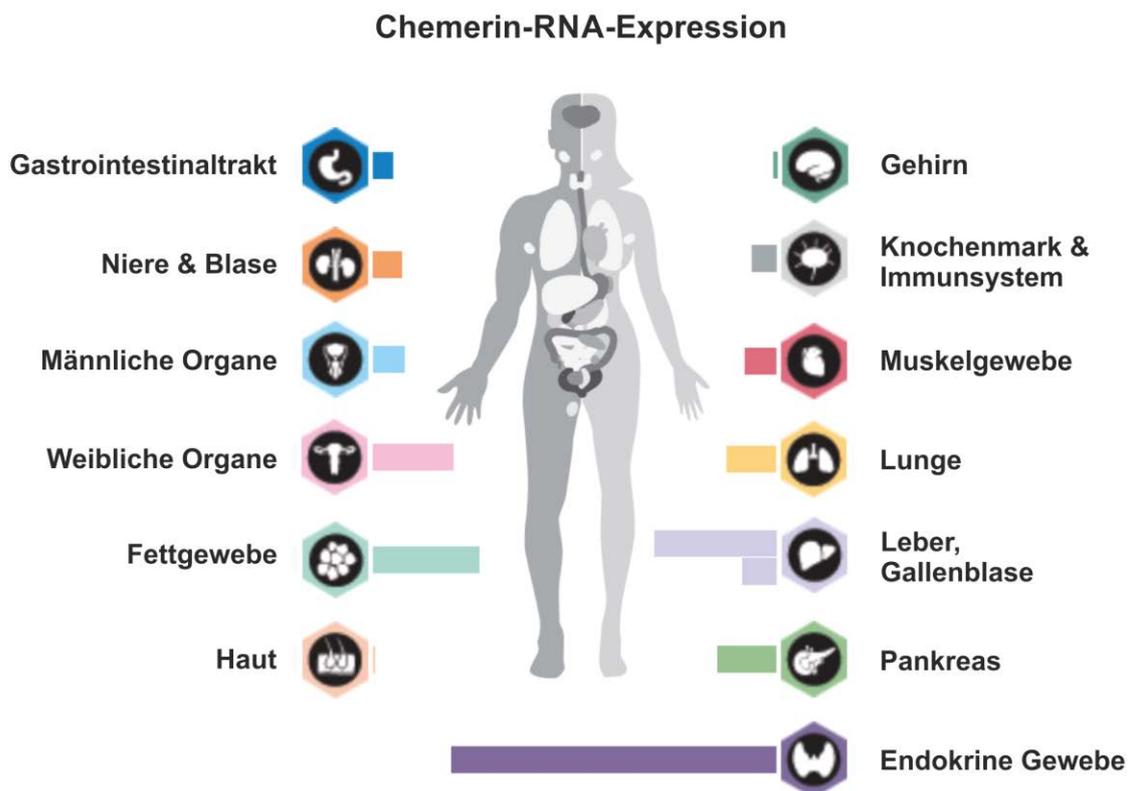
lendes 90-Yttrium enthalten, in die Leberschlagader (*Arteria hepatica*) injiziert [100]. Diese embolisieren wiederum die tumorversorgenden Gefäße und bewirken zusätzlich eine lokale Chemotherapie durch radioaktive Bestrahlung des Tumorgewebes mit hoher Dosis [101]. Derzeit laufen zwei klinische Studien, die die Wirksamkeit dieser Therapiemöglichkeit evaluieren (NCT01556490 [102], NCT01887717 [103]). Die EASL sieht Potential in dieser Methode, empfiehlt sie derzeit jedoch noch nicht explizit für die Behandlung des HCCs [86].

Für HCC-Patienten mit fortgeschrittenem HCC-Status empfiehlt die EASL derzeit Sorafenib, einen synthetisch hergestellten Multi-Kinase-Inhibitor ( $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ ) [86]. Sorafenib wird systemisch verabreicht und ist, sofern keine kurative Therapie mehr möglich ist, derzeit die beste Behandlungsmöglichkeit [104]. Der Multi-Kinase-Inhibitor wirkt auf die Rezeptoren des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) und des Blutplättchen-Wachstumsfaktors (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) sowie auf die Raf-Proteinkinase (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). Auf diese Weise werden die Proliferation und Angiogenese der Tumorzellen inhibiert und deren Apoptose-Rate gesteigert [105-107]. Durch die Sorafenib-Behandlung kann das Leben der betroffenen Patienten im Schnitt um drei Monate verlängert werden [106]. Derzeit sind jedoch keine molekularen oder klinischen Marker bekannt, mit Hilfe derer diejenigen Patienten ausfindig gemacht werden könnten, für die die Sorafenib-Therapie optimal wäre. Für HCC-Patienten, die nicht auf Sorafenib ansprechen, gibt es gegenwärtig keine alternative Therapiemöglichkeit [86].

## 1.2 Chemerin und seine Rezeptoren

### 1.2.1 Expression und Prozessierung von Chemerin

Chemerin wurde im Jahr 1997 als ein durch das Retinoid Tazaroten induziertes Gen in der Haut entdeckt [108]. Daher wird es auch als *Retinoic Acid Receptor Responder 2* (RAR-RES2) oder *Tazarotene-induced Gene 2* (TIG2) bezeichnet. Chemerin wird primär von Adipozyten synthetisiert und gehört daher zu den Adipokinen, den Signalmolekülen des Fettgewebes [109]. Die Leber setzt ebenfalls Chemerin frei, wobei die Synthese vor allem auf die Hepatozyten, zu einem geringeren Teil aber auch auf die Sternzellen, zurückgeht [110]. Weitere Gewebe, die Chemerin produzieren, sind endokrine Gewebe wie die Nebenniere und Nebenschilddrüse, die Ovarien, der Pankreas und die Lunge (Abbildung 2) [111].

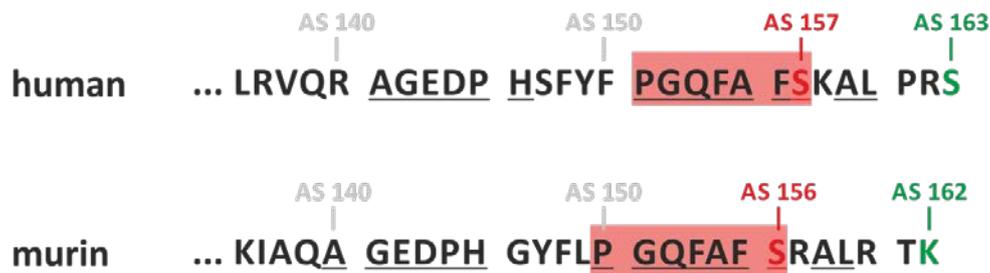


**Abbildung 2: Übersicht der Chemerin-mRNA-Expression des *Human Protein Atlas*.** Chemerin wird neben der Leber, vor allem in den endokrinen Geweben, der Lunge, dem Pankreas, den Ovarien und dem Fettgewebe exprimiert. Die Stärke der Expression ist in Form von Balken dargestellt (abgeändert nach [111]).

Chemerin (Ch) wird zunächst als inaktives Präprochemerin, das beim Menschen 163 Aminosäuren (Ch1-163) lang ist, synthetisiert. Nach endogener proteolytischer Abspaltung eines kurzen Signalpeptids am N-Terminus wird Chemerin als inaktives Vorläufer-Protein (Prochemerin, Ch21-163) ins Blut sezerniert [112-114]. Sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung von Chemerin erfolgt über Proteasen der Entzündungs-, Blutgerinnungs- und fibrinolytischen Kaskaden. Diese modifizieren mittels proteolytischer Spaltungen die Länge des C-Terminus [115]. Da nach der Sekretion des Proteins ausschließlich die Länge des C-Terminus für die Aktivität von Bedeutung ist, ist die letzte Aminosäureposition des Proteins für die Nomenklatur der Isoformen entscheidend. Die höchste Aktivität wird der Isoform Ch157 zugeschrieben. Es kann einerseits direkt durch die Abspaltung von sechs Aminosäuren (-6 AS) von Prochemerin Ch163 durch Elastase entstehen. Andererseits kann es durch einen mehrstufigen Prozess – über die Spaltung durch Plasmin / Tryptase (-5 AS) zum mäßig-aktiven Ch158 – und anschließender Spaltung durch die Carboxypeptidasen N oder B (-1 AS) hervorgehen. Ch156 besitzt hohe Aktivität und entsteht durch Cathepsin G-Spaltung (-7 AS) aus Prochemerin Ch163. Die Inaktivierung erfolgt durch die Spaltung mit Chymase (-3 AS) zu Ch154 oder mit ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) (-2 AS) zu Ch155 [112-114]. Die Aussagen zur Aktivität von Chemerin beziehen sich jedoch lediglich auf einen durch Chemerin regulierten Signalweg. Da dieses Adipokin verschiedene Signalwege aktiviert, könnten bisher als wenig-aktiv bezeichnete Isoformen in Bezug auf andere Signalkaskaden hochaktive Moleküle darstellen.

Ergänzend hierzu ist zu sagen, dass das murine und humane Chemerin homologe Proteine sind und deren Aminosäuresequenzen über weite Teile konserviert sind (Abbildung 3) [116, 117].

Dabei ist das murine Präprochemerin (Ch162; NCBI HomoloGene, Referenzsequenz NP\_082128.1) eine Aminosäure kürzer als das humane (Ch163; NCBI HomoloGene, Referenzsequenz NP\_002880.1). Folglich entspricht das hochaktive C-terminale Aminosäuremotiv „PGQFAFS“ beim humanen Protein der Isoform Ch157, beim murinen der Isoform Ch156 (Abbildung 3) [118].



**Abbildung 3: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem und murinem Präprochemerin.** Humanes Präprochemerin umfasst 163 Aminosäuren (AS), murines lediglich 162 AS (grün). Bei der Prozessierung zu hochaktivem Chemerin (rot) werden bei beiden Spezies die letzten sechs C-terminalen AS abgespalten. Sowohl beim humanen als auch beim murinen Chemerin entsteht so am C-Terminus das hochkonservierte AS-Motiv „PGQFAFS“ (rosé hinterlegt) [117, 118]. Dieses endet im humanen Protein an AS-Position 157, beim murinen an AS-Position 156 (rot). Homologe Proteinbereiche beider Spezies sind unterstrichen. Die Referenzsequenzen wurden NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) entnommen (human, NP\_002880.1; murin, NP\_082128.1).

Im Körper können daher abhängig von der proteolytischen Prozessierung verschiedene Isoformen nachgewiesen werden [119-121]. Kann die gewählte Nachweismethode nicht zwischen den einzelnen Isoformen unterscheiden, so wird von Gesamt-Chemerin gesprochen.

Im Serum des Menschen zirkuliert primär inaktives Prochemerin (Ch163) [119, 122]. Dieses kann dann lokal durch verschiedene Proteasen gespalten und so gewebespezifisch aktiviert bzw. wieder inaktiviert werden [113]. Durch Übergewicht kommt es sowohl beim Menschen als auch bei murinen Modellorganismen zu einer Erhöhung des Gesamt-Serum-Chemerin-Spiegels [29-32], was auf eine vermehrte Chemerin-Synthese im Fettgewebe zurückzuführen ist. Allerdings steht hier – relativ zum Gesamt-Chemerin – sogar weniger aktives Ch157 zur Verfügung [119, 120]. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass weniger Chemerin aktiviert wird oder aber das aktive Chemerin schneller abgebaut wird. Letzteres könnte auf eine fehlerhafte Prozessierung zurückgehen [120]. Dies steht in Einklang mit einer weiteren humanen Studie, in der Chang *et al.* viele relativ kurze Chemerin-Isoformen im Plasma von übergewichtigen Probanden entdecken konnten. Ob diese jedoch lediglich inaktive Abbauprodukte sind oder eine biologische Bedeutung, z. B. als Antagonisten für aktives Chemerin, haben, ist noch nicht geklärt [119]. Bei krankhaft übergewichtigen Patienten korrelieren die erhöhten systemischen Gesamt-Chemerin-Werte mit Insulinresistenz und Biomarkern der geschädigten Leber, wie z. B. Entzündungsparametern und Dyslipidämie [32].

Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Crohn, ulzerativer Colitis, chronischer Pankreatitis, NAFLD oder Zirrhose sind die systemischen Chemerin-Werte erhöht [123-125]. Mit zunehmender Schwere der Zirrhose bricht jedoch die Leberfunktion und damit einhergehend der Serum-Chemerin-Spiegel ein [126, 127]. HCC-Patienten, deren Lebertumore häufig als Komplikation einer Zirrhose entstehen, zeigen ebenfalls niedrige Serum-Chemerin-Werte [128]. Dabei ist ein weniger stark verringertes systemisches Chemerin positiv mit dem Überleben und negativ mit der Rückfallquote assoziiert [128]. In einer weiteren Studie, konnte dieser protektive Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden [127].

Darüber, wie sich die hepatische Chemerin-Expression bei Erkrankungen der Leber verändert, kann noch kein abschließendes Fazit gezogen werden, da die publizierten Daten in keine einheitliche Richtung deuten. Zur NAFLD gibt es Daten, die auf ein verringertes oder stagnierendes Chemerin-Level hindeuten [110, 113, 129-131]. Zwei Studien zur Chemerin-Expression in NASH-Lebern hingegen konnten zeigen, dass die mRNA-Expression in NASH-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht ist [129, 132]. Dies wird bekräftigt durch ein Mausmodell, in welchem durch eine Diät-induzierte NASH das Chemerin-Protein verstärkt exprimiert wird [110]. Wie sich die hepatische Chemerin-Expression in der Zirrhose verändert, ist noch nicht genau beschrieben. Es ist bekannt, dass die zirrhotische Leber verstärkt Chemerin synthetisiert [30]. Ob der Anstieg jedoch primär auf eine vermehrte Expression der Hepatozyten oder der Sternzellen zurückgeht, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.

Des Weiteren konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die Chemerin-Expression in Tumorgewebe verändert ist. Beim Melanom, beim Brust-, Nebennieren-, Lungen-, Colon- und Prostatakarzinom, sowie dem HCC, ist die Chemerin-Expression im Vergleich zum angrenzenden gesunden Gewebe reduziert [34-38]. Dabei ist eine geringere Chemerin-Expression mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert [38, 128]. Damit im Einklang steht eine Studie, die in HCC-Tiermodellen bereits einen protektiven Effekt der Chemerin-Überexpression nachweisen konnte [128].

### 1.2.2 Funktion von Chemerin

Chemerin wurde den Adipokinen zugeschrieben, als entdeckt wurde, dass es von murinen und humanen Adipozyten synthetisiert wird [29, 109]. Es reguliert auf auto- und parakrine Weise die Differenzierung und den Metabolismus der Adipozyten [133]. Im Fettgewebe werden vor allem die aktiven Chemerin-Isoformen exprimiert, was deren Rolle bei der Adipogenese verdeutlicht [119]. Des Weiteren beeinflusst Chemerin die Expression von Genen, die den systemischen Lipid- und Glukosemetabolismus regulieren, wie z. B. Glukosetransporter-4 (GLUT4), Perilipin, Hormon-sensitive Lipase (HSL) und Adiponektin [109, 134]. Da Plasma-Chemerin zudem mit den Plasma-Triglyzeriden, dem Plasma-HDL, dem BMI und dem Blutdruck der Patienten assoziiert ist, wird ihm eine Rolle in der Entwicklung des metabolischen Syndroms zugeschrieben [29, 135-137]. Bezüglich des Blutdrucks konnten Kennedy *et al.* zeigen, dass Chemerin diesen direkt beeinflussen kann, indem es die Vasokonstriktion der Gefäße hervorruft [138]. Zudem fördert Chemerin die Angiogenese durch Induktion der Endothelzellmigration und der Kapillarbildung [139]. Somit ist Chemerin an einem der grundlegenden Prozesse des Gewebewachstums beteiligt. Möglicherweise übernimmt Chemerin aufgrund seiner hohen Expression insbesondere im Fettgewebe die Aufgabe der Bildung neuer Blutgefäße, was die Wechselbeziehung von Chemerin und Übergewicht bekräftigt [140].

Weiterhin spielt Chemerin eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, wobei hier sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte beschrieben wurden [141]. Dies könnte sich zum einen aus der Verteilung der Chemerin-Isoformen, die – wie bereits beschrieben – verschiedene Bioaktivitäten besitzen, ableiten [142]. Zum anderen wird angenommen, dass Chemerin initial die Entzündung verstärkt, wodurch Prozesse, welche die Entzündungsreaktion beenden und anti-inflammatorische Mechanismen beinhalten, aktiviert werden [141-143]. Hierbei wird zunächst infolge der Entzündung proinflammatorisches Chemerin produziert, das chemotaktisch auf Immunzellen wie Neutrophile, natürliche Killerzellen (NK), dendritische Zellen (DC) oder Makrophagen wirkt [38, 142]. Diese werden somit zum Ort der Entzündung rekrutiert. Dabei sind Neutrophile in der Regel die ersten Immunzellen, die am Entzündungsherd ankommen. Diese setzen dort unter anderem die Serin-Protease Proteinase 3 (PR3) frei, welche zur Spaltung von Ch163 zum gering-aktiven

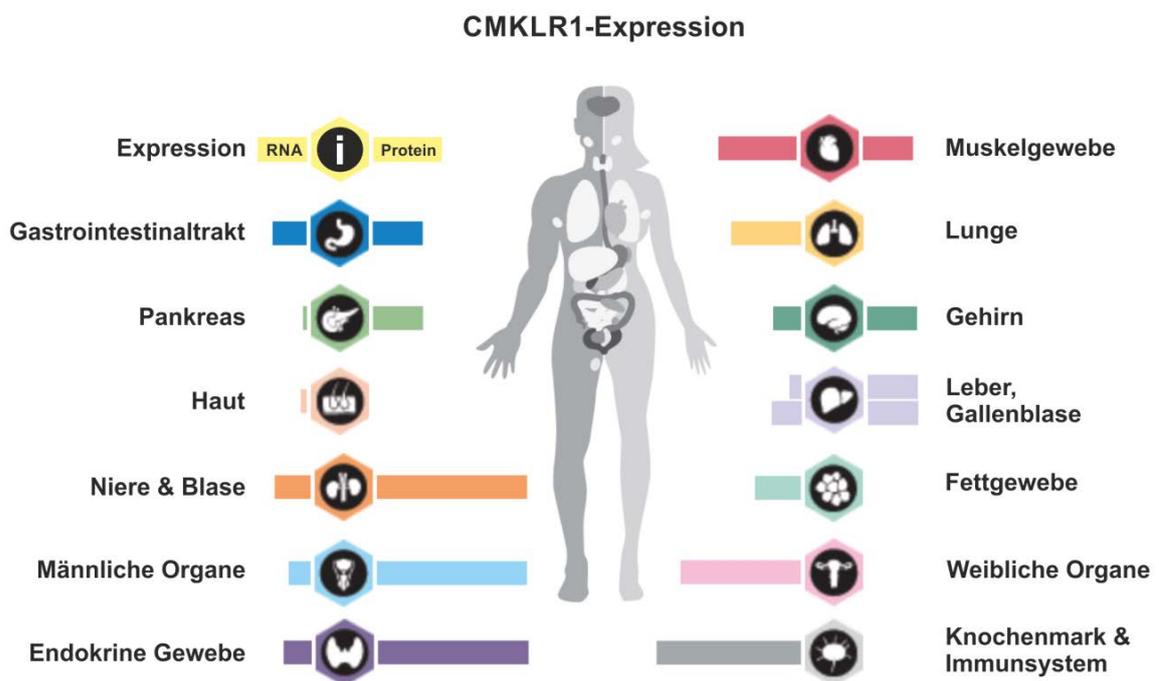
Ch155 führt [142-144]. Hierbei ist anzumerken, dass die Serin-Protease PR3 nicht nur lokal die Chemerin-Aktivität reguliert, sondern auch die Menge an verfügbarem Ch163 modifiziert, was sich wiederum auf die gesamte proteolytische Kaskade auswirkt [144]. Des Weiteren setzen rekrutierte Mastzellen am Entzündungsherd Chymasen frei, die aktives Ch157, aber auch Ch156, zu inaktivem Ch154 abbauen [144]. Auf diese Weise kommt es nach Ankunft der ersten Immunzellen zur lokalen Inaktivierung von Chemerin und somit zur Verringerung der chemotaktischen Wirkung [142, 144]. Die Hauptaufgabe der etwas später ankommenden aktivierten Makrophagen ist die Phagozytose. Sie setzen unter anderem auch Cystein-Proteasen wie Calpain oder Cathepsin S frei, die zur Bildung von anti-inflammatorisch wirkenden Chemerin-Isoformen führen (mCh140-154, mCh23-154, hCh21-155; m, murin; h, human). Diese besitzen eine reduzierte chemotaktische Wirkung, die die Rekrutierung weiterer Immunzellen verringert. Auf diese Weise wirken die von den Immunzellen freigesetzten Proteasen durch proteolytische Spaltung von Chemerin anti-inflammatorisch und führen schrittweise zur Abschwächung der Immunreaktion [142]. Dieser Mechanismus macht erneut deutlich, wie das komplexe Zusammenspiel vieler Proteasen die Bioaktivität von Chemerin reguliert.

DCs und NK-Zellen wird auch eine anti-karzinogene Rolle zugeschrieben [38, 145]. Lin *et al.* konnten zeigen, dass HCC-Gewebe eine geringere Chemerin-Expression zeigen als das parakarzinomatöse Gewebe. Dabei korrelierte die Infiltration mit DCs und NK-Zellen mit der Expressionsstärke von Chemerin. Des Weiteren waren die Tumore größer, je geringer die Chemerin-Expression und je geringer die Infiltration mit DCs und NK-Zellen waren. Dabei hatten Patienten mit niedriger Chemerin-Expression auch eine kürzere Überlebensrate. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Herabregulation der Chemerin-Expression ein Schritt hin zur Tumorentstehung und -progression sein könnte [38]. Zudem konnte in verschiedenen Tiermodellen eine anti-karzinogene Wirkung von Chemerin gezeigt werden. So findet bei einem Hepa1-6-Xenograft-Modell eine stärkere Tumourprogression in Chemerin-Knockout-Mäusen (*Rarres2<sup>-/-</sup>*) als in Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) statt [128]. Die Tumore im Hepa1-6-Xenograft-Modell sind kleiner, wenn die injizierten Hepa1-6-Zellen Chemerin überexprimieren. Ebenso wirkt sich die Injektion von Chemerin in den Tumor auf dessen Wachstum aus, sodass dieser weniger stark proliferiert [128].

Dabei konnte ein indirekter Tumor-inhibierender Effekt von Chemerin nachgewiesen werden, der die inflammatorische Mikroumgebung des Tumors beeinflusst. Entscheidend involviert sind hierbei vor allem Interferon- $\gamma^+$  T-Zellen, eine verringerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und IL-6-Expression (Interleukin-6) sowie eine reduzierte Angiogenese [128].

### 1.2.3 Chemerin als Ligand verschiedener Rezeptoren

Seine Funktionen übt Chemerin primär über zwei Rezeptoren aus, wobei bisher vor allem der *Chemokine-like Receptor 1* (CMKLR1, ChemR23) gut untersucht ist [114]. Dieser Rezeptor wird auf vielen Zelltypen in verschiedensten Geweben des Körpers exprimiert, was seine Multifunktionalität nochmals verdeutlicht. Neben der Leber und dem Fettgewebe wird CMKLR1 besonders stark in der Nebenschilddrüse, den Nieren, den Hoden und der Plazenta exprimiert (Abbildung 4) [29, 109, 138, 146-148].



**Abbildung 4: Übersicht der CMKLR1-Expression des *Human Protein Atlas* auf mRNA- und Proteinebene.** CMKLR1 wird neben der Leber, vor allem in der Nebenschilddrüse, den Nieren, sowie den weiblichen und männlichen Geschlechtsorganen exprimiert. Der Balken links des Wabensymbols entspricht der mRNA-Expression, der rechts der Proteinexpression (abgeändert nach [146]).

In der Leber findet sich CMKLR1 auf Hepatozyten, Sternzellen, Kupfferzellen, Gallengangszellen und sinusoidalen Endothelzellen [149]. Des Weiteren wird CMKLR1 in den Organen des Immunsystems exprimiert, wozu die Thymusdrüse, die Milz und die Lymphknoten zählen [150, 151]. Immunzellen selbst zeigen ebenso ein hohes CMKLR1-Expressionsniveau, weshalb sie auf Chemerin als pro- bzw. anti-inflammatorisches Signalmolekül reagieren können. Hierzu zählen plasmazytoide Zellen, NK-Zellen und Makrophagen [143, 152-154].

CMKLR1 ist ein G Protein-gekoppelter Rezeptor der  $G_{i/o}$ -Familie und besitzt sieben Transmembrandomänen. Bei Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden Chemerin spielt die  $\alpha$ -Untereinheit des G Proteins eine zentrale Rolle bei der Signalweiterleitung. Dabei wird zum einen die cAMP-Produktion (zyklisches Adenosinmonophosphat) der Adenylatzyklase inhibiert und die Phospholipase C aktiviert, wobei es zur Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP3) und intrazellulärem Kalzium kommt. Zum anderen werden verschiedene Kinasen wie MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) und ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) phosphoryliert und dadurch aktiviert [114, 118, 155, 156]. Erst kürzlich konnte ein weiterer Chemerin-Signalweg über RhoA/ROCK (*rho-associated protein kinase*) identifiziert werden, der insbesondere bei der Chemotaxis von Bedeutung ist [157]. Zudem kommt es zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin 2 an den Rezeptor [155, 158]. Dadurch wird der Rezeptor mit dem gebundenen Liganden durch Endozytose internalisiert und die weitere Signalübermittlung wird inhibiert. Die  $\beta$ -Arrestine selbst können jedoch auch wieder Proteinkinasen aktivieren und so Signale weiterleiten [159, 160].

Die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin 2 an den Rezeptor wird für die Bioaktivitätsmessungen des Rezeptors bzw. der bindenden Liganden herangezogen. Dabei wird die Aktivierung des Rezeptors indirekt mit Hilfe eines Reportergens quantifiziert, das proportional zur  $\beta$ -Arrestin 2-Rekrutierung transkribiert wird [120, 158, 161].

Mit Hilfe dieses Assays wurde auch ein weiterer G Protein-gekoppelter Chemerin-Rezeptor namens GPR1 (*G protein-coupled receptor 1*) entdeckt [158]. GPR1 hat eine 40%ige Sequenzidentität zu CMKLR1 und wird ebenso nach seiner Aktivierung internali-

siert. Seine Signalwege und seine funktionelle Relevanz konnten allerdings noch nicht aufgeklärt werden [155-157].

Ein dritter Chemerin-Rezeptor, CCRL2 (*C-C chemokine receptor-like 2*), zeigt nur geringe Sequenzhomologie zu den anderen beiden Rezeptoren. CCRL2 wird unter anderem von Makrophagen, Mastzellen und DCs exprimiert und spielt eine Rolle bei Entzündungsreaktionen [156, 161]. Nach dem bisherigen Stand der Forschung wird CCRL2 nach erfolgter Aktivierung weder internalisiert, noch zieht er eine Signalkaskade nach sich [155]. Es wird vermutet, dass CCRL2 Chemerin bindet und dabei dessen prozessierten C-Terminus den benachbarten CMKLR1-exprimierenden Zellen präsentiert. Auf diese Weise kann CCRL2 zur lokalen Aufkonzentrierung und zur gezielten proteolytischen Aktivierung bzw. Inaktivierung von Chemerin beitragen [141, 142, 157, 162].

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen mit steigender Inzidenz [4]. Jährlich wird bei circa einer halben Million Menschen ein HCC diagnostiziert [1, 2]. Allerdings wird dieses aufgrund der fehlenden Symptome meist erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, wenn eine erfolgreiche Therapie nahezu ausgeschlossen ist [67].

Studien konnten zeigen, dass die Chemerin-Expression im HCC-Gewebe verringert ist und dies mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist [38]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Chemerin-Überexpression das Tumorwachstum *in vivo* vermindert. Chemerin scheint dies sowohl über Immunzellrekrutierung als auch über Immunsystem-unabhängige Mechanismen zu bewirken [34, 128, 163].

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) gilt als Risikofaktor für die Entstehung des HCCs [7]. Dabei ist sowohl in der murinen als auch in der humanen NASH-Leber die Chemerin-Expression stark erhöht [110, 132]. Es erscheint also paradox, warum das im Tiermodell protektiv wirkende Chemerin hier den Übergang von der NASH-Leber hin zum HCC nicht unterbindet. Ein Ziel dieser Arbeit ist also zu untersuchen, ob das hepatische Chemerin in Lebertumoren herunterreguliert ist und ob die Progression der NASH-Leber zum HCC mit einer veränderten Chemerin/CMKLR1-Expression assoziiert ist. Dies soll in einem Mausmodell mit Diethylnitrosamin-induzierten Lebertumoren in der Diät-induzierten NASH und damit einhergehender hepatischer Chemerin-Überexpression untersucht werden.

Um des Weiteren neue Kenntnisse hinsichtlich der Rolle von Chemerin und dessen aktiver Isoform Chemerin156 im HCC zu erhalten, soll ein zweites Tiermodell untersucht werden. Hierbei wird Chemerin156 in HCC-Lebern überexprimiert, um zu klären, ob dessen Erhöhung einen Therapieansatz zur Behandlung des HCCs darstellt. Mögliche Effekte auf die Tumorentstehung und die Immunzellrekrutierung sollen hierbei untersucht werden.

Um weitere Hinweise auf die Pathophysiologie des HCCs zu entdecken, sollen zudem zwei HCC-Patienten-Kohorten näher untersucht werden. Dabei sollen mögliche Unterschiede zwischen NASH- und Hepatitisviren-assoziiertem HCC aufgezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Erkenntnisse gewonnen werden, die helfen die Funktionen und Effekte von Chemerin und dessen Rezeptor CMKLR1 im HCC besser zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Verwendete Geräte	
Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoklav VX-150	Systec
Brutschrank ORBITAL INCUBATOR S150	Stuart
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra
Feinwaage PLE 200-3	Kern & Sohn GmbH
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec
Imaging System ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad
Kamera-Controller DS-U1	Nikon
Konfokalmikroskop D-Eclipse C1	Nikon
Kühlplatte CP60	Microm
Kühlzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Laminar Flow Bench Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific
LightCycler® 1.5 Instrument	Roche
Magnetrührer MR3000D	Heidolph
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Membran-Vakuumpumpe N86 KN.18	KNF
Mikrotom HM400	Mikrotom
Mikrowelle HF12M240	Siemens
Mini Trans-Blot® Module	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-Rad
Mini-Zentrifuge Sprout™	Biozym
Multistepper Handystep S	Brand
Multistepper Multipette® plus	Eppendorf
NanoDrop 2000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific
Paraffin-Streckbad 1052	GFL
PCR-Cycler T1 Thermocycler	Biometra
pH-Meter pH level 1	InoLab
Pipettensatz Research/Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe Accu-jet	BRAND
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Pipettierhilfe neoPipette Controller	Neolab
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph
Power supply PowerPac 200	Bio-Rad
Power supply PowerPac Basic	Bio-Rad
Präparatmappe mit Deckel	Hartenstein
Precellys® 24 Homogenisator	Peqlab
Reinstwasseranlage Milli-Q® Biocel	Millipore
Sicherheitsabzug	LABCONTROL TROX Technik
Sicherheitsspritzflasche	Hartenstein

Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele
Thermoblock TB1	Biometra
Thermomixer comfort/compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070	Bandelin
Vortex REAX 1	Heidolph
Vortex V1	IKA
Waage 440-45N	Kern & Sohn
Waage SC6010	Scout
Wasserbad WNE 14	Memmert
Wide Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 1: Verwendete Geräte

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verwendetes Verbrauchsmaterial	
Bezeichnung	Bezugsquelle
96-well-Platten	Corning
Aspirationspipetten, 5 ml	BD
Aufbewahrungsdosen	Hartenstein
Biopsy Punch 6 mm	Stiefel
Biosphere-Filterspitzen (20 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Combitips advanced (2,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf
Cryobox	VWR
Cryoröhrchen, 2 ml	Corning
Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific
Discardit™ II Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD
Einweg-Skalpell (#11, #15, #22)	FEATHER
Entsorgungsbeutel	VWR
epT.I.P.S.® 50 – 1000 µl	Eppendorf
Filterspitzen SafeSeal® low binding, steril (100 µl, 200 µl)	Biozym
Immun-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad
Injekt-F® solo, 1 ml	B. Braun
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark
Kleenex Facial Tissues	Kleenex
Microlance™ 3 Kanülen (18G, 20G, 21G, 27G)	BD
Mikro-Probengefäß 1,3 ml K3 EDTA	Sarstedt
M-Tubes gentleMACS™	Miltenyi Biotec
Objektträger Menzel-Gläser SUPERFROST ULTRA PLUS®	Thermo Fisher Scientific
PARAFILM® M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten Glas	Brand
Pasteurpipetten Polyethylen	Brand
PCR-Tubes, 0,5 ml, bunt	Biozym
Petrischalen (100 x 15 mm)	BD
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Polypropylen-Sedimentieröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One

Polypropylen-Röhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Precellys® Lysing Kit, CK14 tubes (1,4 mm ceramic beads)	Bertin Technologies S. A. S.
Rotilabo-Cryobox für Cryoröhrchen	Roth
Rundbodenröhrchen, 14 ml	BD
Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Seakem® LE Agarose	Biozym
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt
SHIELDskin CHEM® NEO NITRIL® 300 Handschuhe	SHIELD Scientific
Steriflip-GP 0,22 µm, 50 ml	Merck Millipore
Sterilisationsklebeband	Hartenstein
Swingsette™ Biopsie-Einbettkassetten	Roth
TouchNTuff 300 mm Nitrilhandschuhe	Ansell
Vakuumfiltrationssystem „rapid“-Filtermax (150 ml, 500 ml)	TPP
Wägeschälchen, 80 x 80 mm	Heathrow Scientific
Whatman® gel blotting paper GB003	Sigma Aldrich
Zentrifugenröhrchen, 15 ml konisch PP	Biochrom

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3 Kit-Systeme

Verwendete Kit-Systeme	
Bezeichnung	Bezugsquelle
AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen
DuoSet® ELISA Human Chemerin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Mouse Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Mouse Chemerin	R&D Systems
DyeEx 96 Kit	Qiagen
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric)	Abcam
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAquick 96 PCR Purification Kit	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
Taq PCR Core Kit	Qiagen
ABI Big-Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems

Tabelle 3: Verwendete Kit-Systeme

## 2.1.4 Chemikalien

Verwendete Chemikalien	
Bezeichnung	Bezugsquelle
2%ige Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad
2-Propanol p.A.	Merck Millipore
40%ige Acrylamid-Lösung	Bio-Rad
Aceton p. A.	Merck Millipore
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA (fatty acid free)	Roche
BSA (Fraktion V) für ELISA	Sigma-Aldrich
Chloroform p. A.	Merck Millipore
cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Diethylnitrosamin (DEN, N-Nitrosodiethylamine ISOPAC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS, 1x	Sigma-Aldrich
Entellan®	Merck Millipore
Eosin G-Lösung	Roth
Essigsäure (99%)	Merck Millipore
Ethanol abs. p. A.	Merck Millipore
Ethanol technisch	Chemikalienausgabe, Universität Regensburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Millipore
Formaldehydlösung 37 %	Merck Millipore
Glycerin p. A.	Merck Millipore
Glycin p. A.	Merck Millipore
Hämalaun-Lösung	Roth
HEPES ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
Immersionsöl Type NF	Nikon
Kaliumchlorid	Merck Millipore
Magermilchpulver Reform	Frema
Magnesiumchlorid	Merck Millipore
Methanol p. A.	Merck Millipore
Methanol technisch	Chemikalienausgabe, Universität Regensburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck Millipore
NaCl, 0,9%	B. Braun
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid p. A.	Merck Millipore
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Millipore
Natriumhydroxid	Merck Millipore
Nukleasefreies Wasser	Promega
PBS Dulbecco-Pulver für 1 Liter	Merck Millipore
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech
PeqGOLD Prestained Protein Marker V	Peqlab
PeqGOLD Prestained Protein Marker VI	Peqlab
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Pikrinsäure (1,2 %)	Sigma-Aldrich
Quick-Load 1 kb DNA-Ladder	NewEnglandBioLabs

Quick-Load 100 bp DNA-Ladder	NewEnglandBioLabs
Roti®-GelStain	Roth
Roti-Histol	Roth
Salzsäure rauchend	Merck Millipore
Schwefelsäure (97 %)	Merck Millipore
Stickstoff, flüssig	Linde
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= Tris-Base)	Merck Millipore
Tris-HCl	Merck Millipore
Tween®20	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.1.5.1 Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA

50x TAE	
Komponente	Volumen/Masse
Tris-NH <sub>3</sub>	121 g
Essigsäure	28,6 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

2%iges Agarosegel	
Komponente	Volumen/Masse
Seakem LE Agarose	3 g
1x TAE-Puffer	150 ml
Roti®-GelStain	7,5 µl

10x Gelladepuffer	
Komponente	Volumen/Masse
87 % Glycerin	5,8 ml
Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
0,5 M EDTA, pH 8,0	ad 10 ml

## 2.1.5.2 Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen

### 2.1.5.2.1 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

<b>Trenngel-Mix für 15%ige Gele, pH 8,7</b>	
<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
40 % Acrylamid	30 ml
2 % Bisacrylamid	3,4 ml
3 M Tris-HCl, pH 8,7	10 ml
20 % SDS-Lösung	0,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	32 ml
<b>Lagerung bei 4 °C</b>	

Zum Trenngel-Mix werden unmittelbar vor dem Gießen des Gels 5 µl/ml 10%iges APS und 3 µl/ml TEMED zugegeben. Das noch flüssige Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

<b>Sammelgel-Mix für 5%ige Gele, pH 6,8</b>	
<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
40 % Acrylamid	5 ml
2 % Bisacrylamid	2,6 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	5 ml
20 % SDS-Lösung	0,2 ml
ddH <sub>2</sub> O	24 ml
<b>Lagerung bei 4 °C</b>	

Auf das auspolymerisierte Trenngel wird nach dem Entfernen des Isopropanols das Sammelgel gegossen. Hierfür werden unmittelbar vor dem Gießen des Gels 10 µl/ml 10%iges APS und 3 µl/ml TEMED zum Sammelgel-Mix zugegeben. In das noch flüssige Sammelgel wird der Taschenkamm gesteckt.

<b>5x Lämmli-Puffer</b>	
<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Masse</b>
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,3 ml
20 % Glycerin	5 ml
20 % SDS-Lösung	2 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml
Bromphenolblau	0,025 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	
Komponente	Volumen/Masse
Glycin	144 g
Tris-NH <sub>3</sub>	30 g
20 % SDS-Lösung	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Coomassie-Entfärbelösung	
Komponente	Volumen
Eisessig	50 ml
EtOH 100 %	200 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

#### 2.1.5.2.2 Puffer und Lösungen für Western Blotting

10x Tank-Puffer	
Komponente	Volumen/Masse
Glycin	140 g
Tris-NH <sub>3</sub>	30 g
20 % SDS-Lösung	25 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Wettransfer-Puffer	
Komponente	Volumen/Masse
MeOH	200 ml
10 x Tank-Puffer	80 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
Lagerung bei 4 °C	

#### 2.1.5.2.3 Puffer und Lösungen für die Antikörperfärbung

10x TBS, pH 7,6	
Komponente	Volumen/Masse
Tris-NH <sub>3</sub>	24,2 g
NaCl	80 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
pH-Einstellung mit HCl	

1x TBS-T, pH 7,6	
Komponente	Volumen
1x TBS	1 l
Tween®20	1 ml

5%ige Blockierlösung	
Komponente	Volumen/Masse
1x TBS-T	100 ml
Magermilchpulver	5 g
Lagerung bei 4 °C	

Antikörperlösung	
Komponente	Volumen/Masse
BSA	7,5 g
Natriumazid	50 mg
Tween®20	500 µl
1x TBS	ad 0,5 l
Sterilfiltration, Lagerung bei 4 °C	

### 2.1.5.3 Puffer und Lösungen für ELISAs

Reagent Diluent	
Komponente	Volumen/Masse
BSA	5 g
1x PBS	ad 0,5 l
Sterilfiltration, Lagerung bei 4 °C	

ELISA-Waschpuffer	
Komponente	Volumen
1x PBS	1 l
Tween®20	500 µl

Substratlösung (10 ml pro 96-well-Platte)	
Komponente	Volumen
Lösung A (Wasserstoffperoxid)	5 ml
Lösung B (Tetramethylbenzidin)	5 ml

ELISA-Stopplösung (Schwefelsäure, 2 N)	
Komponente	Volumen
Schwefelsäure (97 %)	5,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

#### 2.1.5.4 Puffer und Lösungen für Immunhistochemische Färbungen

Waschpuffer	
Komponente	Volumen
1x TBS	1 l
Tween®20	500 µl

Stammlösung A für Citratpuffer	
Komponente	Volumen/Masse
Zitronensäure Monohydrat	21,01 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
Lagerung bei 4 °C	

Stammlösung B für Citratpuffer	
Komponente	Volumen/Masse
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29,41 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
Lagerung bei 4 °C	

Citratpuffer	
Komponente	Volumen
Stammlösung A	18 ml
Stammlösung B	82 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
Herstellung direkt vor Gebrauch	

#### 2.1.5.5 Puffer und Lösungen für die Sirius-Red-Färbung

1 x PBS-T	
Komponente	Volumen
Tween®20	250 µl
1x PBS	ad 0,5 l

Sirius-Red-Lösung	
Komponente	Volumen/Masse
Direct Red 80 (Sirius Red)	500 mg
Pikrinsäure (1,2 %)	0,5 l

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper			
Antigen	Bezugsquelle	Wirtsspezies	Verdünnung
ApoA1	Biodesign	<i>goat</i>	1 : 20.000
Caveolin-1	Cell Signaling	<i>rabbit</i>	1 : 10.000
Chemerin (human)	R&D Systems	<i>goat</i>	1 : 1.000
Chemerin (murin)	R&D Systems	<i>goat</i>	1 : 500
CMKLR1	Novus Biologicals	<i>rabbit</i>	1 : 500
CMKLR1	Abcam	<i>rabbit</i>	1 : 1.000
Fabp5	R&D Systems	<i>goat</i>	1 : 5.000
FAS	Cell Signaling	<i>rabbit</i>	1 : 1.000
GAPDH	Cell Signaling	<i>rabbit</i>	1 : 1.000
p53 (human)	Santa Cruz	<i>mouse</i>	1 : 500
SCD1	Cell Signaling	<i>rabbit</i>	1 : 1.000
SND1	Signalway Antibody	<i>rabbit</i>	1 : 400
SOD2	Lab Frontier	<i>rabbit</i>	1 : 2.000
SREBP1c	Thermo Scientific	<i>mouse</i>	1 : 1.000
SREBP2 aktiv	Cayman	<i>rabbit</i>	1 : 1.000
SREBP2 precursor	Cayman	<i>rabbit</i>	1 : 1.000

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.

Sofern nicht anders angegeben, erkennen die Antikörper sowohl das humane als auch das murine Protein. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Antikörperlösung.

### 2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper			
Bezeichnung	Bezugsquelle	Wirtsspezies	Verdünnung
Anti- <i>goat</i> -Antikörper, HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	<i>donkey</i>	1 : 5.000
Anti- <i>mouse</i> -Antikörper, HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	<i>goat</i>	1 : 5.000
Anti- <i>rabbit</i> -Antikörper, HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	<i>donkey</i>	1 : 5.000

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper.

Die sekundären Antikörper wurden in 5%iger Blockierlösung verdünnt.

## 2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

### 2.1.7.1 Oligonukleotide für die semiquantitative Real-Time RT-PCR muriner Gene

Real-Time RT-PCR-Primer muriner Gene			
Gen	Sequenz uni-Primer 5' → 3'	Sequenz rev-Primer 5' → 3'	Amplikonlänge
18S rRNA	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	CATCTAAGGGCATCACAGACC	217 bp
Alox5*	GCATGCAGCTGTAAACTTCG	CCAGTGAAGGAAGCCATGAT	258 bp
CCL2	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	113 bp
Ccng2*	CAGAACCTCCACAGCAGCTA	GAGGTCACATGTCTGTGTCAG	224 bp
CD38	ACGCTGCCTCATCTACTC	GGGGCGTAGTCTTCTTGT	132 bp
Chemerin	AAACACCCACCTGTGCAGT	TTTTACCTTGGGGTCCATT	213 bp
CMKLR1	CTTCTCCCCTAATCCCCTCA	GGGGTGAGTGAGCCATTTT	233 bp
Col4a3*	ACGTGATGGAATCCTGGTC	GTTCCAGGCTTGTCTGGC	130 bp
Cpt1c*	CCTCGAGCTTGCTGTCTTCA	GGGTTCTTGTCAGCAGCAGT	379 bp
Cyclophilin-A	AACACAAACGGTCCCAGTT	TTGAAGGGGAATGAGGAAAA	326 bp
Egr1*	CCTATGAGCACCTGACCACA	GACCAATCCTCCGACCTCTT	226 bp
F4/80	TGCTCTTCTGATGGTGAGA	CCCCGTCTCTGTATTCAACC	182 bp
Fabp5*	ACGGCTTTGAGGAGTACATGA	GTCTGCACCTCCAAGACG	225 bp
G6PC*	CCTGTGAGACCGGACCAG	TTGCTGTGGCTGAAACTTTCAG	263 bp
HMG-CoA-Reduktase	TGTGCTTGGGGCTTCTGTA	CCACGTTTCATGAGTTTCCATT	225 bp
IL-6	CTCTGGGAAATCGTGAAAT	CCAGTTTGGTAGCATCCATC	134 bp
LDLR	GATGGCTATACCTACCCCTCAA	CCTTTTCTGTCCCAGACAA	274 bp
Ly49C	CCCTATTCCAGGGAGCTGT	TCTGTTTACCAGGAAGGAAGATG	129 bp
Ncr1	TTGGCTCTTACAACGACTATGC	GTTGAAAGGTCAAACCTCCAAT	138 bp
PGC1 $\alpha$	GGAATGCACCGTAAATCTGC	AAAATCCAGAGAGTCATACTTGCTC	244 bp
Pnpla5*	ACCATTGCCGACAAGTTAC	CACTGAGAAAGGCATGCAAG	257 bp
Slc12a1*	TATTTGCACAAACGGAGTGGTG	CTCAAGTCATTCTCTGGTCATT	304 bp
Spink1*	CACCCAGATCTTCGACAATG	GTCCTCATTGAAAAGGTGG	251 bp
TGF $\beta$	CTGGGCACCATCCATGAC	CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA	140 bp
YHAZ	GCAATTAAGTGAAGACAAGTGGACA	TGGAAGGCCGGTTAATTTT	96 bp
$\alpha$ SMA	CCAGCACCATGAAGATCAAG	CTTCGTCGTATTCTGTTTGC	129 bp

**Tabelle 7: Verwendete Primer für die Amplifikation muriner Gene.** Die mit \* markierten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit designed und die Real-Time RT-PCR im Labor etabliert.

### 2.1.7.2 Oligonukleotide für die semiquantitative Real-Time RT-PCR humaner Gene

Real-Time RT-PCR-Primer humaner Gene			
Gen	Sequenz uni-Primer 5' → 3'	Sequenz rev-Primer 5' → 3'	Amplikonlänge
18S rRNA	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	CATCTAAGGGCATCACAGACC	217 bp
Chemerin	GGTCCACTGCCCCATAGAG	TTATCATGGCTGGGGATAGAA	256 bp
CMKLR1	ACCTGCATGGGAAAATATCCT	GAGGTTGAGTGTGTGGTAGGG	299 bp

Tabelle 8: Verwendete Primer für die Amplifikation humaner Gene.

### 2.1.7.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung des TP53-Gens

TP53-Sequenzierungs-Primer				
Exon	Primer	Sequenz 5' → 3'	Amplikonlänge	Taq-Core-PCR-Programm
Exons 2-4	uni	TTCATGCTGGATCCCCACT	754 bp	1
	rev	AGAGGAATCCCAAAGTTCCA		
Exons 5-6	uni	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	467 bp	1
	rev	TTAACCCCTCCTCCAGAGA		
Exon 7	uni	CTTGCCACAGGTCTCCCCAA	237 bp	1
	rev	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA		
Exons 8-9	uni	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	445 bp	1
	rev1	AGTGTTAGACTGGAACTTT		
Exons 8-9	uni	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	455 bp	1
	rev2	CGGCATTTTGAGTGTAGAC		
Exon 10	uni	CAATTGTAACCTGAACCATC	260 bp	2
	rev	GGATGAGAATGGAATCCTAT		
Exon 11	uni	AGACCCTCTCACTCATGTGA	245 bp	1
	rev	TGACGCACACCTATTGCAAG		

Tabelle 9: Primer für die Sequenzierung des TP53-Gens [164].

## 2.1.8 Organismen

### 2.1.8.1 Mäuse

In dieser Arbeit wurden ausschließlich C3H/HeNRj-Mäuse von Janvier Labs verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Inzuchtstamm der Spezies *Mus musculus domesticus*.

### 2.1.8.2 Viren

Verwendete Adeno-assoziierte Viren	
Bezeichnung	Bezugsquelle
Adeno-assoziierte Viren, Serotyp 8, mit Expressionsplasmid pAAV-AFP-MMAP-Chemerin156 ( <i>Chemerin156-Überexpressionsplasmid</i> )	SIRION Biotech
Adeno-assoziierte Viren, Serotyp 8, mit Expressionsplasmid pAAV-empty ( <i>Kontrollplasmid</i> )	SIRION Biotech

Tabelle 10: Verwendete Adeno-assoziierte Viren.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit humanen Proben

Alle Untersuchungen wurden gemäß der Richtlinien der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HPCR (*Human Tissue and Cell Research*, Regensburg) und nach Bewilligung durch die örtliche Ethikkommission der Universität Regensburg durchgeführt. Zudem lag von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Leberproben wurden von Prof. Dr. rer. nat. Thomas S. Weiß der Kinderuniklinik Ostbayern (KUNO, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1.1 Patienten mit NASH-assoziiertem hepatozellulären Karzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tumorgewebe und daran angrenzendes gesundes Lebergewebe von Patienten mit NASH-assoziiertem hepatozellulären Karzinom (HCC) untersucht (Tabelle 11). Patienten mit Hepatitis-assoziiertem HCC wurden aus dieser HCC-Kohorte ausgeschlossen.

NASH-assoziierte HCC-Kohorte	
Charakteristikum	Wert/Anzahl
Patienten	21
Geschlecht	männlich
T2D	11
Keine Steatose / Steatose / NASH	11 / 6 / 4
Alter (Jahren)	63 (47 - 84)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,7 (19,7 - 44,6)
AST (U/l)	31,5 (14 - 145)
ALT (U/l)	42 (23 - 378)
Bilirubin (mg/dl)	0,6 (0,2 - 2,5)
Leberfibrose	13
Grading G1 / G2 / n. d.	3 / 14 / 4
Staging T1 / T2 / T3 / n. d.	9 / 6 / 5 / 1
Lymphatische Invasion: nein / ja	20 / 1
Vaskuläre Invasion: nein / microvaskulär / macrovaskulär / n. d.	12 / 6 / 2 / 1

**Tabelle 11: Charakteristika der NASH-assoziierten HCC-Kohorte.** Angabe der Werte als Median und dessen Wertebereich. (T2D, Typ-2-Diabetes; BMI, *Body-Mass-Index*; AST, Aspartat-Aminotransferase; ALT, Alanin-Aminotransferase; n. d., nicht definiert).

Die Patienten wurden nach dem TNM-Klassifikationssystem in verschiedene Stadien eingeteilt (TNM: Tumor – Nodus *lymphoideus*, Lymphknoten – Metastasen) [165]. Dabei findet je eine Einzelbewertung der Primärtumorausdehnung (T), des Lymphknotenbefalls (N) und der Fernmetastasierung (M) statt. Hierbei entspricht die maximale Tumorausdehnung bei T1  $\leq$  2 cm, bei T2  $\leq$  5 cm und bei T3  $>$  5 cm. In dieser Kohorte wurden die Tumore von neun Patienten als T1, von sechs Patienten als T2 und von fünf Patienten als T3 eingestuft. Für einen Patienten lagen keine Angaben vor.

Des Weiteren wurden die Patienten anhand der Differenzierung der Tumore, also entsprechend der Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe, in verschiedene *Grading*-Stufen eingeteilt (G1 = gut differenziert bis G4 = undifferenziert). Tumore von drei Patienten sind in Stufe G1, von 14 Patienten in Stufe G2 und von vier Patienten fand keine Einstufung statt. Die Charakteristika der HCC-Kohorte sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

### 2.2.1.2 Patienten mit Hepatitis-assoziiertem hepatozellulären Karzinom

In einer weiteren Patienten-Kohorte konnten Analysen von Tumorgewebe und daran angrenzendem gesunden Lebergewebe von Patienten mit Hepatitis-assoziiertem hepatozellulären Karzinom durchgeführt werden (Tabelle 12).

HBV/HCV-HCC-Kohorte	
Charakteristikum	Wert/Anzahl
Patienten	24
Geschlecht (m / w)	18 / 6
HBV / HCV / HBV+HCV	10 / 11 / 3
T2D	5
Keine Steatose / Steatose / n. d.	15 / 8 / 1
Alter (Jahren)	56 (35 - 78)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,0 (18,7 - 30,0)
AST (U/l)	70,5 (19,0 - 200,0)
ALT (U/l)	57,5 (24,0 - 167,0)
Bilirubin (mg/dl)	0,7 (0,3 - 3,7)
Leberfibrose	22
<i>Grading</i> G1 / G2 / n. d.	1 / 13 / 10
<i>Staging</i> T1 / T2 / T3 / n. d.	6 / 6 / 4 / 8

**Tabelle 12: Charakteristika der HBV/HCV-HCC-Kohorte.** Angabe der Werte als Median und dessen Wertebereich. (T2D, Typ-2-Diabetes; BMI, *Body-Mass-Index*; AST, Aspartat-Aminotransferase; ALT, Alanin-Aminotransferase; n. d., nicht definiert).

In dieser Kohorte sind zehn Patienten HBV-infiziert, elf Patienten HCV-infiziert und drei der Patienten mit beiden Virustypen (HBV+HCV) infiziert. Insgesamt umfasst die Studie sechs Frauen und 18 Männer. Die Charakteristika der HBV/HCV-HCC-Kohorte sind in Tabelle 12 dargestellt.

### **2.2.2 Arbeiten mit Versuchstieren**

Alle Tierversuche wurden gemäß der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und des „*Guide for the care and use of laboratory animals*“ aus dem Jahre 1999 des Instituts für Labortierforschung (Washington, USA) durchgeführt und vom Versuchstierkomitee der Universität Regensburg, der Regierung der Oberpfalz und der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die Experimente erfüllten die Vorgaben der Tierschutz-Versuchstierordnung.

#### **2.2.2.1 Versuchstierhaltung**

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg bei einer Raumtemperatur von  $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  bei konstanter Luftfeuchtigkeit und 12-stündigem Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser (*ad libitum*).

#### **2.2.2.2 C3H/HeNRj-Mäuse**

Die C3H/He-Mauslinie wurde im Jahr 1920 von L. C. Strong durch die Kreuzung weiblicher Bagg Albinos mit einer männlichen DBA-Maus gezüchtet [166]. Die weiblichen Nachkommen dieser Zucht entwickelten gehäuft Brusttumoren und generell weist diese Linie eine hohe Inzidenz von Hepatomen auf [167]. Dies liegt wohl an der Hypermethylierung der Promotorregion verschiedener Tumorsuppressorgene und der damit einhergehenden Inaktivierung dieser Gene [168-170].

Für diese Arbeit wurden ausschließlich männliche C3H/HeNRj-Mäuse von *Janvier Labs* (Le Genest-Staint-Isle, Frankreich) verwendet.

### **2.2.2.3 Tiermodelle: DEN-induziertes HCC bei C3H/HeNRj-Mäusen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei HCC-Tiermodelle untersucht, welche beide auf der kanzerogenen Wirkung von Diethylnitrosamin (DEN) basieren [171, 172]. Die Chemikalie DEN wird intraperitoneal (i. p.) injiziert, zur Leber transportiert und in den Hepatozyten metabolisch aktiviert (Cytochrom P450). Da die Hepatozyten von zwei Wochen alten Mäusen noch besonders aktiv proliferieren, ist der Effekt auf diese Zellen besonders stark, sodass bereits eine einmalige DEN-Injektion zur Bildung von Hepatomen führt [173, 174]. Die kanzerogene Wirkung des DENs liegt dabei einerseits in seiner DNA-alkylierenden Aktivität, andererseits in der Steigerung des oxidativen Stresses [173, 175]. Innerhalb von fünf bis sechs Monaten nach der DEN-Injektion kommt es zur Entstehung von Hepatomen [174, 176, 177].

In dieser Arbeit wurde den Mäusen im Alter von 18 bis 21 Tagen pro Gramm Körpergewicht 25 µg DEN/ddH<sub>2</sub>O i. p. injiziert [177]. Der Kontrollgruppe wurde ddH<sub>2</sub>O injiziert.

#### **2.2.2.3.1 NASH-assoziiertes HCC-Modell**

Das NASH-assoziierte HCC kann in Mäusen durch die Injektion von DEN und die spätere Verfütterung einer Methionin-Cholin-defizienten Diät hervorgerufen werden. Dabei fördert die Diät das Tumorwachstum [176, 177].

Methionin ist eine essentielle Aminosäure, die über die Nahrung aufgenommen werden muss. Sie ist entscheidend für die Proteinbiosynthese und dient unter anderem als Substrat für die Synthese des Methylgruppendonors S-Adenosylmethionin (SAM) und des Antioxidans Glutathion (GSH), welche eine wichtige Rolle bei der Reduktion des oxidativen Stresses spielen. Folglich führt ein Mangel an Methionin zu gesteigertem oxidativen Stress und zur Schädigung von Hepatozyten, was schließlich zur Entzündung und Fibrosierung der Leber führt [178].

Cholin kann – im Vergleich zu Methionin – zu geringen Maßen endogen aus Methionin synthetisiert werden. Es ist eine wichtige Komponente der Plasmamembran und essentiell in der *de novo* Synthese von Phosphatidylcholin, einem wesentlichen Bestandteil der VLDL-Partikel. Durch einen Mangel an VLDL-Partikeln können Triglyzeride nicht mehr aus der Leber ins Blut abgegeben werden. Folglich kommt es aufgrund der Akkumulation von Triglyzeriden in der Leber zur Hepatosteatose [178, 179].

Das Füttern der Methionin-Cholin-defizienten Diät führt bei den Tieren zur hepatischen Steatose und Fibrose, als negativen Begleiteffekt aber zu einem starken Gewichtsverlust, welcher auf die Methionin-Defizienz zurückzuführen ist [178]. Aus diesem Grund wurde für die hier vorliegende Arbeit eine Diät verwendet, die Cholin-defizient ist, jedoch einen geringen Anteil (0,17 %) Methionin enthält (LMCD-Diät, LowMethionin-Cholin-defiziente-Diät, E15667-94, Ssniff, Soest) [180]. So kann der Gewichtsverlust umgangen werden, was die Fütterung der Diät über einen langen Zeitraum ermöglicht [180, 181]. Dadurch ist die Grundvoraussetzung für die langfristige Entstehung von Hepatomen im NASH-Modell gegeben. Die zugehörige Kontrolldiät (E15668-04, Ssniff, Soest) hat die gleiche Grundzusammensetzung, enthält jedoch zusätzlich Cholin (0,2 %). Die LMCD-Diät und die zugehörige Kontrolldiät wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen gefüttert. Dabei wurde wöchentlich das Körpergewicht und die Futteraufnahme der Mäuse dokumentiert.

#### **2.2.2.3.2 AAV-vermittelte hepatische Überexpression von Chemerin156 im HCC**

In diesem Teil der Arbeit sollten die Effekte einer hepatischen Überexpression von Chemerin156 (Ch156) auf die bereits tumorösen Lebern untersucht werden. Hierfür wurden wiederum DEN-injizierte C3H/HeNRj-Mäuse verwendet.

Für die hepatische Überexpression von Ch156 wurden Adeno-assoziierte Viren (AAV) eingesetzt [182]. Diese besitzen die Fähigkeit bestimmte Gensequenzen, wie z. B. Ch156, in das Genom von Wirtsorganismen stabil zu integrieren [183]. Hierfür werden die AAV-eigenen Gene für die Virus-Replikation (*rep*) und die Capsid-Proteine (*cap*) durch das Transgen ersetzt [184, 185]. Wie für alle Mitglieder der Familie der Parvoviren charakteristisch, sind AAVs für ihre Replikation auf ein Helfervirus, wie z. B. Herpes- oder Adenoviren, angewiesen [184]. Aus diesem Grund ist die Pathogenität der AAVs sehr gering, wodurch sie sowohl für die Genforschung als auch die humane Gentherapie geeignet sind [183, 186].

Um einzig eine hepatische Überexpression von Ch156 zu erzielen, wurde zum einen ein gewebspezifischer Promotor verwendet, ein chimärer Leber-spezifischer  $\alpha$ -Fetoprotein-Enhancer/Albumin-Promotor [187]. Zum anderen wurde ein bestimmter AAV-Serotyp, der hepatotrope Serotyp AAV8, ausgewählt [186, 188].

Die in dieser Arbeit verwendeten AAVs mit Ch156-cDNA und die entsprechenden Kontrollviren wurden von SIRION Biotech (Martinsried) bezogen. Bei einem Alter von sechs

Monaten wurden pro Maus  $1 \times 10^{12}$  Viruspartikel i. p. injiziert [189, 190]. Um zu überprüfen, ob die Expression des Transgens bereits wie beschrieben [189, 190] nach einer Woche ansteigt, wurde den Mäusen eine Woche vor der Injektion sowie eine, vier, acht und zwölf Wochen nach der Injektion je einige Mikroliter Schwanzblut abgenommen, um Chemerin im Blutplasma zu messen.

#### **2.2.2.4 Präparation**

Die Mäuse wurden circa 14 h vor der Präparation nüchtern gesetzt, um mögliche metabolische Effekte besser vergleichen zu können. Nach der Bestimmung des Körpergewichts wurden die Tiere durch Begasung mit CO<sub>2</sub> und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Direkt im Anschluss wurde den Tieren durch kardiale Punktion mit einer 27G-Kanüle Herzblut entnommen und dieses in ein mit EDTA-beschichtetes Mikro-Probengefäß (1,3 ml K3 EDTA) überführt um die Agglutination zu unterbinden. Um das Blutplasma zu gewinnen, wurden die Proben im Anschluss für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Des Weiteren wurden Leber, Milz, verschiedene Fettdepots (subkutanes, epididymales und perirenales Fett), braunes Fettgewebe und der Oberschenkelmuskel der Maus präpariert. Das Gewicht der Leber sowie der weißen Fettgewebe wurde bestimmt und dokumentiert. Das Erscheinungsbild der Leber sowie die Tumore jedes einzelnen Leberlappens wurden fotodokumentiert. Für die spätere DNA-/RNA-/Protein-Isolierung wurden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C aufbewahrt. Für histologische Untersuchungen wurde ein Teil der Leber sowie der Fettdepots in Biopsie-Einbettkassetten überführt und über Nacht in 4 % Formaldehyd/PBS fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gewebe in Paraffin eingebettet und die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.2.5 Tumorquantifizierung

Die Anzahl der Tumore jeder einzelnen Leber wurde im Anschluss an die Präparation anhand der Fotodokumentation bestimmt. Hierfür wurde das *Cell Counter plugin* in ImageJ (1.47v) verwendet. Anhand ihres Durchmessers wurden die Tumore in fünf Kategorien unterteilt (Tabelle 13).

Kategorisierung der Tumore				
Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4	Kategorie 5
$\varnothing < 1 \text{ mm}$	$1 \leq \varnothing < 2 \text{ mm}$	$2 \leq \varnothing < 5 \text{ mm}$	$5 \leq \varnothing < 10 \text{ mm}$	$\varnothing \geq 10 \text{ mm}$

Tabelle 13: Kategorisierung der Tumore anhand ihres Durchmessers [mm].

## 2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.2.3.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.2.3.1.1 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde der DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen verwendet. Hierfür wurden zwischen 10 mg und 30 mg Lebergewebe auf Trockeneis abgewogen und auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  zwischengelagert. Der Lysepuffer (RLT-Puffer) wurde direkt vor dem Gebrauch mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Für Gewebestücke  $< 20 \text{ mg}$  wurde  $350 \text{ }\mu\text{l}$  RLT-Puffer verwendet, für Gewebestücke  $> 20 \text{ mg}$   $600 \text{ }\mu\text{l}$  RLT-Puffer. Die gefrorenen Gewebestücke wurden in Precellys® *ceramic bead*-Röhrchen (Lysing Kit, CK14 tubes) überführt und erst unmittelbar vor dem Homogenisieren mit dem RLT-Puffer überschichtet. Im Precellys® 24 Homogenisator wurden die Gewebe für  $2 \times 10 \text{ s}$  bei  $5.000 \text{ rpm}$  aufgearbeitet. Das Gewebelysats wurde bei  $13.000 \text{ rpm}$  für  $3 \text{ min}$  abzentrifugiert und der Überstand in eine All-Prep®-DNA-Säule überführt. Die Säule wurde bei  $10.000 \text{ rpm}$  für  $30 \text{ s}$  zentrifugiert. Hierbei bindet die DNA an die Säule; das Lysat enthält sowohl RNA als auch Proteine und wurde daher für die RNA- (2.2.3.2.1) bzw. Protein-Isolierung (2.2.4.1.1.) aufbewahrt. Die an die Säule gebundene DNA wurde zunächst mit  $500 \text{ }\mu\text{l}$  AW1-Puffer gewaschen und  $15 \text{ s}$  bei  $10.000 \text{ rpm}$  abzentrifugiert. Dann folgte ein Waschschriff mit  $500 \text{ }\mu\text{l}$  AW2-Puffer und ein erneuter Zentrifugationsschritt für  $2 \text{ min}$  bei  $13.000 \text{ rpm}$ . Zuletzt wurde die DNA-Säule in ein neues  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführt. Die Membranen wurden mit  $60 \text{ }\mu\text{l}$  auf  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgewärmtem Elutionspuffer für  $2 \text{ min}$  inkubiert. Die DNA wurde schließlich durch Zentrifugation der Säule für  $1 \text{ min}$  bei  $13.000 \text{ rpm}$  eluiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.3.1.2 Bestimmung der DNA-Reinheit und -Konzentration**

Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA-Proben wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers bestimmt. Dabei wird die Absorption der Probe bei 230 nm, 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Quotienten A260/A230 und A260/A280 beschreiben die Reinheit der Probe. Für Sequenzierungen wurde ausschließlich reine DNA mit einem A260/A280 Quotienten von 1,8 verwendet. Als Referenzwert für die Proben wurde die Absorption des Lösungsmittels (ddH<sub>2</sub>O) vermessen. Pro Probe wurden 1,5 µl für die Messung eingesetzt.

#### **2.2.3.1.3 Sequenzierung – Bestimmung des TP53-Status**

Das TP53-Gen kodiert für ein Tumorsuppressorprotein, das Tumorprotein p53, und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus [191]. Es ist bekannt, dass es unter anderem auch im hepatozellulären Karzinom überexprimiert wird [39] oder mutiert ist [192]. Um die in dieser Arbeit untersuchte NASH-assoziierte (Hepatitisviren-freie) HCC-Kohorte besser zu charakterisieren, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg der Status des TP53-Gens der HCC-Patienten bestimmt.

Hierfür wurden alle kodierenden Exons des TP53-Gens (Exon 2 - 11), einschließlich des angrenzenden Exon/Intron-Übergangs, sequenziert und auf Mutationen untersucht. Die hierbei verwendeten Primersequenzen (2.1.7.3, Tabelle 9) wurden dem Protokoll „*Detection of TP53 mutations by direct sequencing*“ der *International Agency for Research on Cancer* (IARC, TP53 Database, protocol update 2010, [164]) entnommen.

Für die Sequenzierung wurden zunächst die einzelnen Exons des TP53-Gens aus der isolierten genomischen DNA (gDNA) (2.2.3.1.1) der Patienten mit Hilfe der IARC-Primerpaare und des Taq PCR Core Kits von Qiagen amplifiziert. Der hierfür verwendete Taq-Core-PCR-Ansatz (Tabelle 14) und die zugehörigen Taq-Core-PCR-Programme sind im Folgenden aufgelistet (Tabelle 15, Tabelle 16).

1x Taq-Core-PCR-Ansatz	
Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O	31,5 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Uni-Primer (25 µM)	0,5 µl
Rev-Primer (25 µM)	0,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
gDNA-Template	1 µl (50 - 100 ng/µl)
Σ	50 µl

Tabelle 14: Standardansatz für die Taq-Core-PCR.

Taq-Core-PCR-Programm 1								
Phase	Temperatur							Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C							2 min
Denaturierung	94 °C							30 s pro Zyklus
Annealing	63 °C 3x	62,5 °C 3x	62 °C 3x	61,5 °C 3x	61 °C 3x	60,5 °C 3x	60 °C 30x	45 s pro Zyklus
Elongation	72 °C							60 s pro Zyklus
Schluss-elongation	72 °C							10 min
Lagerung	4 °C							∞

Tabelle 15: Taq-Core-PCR-Programm 1.

Taq-Core-PCR-Programm 2								
Phase	Temperatur							Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C							2 min
Denaturierung	94 °C							30 s pro Zyklus
Annealing	59 °C 3x	58,5 °C 3x	58 °C 3x	57,5 °C 3x	57 °C 3x	56,5 °C 3x	56 °C 30x	45 s pro Zyklus
Elongation	72 °C							60 s pro Zyklus
Schluss-elongation	72 °C							10 min
Kühlung	4 °C							∞

Tabelle 16: Taq-Core-PCR-Programm 2.

Ein kleiner Teil des Taq-Core-PCR-Ansatzes (2 µl Probe in 12 µl 1x Ladepuffer) wurde auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die Spezifität der PCR-Produkte anhand ihrer

Amplikongröße zu überprüfen. Die auf diese Weise validierten Taq-Core-PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt.

Die so vorbereiteten Proben dienen im Anschluss als Template für die Cycle-Sequencing-PCR (ABI Big-Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Darmstadt). Für diese PCR wurden die identischen Primer zur Taq-Core-PCR eingesetzt, jedoch nicht als Primerpaar, sondern getrennt in zwei separaten Cycle-Sequencing-PCR-Ansätzen. Auf diese Weise werden pro Exon zwei DNA-Fragmente generiert, die in ihrer Gesamtheit die Sequenz des Exons lückenlos abdecken. Im Folgenden sind der Standardansatz für die Cycle-Sequencing-PCR (Tabelle 17) sowie das zugehörige PCR-Programm (Tabelle 18) aufgeführt.

1x Cycle-Sequencing-PCR-Ansatz	
Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O	9,8 µl
5x PCR-Puffer	3 µl
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 µl
Primer (1 µM), uni oder rev	3,2 µl
aufgereinigtes Taq-Core-PCR-Produkt	2 µl
Σ	20 µl

Tabelle 17: Standardansatz für die Cycle-Sequencing-PCR.

Cycle-Sequencing-PCR-Programm			
Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	25
Denaturierung	96 °C	10 s	
Annealing	50 °C	5 s	
Elongation	60 °C	4 min	
Kühlung	15 °C	∞	

Tabelle 18: Cycle-Sequencing-PCR-Programm.

Im Anschluss wurden die Cycle-Sequencing-PCR-Produkte über das DyeEx 96 Kit von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und für das Cycle-Sequencing eingesetzt. Hierfür wurden in einer 96-well-Sequenzierplatte 4 µl des aufgereinigten Cycle-Sequencing-PCR-Produkts in je 15 µl Hi-Di Formamid resuspendiert, die Platte kurz ab-

zentrifugiert und schließlich im ABI Prism Genetic Analyzer 3100xl (PE Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Die ausgegebenen Sequenzen wurden mit Hilfe der SEQUENCHER Software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) mit der TP53 Referenzsequenz NM\_000546.5 von NCBI verglichen. Die dabei ermittelten Sequenzvarianten wurden über die *Human Gene Mutation Database* (HGMD) und die *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) validiert.

### **2.2.3.2 Arbeiten mit RNA**

#### **2.2.3.2.1 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Isolierung aus Lebergewebe wurde der DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen verwendet. Hierfür wurde das für die RNA- bzw. Protein-Isolierung aufbewahrte Lysat der DNA-Säule verwendet (2.2.3.1.1). Dieses enthält sowohl RNA als auch Proteine. Für die Aufreinigung der RNA wurde das Lysat zunächst mit 100 %igem Ethanol (p. A.) versetzt. Für Lysate aus Gewebestücken < 20 mg (350 µl RLT-Puffer) wurden 250 µl Ethanol zugegeben, für Lysate aus Gewebestücken > 20 mg (600 µl RLT-Puffer) 430 µl Ethanol. Die Proben wurden gut resuspendiert und sofort auf die RNeasy-Säulen überführt. Hierbei bindet die RNA an die Membran der Säule. Die Säule wurde bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert und das Lysat bei RT für die spätere Proteinextraktion (2.2.4.1.1) aufbewahrt. Die an die Membran gebundene RNA wurde zunächst mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 s bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl RPE-Puffer. Bei letzterem wurde für 2 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein frisches 2 ml collection tube überführt. Durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min wurde die RNeasy-Säule komplett von Pufferresten befreit. Für die Elution der RNA wurde die Säule im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden 20 µl auf 37 °C vorgewärmtes RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert und für 1 min inkubiert. Für eine höhere Ausbeute wurde das RNA-Lysat nach dem Abzentrifugieren bei 10.000 rpm für 1 min nochmals auf die Membran pipettiert, inkubiert und abzentrifugiert. Zum Abschluss wurden weitere 10 µl RNase-freies Wasser für die RNA-Elution auf die Membran pipettiert, inkubiert und abzentrifugiert. Die aufgereinigte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA-Proben wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers bestimmt. Dabei wird die Absorption der Probe bei 230 nm, 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Quotienten  $A_{260}/A_{230}$  und  $A_{260}/A_{280}$  beschreiben die Reinheit der Probe. Für die Analysen wurde ausschließlich reine RNA mit einem  $A_{260}/A_{280}$  Quotienten von 2,0 verwendet. Als Referenzwert für die Proben wurde die Absorption des Lösungsmittels (ddH<sub>2</sub>O) vermessen. Pro Probe wurden 1,5 µl für die Messung eingesetzt.

#### **2.2.3.2.3 RNA-Aufreinigung für Microarray-Analysen**

RNA-Proben für die Hybridisierung von Microarrays wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert und mittels eines *on-column* DNase-Verdau von einer etwaigen gDNA-Kontamination befreit. Hierfür wurde die mittels DNA/RNA/Protein Mini Kit isolierte RNA am NanoDrop 2000 Spectrophotometer vermessen und 2,5 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Im Anschluss wurden 350 µl RLT-Puffer zu den Proben gegeben und diese gut resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl 100 %igem Ethanol (p. A.) wurden die Proben auf die RNeasy Mini spin column überführt und 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNA bindet dabei an die Membran, der Durchfluss wurde verworfen. Nach einem Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer wurden pro Probe 80 µl DNase-Mix (10 µl DNase-Stock + 70 µl RDD-Puffer) direkt auf die Membran pipetiert. Der *on-column* DNase-Verdau erfolgte für 15 min bei RT. Im Anschluss wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und die Säule bei 10.000 rpm für 15 s abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl RPE-Puffer. Nach dem Trocknen der Membran durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

#### **2.2.3.2.4 cDNA-Synthese**

Um die Expression verschiedener Gene bestimmen zu können, wurden semiquantitative Real-Time RT-PCRs (RT, reverse Transkriptase) durchgeführt. Hierfür wurde die aus Geweben isolierte RNA (2.2.3.2.1) zunächst mit Hilfe eines viralen Enzyms, der reversen Transkriptase (RT), in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet. Hierbei diente die iso-

lierte RNA als Template für die AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) Reverse Transkriptase. Um eine möglichst vollständige reverse Transkription der RNA zu cDNA zu erreichen, wurden *random hexamer*-Primer verwendet. Diese kurzen Oligonukleotide beliebiger Sequenz binden entlang der gesamten RNA jeweils an die komplementären Sequenzen und gewährleisten so auf ganzer Länge der RNA eine akkurate cDNA-Synthese. Der Ansatz für die reverse Transkription einer Probe ist in Tabelle 19 dargestellt. Zusätzlich zu den Proben wurde pro Proben-Set auch ein cDNA-Standard aus mehreren RNA-Proben generiert, der für die spätere relative Quantifizierung der Real-Time RT-PCRs benötigt wird.

<b>1x RT-PCR-Ansatz</b>		
<b>Komponente</b>	<b>pro Probe</b>	<b>Standard</b>
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	8 µl	16 µl
<b>10x Reverse Transkriptions-Puffer</b>	4 µl	8 µl
<b>10 mM dNTP-Mix</b>	4 µl	8 µl
<b><i>random hexamer</i>-Primer (0,5 µg/µl)</b>	0,5 µl	1 µl
<b>RNasin® Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)</b>	1 µl	2 µl
<b>AMV-Reverse Transkriptase (25 U/µl)</b>	1 µl	2 µl
<b>RNA [µg] in RNase-freiem H<sub>2</sub>O [µl]</b>	1 µg in 21,5 µl	4 µg in 43 µl
<b>Σ</b>	40 µl	80 µl

Tabelle 19: RT-PCR-Ansatz für eine Probe bzw. den Standard.

Die einzelnen Komponenten des RT-PCR-Ansatzes wurden auf Eis pipettiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h. Im Anschluss wurde die Reverse Transkriptase für 5 min bei 95 °C inaktiviert, die cDNA auf Eis abgekühlt und schließlich bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.3.2.5 Expressionsanalyse via semiquantitativer Real-Time RT-PCR**

Die semiquantitative Real-Time RT-PCR ist eine gängige Methode um die mRNA-Expressionsstärke eines bestimmten Gens zu analysieren. Die Quantifizierung beruht dabei auf der direkten Messung eines fluoreszenten Signals, das proportional zur eingesetzten cDNA-Menge mit jedem Zyklus der PCR zunimmt.

Das Prinzip der semiquantitativen Real-Time RT-PCR ähnelt dem der klassischen PCR, wobei durch die Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green I eine kontinuierliche („Real-Time“) Messung der DNA-Syntheserate stattfinden kann. Da SYBR Green I ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet, findet die Messung der Fluoreszenz stets nach

der Elongationsphase statt. Entsprechend der Verdopplung der DNA-Menge bei jedem Zyklus der PCR zeigt die aufgezeichnete Fluoreszenzkurve einen exponentiellen Anstieg. Je stärker die Fluoreszenz einer Probe, desto mehr doppelsträngiges PCR-Produkt liegt vor und desto mehr cDNA des zu analysierenden Gens war zu Beginn der semiquantitativen Real-Time RT-PCR im Reaktionsansatz.

Die Proben erreichen einen definierten Schwellenwert (*threshold*), also eine definierte Fluoreszenzstärke in der log-Phase, bei einer bestimmten Zyklenzahl der PCR (=CP-Wert, *crossing point*). Da das Erreichen des Schwellenwerts von der eingesetzten cDNA-Menge abhängt, lässt der CP-Wert Rückschlüsse auf die eingesetzte mRNA-Menge zu.

Schließlich wird die anhand des CP-Werts ermittelte mRNA-Menge jedes gemessenen Gens mit der eines Housekeeper-Gens verrechnet. Gängige Housekeeper sind z. B. 18S rRNA, Cyclophilin-A oder YWHAZ. Diese werden konstitutiv, also stets gleich stark exprimiert und sind daher als Referenzgene für die semiquantitative Real-Time RT-PCR geeignet. Auf diese Weise kann die relative Transkriptionsstärke jedes Gens bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde das LightCycler® 1.5 Instrument mit der LightCycler® Software Version 3 verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit in 20 µl LightCycler® Kapillaren analysiert. Der im Kit bereitgestellte LightCycler®-Mix enthält 10x Reaktionspuffer, die HotStart Taq DNA-Polymerase, dNTPs und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I.

Zusätzlich zu den Proben kam der cDNA-Standard in der Real-Time RT-PCR zum Einsatz. Dieser wurde unverdünnt (I: 50 ng/µl), sowie seriell in ddH<sub>2</sub>O verdünnt (II: 25 ng/µl, III: 12,5 ng/µl, IV: 6,25 ng/µl) eingesetzt. Auf diese Weise konnte zum einen die Effizienz der PCR bewertet werden, zum anderen wurde der Standard für die Quantifizierung der Proben herangezogen.

Der Reaktionsansatz für die Proben und die Standards (I-IV) der Real-Time RT-PCR ist im Folgenden beschrieben (Tabelle 20).

1x Real-Time RT-PCR-Ansatz pro Kapillare		
Komponente	pro Probe	pro Standard (I - IV)
LightCycler®-Mix	2 µl	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl	2,4 µl
Primer uni (5 pmol/µl)	1 µl	1 µl
Primer rev (5 pmol/µl)	1 µl	1 µl
cDNA	2 µl (25 ng/µl)	2 µl (I: 50 ng/µl, II: 25 ng/µl, III: 12,5 ng/µl, IV: 6,25 ng/µl)
ddH <sub>2</sub> O	11,6 µl	11,6 µl
Σ	20 µl	20 µl

Tabelle 20: Standardreaktionsansatz der semiquantitativen Real-Time RT-PCR

Die einzelnen Phasen des Real-Time RT-PCR-Programms sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 21).

Real-Time RT-PCR-Programm			
Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Hitzeaktivierung	95 °C	10 min	35 - 40
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	60 °C	10 s	
Elongation	72 °C	10 s	
Fluoreszenzmessung	primerspezifisch	1 s	
Schmelzkurve	60 °C → 95 °C	0,1 °C/s	
Kühlung	40 °C	30 s	

Tabelle 21: Real-Time RT-PCR-Programm

#### 2.2.3.2.6 Etablierung der Analyse von Genen via semiquantitativer Real-Time RT-PCR

Da die akkurate Amplifikation der zu untersuchenden Sequenzen bei der semiquantitativen Real-Time RT-PCR das entscheidende Kriterium ist, müssen für die Untersuchung jedes Genes spezifische Primer entworfen und deren Präzision in Vorversuchen im Labor validiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Analyse von zehn Genen (Alox5, Ccng2, Col4a3, Cpt1c, Egr1, Fabp5, G6PC, Slc12a1, Spink1, Pnpla5) für die semiquantitative Real-Time

RT-PCR neu etabliert. Hierfür sind vier Schritte notwendig: 1) Primerdesign, 2) Real-Time RT-Test-PCR, 3) Agarosegelelektrophorese, 4) Sequenzierung der Amplikons.

Für das Design der Primer wurde zum Teil auf den *Universal Probe Library Assay Design Center* von Roche zurückgegriffen, zum Teil wurden die Primer manuell designed. Dabei wurde stets darauf geachtet, folgende Kriterien einzuhalten: Primerlänge ca. 20 Basen, Amplikonlänge: 100 - 400 bp, Amplikonlage: Intron-umspannend, GC-Gehalt: ca. 60 %, Schmelztemperatur: 60 °C.

Für den Primertest wurden cDNAs eingesetzt, die aus dem später zu analysierenden Probenstamm stammten. Binden die Primer spezifisch, so zeigen die PCR-Fragmente eine einheitliche und abrupt abfallende Schmelzkurve, die auf dem Aufschmelzen des spezifischen PCR-Produkts und dem damit einhergehenden Fluoreszenzabfall beruht. Anhand dieser kann auch die optimale Fluoreszenz-Messtemperatur für jeden Test bestimmt werden.

Die Amplifikate, die aufgrund ihrer Schmelzkurve auf ein spezifisches PCR-Produkt schließen ließen, wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte, die eine klare Bande auf Höhe des zu erwartenden Amplikons zeigten, ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Das extrahierte DNA-Fragment wurde schließlich bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg) sequenziert und die ausgegebene Sequenz mit der annotierten Primer-spezifischen Sequenz verglichen (*Pairwise Sequence Alignment (NUCLEOTIDE)*, EMBOSS Needle; *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST®). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich LightCycler®-Primer verwendet, die diese Kriterien erfüllten.

## **2.2.4 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.4.1 Arbeiten mit Gewebeproben**

#### **2.2.4.1.1 Proteinisolierung für Western Blot**

Für die Proteinisolierung aus Lebergewebe wurde der DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen verwendet. Hierfür wurde das für die Proteinisolierung aufbewahrte Lysat der RNeasy-Säule verwendet (2.2.3.2.1). Zur Präzipitation der Proteine wurde das Lysat zunächst mit einem Volumen APP-Puffer versetzt. Für Lysate aus Gewebestücken < 20 mg (ca. 600 µl Lysat) wurden 600 µl APP-Puffer zugegeben, für Lysate aus Gewebestücken

> 20 mg (ca. 1.000 µl Lysat) 1.000 µl APP-Puffer. Die Proben wurden gut resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert und so das präzipitierte Protein pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Proteinpellet für 15 min bei 25 °C vollständig getrocknet. Im Anschluss wurden die Proteine in 5%iger SDS-Lösung aufgenommen. Für Proteinpellets aus Gewebestücken < 10 mg wurden 100 µl SDS-Lösung verwendet, für Proteinpellets aus Gewebestücken < 20 mg 200 µl und für Proteinpellets aus Gewebestücken > 20 mg bis zu 400 µl. Um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen, wurden die mit SDS-Lösung überschichteten Pellets zwei- bis dreimal für 10 s bei 20 % Amplitude mit dem Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070 geschallt. Daraufhin wurden die Proben über Nacht bei -20 °C eingefroren und am Folgetag nochmals ein- bis zweimal für 10 s bei 20 % Amplitude geschallt. Nachdem die Proteinpellets vollständig gelöst waren, wurden die Lysate für 5 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Konzentration der Proteinlysate nach deren Isolierung zu bestimmen, wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Bei diesem Kit beruht die Quantifizierung auf einer kolorimetrischen Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA). Unter alkalischen Bedingungen sind Proteine in der Lage Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen zu reduzieren (Biuret-Reaktion), welche wiederum mit BCA einen intensiv violetten Komplex bilden. Da dieser Farbstoff stabil ist und sich seine Synthese über eine große Spannweite proportional zur Proteinkonzentration verhält, kann durch die Intensität der Farbe die Proteinkonzentration genau ermittelt werden [193]. Die Farbreaktion wird mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Anhand einer seriell verdünnten Standardkurve aus BSA (2.000 µg/ml bis 31,25 µg/ml, bovines Serum-Albumin) und unter Verwendung der Microplate Manager® Software 6.2 von Bio-Rad, kann die Konzentration der Proben berechnet werden.

Um im Detektionsbereich des Photometers und innerhalb der Standardkurve zu liegen, wurden die Proben für den BCA Protein Assay 1 : 10 in PBS verdünnt. Jeweils 10 µl des

Standards wurden in Doppelwerten und jeweils 10 µl der Proben wurden in Triplikaten auf eine 96-well-Platte pipettiert und pro well 200 µl des BCA-Reagenzgemisches (Reagenz A : Reagenz B, 50 : 1) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Assay bei 540 nm mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Reader ausgelesen.

#### **2.2.4.1.3 SDS-PAGE**

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür werden die Proben zunächst mit Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Durch das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS und β-Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert und deren Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Dabei bewirkt das β-Mercaptoethanol die Spaltung der Disulfidbrücken im Protein [194]. Das SDS hingegen bindet an hydrophobe Bereiche der Proteine und überlagert so die Eigenladung der Proteine. Dadurch werden die Proteine gleichmäßig negativ geladen und aufgrund der Abstoßung der negativen Ladungen linearisiert [195]. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Proteine ausschließlich aufgrund ihrer Molekülmasse unterschiedlich stark von der Anode angezogen werden und sich so im Gel auftrennen.

In dieser Arbeit wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell System von Bio-Rad für die SDS-PAGE verwendet. Die SDS-Polyacrylamidgele setzten sich dabei aus einem großporigen 5%igen Sammelgel und einem engporigen 15%igen Trenngel zusammen, die nacheinander zwischen zwei Glasplatten übereinander gegossen werden: unten das Trenngel zur Auftrennung der Proteine, oben das Sammelgel mit den Beladungstaschen, an dessen Übergang zum Trenngel sich die Proteine aufkonzentrieren. APS und TEMED dienen als Radikalstarter bzw. Katalysator für die Polymerisation der Acrylamidgele. Nach dem Auspolymerisieren der Acrylamidgele wurden diese in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und diese mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt. Pro Tasche wurden 20 µg Gesamtprotein geladen, welche zuvor mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und erhitzt wurden. Zusätzlich zu den Proben wurden in eine Tasche 5 µl PeqGOLD Prestained Protein Marker als Standard aufgetragen. Die SDS-PAGE lief bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel für 70 - 80 min.

#### 2.2.4.1.4 Western Blotting

Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die im Agarosegel aufgetrennten Proteine auf eine Immun-Blot® PVDF-Membran übertragen, um die Proteine schließlich spezifisch über Antikörperfärbungen nachweisen zu können. Hierfür wurde das Mini Trans-Blot Module von Bio-Rad verwendet. Zunächst wurde die Membran für circa 20 s in Methanol aktiviert. Pro Western Blot wurden vier Whatman® gel blotting paper GB003 und zwei Schaumstoffpads in Wettransfer-Puffer getränkt. Im Anschluss wurden die Membran und das Acrylamidgel zwischen je zwei Whatman® paper und je einem Schaumstoffpad in die Blotting-Kassette eingespannt. Die Kassette wurde in der Blotting-Apparatur platziert, diese komplett mit Wettransfer-Puffer befüllt und mit einem Kühlblock bestückt. Das Western Blotting erfolgte bei 80 V für 90 min. Dabei wurde die Spannung so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden.

#### 2.2.4.1.5 Proteindetektion

Um Proteine auf der PVDF-Membran detektieren zu können, wurde die PVDF-Membran direkt nach dem Western Blotting für 1 h mit 5%iger Blockierlösung inkubiert. Dabei werden unbesetzte Bindestellen der Membran blockiert, was die Grundvoraussetzung für eine spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion ist. Im Anschluss wurde die Membran viermal für je 15 min in TBS-T gewaschen und schließlich ü. N. bei 4 °C in Antigen-spezifischem Primärantikörper, der in der Regel 1 : 500 bis 1 : 1.000 verdünnt wurde (Tabelle 5), inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte für 1 h bei RT die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 6), der in der Regel 1 : 5.000 in 5%iger Blockierlösung verdünnt wurde. An diesen ist als Reporterenzym eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, mit Hilfe derer letztlich die Proteindetektion gelingt. Es folgten weitere drei Waschschrte in TBS-T für je 10 min, sowie zwei Waschschrte für je 5 min in TBS. Schließlich wurden die Membranen für 5 min im Dunkeln in Amersham™ ECL™ Prime WB Detection Reagent (*Luminol Enhancer-Lösung* : Peroxid-Lösung, 1 : 1) inkubiert. Dabei wird das darin enthaltene HRP-Substrat in ein messbares chemilumineszentes Signal umgesetzt, das am Chemidoc™ XRS+ Imaging System von Bio-Rad gemessen werden konnte.

#### **2.2.4.1.6 Coomassie-Färbung**

Bei der Coomassie-Färbung werden alle Proteine, unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz, angefärbt. Die Färbung des Gesamtproteins beruht dabei darauf, dass sich der blau-violette Farbstoff an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert.

Für diese Färbung wurden die Membranen bzw. Acrylamidgele für 1 h in Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution inkubiert. Die Membranen wurden im Anschluss mit H<sub>2</sub>O entfärbt, Gele hingegen mit Coomassie-Entfärbelösung. Dadurch wurden die Proteine als blaue Banden auf der Membran bzw. auf dem Acrylamidgel sichtbar. Mit Hilfe des Chemidoc<sup>TM</sup> XRS+ Imaging System wurde die Coomassie-Färbung dokumentiert.

#### **2.2.4.1.7 Quantifizierung von Proteinbanden**

Die Quantifizierung der Proteinbanden der Immunoblots sowie der Coomassie-gefärbten Membranen wurde mit Hilfe des Programms ImageJ (1.47v) durchgeführt [196].

Zur Normalisierung etwaiger Beladungsschwankungen einzelner Spuren wurde entweder die Expression eines Housekeepers wie GAPDH oder  $\beta$ -Aktin herangezogen, oder die Menge an Coomassie-gefärbtem Gesamtprotein.

#### **2.2.4.1.8 Proteinisolierung und Immunpräzipitation (IP) von hepatischem Chemerin für die Massenspektrometrie**

Um Aufschluss über die weitere Prozessierung von Chemerin156 (Ch156) nach der AAV-vermittelten hepatischen Überexpression von Chemerin156 zu erhalten, wurde Chemerin aus Tumorgewebe der Mäuse immunpräzipitiert und im Anschluss massenspektrometrisch untersucht. Hierfür wurde der Pierce<sup>TM</sup> Classic Magnetic IP/Co-IP Kit verwendet.

Dieser ermöglicht eine effektive und effiziente Immunpräzipitation des gewünschten Proteins durch magnetische Kügelchen (Magnetic Beads), an welche ein rekombinantes Fusionsprotein (Protein A/G) aus den bakteriellen Antikörper-bindenden Proteinen A und G angelagert ist. Diese binden an die konservierten Antikörperbereiche (F<sub>c</sub>-Region der schweren Kette) und können daher Komplexe mit einem breiten Spektrum an Antikörpern formen [197]. Diese Fähigkeit wird bei der Immunpräzipitation genutzt, um das gewünschte Antigen über einen Antigen-spezifischen Antikörper zu binden, der dann wieder-

rum über das Protein A/G der Beads präzipitiert werden kann. Letztlich kann das gewünschte Antigen vom Antikörper gelöst und auf diese Weise angereichert werden.

Für die Proteinisolierung und Immunpräzipitation von hepatischem Chemerin wurden pro Tier 200 mg Tumorgewebe eingesetzt. Dem IP-Lysepuffer wurden direkt vor dem Gebrauch Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail) zugesetzt. Das gefrorene Gewebe wurde in M-Tubes überführt, mit 1 ml IP-Lysepuffer überschichtet und mit Hilfe des gentle-MACS™ Dissociators im Programm „RNA frozen“ homogenisiert. Die Lysate wurden kurz abzentrifugiert und in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 rpm bei dem sich eine Fettschicht oberhalb des Proteinlysats abscheidet. Um das Fett vom Proteinlysats zu trennen, wurde mit einer Spritze mit feiner Kanüle das Lysat vorsichtig aufgesogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation und Überführung des Proteinlysats mit Hilfe einer Spritze wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Lysate wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Assays (2.2.4.1.2) 1 : 50 in PBS verdünnt.

Im Anschluss wurden 1.000 µg des isolierten Proteins und 10 µg des IP-Antikörpers ( $\alpha$ -muriner Chemerin-Antikörper, AF2325, R&D) mit IP-Lysepuffer auf ein Volumen von 500 µl gebracht, vorsichtig invertiert und schließlich ü. N. bei 4° C inkubiert. Dabei bildete sich der Immunkomplex aus Antigenen und Antikörper aus. Neben den soeben beschriebenen Proben wurden zusätzlich noch eine Negativkontrolle mit Leberprotein, jedoch ohne IP-Antikörper, sowie eine Negativkontrolle mit IP-Antikörper, jedoch ohne Leberprotein vorbereitet und ü. N. bei 4° C inkubiert.

Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden die Proteinisolierung und die Bildung des Immunkomplexes an einem Tag durchgeführt. Das restliche Leberlysats wurde bei -80 °C gelagert.

Am Folgetag wurden zunächst für jede Probe 25 µl der Pierce Protein A/G Magnetic Beads in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 175 µl IP-Waschpuffer gewaschen. Indem die Reaktionsgefäße in einen magnetischen Ständer gestellt wurden, der die Beads seitlich anzieht und fixiert, konnte der IP-Waschpuffer abgenommen werden. Der Waschschrift wurde mit 1 ml IP-Waschpuffer unter vorsichtigem, 1-minütigem vortexen wiederholt. Der ü. N. inkubierte Mix aus Leberprotein und IP-Antikörper (= Immunkomplex) wurde zu den gewaschenen Beads gegeben und für 1 h bei RT unter langsamem Schütteln

(700 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden mit Hilfe des Magnet-Ständers die Beads mit dem daran gebundenen Immunkomplex fixiert und die restliche, ungebundene Probe abgenommen. Es folgten drei Waschschriffe mit je 500 µl IP-Waschpuffer, sowie ein weiterer mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Beads in 100 µl Lane Marker Sample Buffer, der zuvor 1 : 5 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt wurde, aufgenommen. Durch 10-minütige Inkubation der Beads im Lane Marker Sample Buffer wurde das Antigen schließlich unter langsamem Schütteln (700 rpm) bei RT eluiert. Das IP-Eluat und das darin immunpräzipitierte hepatische Chemerin wurden mit Hilfe des Magnet-Ständers von den Beads separiert und der Erfolg der IP mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Durch spezifische Detektion des Chemerin-Proteins auf den Membranen konnte so die Zuverlässigkeit der Chemerin-IP bestätigt werden.

Für die massenspektrometrische Analyse des präzipitierten hepatischen Chemerins wurden 35 µl des IP-Eluats auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Das Gel wurde nach dem Lauf in Coomassie Brilliant Blue gefärbt, mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt und schließlich die blau gefärbten Chemerin-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Frau Dr. Astrid Bruckmann der *core facility* der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Deutzmann (Universität Regensburg) durchgeführt (2.2.8.2.).

## **2.2.4.2 Arbeiten mit Serum/Plasmaproben**

### **2.2.4.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Um gelöste Proteine aus Serumproben spezifisch nachweisen und quantifizieren zu können, wurde der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Dabei war in dieser Arbeit insbesondere die Quantifizierung von Chemerin im Serum der AAV-injizierten Mäuse von Bedeutung, da dies einen Rückschluss auf die Adeno-assoziierte hepatische Überexpression von Chemerin<sup>156</sup> zuließ.

Die verwendeten DuoSet<sup>®</sup> ELISAs von R&D beruhen auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Dabei wird ein Antikörper (*coating/capture antibody*) im well einer 96-well-Platte verankert, der spezifisch das zu detektierende Antigen bindet. Die Detektion erfolgt dann über einen zweiten Biotin-gekoppelten Antikörper (*detection antibody*), der ebenfalls an das Antigen, jedoch an ein anderes Epitop, bindet. Der so entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex kann dann durch eine enzymatische Farbreaktion detektiert werden.

Hierfür wird zunächst ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym (Streptavidin-HRP) zugegeben. Durch die Interaktion zwischen Streptavidin und dem Biotin des *detection antibody* wird das Enzym (HRP, *horseradish peroxidase*) indirekt an den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Letztlich kann die HRP das zugegebene farblose Substrat quantitativ in ein kolorimetrisch detektierbares Produkt umsetzen. Die enzymatische Reaktion wird schließlich durch Zugabe der ELISA-Stopplösung beendet und der Farbumschlag kolorimetrisch vermessen.

Zunächst wurde für den ELISA eine 96-well-Platte ü. N. mit je 100 µl *capture antibody*/PBS pro well inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit je 200 µl Reagent Diluent blockiert. Es folgten weitere drei Waschschrte, bevor die in Reagent Diluent verdünnten Proben in Doppelwerten von je 100 µl pro well auf die Platte aufgetragen wurden. Zur Quantifizierung der Proben wurde zusätzlich ein seriell verdünnter Standard mit bekannter Konzentration (0 pg/ml - max. 2.000 pg/ml) des zu quantifizierenden Proteins, ebenfalls in Doppelwerten von je 100 µl pro well, eingesetzt. Während einer zweistündigen Inkubation bei RT erfolgte die Bindung des zu detektierenden Proteins an den *capture antibody*. Durch erneutes dreimaliges Waschen wurde ungebundenes Protein entfernt und im Anschluss für 2 h der *detection antibody* (verdünnt in Reagent Diluent, je 100 µl pro well) inkubiert. Weitere drei Waschschrte folgten, bevor der Assay mit 100 µl Streptavidin/HRP (1 : 200 in Reagent Diluent verdünnt) für 20 min im Dunkeln inkubiert wurde. Nach viermaligem Waschen wurden pro well 100 µl Substrat (Substrate Reagent Pack, A : B = 1 : 1) pipettiert und der Assay weitere 20 min im Dunkeln inkubiert. Die dabei ablaufende Farbreaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 50 µl ELISA-Stopplösung beendet. Mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Readers wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, die des Hintergrunds bei 540 nm. Die Auswertung des ELISAs erfolgte unter Verwendung der Microplate Manager® Software 6.2 von Bio-Rad.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murines und humanes Chemerin, sowie murines Adiponektin im Plasma bzw. Serum bestimmt. Die Proben wurden für den murinen Chemerin-ELISA 1 : 1.000 in Reagent Diluent verdünnt, für den murinen Adiponektin-ELISA 1 : 20.000.

### **2.2.5 Messung des oxidativen Stresses in der Leber**

Oxidativer Stress kann die oxidative Degradation von Lipiden bewirken. Eines der dabei entstehenden Endprodukte ist Malondialdehyd (MDA) [198]. Um den oxidativen Stress in der Leber zu messen, wurde daher mit Hilfe des Peroxidation Assay Kits (Colorimetric / Fluorometric) die MDA-Konzentration in Leberlysaten bestimmt. Dabei reagiert MDA unter Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA) zu einem MDA-TBA-Addukt. Dieses ist kolorimetrisch bei 540 nm detektierbar. Die Lyse der Leberproben und die Durchführung des Assays erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Messung fand mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Readers statt.

### **2.2.6 Histologische Untersuchungen**

Um histologische Untersuchungen an Geweben vornehmen zu können, mussten diese unmittelbar nach der Präparation durch Formalinfixierung und Paraffinierung konserviert werden (2.2.2.4). Auf diese Weise bleiben alle Strukturen des Gewebes erhalten und können im Anschluss durch histologische Färbungen sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurden zunächst mit Hilfe des Microtoms RM2145 3 - 5 µm dicke Schnitte der paraffinierten Lebern angefertigt, die auf SUPERFROST ULTA PLUS® Objektträger übertragen wurden. Bis zur Färbung der Schnitte mit Hämalaun/Eosin bzw. Sirius-Red wurden diese bei RT gelagert.

#### **2.2.6.1 Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E)**

Um die Gewebestruktur der Lebern unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Dabei werden durch den basischen Farbstoff Hämalaun alle basophilen Strukturen des Gewebes blau angefärbt, wozu auch Strukturen wie der Zellkern zählen. Alle acidophilen Strukturen hingegen, werden durch das Eosin rötlich gefärbt. Aus diesem Grund erscheint das Zellplasma der Zellen nach der Färbung rötlich.

Vor der Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Histol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert (Tabelle 22).

Absteigende Alkoholreihe				
2x 10 min	2x 5 min	2x 5 min	2x 5 min	5 min
Histol	100 % EtOH	96 % EtOH	70 % EtOH	ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 22: Entparaffinierung und absteigende Alkoholreihe zur Rehydratisierung.**

Die rehydratisierten Schnitte wurden für 5 min in Hämalaun inkubiert und im Anschluss für circa 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Aufgrund der pH-Änderung kommt es dabei zur Farbänderung und Stabilisierung der blauen Farbe im Zellkern. Unmittelbar danach folgte eine 5-minütige Inkubation in 0,5%iger Eosin G-Lösung für die Rotfärbung des Zytoplasmas. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert (Tabelle 23).

Aufsteigende Alkoholreihe				
1x 2 min	2x 2 min	2x 2 min	2x 2 min	2x 5 min
ddH <sub>2</sub> O	70 % EtOH	96 % EtOH	100 % EtOH	Histol

**Tabelle 23: Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratisierung.**

Letztlich wurden die gefärbten Leberschnitte mit einem Tropfen Schnelleindeckmittel Entellan® und Deckgläschen (Menzel-Gläser, 24 x 50 mm) eingedeckt und ü. N. getrocknet. Die Schnitte wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops Nikon Eclipse E600 mikroskopiert.

### 2.2.6.2 Sirius-Red-Färbung

Um fibrotische Veränderungen im Lebergewebe darstellen zu können, wurde auf die Sirius-Red-Färbung zurückgegriffen. Dieser stark anionische Farbstoff zeigt hydrophile Eigenschaften und seine Sulfonsäuregruppen reagieren mit basischen Aminogruppen der Kollagenfasern des Bindegewebes. Dabei lagern sich die Sirius-Red Moleküle parallel entlang der Kollagenfasern an [199].

Für die Sirius-Red-Färbung der Lebern wurden zunächst die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydratisiert (Tabelle 22). Es folgte eine 10-sekündige Inkubation in 1x PBS-T, bevor die Schnitte für 30 min in Sirius-Red-Lösung angefärbt werden. Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert (Tabelle 23). Nach dem Eindeckeln mit Entellan® wurden die Schnitte mit Hilfe des Konfokalmikroskops Nikon Eclipse E600 mikroskopiert.

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS Statistics 21 (IBM, Leibniz Rechenzentrum, München). Diese Software wurde sowohl für die Berechnung des Mann-Whitney U Tests und der einfachen ANOVA mit post-hoc Bonferroni-Korrektur als auch für die Erstellung der Graphen verwendet. Die Boxplots zeigen hierbei den Median der Werte, die obere (0,75) und untere (0,25) Quartile sowie den gesamten Wertebereich. Der Student's t-Test wurde mit MS Excel oder SPSS Statistics 21 ausgeführt. Ausreißer wurden durch Kreise oder Sterne kenntlich gemacht. p-Werte ab einem Wert  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

### **2.2.8 Versuche in Kooperationen bzw. Auftragsarbeiten**

#### **2.2.8.1 Bereitstellung humaner Leberproben**

In Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Thomas S. Weiß der Kinderuniklinik Ostbayern (KUNO, Universitätsklinikum Regensburg) konnten in dieser Arbeit humane Leberproben untersucht werden. Sowohl die Normal- und Tumorgewebe der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte als auch die der HBV/HCV-HCC-Kohorte wurden von Prof. Dr. rer. nat. Thomas S. Weiß und seinem Team gesammelt. Zusätzlich zu den Gewebeproben wurden uns die zugehörigen, anonymisierten Patientencharakteristika zur Verfügung gestellt.

#### **2.2.8.2 Massenspektrometrie von Proteinen**

Um die weitere Prozessierung des überexprimierten murinen Chemerin156 (Ch156) näher untersuchen zu können, wurde Chemerin aus Tumorgewebe mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP, 2.2.4.1.8) isoliert und über ein SDS-Gel (2.2.4.1.3) aufgetrennt. Durch Coomassie-Färbung (2.2.4.1.6) konnten die Chemerinproteinbanden gezielt ausgeschnitten und für die massenspektrometrischen Analysen vorbereitet werden. Die Elution und der Trypsin-Verdau der Chemerin-Proben sowie die Massenspektrometrie wurden in Kooperation mit Frau Dr. Astrid Bruckmann der *core facility* der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Deutzmann (Universität Regensburg) durchgeführt.

Insgesamt wurden Proben von je 8 Tieren, die mit Empty-AAVs bzw. Ch156-AAVs injiziert worden waren, massenspektrometrisch analysiert. Von jedem Tier wurde das Vorkommen der verschiedenen Chemerin-Isoformen (Ch153, Ch154, Ch155 bzw. Ch156) im Tumorgewebe untersucht.

### **2.2.8.3 Massenspektrometrie von Lipiden**

Für die Quantifizierung von Lipiden mittels Massenspektrometrie wurde eine Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg geschlossen (PD Dr. Gerhard Liebisch und Dr. Sabrina Krautbauer).

Dabei wurden die Lipide durch eine direkte Einspritzung in die Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) im positiven Ionenmodus untersucht [200, 201]. Die Lebergewebe wurden entsprechend der Methode nach Bligh & Dyer vorbereitet [202].

In der Lipid-Massenspektrometrie wurden die Tumorgewebe und parakarzinomatösen Normalgewebe von 21 HCC-Patienten untersucht (2.2.1.1).

### **2.2.8.4 Sequenzierung von gDNA**

In Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Dr. Charalampos Aslanidis) konnte das TP53-Gen von 21 HCC-Patienten sequenziert werden (2.2.3.1.3). Hierfür wurde unserer Arbeitsgruppe unter anderem der ABI Prism Genetic Analyzer 3100xl (PE Applied Biosystems, Darmstadt) sowie die SEQUENCHER Software der Gene Codes Corporation (Ann Arbor, Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.8.5 Microarray-Analysen**

Um einen Hinweis auf die Genexpressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe der Empty-/Ch156-AAV-injizierten Tiere zu erhalten, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt.

Hierfür wurde aus Gewebeproben zunächst RNA isoliert (2.2.3.2.1), diese aufgereinigt (2.2.3.2.3) und schließlich für den Microarray Mouse Gene 2.1. ST verwendet. Insgesamt wurde mRNA von je 10 Tieren mit Empty-AAV-Injektion bzw. Ch156-AAV-Injektion eingesetzt. Von jedem Tier wurde vergleichend die mRNA-Expression von Normalgewebe und Tumorgewebe untersucht.

Die weitere Probenprozessierung und Microarray-Hybridisierung wurde in der *Genomics Core Facility* Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB, Universität Regensburg) durchgeführt.

#### **2.2.8.6 Bestimmung der *ex vivo*-Bioaktivität von Serum-Chemerin mit Hilfe des Tango Assays**

Um die Bioaktivität des Chemerin-Proteins im Serum von Mäusen mit NASH-assoziiertem HCC bzw. nach Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression zu bestimmen, wurde der Tango Assay verwendet. Die Durchführung des Assays fand im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Christopher Sinal der Dalhousie Universität in Halifax (Nova Scotia, Kanada) statt. Der Tango Assay ist ein Zell-basierter Reportergen-Assay, der die *ex vivo*- $\beta$ -Arrestin 2-Aktivierung der Chemerin-Rezeptoren CMKLR1 und GPR1 quantitativ anhand eines fluoreszenten Signals ermittelt [121].

Basis des Assays sind HEK293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney*), die ein Fusionsprotein aus dem GPCR (CMKLR1 bzw. GPR1) mit einem nicht-nativen Transkriptionsfaktor exprimieren. Dieser ist C-terminal über eine TEV-Protease-Schnittstelle (*Tabacco Etch Virus*) an den Rezeptor gekoppelt.

Bindet Chemerin an diesen modifizierten GPCR kommt es zur Rekrutierung des Protease-getaggen  $\beta$ -Arrestin 2, was zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors führt. Dieser wird in den Kern der Zelle transloziert und führt dort zur Induktion des Reportergens [158]. Unter Zugabe eines Substrats kann dann die Bioaktivität anhand des emittierten Lichts quantifiziert werden.

Zusätzlich zu den Proben wurde auch die Emission eines Standards aus seriell verdünntem rekombinantem murinem Ch156 (R&D Systems) gemessen. Anhand dessen wurde die Bioaktivität der Serum-Chemerin-Proben berechnet.

### 3 Ergebnisse

Chemerin wird in erster Linie von den Adipozyten und Hepatozyten, zu geringeren Teilen aber auch von den Sternzellen der Leber synthetisiert [109, 110]. Der Serumspiegel von Chemerin wird jedoch vor allem durch die Synthese bzw. Sekretion durch die Adipozyten determiniert. Die adipozytäre Expression von Chemerin ist daher bei Übergewicht schon aufgrund der größeren Fettdepots erhöht [32]. Die NASH ist eine häufige Folgeerkrankung der Leber bei Übergewichtigen. Dabei ist die hepatische Expression von Chemerin in der NASH sowohl im Menschen als auch im murinen Modellorganismus in vielen, aber nicht allen Studien erhöht [110, 129, 132]. Die NASH wiederum gilt als Risikofaktor für die Entstehung des HCCs. Im HCC ist – im Gegensatz zur NASH – die Chemerin-Expression reduziert [38]. Dabei ist die geringere Chemerin-Expression im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert [38, 128]. Um also neue Erkenntnisse über Chemerin und dessen Bedeutung bei der Progression der NASH zum HCC zu gewinnen, wurden ein NASH- sowie ein NASH-assoziiertes HCC-Mausmodell analysiert.

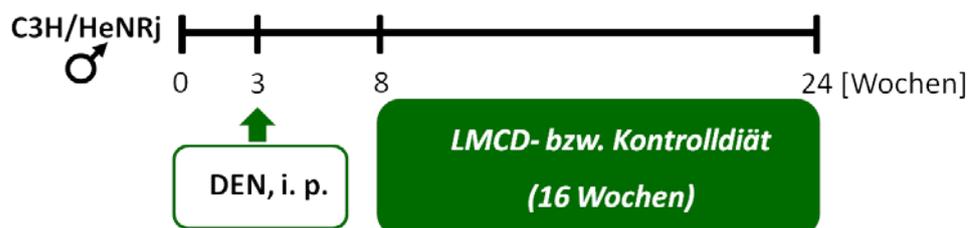
#### 3.1 Chemerin in der murinen NASH

Die NASH kann im Tiermodell durch das Füttern einer LowMethionin-Cholin-defizienten Diät (LMCD-Diät) hervorgerufen werden. Dabei kommt es aufgrund des reduzierten Triglyzeridexports aus der Leber und des erhöhten oxidativen Stresses zur Verfettung, Entzündung und Fibrose des Organs. Die LMCD-Diät bietet somit die Möglichkeit die Pathogenese der humanen NASH im Tiermodell nachzuahmen [178-181]. Die Verfettung der Leber sollte dabei in einer Steigerung der endogenen Chemerin-Synthese resultieren [32, 110, 132]. Um des Weiteren den Fortschritt der NASH zum HCC analysieren zu können, wurde zudem das Karzinogen Diethylnitrosamin (DEN) eingesetzt [174-177]. Die genaue Wirkweise der LMCD-Diät sowie des DENs sind in den Abschnitten 2.2.2.3.1 und 2.2.2.3 beschrieben.

Die Ergebnisse der Versuche dieses Kapitels wurden im April 2018 im Artikel „*Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis*“ im Journal *ANTICANCER RESEARCH* veröffentlicht [203].

### 3.1.1 Versuchsablauf des NASH-HCC-Mausmodells

Im Rahmen dieser Studie wurden ausschließlich männliche C3H/HeNRj Mäuse verwendet. Diesen wurde im Alter von 18 bis 21 Tagen pro Gramm Körpergewicht einmalig 25 µg DEN/ddH<sub>2</sub>O i. p. injiziert, was im Verlauf des nächsten halben Jahres die Entstehung von Lebertumoren begünstigt [174, 176, 177]. Ab einem Alter von 8 Wochen wurde den Mäusen für eine Dauer von 16 Wochen die LMCD- bzw. die zugehörige Kontrolldiät (K) gefüttert, wodurch die NASH induziert wird. Dabei wurde wöchentlich das Körpergewicht und die Futtermittelaufnahme der Tiere protokolliert. Nach 24 Wochen wurde die Studie beendet. In Abbildung 5 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt [203].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des NASH-HCC-Mausmodells.** Knapp 3 Wochen alten Tieren wird zur Tumorinduktion einmalig DEN (25 µg/g Körpergewicht) i. p. injiziert. Ab einem Alter von 8 Wochen wird zur NASH-Induktion eine LMCD- bzw. die zugehörige Kontrolldiät gefüttert. Im Alter von 24 Wochen erfolgt die Präparation der Tiere. (DEN, Diethylnitrosamin; i. p., intraperitoneal; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät).

Entsprechend der Kombination aus Injektion (ddH<sub>2</sub>O bzw. DEN) und Diät (LMCD- oder Kontrolldiät) ergaben sich vier Behandlungsgruppen. Pro Gruppe wurden 10 bis 11 Tiere untersucht, sodass für diese Studie insgesamt 43 Tiere verwendet wurden [203].

### 3.1.2 Körperliche Konstitution der Versuchstiere

Bei Versuchsabschluss wurde neben dem Körpergewicht das Gewicht der Leber, der Milz und verschiedener Fettdepots der Tiere bestimmt.

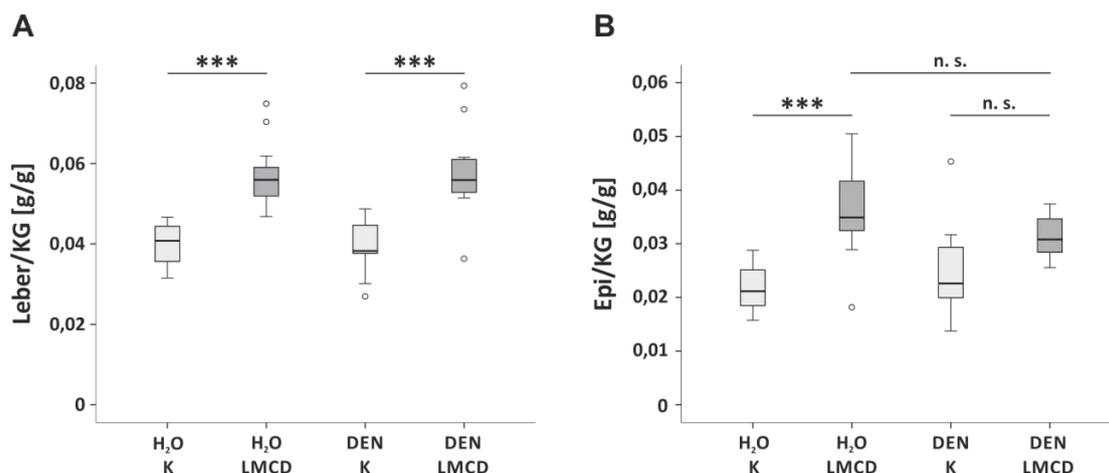
Das Körpergewicht der Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen unterschied sich weder infolge der DEN-Injektion, noch infolge der Diät (Tabelle 24) [203].

Körpergewicht [g] im Alter von 24 Wochen					
Gruppe	Anzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O-K	11	42,66	42,23	1,77	n. s.
H <sub>2</sub> O-LMCD	11	42,13	41,64	3,97	n. s.
DEN-K	10	43,18	42,15	3,06	n. s.
DEN-LMCD	11	43,70	41,44	6,80	n. s.

**Tabelle 24: Körpergewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Die Tiere hatten während der gesamten Studie und zum Zeitpunkt der Präparation ein vergleichbares Körpergewicht (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Für die bessere Vergleichbarkeit wurde das Gewicht der Leber sowie der Fettdepots jeder einzelnen Maus auf das jeweilige Körpergewicht (KG) normalisiert. Die Mäuse hatten nach 16-wöchiger Fütterung der LMCD-Diät höchstsignifikant schwerere Lebern als die Mäuse auf Kontrolldiät. Es zeigte sich kein Unterschied im Lebergewicht zwischen den H<sub>2</sub>O- und DEN-injizierten Tieren (Abbildung 6 A) [203]. Die epididymalen Fettdepots der Mäuse auf LMCD-Diät waren in der H<sub>2</sub>O-injizierten Gruppe höchstsignifikant schwerer. In der DEN-injizierten Gruppe war auf LMCD-Diät ebenfalls eine Steigerung der epididymalen Fettmasse zu beobachten, jedoch war diese nicht signifikant. Innerhalb der LMCD-Diät-gefütterten Tiere konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Injektionsgruppen festgestellt werden (Abbildung 6 B) [203].



**Abbildung 6: Gewicht der Leber und des epididymalen Fettgewebes der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Lebergewicht, (B) Gewicht des epididymalen Fettgewebes. Die Normalisierung der Werte (A) - (B) erfolgte auf das KG. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät; Epi, Epididymales Fettgewebe; KG, Körpergewicht; n. s., nicht signifikant). \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Das Gewicht der subkutanen (Tabelle 25) und perirenal Fettdepots (Tabelle 26) war zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen vergleichbar [203].

Subkutanen Fettgewebe/KG [mg/g] im Alter von 24 Wochen				
Gruppe	Median	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O-K	30,0	31,8	5,8	n. s.
H <sub>2</sub> O-LMCD	34,7	35,3	4,4	n. s.
DEN-K	39,5	38,1	6,1	n. s.
DEN-LMCD	34,5	36,9	9,6	n. s.

**Tabelle 25: Gewicht der subkutanen Fettdepots der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Normalisierung des Gewichts der subkutanen Fettdepots auf das Körpergewicht. (KG, Körpergewicht; DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Perirenales Fettgewebe/KG [mg/g] im Alter von 24 Wochen				
Gruppe	Median	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O-K	15,1	14,6	2,4	n. s.
H <sub>2</sub> O-LMCD	14,6	15,1	2,4	n. s.
DEN-K	17,0	17,1	3,6	n. s.
DEN-LMCD	16,8	16,7	2,7	n. s.

**Tabelle 26: Gewicht der perirenal Fettdepots der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Normalisierung des Gewichts der perirenal Fettdepots auf das Körpergewicht. (KG, Körpergewicht; DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Das Gewicht der Milz wurde weder durch die H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion noch die LMCD/K-Diät beeinflusst (Tabelle 27).

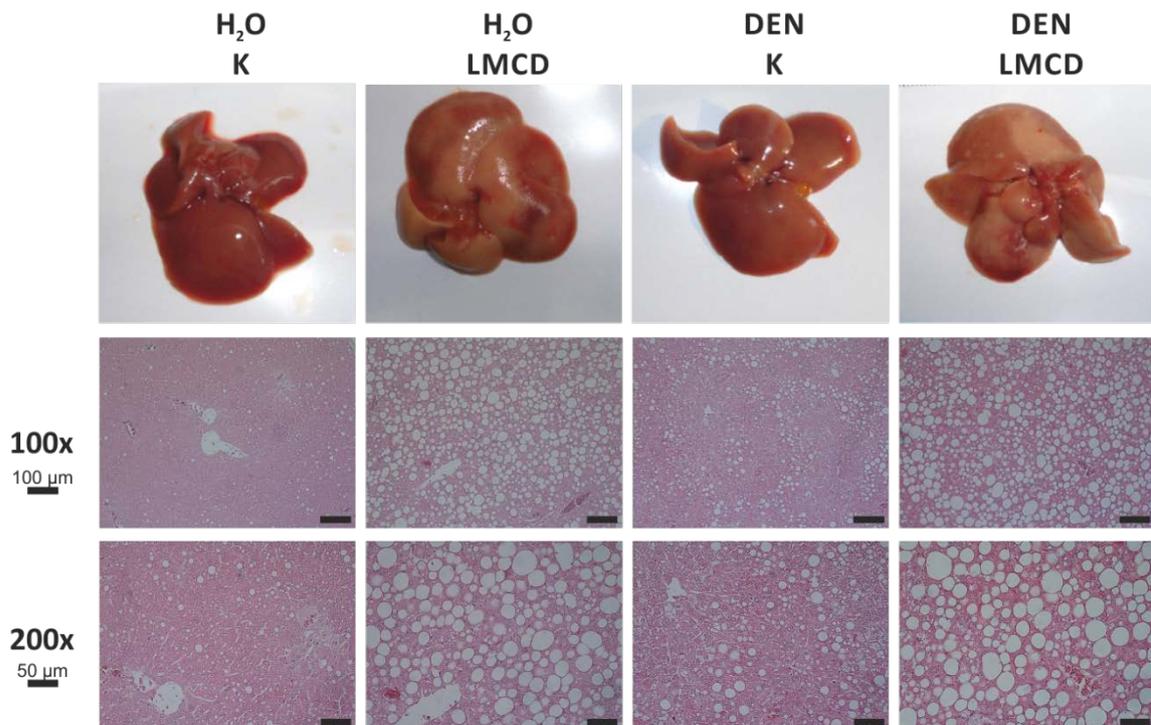
Milzgewicht/KG [mg/g] im Alter von 24 Wochen				
Gruppe	Median	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O-K	2,01	2,20	0,64	n. s.
H <sub>2</sub> O-LMCD	2,37	2,45	0,45	n. s.
DEN-K	2,12	2,01	0,87	n. s.
DEN-LMCD	2,37	2,17	0,90	n. s.

**Tabelle 27: Milzgewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Normalisierung des Milzgewichts auf das Körpergewicht. (KG, Körpergewicht; DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

### 3.1.3 Untersuchung der hepatischen Steatose

Um den Steatosegrad der Lebern bestimmen zu können, wurden diese zum einen makroskopisch betrachtet (Abbildung 7) [203]. Dabei konnte bei den LMCD-Diät-gefütterten Tieren beider Injektionsgruppen aufgrund der Verfettung der Leber eine hellere Grundfärbung beobachtet werden. Zum anderen wurde der Steatosegrad histologisch untersucht. Hierfür wurden Dünnschnitte der Lebern angefertigt und H&E gefärbt. Dabei treten die Fetteinlagerungen der Leber indirekt als ungefärbte weißerscheinende tropfenförmige Bereiche hervor. Die Lebern der LMCD-Diät-gefütterten Mäuse zeigten deutlich mehr Lipidtropfen als die der Kontrolldiät. Die DEN-Injektion selbst führt zu keiner nennenswerten Änderung des Steatosegrads [203].



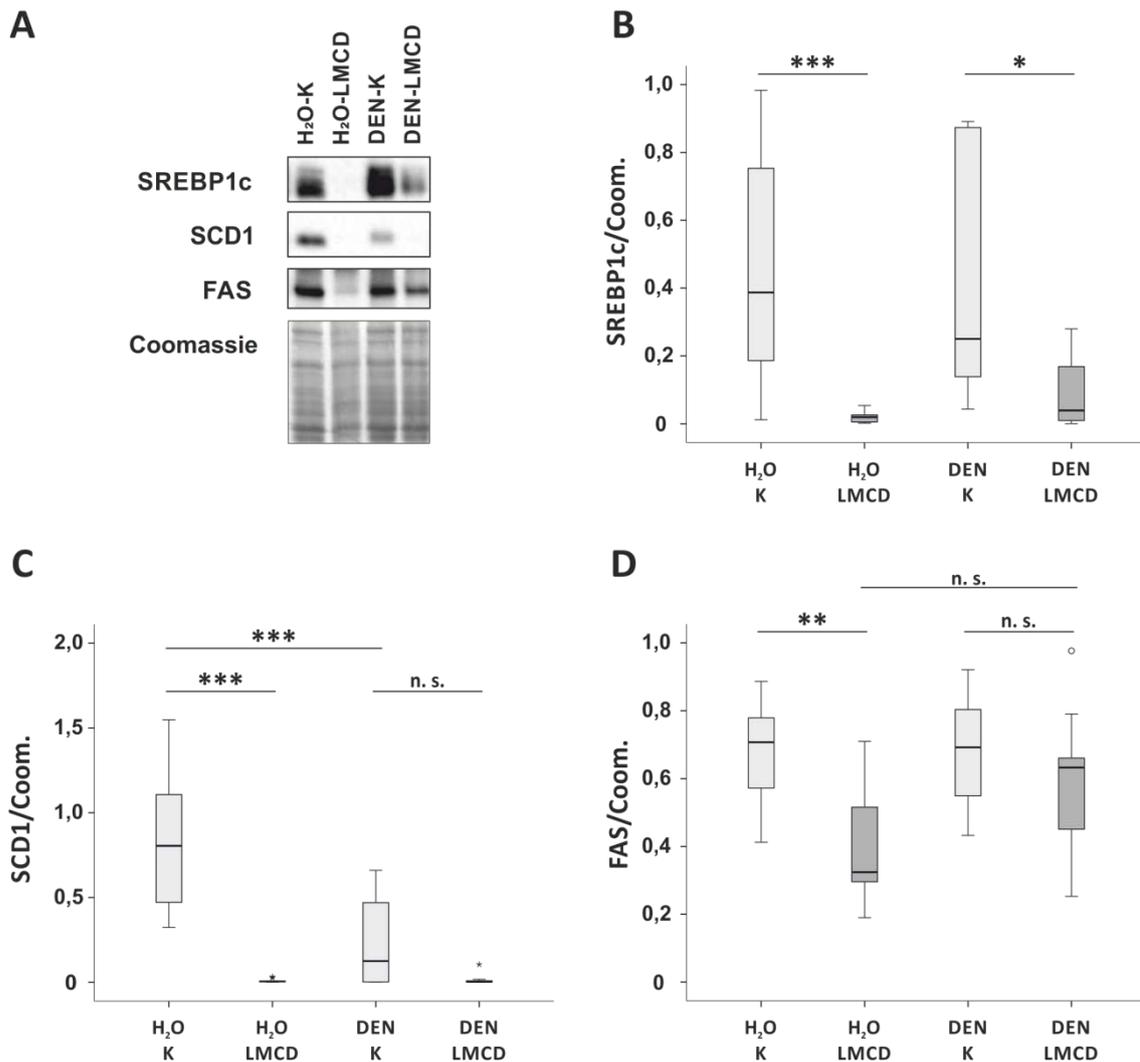
**Abbildung 7: Bestimmung des Steatosegrads der Lebern der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Makroskopische Betrachtung der Lebern sowie mikroskopische Aufnahmen der H&E-gefärbten Leberdünnschnitte. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

### 3.1.4 Untersuchung des Lipid- und Cholesterinmetabolismus

Um auf molekularer Ebene weitere Informationen bezüglich des Fettstoffwechsels zu erhalten, wurden SREBP-1c, SCD1, FAS, SREBP-2 und Caveolin-1 auf Proteinebene untersucht (SREBP, *Sterol Regulatory Element Binding-Protein*; SCD1, *Stearoyl-CoA Desaturase 1*, FAS, *Fatty Acid Synthase*).

SREBP1c ist wesentlich an der Regulation der endogenen Fettsäuresynthese (*de novo* Lipogenese) beteiligt [204, 205]. Als Transkriptionsfaktor kann es sowohl die Expression von SCD1 als auch von FAS erhöhen. SCD1 katalysiert die Bildung einfach ungesättigter Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren [206], welche wiederum von FAS gebildet werden [207]. Sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren werden mit Glycerin zu Triglyceriden verestert und finden sich auch in weiteren Fetten wie den Phospholipiden [205]. Folglich spielen diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Lipogenese und der Speicherung von Energie.

Das Füttern der LMCD-Diät bewirkte eine höchstsignifikante Reduktion der Expression von SREBP1c (nicht prozessierte Form) und SCD1 sowie eine hochsignifikante Reduktion der Expression von FAS in der NASH-Leber (Abbildung 8 A - D). Diese Verringerung der Proteinexpressionen infolge der LMCD-Diät war auch in der DEN-injizierten Gruppe zu sehen, welche allerdings nur bei SREBP1c signifikant war (Abbildung 8 B) [203]. Bei Fütterung der Kontrolldiät hatte die Injektion von DEN lediglich einen Effekt auf die Proteinexpression von SCD1. Diese war infolge der DEN-Injektion höchstsignifikant verringert (Abbildung 8 C) [203].

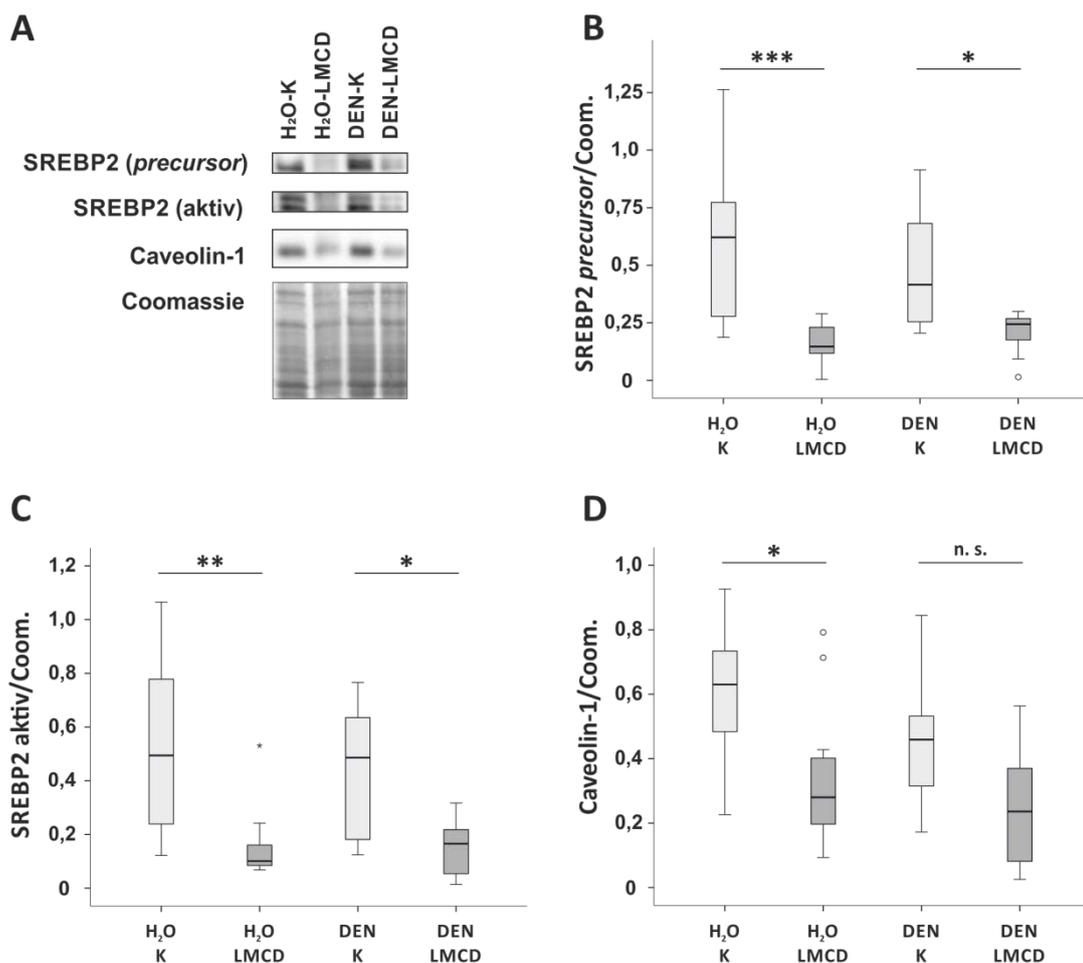


**Abbildung 8: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Exemplarischer Immunoblot der SREBP1c-, SCD1- und FAS-Proteinexpression. (B) Quantifizierung der SREBP1c-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. (C) Quantifizierung der SCD1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. (D) Quantifizierung der FAS-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

SREBP2 und Caveolin-1 regulieren die Cholesterinsynthese sowie die hepatische Lipidhomöostase. Bei Cholesterinmangel wird SREBP2 aus seiner Vorstufe (*precursor*) proteolytisch aktiviert und als Transkriptionsfaktor in den Kern transportiert. Dort aktiviert es Gene für die Cholesterin- und LDL-Rezeptor-Synthese [205]. Caveolin-1 hingegen ist ein Bestandteil der Caveolae der Membranen und schützt durch den Efflux von Cholesterin die Zellen vor intrazellulärer Cholesterinester- bzw. Lipidakkumulation [208, 209].

Die Expression des nicht-prozessierten (*precursor*) als auch des durch Proteolyse aktivierten SREBP2 war in der NASH-Leber infolge der LMCD-Diät hochsignifikant reduziert. Die DEN-Injektion beeinflusste diese Reduktion nicht (Abbildung 9 A - C) [203].

Die Caveolin-1-Proteinexpression war in der NASH-Leber signifikant verringert. Diese Verringerung war auch bei der DEN-LMCD-Gruppe zu sehen, allerdings war diese nicht signifikant (Abbildung 9 A, D) [203].



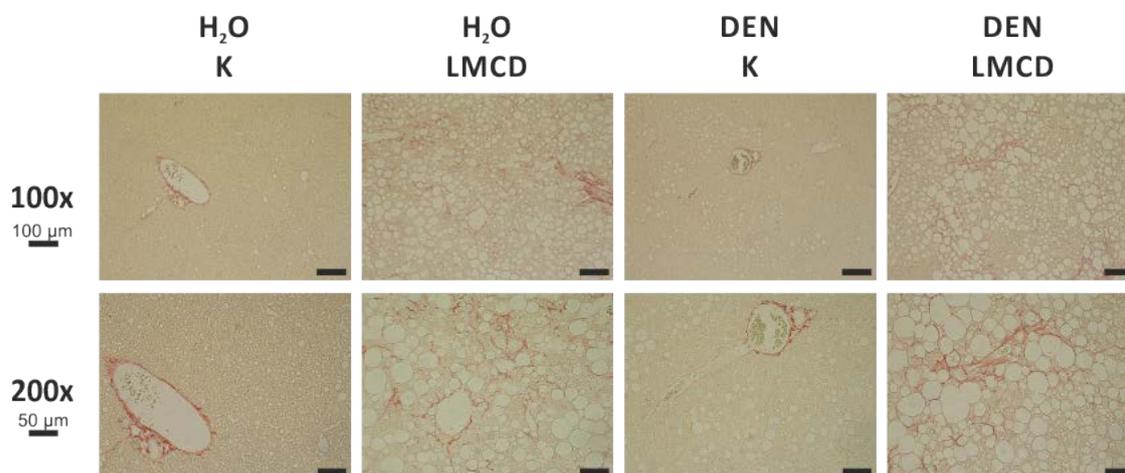
**Abbildung 9: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.**

(A) Exemplarischer Immunoblot der SREBP2 (*precursor*)-, SREBP2 (aktiv)- und Caveolin-1-Proteinexpression. (B) Quantifizierung der SREBP2 (*precursor*)-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. (C) Quantifizierung der SREBP2 (aktiv)-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. (D) Quantifizierung der Caveolin-1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.1.5 Untersuchung der hepatischen Fibrose und des oxidativen Stresses

Die NASH-Leber ist charakterisiert durch Entzündung und Fibrosierung des Gewebes [11]. Um zu überprüfen, ob die in dieser Studie verwendete LMCD-Diät zur hepatischen Fibrose führt und ob diese durch die DEN-Injektion beeinflusst wird, wurde eine Sirius-Red-Färbung von Leberdünnschnitten angefertigt. Dabei treten die Kollagenfasern durch eine rötliche Färbung hervor.

Die Lebern der Tiere auf Kontrolldiät wiesen keine Fibrose auf, weder nach H<sub>2</sub>O- noch nach DEN-Injektion. Die Lebern der LMCD-gefütterten Tiere zeigten eine deutliche Fibrose, wobei der Fibrosegrad durch die Injektion von DEN nicht beeinflusst wurde (Abbildung 10) [203].



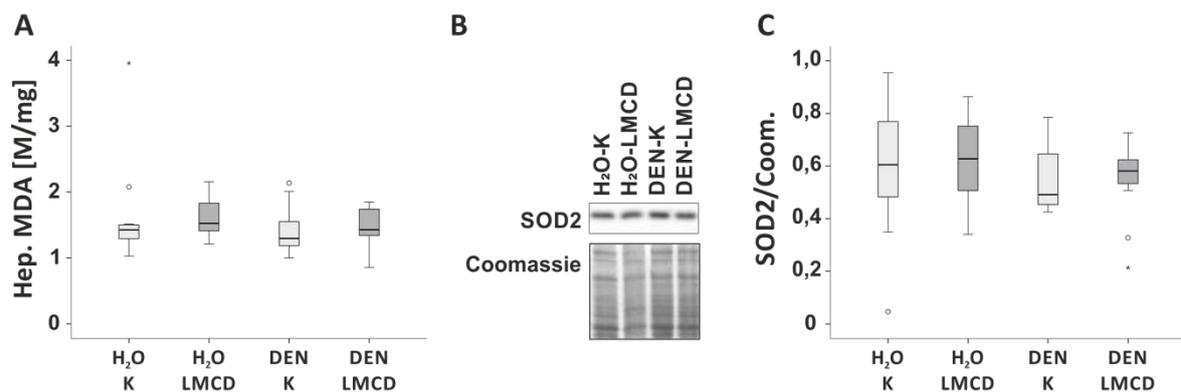
**Abbildung 10: Bestimmung des Fibrosegrads der Lebern der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** Mikroskopische Aufnahmen der Sirius-Red-gefärbten Leberdünnschnitte. Die Fibrosierung wird durch die rötlich gefärbten Kollagenfasern deutlich. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

Der geringe Methionin-Anteil der in dieser Studie verwendeten LMCD-Diät führte zu einem Mangel an Antioxidantien und damit einhergehend möglicherweise zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses [178]. Dieser zieht die Schädigung von Proteinen, Lipiden und der DNA nach sich und kann letztlich zur Apoptose und Nekrose der Hepatozyten führen. Die dabei stattfindende Aktivierung von Sternzellen und Kupfferzellen kann zur Fibrosierung des Gewebes beitragen [210].

Um also aufzuklären, ob die Fibrosierung der Leber mit einer Steigerung des oxidativen Stresses einhergeht, wurden die Superoxid Dismutase 2-Expression (SOD2) und die Ma-

londialdehyd-Akkumulation (MDA) in der Leber quantifiziert. Die SOD2 ist ein Antioxidans und schützt die Zellen in Zusammenarbeit mit Katalase vor den hochreaktiven Superoxid-Anionen [210]. MDA hingegen ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation und somit ein Maß für die oxidative Schädigung [198].

Das Ausmaß des oxidativen Stresses in der Leber der Versuchstiere war weder durch die Fütterung der LMCD-Diät, noch durch die Injektion von DEN signifikant verändert. Dies zeigte sich sowohl im MDA-Level (Abbildung 11 A) als auch in der SOD2-Expression (Abbildung 11 B, C).



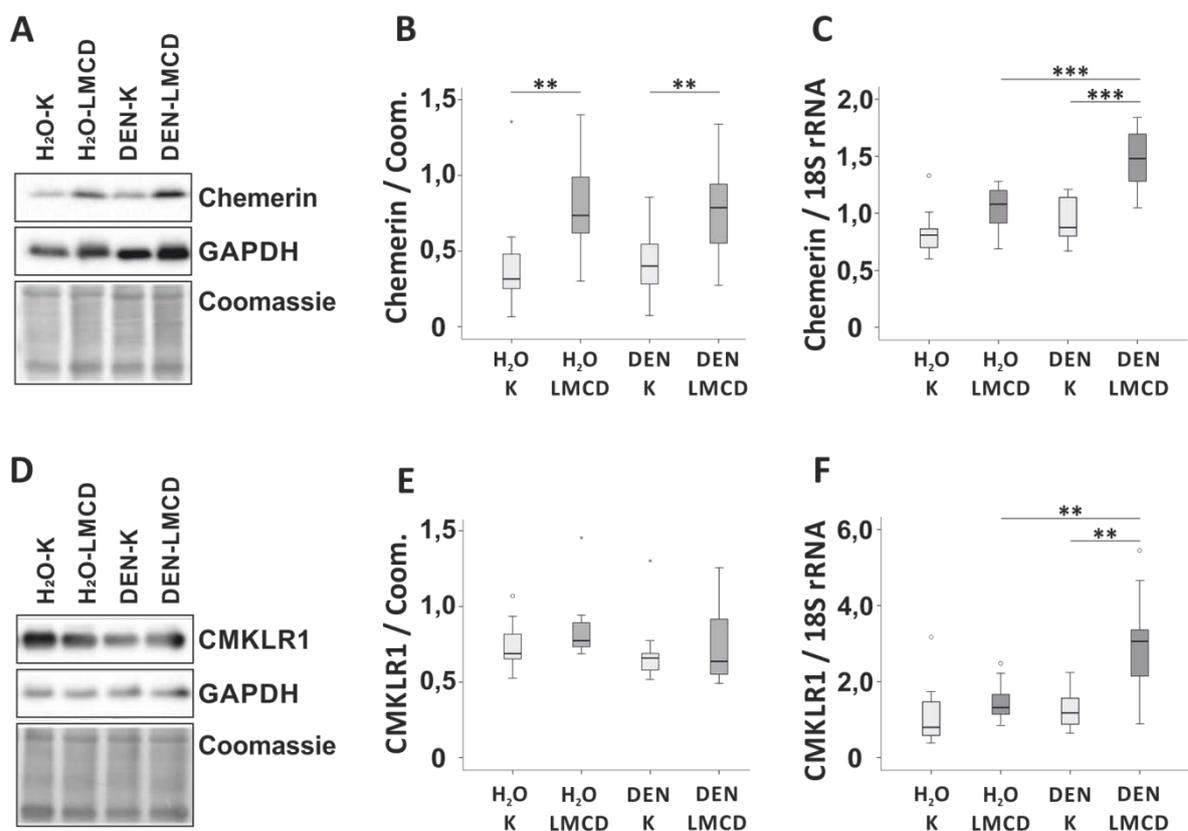
**Abbildung 11: Bestimmung des oxidativen Stresses der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Hepatische MDA-Konzentration. (B) Exemplarischer Immunoblot der hepatischen SOD2-Expression. (C) Quantifizierung der SOD2-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät).

### 3.1.6 Hepatische Chemerin- und CMKLR1-Expression

Es ist bekannt, dass eine Methionin-Cholin-defiziente-Diät (MCD-Diät, 0 % Methionin) in Mäusen die Bildung einer NASH-Leber hervorruft und dabei die systemischen und hepatischen Chemerin-Level erhöht werden [110]. Die NASH ist ein Risikofaktor für die Entstehung des HCCs und die Fütterung der MCD-Diät fördert die Progression der NASH zum HCC [176]. Einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass eine hohe Chemerin-Expression wiederum vor der Entstehung des HCCs schützt [38, 128].

Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob die hier verwendete LMCD-Diät (0,17 % Methionin) die hepatische Chemerin-Expression erhöht und ob dies die Expression des Chemerin-Rezeptors CMKLR1 beeinflusst. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Chemerin- und CMKLR1-Expression der Leber im NASH-Modell und dem NASH-HCC-Modell unterscheiden.

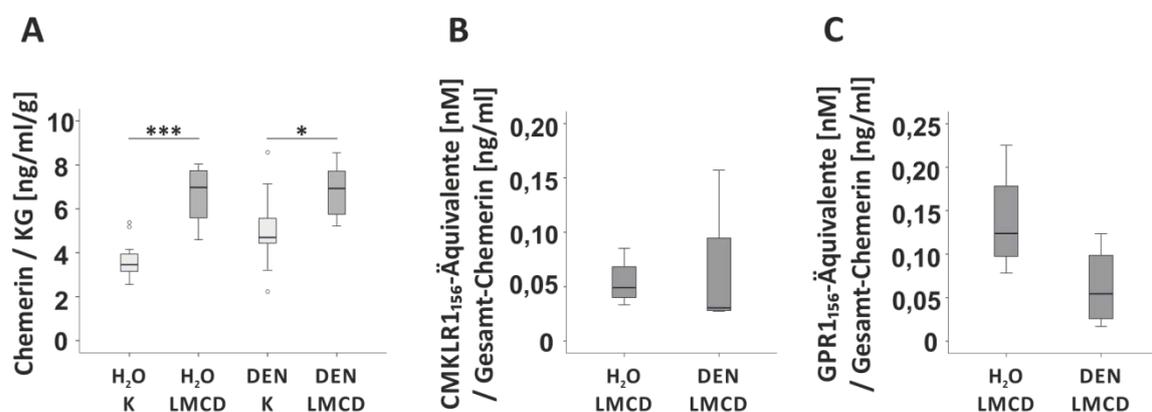
Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, führte die in dieser Studie verwendete LMCD-Diät, ebenso wie die in der Literatur beschriebene MCD-Diät [110], zur Steigerung der hepatischen Chemerin-Proteinexpression. Die DEN-Injektion schien auf mRNA-Ebene die LMCD-bedingte Chemerin-Expression zu verstärken (Abbildung 12 C), dieser Effekt war jedoch auf Proteinebene nicht mehr erkennbar (Abbildung 12 A, B). Ebenso war die CMKLR1-mRNA-Expression in der DEN-NASH-Leber stark erhöht (Abbildung 12 F). Auf Proteinebene jedoch waren weder aufgrund der LMCD-Diät, noch aufgrund der DEN-Injektion signifikante Änderungen der CMKLR1-Expression zu beobachten (Abbildung 12 D, E) [203].



**Abbildung 12: Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Exemplarischer Immunoblot der hepatischen Chemerin-Expression. (B) Quantifizierung der Chemerin-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (C) Hepatische Chemerin-mRNA-Expression. Normalisierung auf 18S rRNA. (D) Exemplarischer Immunoblot der hepatischen CMKLR1-Expression. (E) Quantifizierung der CMKLR1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (F) Hepatische CMKLR1-mRNA-Expression. Normalisierung auf 18S rRNA. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät; Coom., Coomassie). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.1.7 Quantifizierung und Bioaktivitätsmessung von Serum-Chemerin

Der systemische Chemerin-Protein-Spiegel wurde mit Hilfe eines DuoSet® ELISAs von R&D bestimmt. Die LMCD-Diät führte bei Mäusen mit H<sub>2</sub>O- und DEN-Injektion gleichermaßen zum Anstieg des Serum-Chemerin-Spiegels (Abbildung 13 A). Da dieser Assay jedoch die Gesamt-Chemerin-Konzentration im Serum quantifiziert, kann kein Rückschluss auf die Konzentration der verschiedenen Chemerin-Isoformen und die damit einhergehende Chemerin-Aktivität im Serum gezogen werden. Aus diesem Grund wurde die *ex vivo*-Bioaktivität von Serum-Chemerin mit Hilfe des Tango-Assays ermittelt (Abbildung 13 B, C) [203]. Die Messungen hierfür wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Christopher Sinal der Dalhousie Universität in Halifax (Nova Scotia, Kanada) durchgeführt.



**Abbildung 13: Quantifizierung und Messung der Bioaktivität von Serum-Chemerin der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Gesamt-Chemerin im Serum der Mäuse. Normalisierung auf das Körpergewicht (KG). (B) Serum-Chemerin-Aktivierung des Rezeptors CMKLR1 dargestellt als Chemerin156-Äquivalente (n = 4 pro Gruppe). Normalisierung auf Gesamt-Serum-Chemerin. (C) Serum-Chemerin-Aktivierung des Rezeptors GPR1 dargestellt als Chemerin156-Äquivalente (n = 4 pro Gruppe). Normalisierung auf Gesamt-Serum-Chemerin. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät; KG, Körpergewicht). \* p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,001.

Beim Tango-Assay wird die Bioaktivität von Serum-Chemerin indirekt durch die Quantifizierung eines Reportergens bestimmt, welches proportional zur Aktivierung des Rezeptors exprimiert wird. Als Standard wird die Aktivität von Chemerin156 gemessen, weshalb die Aktivierung des Rezeptors schließlich in Form von Chemerin156-Äquivalenten dargestellt wird.

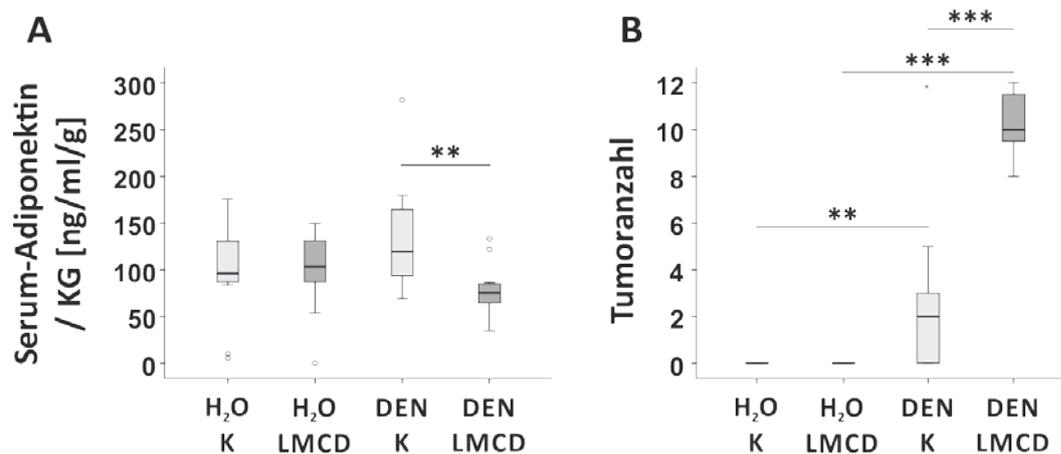
In diesem Assay wurden ausschließlich die LMCD-gefütterten Tiere verglichen, da diese erhöhte Serum-Chemerin-Werte aufwiesen. Durch den Vergleich der H<sub>2</sub>O- mit den DEN-

injizierten Tieren sollte Näheres über die Chemerin-Aktivität und Rezeptor-Aktivierung beim Übergang der NASH zum HCC herausgefunden werden. Bei der Aktivierung von CMKLR1 konnte kein Unterschied zwischen den Seren der H<sub>2</sub>O- und der DEN-injizierten Tiere festgestellt werden (Abbildung 13 B). Die GPR1-Aktivierung war bei den DEN-behandelten Tieren tendenziell erniedrigt ( $p = 0,114$ ) (Abbildung 13 C) [203].

### 3.1.8 Messung von Serum-Adiponektin und Quantifizierung der Tumore

Ein weiteres Adipokin, das ins Serum sezerniert wird und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist Adiponektin [211]. Anders als bei den meisten Adipokinen sinken dessen Serum-Werte bei Übergewicht [212]. Auch in der Fettleber [213] und im Serum von HCC-Patienten [214] ist seine Expression verringert. Hohe Adiponektin-Werte hingegen wirken protektiv auf die NASH- und Fettleber, indem sie Fibrose, Entzündung und Zellschädigung mildern [215]. Zudem wird Adiponektin eine Tumor-hemmende Wirkung zugesprochen [27, 214, 216, 217].

Der Serum-Adiponektin-Spiegel war in DEN-injizierten Mäusen auf LMCD-Diät hochsignifikant reduziert. Die Tiere der drei verbleibenden Behandlungsgruppen zeigten einen vergleichbaren Serum-Adiponektin-Spiegel (Abbildung 14 A) [203].



**Abbildung 14: Serum-Adiponektin und Tumoranzahl der C3H/HeNRj-Mäuse nach H<sub>2</sub>O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Quantifizierung von Serum-Adiponektin. Normalisierung auf das Körpergewicht (KG). (B) Bestimmung der Tumoranzahl pro Leber. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät; KG, Körpergewicht). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

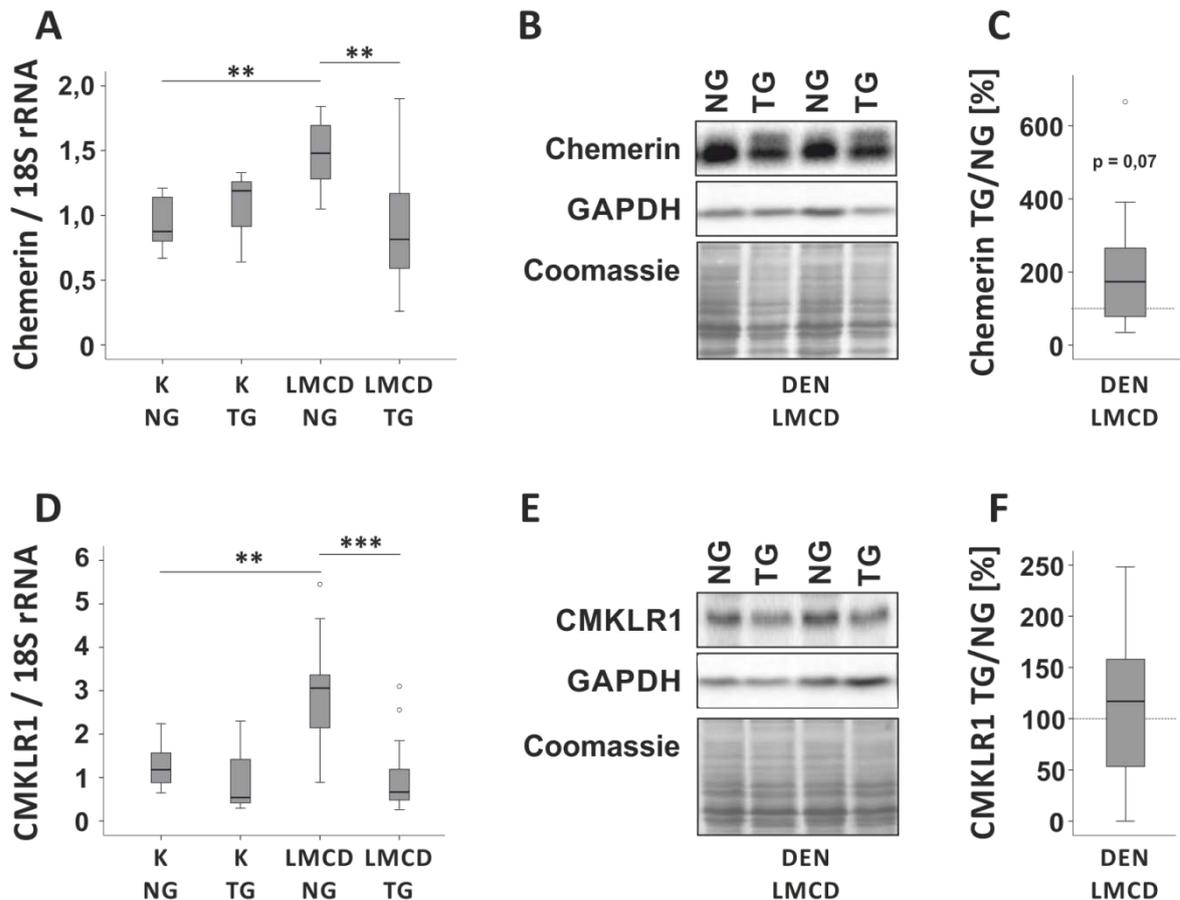
Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen dieser Studie zeigte sich in der Anzahl der Lebertumore. Das Karzinogen DEN führte zur Entstehung von Tumoren ( $n = 6/10$  Tiere), wobei die LMCD-Diät diesen Effekt höchstsignifikant verstärkte ( $n = 11/11$  Tiere) (Abbildung 14 B) [203]. Dabei hatten Tiere mit DEN-Injektion im Schnitt zwei Lebertumore, Tiere mit zusätzlicher LMCD-Diät bis zu 12 Lebertumore. Mäuse mit H<sub>2</sub>O-Injektion hingegen hatten unabhängig von der Diät keine Tumore. Die meisten der Tumore waren maximal 1 mm im Durchmesser. Vereinzelt Tumore waren bis zu 4 mm im Durchmesser. Die DEN-Injektion förderte die Karzinogenese in den NASH-Lebern der LMCD-gefütterten Tiere entscheidend. Dabei konnte die erhöhte endogene Chemerin-Expression in den NASH-Lebern die Entstehung von Tumoren infolge der DEN-Injektion nicht verhindern.

### **3.1.9 Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 in Normal- und Tumorgewebe**

Im Folgenden wurde die Chemerin- und CMKLR1-Expression der Tumore (Tumorgewebe, TG) der DEN-injizierten Mäuse im Vergleich zum parakarzinomatösen Normalgewebe (NG) näher untersucht.

Die Chemerin-mRNA-Expression war im NG und TG der Mäuse auf Kontrolldiät vergleichbar. Im NG der LMCD-gefütterten Tiere war ein deutlicher Anstieg der Expression im Vergleich zu den TG, aber auch im Vergleich zu den NG der Tiere auf Kontrolldiät zu verzeichnen (Abbildung 15 A). Auf Proteinebene deutete sich eine Erhöhung von Chemerin im TG der LMCD-gefütterten Tiere an ( $p = 0,07$ ) (Abbildung 15 B, C) [203].

CMKLR1 war auf mRNA-Ebene ähnlich reguliert wie Chemerin. NG und TG der Mäuse auf Kontrolldiät, sowie die TG der Tiere auf LMCD-Diät zeigten eine vergleichbare CMKLR1-mRNA-Expression. Im NG der LMCD-gefütterten Tiere war ein deutlicher Anstieg der CMKLR1-Expression zu verzeichnen (Abbildung 15 D). Auf Proteinebene konnten keine signifikanten Expressionsänderungen protokolliert werden (Abbildung 15 E, F) [203].



**Abbildung 15: Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 in NG und TG der DEN-injizierten C3H/HeNRj-Mäuse nach 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.** (A) Chemerin-mRNA-Expression in NG und TG der Lebern der DEN-injizierten Tiere. Normalisierung auf 18S rRNA. (B) Exemplarischer Immunoblot der Chemerin-Expression in NG und TG der Lebern von DEN-LMCD-Tieren. (C) Chemerin-Proteinexpression der TG relativ zum NG in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. Normalisierung auf GAPDH. (D) CMKLR1-mRNA-Expression in NG und TG der Lebern der DEN-injizierten Tiere. Normalisierung auf 18S rRNA. (E) Exemplarischer Immunoblot der CMKLR1-Expression in NG und TG der Lebern von DEN-LMCD-Tieren. (F) CMKLR1-Proteinexpression der TG relativ zum NG in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. Normalisierung auf GAPDH. (DEN, Diethylnitrosamin; LMCD, LowMethionin-Cholin-defiziente Diät; K, Kontrolldiät zur LMCD-Diät; NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

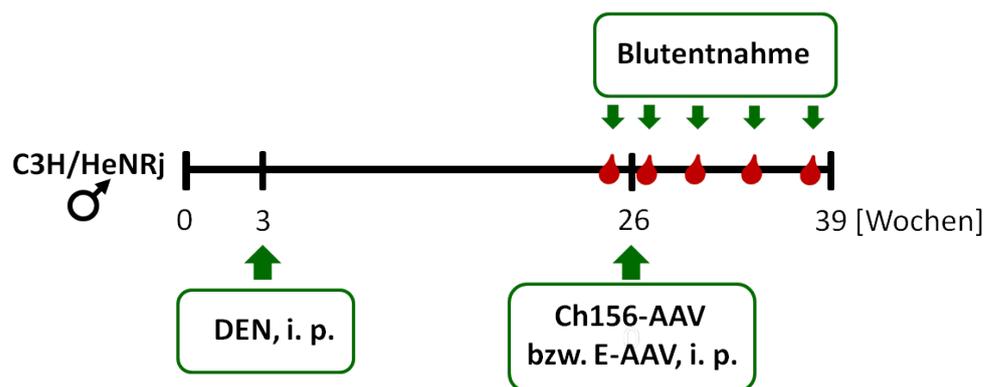
Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden im April 2018 im Artikel „Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis“ im Journal *ANTICANCER RESEARCH* veröffentlicht [203].

### 3.2 Chemerin im murinen HCC

Da im murinen NASH-HCC-Modell kein protektiver Effekt der endogenen Chemerin-Überexpression beobachtet werden konnte, wurde in einem weiteren Mausmodell untersucht, wie sich die Überexpression der aktiven Chemerin-Isoform auf die Pathogenese des HCCs auswirkt. In einem Hepa1-6-Xenograft-Modell ist es Lin *et al.* gelungen, durch die Überexpression von aktivem Chemerin (Chemerin156, Ch156) das Tumorstadium und die Mortalität der Tiere zu verringern [128].

#### 3.2.1 Versuchsablauf des HCC-Mausmodells

Für das hier beschriebene HCC-Mausmodell wurde männlichen C3H/HeNRj-Mäusen zur Tumorerzeugung im Alter von 18 bis 21 Tagen pro Gramm Körpergewicht 25 µg DEN i. p. injiziert (Abbildung 16).



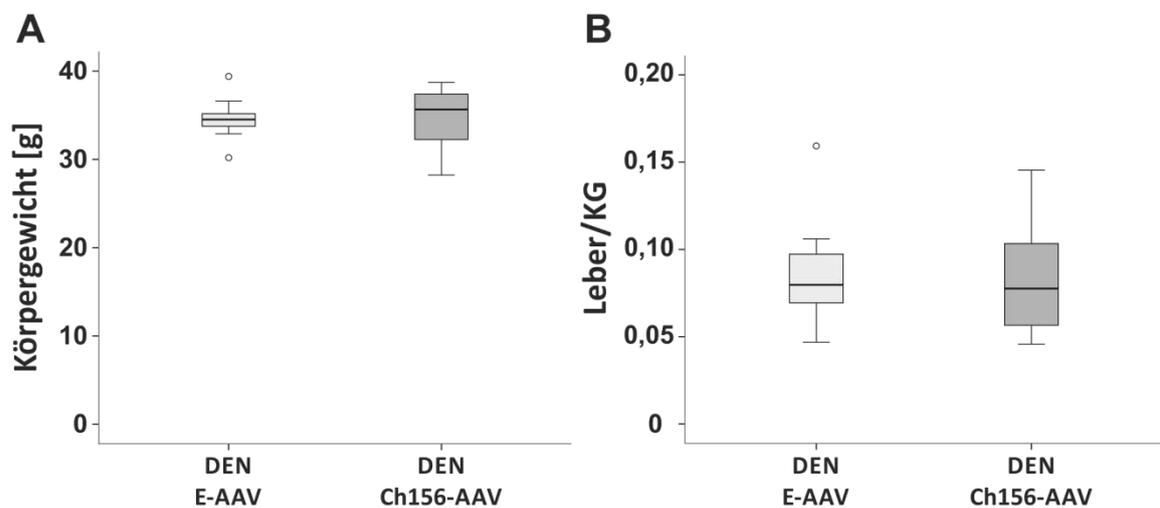
**Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des HCC-Mausmodells.** Knapp 3 Wochen alten Tieren wird zur Tumorerzeugung einmalig DEN (25 µg/g Körpergewicht) i. p. injiziert. Die hepatische Überexpression von Chemerin156 (Ch156) wird im Alter von 26 Wochen durch die AAV-Injektion ( $1 \times 10^{12}$  Viruspartikel, i. p.) induziert. Kontrolltieren werden AAV ohne kodierende Sequenzen injiziert (E-AAV). Im Alter von 39 Wochen erfolgt die Präparation der Tiere.

Die hepatische Überexpression von Ch156 wurde über Adeno-assoziierte Viren des Serotyps 8 (AAV) unter der zusätzlichen Verwendung eines Leber-spezifischen Promotors gewährleistet (SIRION Biotech, Martinsried) (siehe Abschnitt 2.2.2.3.2). Die Tiere exprimierten entweder Ch156 (Ch156-AAV, n = 12) oder waren zur Kontrolle mit einem AAV ohne kodierende Sequenz infiziert worden (E-AAV; E, Empty; n = 9). Im Alter von sechs Monaten wurden pro Maus  $1 \times 10^{12}$  Viruspartikel i. p. injiziert. Dabei sollte sich die gesteigerte Chemerin-Expression auch im systemischen Chemerin-Spiegel niederschlagen [182]. Aus diesem Grund wurden zur Überprüfung der Chemerin-Expression eine Woche vor der

Virus-Injektion sowie eine, vier, acht und zwölf Wochen nach der Virus-Injektion einige Mikroliter Blut aus der Schwanzvene entnommen. Nach insgesamt 39 Wochen wurde die Studie beendet.

### 3.2.2 Körperliche Konstitution der Versuchstiere

Nach Abschluss des Versuchs wurden die Gewichte der Leber, der Milz und der verschiedenen Fettdepots jedes Tieres ermittelt. Die Tiere der Chemerin156-AAV-Gruppe (Ch156-AAV) und der Kontrollgruppe (E-AAV) hatten zum Zeitpunkt der Präparation ein vergleichbares Körper und Lebergewicht (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Körpergewicht und Lebergewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Körpergewicht. (B) Lebergewicht normalisiert auf das Körpergewicht. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus; KG, Körpergewicht).

Das Gewicht der Milz sowie des epididymalen, perirenen und subkutanen Fettgewebes war ebenfalls zwischen beiden AAV-Gruppen vergleichbar (Tabelle 28).

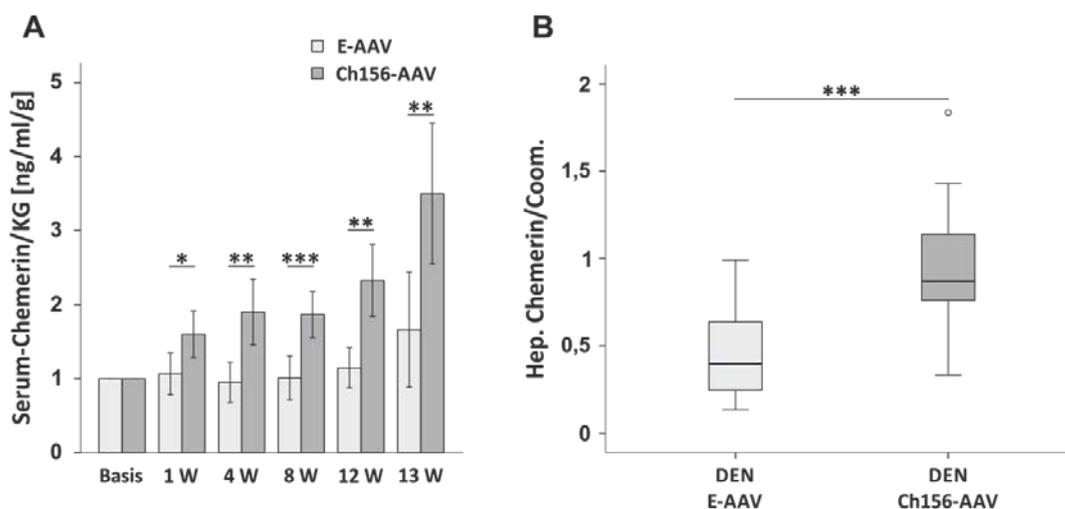
Gewichte verschiedener Gewebe [mg/g] im Alter von 39 Wochen					
Gewebe	AAV-Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz
Milz	Empty	3,6	4,4	2,1	n. s.
	Chemerin156	3,3	3,7	1,0	
Epididymales Fettgewebe	Empty	17,9	18,7	8,1	n. s.
	Chemerin156	18,3	20,7	8,6	
Perirenales Fettgewebe	Empty	7,6	8,3	3,4	n. s.
	Chemerin156	6,8	8,2	3,0	
Subkutanes Fettgewebe	Empty	15,6	16,5	4,2	n. s.
	Chemerin156	19,6	19,8	4,1	

**Tabelle 28: Gewichte verschiedener Gewebe der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Normalisierung des Gewichts der verschiedenen Gewebe auf das Körpergewicht. (n. s., nicht signifikant).

### 3.2.3 Systemische und hepatische Chemerin-Expression

Zur Überprüfung des Chemerin-Expressionslevels infolge der AAV-Injektion, wurde das zunächst wöchentlich, dann monatlich entnommene Blut der Schwanzvene verwendet. Das daraus gewonnene Serum wurde mit Hilfe des DuoSet® Chemerin-ELISAs von R&D analysiert. Dadurch konnte die Gesamt-Chemerin-Konzentration im Serum der Mäuse quantifiziert werden. Des Weiteren wurde die hepatische Chemerin-Expression nach Versuchsabschluss mit Hilfe von Immunoblots bestimmt.

Im Verlauf dieser Studie konnte über einen Zeitraum von 13 Wochen hinweg eine stetige Steigerung des systemischen Chemerin-Spiegels infolge der Ch156-AAV-Injektion beobachtet werden. Die Werte sind relativ zur Basis-Konzentration des Serum-Chemerins eine Woche vor der AAV-Injektion dargestellt und auf das Körpergewicht normalisiert (Abbildung 18 A). Aufgrund des erhöhten systemischen Chemerin-Spiegels kann davon ausgegangen werden, dass zum einen die hepatische Ch156-Überexpression bereits wenige Tage nach der AAV-Injektion effektiv stattfindet, zum anderen, dass das synthetisierte Chemerin zum Teil auch ins Serum sekretiert wird und daher via ELISA detektiert werden kann. Der Serum-Chemerin-Spiegel war am Ende des Versuchs infolge der Ch156-AAV-Injektion sogar doppelt so hoch als in der Kontrollgruppe. Am Ende des Versuchs konnte auch die hepatische Chemerin-Expression quantifiziert werden (Abbildung 18 B). Dabei zeigte sich infolge der Adeno-assoziierten Ch156-Überexpression eine höchstsignifikante Steigerung der Chemerin-Expression in der Leber.



**Abbildung 18: Systemischer Chemerin-Spiegel und hepatische Chemerin-Expression der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Serum-Chemerin-Spiegel ab dem Zeitpunkt der AAV-Injektion im Alter von 26 Wochen. Verlauf des Serum-Chemerin-Spiegels der Tiere über 13 Wochen hinweg bis zum Versuchsabschluss im Alter von 39 Wochen. Darstellung in Relation zum Chemerin-Basiswert vor der AAV-Injektion und Normalisierung auf das Körpergewicht. (B) Hepatische Chemerin-Expression am Ende des Versuchs. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus; KG, Körpergewicht; W, Woche; Coom., Coomassie). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

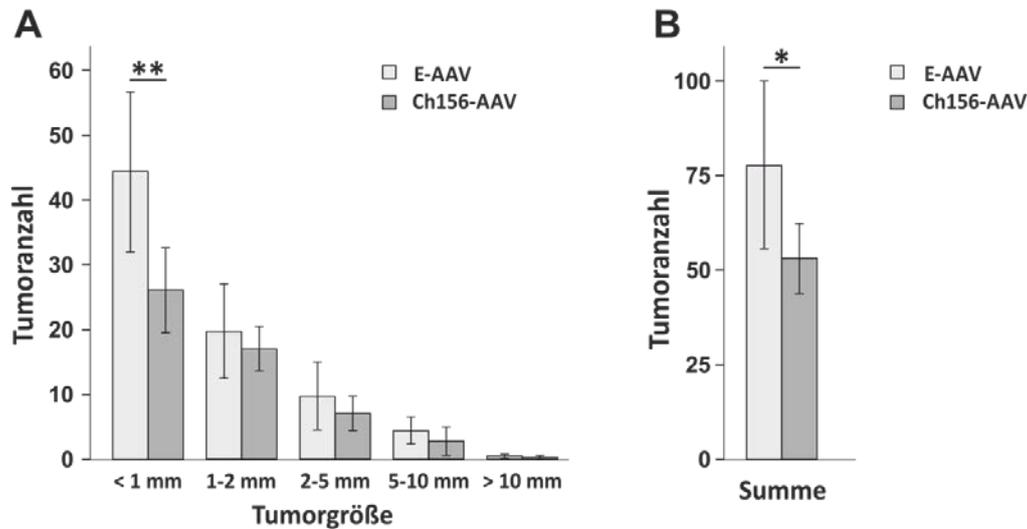
### 3.2.4 Einfluss von Ch156 auf die Anzahl und Größe von Hepatomen

Die Leber wurde bei der Präparation der Tiere auch auf ihre Tumorlast hin untersucht. Dabei wurden die Lebertumore entsprechend ihres Durchmessers in fünf Kategorien unterteilt (Tabelle 29) und quantifiziert (Abbildung 19). Es konnten keine pathologischen Veränderungen anderer Organe oder Metastasen entdeckt werden.

Kategorisierung der Tumore				
Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4	Kategorie 5
$\emptyset < 1 \text{ mm}$	$1 \leq \emptyset < 2 \text{ mm}$	$2 \leq \emptyset < 5 \text{ mm}$	$5 \leq \emptyset < 10 \text{ mm}$	$\emptyset \geq 10 \text{ mm}$

**Tabelle 29: Kategorisierung der Tumore anhand ihres Durchmessers [mm] in fünf Kategorien.**

Die Ch156-AAV-Gruppe zeigte in jeder der fünf Kategorien weniger Lebertumore als die Kontrollgruppe (Abbildung 19 A). Dabei war die Tumoranzahl in Kategorie 1 ( $\emptyset < 1 \text{ mm}$ ) hochsignifikant verringert. Des Weiteren war die Gesamtsumme der Tumore pro Leber in der Ch156-Überexpressionsgruppe signifikant um circa 30 % reduziert (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: Tumorquantifizierung der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** (A) Bestimmung der Tumoranzahl pro Mausleber und Kategorisierung der Tumore entsprechend ihres Durchmessers. (B) Gesamtumoranzahl pro Mausleber. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

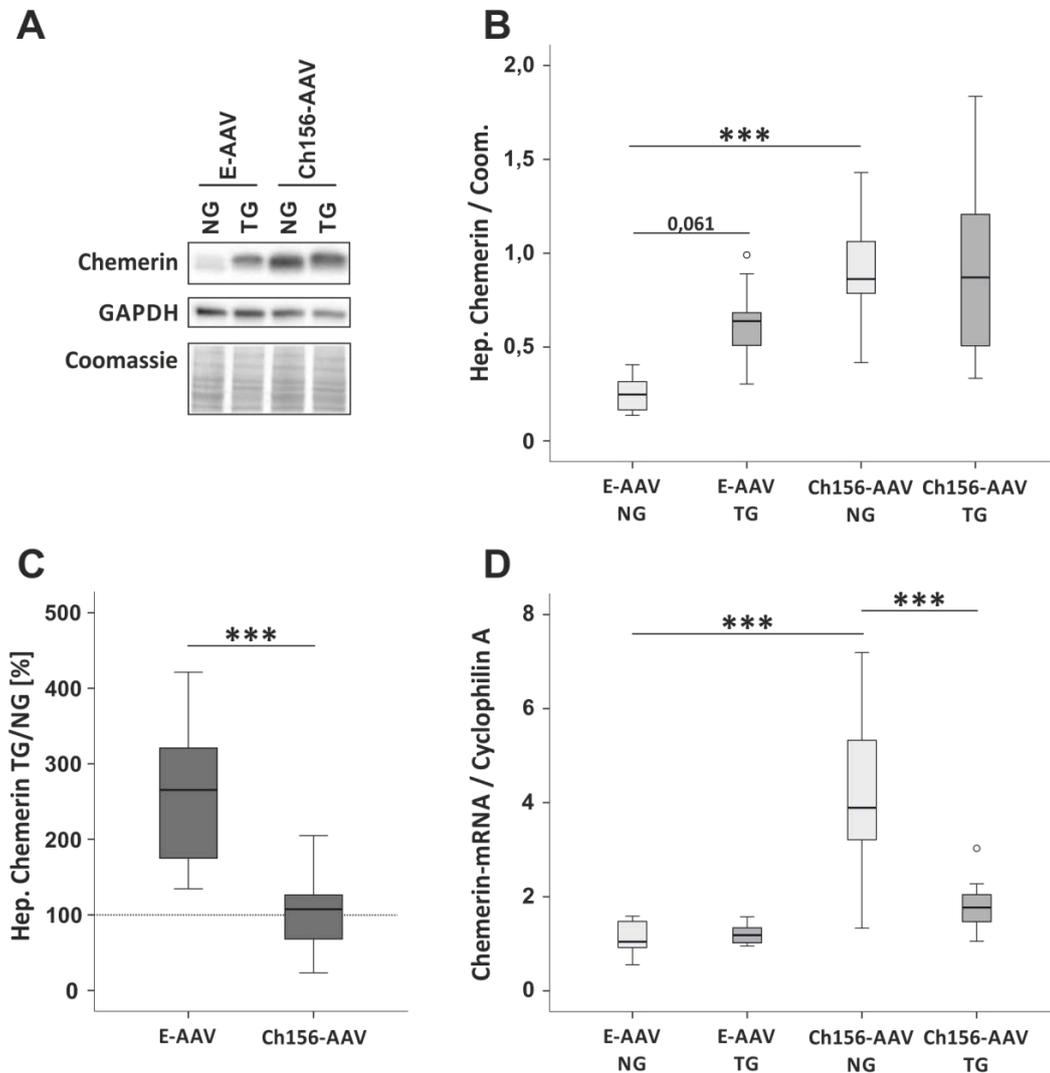
Die weiteren Analysen im Rahmen dieses Tiermodells wurden im Folgenden stets sowohl am Tumorgewebe (TG) als auch am zugehörigen parakarzinomatösen Normalgewebe (NG) durchgeführt, um etwaige Unterschiede ermitteln zu können.

### 3.2.5 Hepatische Chemerin-Expression in Normal- und Tumorgeweben

Zunächst wurde die hepatische Chemerin-Expression im Normal- und Tumorgewebe bei den AAV-Gruppen auf RNA- und Proteinebene näher untersucht (Abbildung 20).

Die Chemerin-mRNA-Expressionslevel waren im Normal- und Tumorgewebe der Kontroll-AAV-infizierten Tiere vergleichbar. Die Injektion der Ch156-AAVs führte im NG zu einem hochsignifikanten Anstieg der Chemerin-mRNA-Expression. Diese war im TG der Ch156-AAV-Gruppe nicht zu beobachten (Abbildung 20 D). Auf Protein-Ebene kam es ebenfalls im NG der Ch156-AAVs zu einem hochsignifikanten Anstieg der Chemerin-Expression im Vergleich zu den NG der E-AAVs. Des Weiteren zeigte sich ein Trend zu einer höheren Expression in den TG innerhalb der Kontrollgruppe ( $p = 0,061$ ). NG und TG der Ch156-AAV-Gruppe zeigten ein vergleichbares Chemerin-Proteinlevel (Abbildung 20 A, B). Durch Berechnung der relativen Chemerin-Proteinexpression des TGs durch Normalisierung auf das parakarzinomatöse NG zeigte sich, dass im TG der Kontroll-AAV-Gruppe im Schnitt eine 2,5-fach erhöhte Chemerin-Expression stattfand. Demgegenüber zeigte die Ch156-

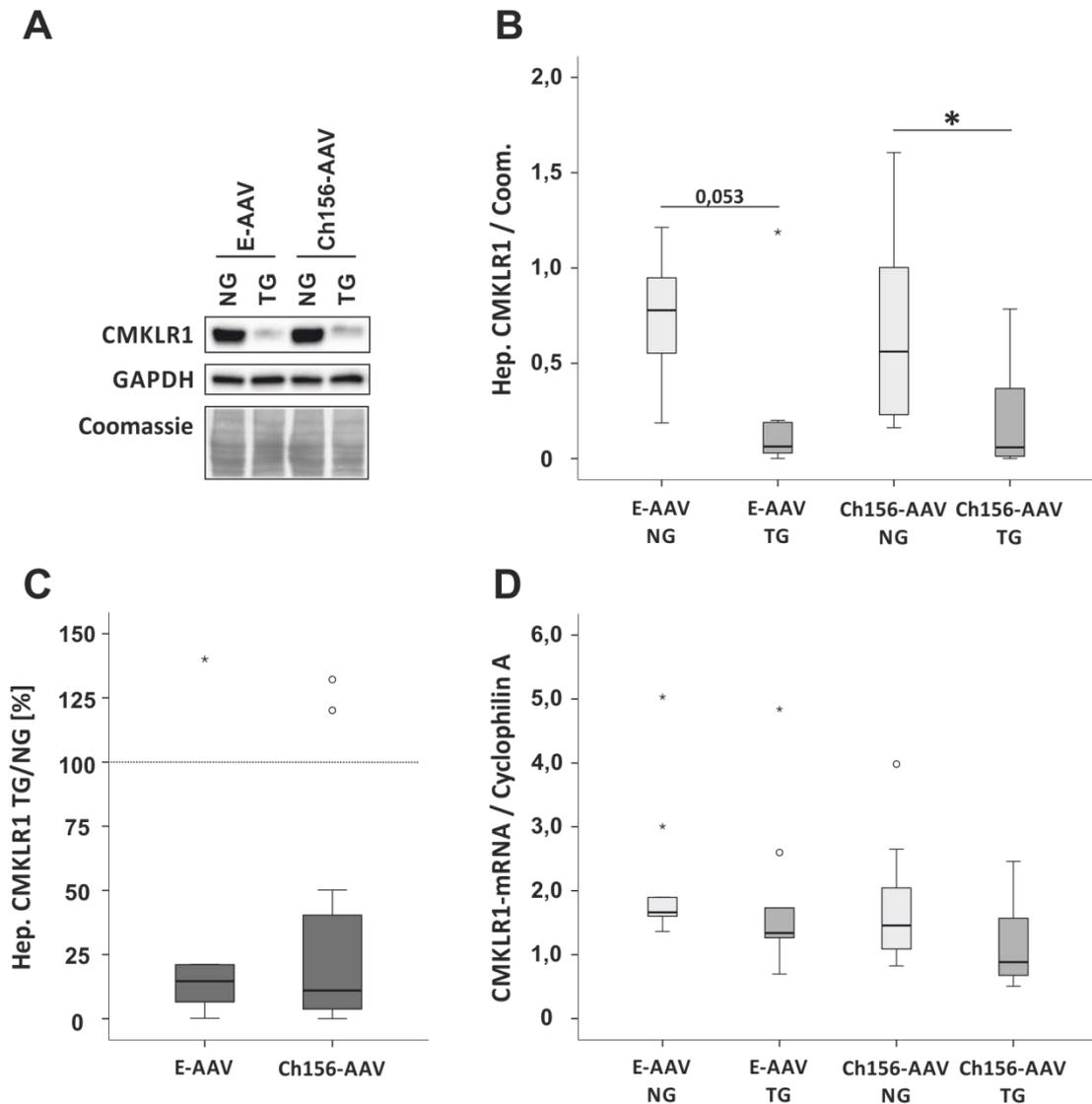
AAV-Gruppe ein hochsignifikant geringeres TG/NG-Chemerin-Proteinlevel. Dieses lag aufgrund des ähnlichen Expressionslevels von NG und TG bei circa 100 % (Abbildung 20 C).



**Abbildung 20: Hepatische Chemerin-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Exemplarischer Immunoblot der Chemerin-Proteinexpression. (B) Quantifizierung der Chemerin-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (C) Chemerin-Proteinexpression der TG relativ zum NG in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (D) Chemerin-mRNA-Expression. Normalisierung auf Cyclophilin A. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.6 Einfluss von Ch156 auf die hepatische CMKLR1-Expression in Normal- und Tumorgeweben

Um einen möglichen Einfluss der Ch156-Überexpression auf den Rezeptor CMKLR1 ermitteln zu können, wurde dessen Expression untersucht. Die Analysen fanden vergleichend in Normal- und Tumorgeweben beider AAV-Gruppen statt. Im Folgenden ist die hepatische CMKLR1-Expression auf RNA- und Protein-Ebene dargestellt (Abbildung 21).

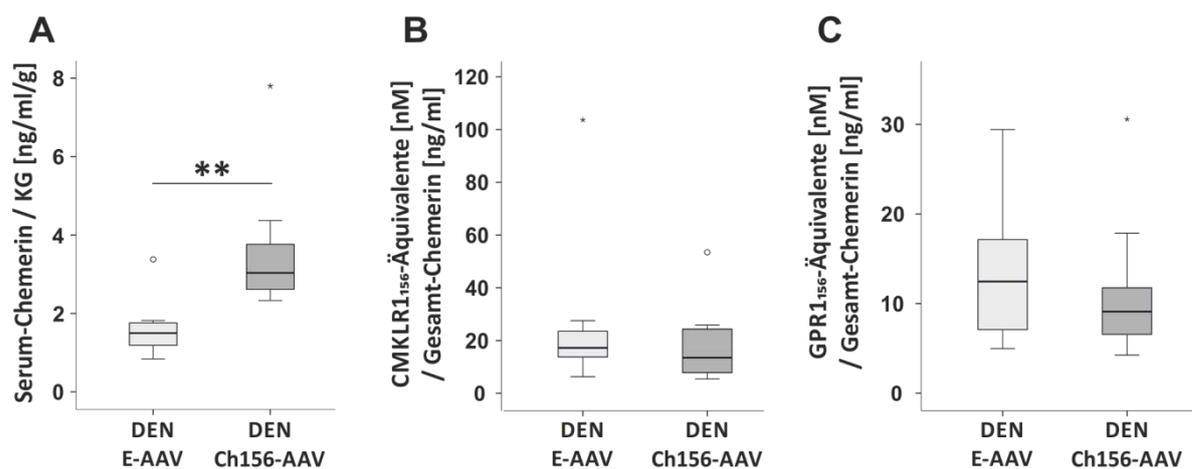


**Abbildung 21: Hepatische CMKLR1-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Exemplarischer Immunoblot der CMKLR1-Proteinexpression. (B) Quantifizierung der CMKLR1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Zur Normalisierung wurde Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein herangezogen. (C) CMKLR1-Proteinexpression der TG relativ zum NG in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (D) CMKLR1-mRNA-Expression. Normalisierung auf Cyclophilin A. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die CMKLR1-Expression wurde auf RNA-Ebene weder durch die Adeno-assoziierte Überexpression von Ch156 beeinflusst, noch war CMKLR1 im NG und TG differenziell exprimiert (Abbildung 21 D). Auf Proteinebene konnte ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen den NG und TG der Lebern beobachtet werden. Die CMKLR1-Proteinexpression war in den TG beider AAV-Gruppen deutlich reduziert. Diese Reduktion war in der Ch156-AAV-Gruppe signifikant, in der E-AAV-Gruppe tendenziell ( $p = 0,053$ ) (Abbildung 21 A, B). Auch für CMKLR1 wurde die relative Proteinexpression des TG durch Normalisierung auf das parakarzinomatöse NG berechnet. Hierbei wurde der Expressionsunterschied zwischen TG und NG nochmals deutlich, wobei das TG im Schnitt nur etwa ein Zehntel der CMKLR1-Expression des NGs aufwies (Abbildung 21 C). Im Gegensatz zur Chemerin-TG/NG-Expression konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Empty- und der Ch156-AAV-Gruppe gezeigt werden.

### 3.2.7 Messung der *ex vivo*-Bioaktivität von Serum-Chemerin

Um herauszufinden, ob das durch die Ch156-AAV-Injektion synthetisierte Chemerin im Serum auch eine höhere Bioaktivität zeigt, wurde diese im Anschluss bestimmt. Hierfür wurde der Tango-Assay eingesetzt, der in Kooperation mit Prof. Dr. Christopher Sinal der Dalhousie Universität in Halifax (Nova Scotia, Kanada) durchgeführt wurde (Abbildung 22).



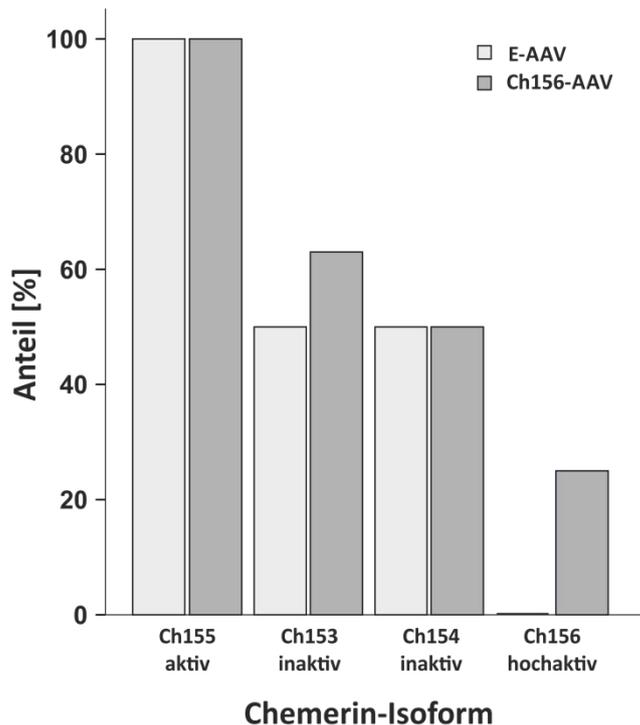
**Abbildung 22: Messung der Bioaktivität von Serum-Chemerin der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Gesamt-Chemerin im Serum der Mäuse. Normalisierung auf das Körpergewicht (KG). (B) Serum-Chemerin-Aktivierung des Rezeptors CMKLR1 dargestellt als Chemerin<sub>156</sub>-Äquivalente ( $n = 12$  pro Gruppe). Normalisierung auf Gesamt-Serum-Chemerin. (C) Serum-Chemerin-Aktivierung des Rezeptors GPR1 dargestellt als Chemerin<sub>156</sub>-Äquivalente ( $n = 12$  pro Gruppe). Normalisierung auf Gesamt-Serum-Chemerin. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin<sub>156</sub>; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*\*  $p \leq 0,01$ .

Für den Tango-Assay wurde das Serum der letzten Blutentnahme bei Versuchsabschluss, also nach 13-wöchiger Ch156-Überexpression, eingesetzt. Wie bereits eingangs erwähnt, zeigten die Tiere der Ch156-AAV-Gruppe einen hochsignifikant gesteigerten Serum-Chemerin-Spiegel (Abbildung 22 A). Relativ zum Gesamt-Serum-Chemerin zeigte sich bei der Aktivierung von CMKLR1 und GPR1 kein Unterschied zwischen den Seren der Empty- und der Ch156-AAV-injizierten Tiere (Abbildung 22 B, C). Daher kann davon ausgegangen werden, dass parallel mit dem Serum-Chemerin auch dessen Bioaktivität ansteigt.

### **3.2.8 Analyse der Chemerin-Isoformen im hepatischen Tumorgewebe**

Im Folgenden wurden die Chemerin-Isoformen der Leber noch weiter spezifiziert. Hierfür wurde Chemerin-Protein aus HCC-Geweben beider AAV-Gruppen mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert, aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert (n = 8 pro Gruppe). Die Massenspektrometrie erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Astrid Bruckmann der *core facility* der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann (Universität Regensburg).

Bei der Massenspektrometrie konnten in den Tumorgeweben vier verschiedene Chemerin-Isoformen detektiert werden (Abbildung 23). Alle der untersuchten Mäuse trugen die Isoform Ch155, welche aus dem endogenen Prochemerin (Ch162) infolge der proteolytischen Spaltung durch Proteinase 3, Trypsinase oder Elastase entstehen kann [112]. Die am zweithäufigsten detektierte Isoform war Ch153. Diese entsteht durch die Spaltung des hochaktiven Ch156 durch Chymase [112] und wurde bei den Ch156-AAV-Tieren etwas häufiger detektiert als in den Kontroll-AAV-Tieren (63 % vs. 50 % der Tiere). Auch die dritthäufigste Isoform Ch154 (50 % der Tiere) entsteht infolge der Inaktivierung des Ch156 durch ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) [112]. Bei dieser Isoform war jedoch kein Unterschied zwischen den beiden AAV-Gruppen zu sehen. Die am seltensten detektierte Isoform ist Ch156. Diese Isoform wurde ausschließlich in den Lebertumoren der Ch156-AAV-Gruppe detektiert, wenn auch nur bei 25 % der untersuchten Tiere (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Massenspektrometrische Isoform-Analyse von Chemerin aus hepatischem Tumorgewebe der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** Detektion von vier verschiedenen Chemerin-Isoformen: Ch153, Ch154, Ch155 und Ch156. Anordnung der Isoformen mit abnehmender Häufigkeit. Darstellung der Detektionshäufigkeit als relativen Anteil der untersuchten Tiere in Prozent (n = 8 pro Gruppe). (Durchführung der Massenspektroskopie durch Dr. Astrid Bruckmann).

### 3.2.9 Einfluss von Ch156 auf die Expression von Entzündungs- und Immunzellmarkern

Aus der Literatur ist bekannt, dass aktives Chemerin als Chemoattraktant eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen spielt und auf diese Weise das Tumorstadium vermindert werden kann [34, 38, 114, 153]. Aus diesem Grund wurden auch in dieser Arbeit Entzündungs- und Immunzellmarker untersucht.

Um zunächst herauszufinden, ob die C3H/HeNRj-Mäuse entzündliche Veränderungen der Leber aufweisen, wurden mehrere inflammatorische Markergene untersucht: der Makrophagenmarker F4/80 [218], der Monozytenattraktant CCL2/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) [219], das Makrophagen- und NK-Zell-Transmembran-Glykoprotein CD38 [218, 220, 221] und das proinflammatorische Zytokin IL-6 [222].

In Bezug auf diese inflammatorischen Markergene konnte weder ein Unterschied zwischen dem Normal- und Tumorgewebe der Lebern, noch infolge der Ch156-Überexpression festgestellt werden (Tabelle 30).

Entzündungsmarker					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
F4/80	E-AAV NG	1,66	2,75	1,88	n. s.
	E-AAV TG	2,13	2,59	1,57	n. s.
	Ch156-AAV NG	1,44	2,25	1,68	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,18	1,91	1,52	n. s.
CCL2/MCP-1	E-AAV NG	0,59	0,55	0,18	n. s.
	E-AAV TG	0,44	0,46	0,22	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,49	0,57	0,33	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,31	0,36	0,18	n. s.
CD38	E-AAV NG	1,53	1,99	0,90	n. s.
	E-AAV TG	2,36	2,59	0,69	n. s.
	Ch156-AAV NG	1,73	1,84	0,75	n. s.
	Ch156-AAV TG	2,26	2,43	0,44	n. s.
IL-6	E-AAV NG	1,69	1,42	0,81	n. s.
	E-AAV TG	0,52	0,74	0,71	n. s.
	Ch156-AAV NG	2,28	2,62	2,15	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,27	1,41	0,98	n. s.

**Tabelle 30: Hepatische Expression von Entzündungsmarkern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse der Expression von F4/80, CCL2/MCP-1, CD38 und IL-6 mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung aller Gene auf Cyclophilin A. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Des Weiteren wurde spezifisch die Präsenz der NK-Zellen anhand ihrer Rezeptoren NCR1 (*natural cytotoxicity triggering receptor 1*) [223] und Ly49c (*killer cell lectin-like receptor*) [224] untersucht. Auch bei diesem Immunzelltyp waren keine signifikanten Veränderungen zwischen den vier Vergleichsgruppen zu beobachten (Tabelle 31).

NK-Zell-Marker					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
NCR1	E-AAV NG	1,62	1,73	0,62	n. s.
	E-AAV TG	1,95	2,09	0,64	n. s.
	Ch156-AAV NG	2,04	2,09	1,39	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,91	2,17	1,10	n. s.
Ly49c	E-AAV NG	0,89	0,91	0,33	n. s.
	E-AAV TG	0,67	0,73	0,32	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,84	0,85	0,29	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,49	0,57	0,25	n. s.

**Tabelle 31: Hepatische Expression von NK-Zell-Markern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse der Expression von NCR1 und Ly49C mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung aller Gene auf Cyclophilin A. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus).

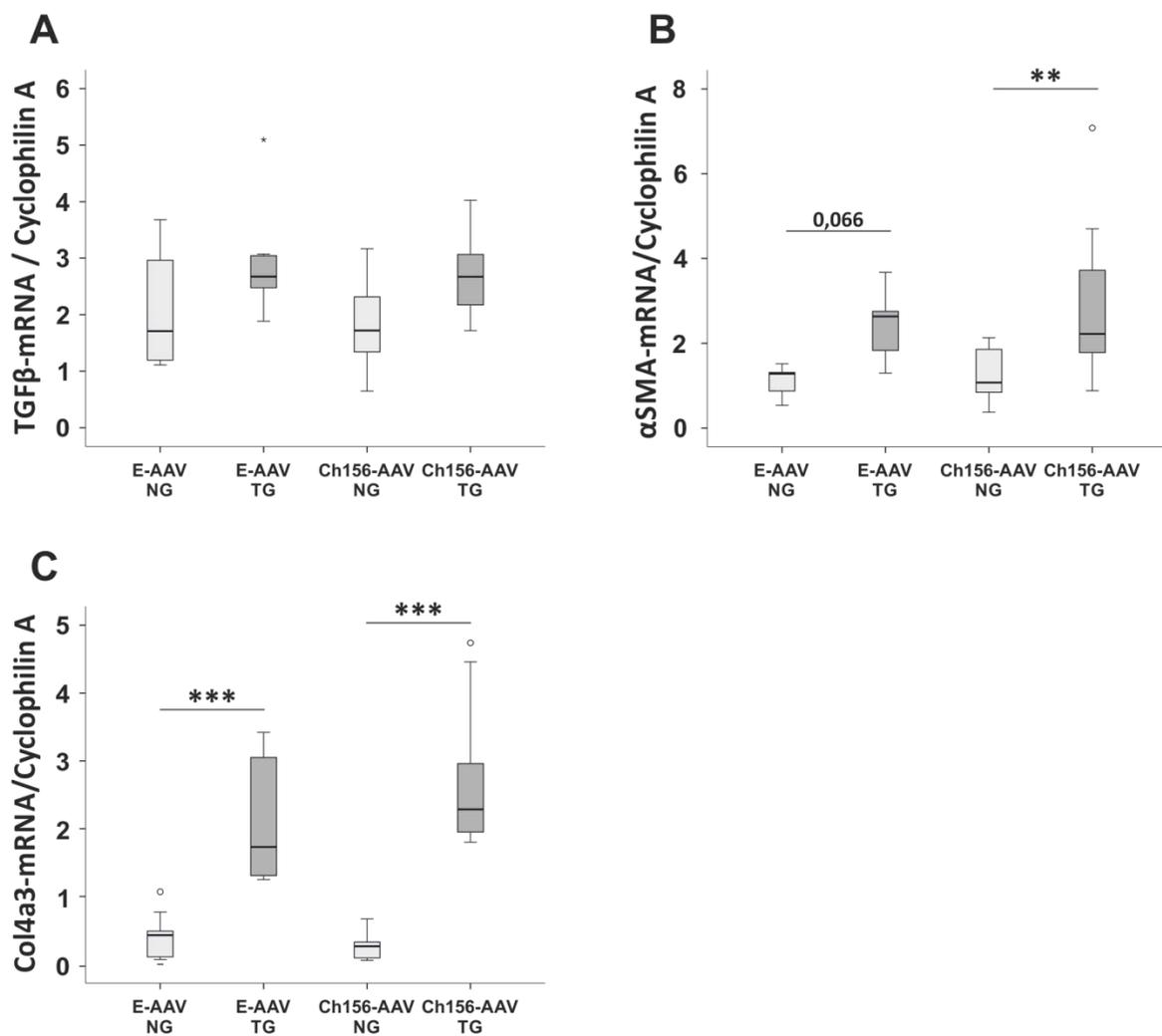
<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

### 3.2.10 Einfluss von Ch156 auf die Expression von Fibrosemarkern

Eine Schädigung des Gewebes, wie es auch bei Lebertumoren der Fall ist, geht mit der Aktivierung von Fibroblasten bzw. Sternzellen einher [225, 226]. Dabei kommt es unter anderem zur vermehrten Kollagensynthese und Veränderung der extrazellulären Matrix [227]. Den aktivierten Fibroblasten wird auch eine entscheidende Rolle bei der Progression und Metastasierung von Tumoren zugesprochen, da sie unter anderem die Mikroumgebung des Tumors verändern [226].

Um zu untersuchen, ob das TG im Vergleich zum parakarzinomatösen NG eine stärkere Schädigung und Sternzellaktivierung aufweist und ob diese durch die Überexpression von Chemerin156 beeinflusst wird, wurden daher die Fibrosemarker TGF $\beta$  und  $\alpha$ SMA analysiert. TGF $\beta$  ist ein verstärkender Mediator der Fibrose, da es die ECM-Produktion fördert [228] und die Apoptose der Sternzellen unterbindet [227]. Die Expression von  $\alpha$ SMA findet in Sternzellen ausschließlich nach ihrer Aktivierung statt und daher ist  $\alpha$ SMA ein Marker für aktivierte Sternzellen. Aktivierte Sternzellen exprimieren verstärkt Kollagene des Typs I und III [229]. Die differenzielle Expression eines Typ IV-Kollagens, Kollagen 4A3 (Col4a3), wurde durch eine Microarray-Analyse (2.2.8.5) identifiziert, weshalb seine Expression auf mRNA-Ebene überprüft wurde. In der Niere ist Col4a3 entscheidend an der Fibrosierung des Gewebes beim Alport Syndrom beteiligt [230].

Bei den Analysen zeigte sich keine signifikante Veränderung der TGF $\beta$ -Expression (Abbildung 24 A). Die Expression von  $\alpha$ SMA und Col4a3 war im TG beider AAV-Gruppen induziert (Abbildung 24 B, C). Dabei war die Erhöhung in der Ch156-AAV-Gruppe hoch- ( $\alpha$ SMA) bzw. höchstsignifikant (Col4a3). Innerhalb der Kontroll-AAV-Gruppe war die Erhöhung von  $\alpha$ SMA im TG lediglich tendenziell ( $p = 0,066$ ), die von Col4a3 war höchstsignifikant. Dennoch konnten zwischen den AAV-Gruppen bei keinem der drei untersuchten Gene Expressionsunterschiede beobachtet werden.



**Abbildung 24: Hepatische Expression von Fibrose-Markern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse von (A) TGF $\beta$ , (B)  $\alpha$ SMA und (C) Col4a3 mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung aller Gene auf Cyclophilin A. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Neben Col4a3 konnten weitere regulierte Gene über die Microarray-Analyse identifiziert werden. Hierzu gehören Gene, die am Lipid- und Cholesterinmetabolismus beteiligt sind bzw. Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese beeinflussen. Im Folgenden sind die Analyseergebnisse dieser und weiterer Gene auf mRNA- und Proteinebene dargestellt.

### **3.2.11 Einfluss von Ch156 auf die Expression von Genen für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese**

Die durch den Microarray identifizierten Gene für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese sind Slc12a1 (*Solute carrier family 12, member 1*), Spink1 (*Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1*), Egr1 (*Early growth response 1*), G6PC (*Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit*) und Ccng2 (*Cyclin G2*).

Slc12a1 kodiert für einen nierenspezifischen Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter. *In vivo*- und *in vitro*-Daten zeigen seine Bedeutung für das Wachstum, die Proliferation und die Tumorgenese der hepatischen Zelllinie Hep3B, weshalb Slc12a1 als potentielles HCC-Onkogen angesehen wird [231].

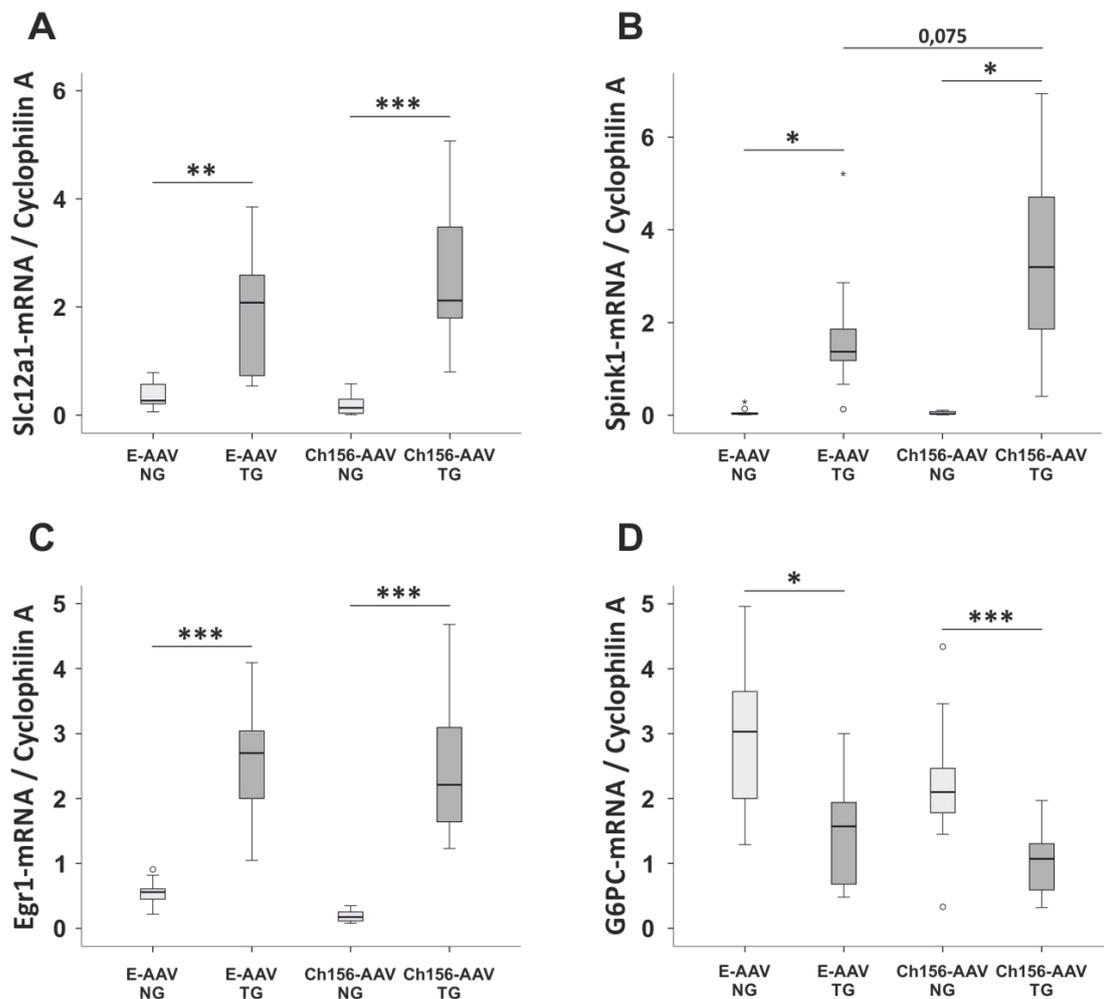
In der hier vorliegenden Studie war Slc12a1 im Tumorgewebe hoch- bzw. höchstsignifikant erhöht (Abbildung 25 A). Diese Erhöhung war unabhängig von der Adeno-assoziierten Überexpression von Ch156.

Spink1 wirkt vor allem im Pankreas als Trypsin-Inhibitor und schützt so das Gewebe vor der verfrühten Aktivierung dieses Verdauungsenzyms. In der Leber wird Spink1 in den Gallengängen exprimiert und inhibiert so die Trypsinaktivierung durch die Gallenflüssigkeit [232]. Des Weiteren wirkt Spink1 als Wachstumsfaktor und inhibiert die Apoptose, weshalb es zur Tumorprogression beiträgt [233]. Es beeinflusst auch Invasion und Metastasierung und ist bei verschiedenen Tumorarten differenziell exprimiert [232].

Die Spink1-mRNA-Expression war im TG beider AAV-Gruppen signifikant erhöht. In der Ch156-AAV-Gruppe war der Anstieg größer, jedoch nicht signifikant stärker als in der Kontroll-AAV-Gruppe (Abbildung 25 B).

Egr1 hingegen wird eine Tumorsuppressor-Funktion zugeschrieben, indem es TGF $\beta$ 1 und p53 induziert. Dadurch wird das Wachstum der Zellen inhibiert und die Apoptose eingeleitet [234, 235]. Bei Prostatakarzinomen wirkt Egr1 hingegen tumorprogressiv [236].

In den Tumorgeweben beider AAV-Gruppen ist Egr1 höchstsignifikant induziert. Dabei wird die Expressionsstärke nicht durch die Ch156-Überexpression beeinflusst (Abbildung 25 C).



**Abbildung 25: Hepatische Expression von Markern für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenes in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** Analyse von (A) Slc12a1, (B) Spink1 (C) Egr1 und (D) G6PC mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung aller Gene auf Cyclophilin A. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

G6PC ist ein an der Glukoneogenese und Glykogenolyse beteiligtes Enzym und reguliert so die Glukosehomöostase. Im Ovariakarzinom fördert es Zellwachstum, Proliferation, Viabilität und Invasion. Eine Verringerung der G6PC-Expression hingegen führt *in vitro* zu

einer stärkeren Regulation des Zellzyklus [237]. Bei der Glykogenspeicherkrankheit ist das Enzym G6PC nicht funktional, weshalb es zur Hypoglykämie und zur Hyperlipidämie kommt [238].

In dieser Studie konnte eine verringerte G6PC-Expression in den Tumorgeweben beider AAV-Gruppen beobachtet werden. Diese war in der Kontroll-AAV-Gruppe signifikant, in der Ch156-AAV-Gruppe höchstsignifikant. Zwischen den beiden AAV-Gruppen gab es keine signifikanten Expressionsunterschiede (Abbildung 25 D).

Ccng2 kann den Zellzyklusarrest einleiten und so das Wachstum inhibieren. Aus diesem Grund wird es als Tumorsuppressorgen angesehen [239, 240]. Weder zwischen den Normal- und Tumorgeweben, noch zwischen den beiden AAV-Gruppen war Ccng2 signifikant reguliert (Tabelle 32). Die im Microarray identifizierte veränderte Genexpression von Ccng2 konnte also auf mRNA-Ebene nicht verifiziert werden.

Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
Ccng2	E-AAV NG	1,37	1,54	0,63	n. s.
	E-AAV TG	1,66	1,65	0,34	n. s.
	Ch156-AAV NG	1,16	1,30	0,54	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,44	1,50	0,30	n. s.

**Tabelle 32: Hepatische Ccng2-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** Analyse von Ccng2 als einen Marker für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung auf Cyclophilin A. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

### 3.2.12 Einfluss von Ch156 auf den Lipid- und Cholesterinmetabolismus

Es ist bekannt, dass Tumorgewebe einen erhöhten Energiebedarf und einen veränderten Lipidmetabolismus aufweisen [55]. Aus diesem Grund wurde auch die hepatische Expression von Genen untersucht, die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind. Hierzu zählen SREBP1c, SCD1 und FAS, auf deren physiologische Bedeutung bereits in Abschnitt 3.1.4 genauer eingegangen wurde. Diese Gene sind jedoch weder im Tumorgewebe noch infolge der Ch156-Überexpression differenziell exprimiert (Tabelle 33).

Fettsäuresynthese					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
<b>SREBP1c</b> (precursor)	E-AAV NG	0,52	0,55	0,35	n. s.
	E-AAV TG	0,74	0,91	0,57	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,70	0,82	0,57	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,85	0,97	0,50	n. s.
<b>SREBP1c</b> (aktiv)	E-AAV NG	0,36	0,39	0,35	n. s.
	E-AAV TG	0,63	0,70	0,63	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,27	0,53	0,59	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,38	0,64	0,63	n. s.
<b>SCD1</b>	E-AAV NG	0,82	0,75	0,73	n. s.
	E-AAV TG	0,95	0,81	0,66	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,63	0,75	0,61	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,60	0,61	0,50	n. s.
<b>FAS</b>	E-AAV NG	0,30	0,43	0,35	n. s.
	E-AAV TG	0,84	0,84	0,32	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,74	0,85	0,62	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,05	1,16	0,62	n. s.

**Tabelle 33: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse der Proteinexpression von SREBP1c (precursor und aktiv), SCD1 und FAS. Normalisierung auf den Housekeeper GAPDH. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Um herauszufinden, ob der Cholesterinmetabolismus in diesem HCC-Tiermodell verändert ist, wurde die Expression von HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A-Reduktase), LDLR (LDL-Rezeptor), ApoA1 (Apolipoprotein A1), PGC1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), SREBP2, SND1 (Staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1) und Cav-1 (Caveolin-1) untersucht.

Die HMG-CoA-Reduktase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, wobei der Großteil des Cholesterins über den LDL-Rezeptor in die Zellen aufgenommen wird [241, 242]. Der reverse Cholesterintransport zurück zur Leber, in der überschüssiges Cholesterin letztlich ausgeschieden wird, erfolgt über die Einlagerung des Cholesterins in HDL-Partikel, deren charakteristisches Transportprotein ApoA1 darstellt [243]. PGC1 $\alpha$  reguliert die Biogenese von Mitochondrien und verschiedene metabolische Stoffwechselwege in der Leber, wie z. B. die Bildung von Gallensäuren aus Cholesterin, und trägt so zur Cholesterinhomöostase bei [244, 245]. SREBP2 wiederum wird bei Choleste-

rinmangel aktiviert und führt zur verstärkten Synthese von Cholesterin und Expression des LDL-Rezeptors [205]. Dabei kommt es auch zur Aktivierung von SND1, was nicht nur die Cholesterinsynthese sondern auch die Cholesterinspeicherung fördert. Allerdings wird SND1 auch als potentiell Onkogen angesehen, da es die Karzinogenese vorantreibt [246]. Letztlich schützt Caveolin-1 die Zellen durch den Efflux von Cholesterin vor dessen Akkumulation [208, 209].

Cholesterinmetabolismus					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
LDLR	E-AAV NG	1,61	1,58	0,50	n. s.
	E-AAV TG	1,82	2,09	0,67	n. s.
	Ch156-AAV NG	1,93	1,99	0,99	n. s.
	Ch156-AAV TG	2,44	2,33	0,59	n. s.
PGC1 $\alpha$	E-AAV NG	1,14	1,26	0,52	n. s.
	E-AAV TG	1,25	1,39	0,43	n. s.
	Ch156-AAV NG	1,17	1,39	0,87	n. s.
	Ch156-AAV TG	1,34	1,36	0,28	n. s.
SREBP2 (precursor)	E-AAV NG	0,37	0,43	0,32	n. s.
	E-AAV TG	0,68	0,59	0,35	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,36	0,52	0,47	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,47	0,55	0,45	n. s.
SREBP2 (aktiv)	E-AAV NG	0,82	0,85	0,71	n. s.
	E-AAV TG	0,49	0,51	0,28	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,84	0,88	0,45	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,30	0,50	0,52	n. s.
SND1	E-AAV NG	0,87	0,81	0,21	n. s.
	E-AAV TG	0,86	0,99	0,35	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,82	0,92	0,28	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,89	1,10	0,50	n. s.
Cav-1	E-AAV NG	0,31	0,40	0,34	n. s.
	E-AAV TG	0,56	0,74	0,59	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,39	0,42	0,27	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,43	0,61	0,53	n. s.

**Tabelle 34: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse der Expression von LDLR und PGC1 $\alpha$  mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung auf Cyclophilin A. Analyse der Proteinexpression von SREBP2 (*precursor* und *aktiv*), SND1 und Caveolin-1. Normalisierung auf den Housekeeper GAPDH. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus).

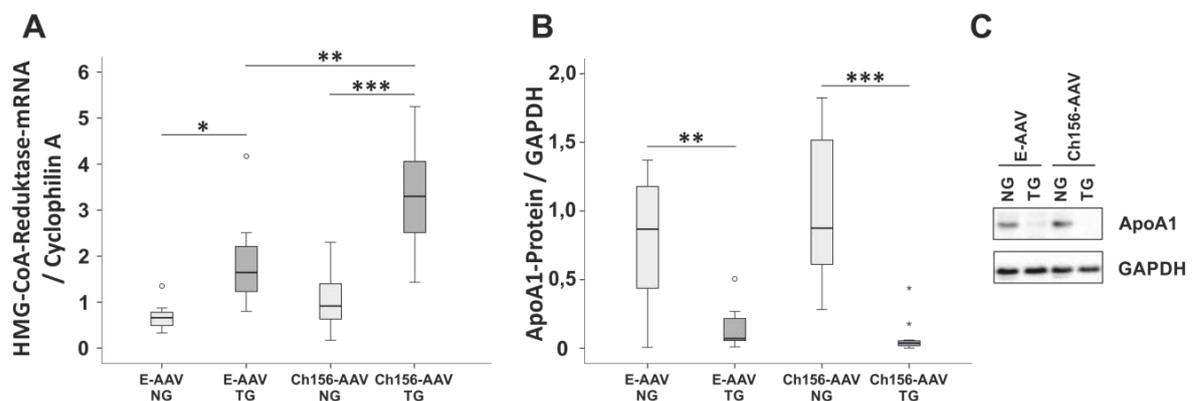
<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Ein Großteil der hier beschriebenen, am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteine – LDLR, PGC1 $\alpha$ , SREBP2, SND1 und Cav-1 – zeigte keine differenzielle Expression in den Tumorgeweben der C3H/HeNRj-Mäuse. Ebenso war deren Expression nicht durch die Überexpression von Ch156 beeinflusst (Tabelle 34).

Zwei Proteine des Cholesterinmetabolismus, bei denen eine Regulation beobachtet werden konnte, sind das Cholesterinsyntheseenzym HMG-CoA-Reduktase und das Apolipoprotein ApoA1 (Abbildung 26).

Die HMG-CoA-Reduktase war in den TG der Kontroll-AAV-Gruppe signifikant auf circa das Doppelte erhöht. In der Ch156-AAV-Gruppe war die HMG-CoA-Reduktase im TG im Vergleich zum NG sogar höchstsignifikant auf das circa Dreifache erhöht. Dabei war die Induktion der Expression im TG der Ch156-überexprimierenden Tiere hochsignifikant stärker als im TG der Kontroll-AAV-Gruppe (Abbildung 26 A).

ApoA1 hingegen war in den TG beider AAV-Gruppen deutlich reduziert. In der Kontroll-AAV-Gruppe war diese Reduktion hochsignifikant, in der Ch156-AAV-Gruppe höchstsignifikant. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen der Ch156-Überexpressions- und der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 26 B, C).



**Abbildung 26: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Genen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** (A) Analyse der HMG-CoA-Reduktase mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung auf Cyclophilin A. (B) Quantifizierung der ApoA1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung von Immunobots. Normalisierung auf den Housekeeper GAPDH. (C) Exemplarischer Immunoblot der ApoA1-Proteinexpression. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Wie bereits erwähnt, konnten durch die Microarray-Analyse auch Gene identifiziert werden, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind (Abbildung 27, Tabelle 35). Deren differen-

zielle Expression wurde ebenfalls auf mRNA- und / oder Protein-Ebene genauer untersucht.

Die identifizierten Gene sind Fabp5 (*Fatty acid binding protein 5, epidermal*), Alox5 (*Arachidonate 5-lipoxygenase*), Pnpla5 (*Patatin-like phospholipase domain containing 5*) und Cpt1c (*carnitine palmitoyl-transferase 1c*).

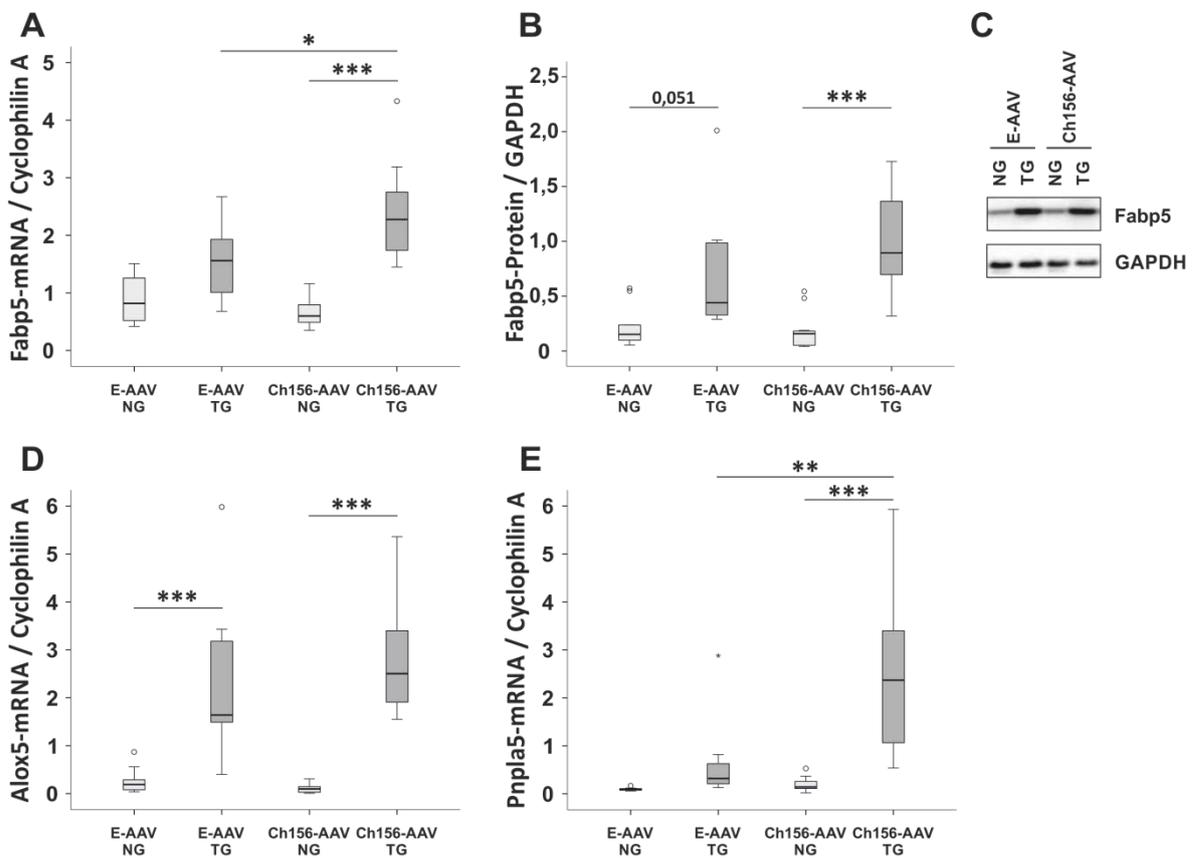
Fabp5 ist ein Protein, das langkettige Fettsäuren binden kann. Es wird vermutet, dass Fabp5, wie alle Mitglieder der FABPs, eine Rolle bei der Aufnahme, dem Transport und dem Metabolismus von Fettsäuren spielt. Seine Expression ist in Tumoren und Zellen mit verändertem Lipidmetabolismus häufig erhöht [247, 248]. Des Weiteren bewirkt Fabp5 wohl die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und kann so die Metastasierung von Tumoren beeinflussen [46, 53, 54].

In dieser Studie konnte auf mRNA-Ebene keine signifikante Veränderung der Fabp5-Expression im TG der Kontroll-AAV-Gruppe im Vergleich zum angrenzenden NG beobachtet werden. Demgegenüber fand eine höchstsignifikante Erhöhung der Fabp5-Expression im TG der Ch156-AAV-Gruppe im Vergleich zum NG statt. Diese war zudem signifikant höher als im TG der Kontroll-AAV-Mäuse (Abbildung 27 A). Auf Protein-Ebene hingegen war die Fabp5-Expression im TG beider AAV-Gruppen erhöht. Diese Induktion der Expression war bei der Kontroll-AAV-Gruppe fast signifikant ( $p = 0,051$ ), bei der Ch156-AAV-Gruppe höchstsignifikant. Zwischen der Fabp5-Expression der TG beider AAV-Gruppen konnte auf Protein-Ebene kein signifikanter Unterschied protokolliert werden (Abbildung 27 B, C).

Alox5 kodiert für ein Protein der Lipoxygenase-Familie und katalysiert die Bildung verschiedener Leukotriene aus Arachidonsäure. Diese können pro-inflammatorisch und anti-apoptotisch wirken und so die Tumorentstehung begünstigen. Schließlich können sie sogar die Tumormikroumgebung verändern und pro-angiogen und immunsuppressiv wirken [249]. Auf diese Weise kann Alox5 die Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten beeinflussen, wobei seine Rolle im HCC noch nicht geklärt ist [250].

Die Alox5-Expression war im TG beider AAV-Gruppen hochsignifikant erhöht, wobei die Expression von Alox5 in den NG der Tiere auf einem sehr niedrigen Level lag. Die adeno-

assoziierte Ch156-Überexpression beeinflusste die hepatische Alox5-Expression nicht (Abbildung 27 D).



**Abbildung 27: Hepatische Expression von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiierter Ch156-Überexpression.** Analyse von Fabp5 mittels (A) semiquantitativer Real-Time RT-PCR und (B) densitometrischer Vermessung von Immunoblots. Normalisierung der mRNA-Expression auf Cyclophilin A und der Proteinexpression auf GAPDH. (C) Exemplarischer Immunoblot der Fabp5-Expression. Analyse von (D) Alox5 und (E) Pnpla5 mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung beider Gene auf Cyclophilin A. (DEN, Diethylnitrosamin; E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiierter Virus). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Pnpla5 reguliert den Lipidmetabolismus, indem es die Transacetylierung von Fettsäuren und damit deren Synthese inhibiert [248]. Seine Expression ist bei Nahrungsmangel reduziert, bei der Differenzierung von Adipozyten und bei Übergewicht induziert [251]. Des Weiteren spielt Pnpla5 eine Rolle bei der Bildung der Membranen von Autophagosomen [252].

Pnpla5 zeigte im TG und NG in der Kontroll-AAV-Gruppe keine differenzielle Expression. In der Ch156-AAV-Gruppe kam es hingegen im TG zu einer höchstsignifikanten Induktion der

Pnpla5-Expression. Diese war auch im Vergleich zum TG der Kontroll-AAV-Gruppe hochsignifikant stärker (Abbildung 27 E).

Cpt1c spielt ebenfalls eine Rolle im Lipidmetabolismus und der Energiehomöostase. Es reguliert den Transport langkettiger Fettsäuren in Mitochondrien und auf diese Weise die  $\beta$ -Oxidation [253]. In Tumorzellen fördert es die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und damit das Tumorstadium [254]. Aus diesem Grund wird es als potentiell Onkogen angesehen [253].

Bei dem hier untersuchten HCC-Mausmodell konnte weder eine differenzielle Cpt1c-Expression im TG beobachtet werden, noch eine Veränderung infolge der Ch156-Überexpression (Tabelle 35).

Lipidmetabolismus					
Gen	Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz <sup>#</sup>
Cpt1c	E-AAV NG	0,20	0,20	0,08	n. s.
	E-AAV TG	0,17	0,26	0,22	n. s.
	Ch156-AAV NG	0,16	0,18	0,07	n. s.
	Ch156-AAV TG	0,25	0,28	0,13	n. s.

**Tabelle 35: Hepatische Cpt1c-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.** Analyse von Cpt1c als einen Regulator des mitochondrialen Fettsäure-Transports und der  $\beta$ -Oxidation mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR. Normalisierung auf Cyclophilin A. (E, Empty; Ch156, Chemerin156; AAV, Adeno-assoziiertes Virus).

<sup>#</sup> n. s., nicht signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

### 3.3 Untersuchungen im humanen HCC

Um weitere Erkenntnisse über Chemerin und seinen Rezeptor CMKLR1 in der Pathologie des HCC zu erhalten, wurden Gewebeproben humaner HCC-Patienten untersucht. Laut Literatur ist die Chemerin-Expression in Tumorgeweben verschiedener Tumorarten reduziert [34-38], wobei eine höhere Chemerin-Expression wohl einen protektiven Effekt ausübt [38, 128]. Als Hauptursachen für die Entstehung des HCCs gelten unter anderem die NASH und die Infektion mit Hepatitisviren [255].

Um hierbei etwaige Unterschiede herausfinden zu können, wurde bei den Analysen zwischen HCC-Patienten mit und ohne Hepatitis-Infektion unterschieden. Die Untersuchungen bei dieser humanen Studie erfolgten ebenfalls sowohl an Tumorgewebe auch als an parakarzinomatösem Normalgewebe der Lebern.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Hepatitisviren-freie HCC-Kohorte umfasste 21 männliche Patienten, wovon sechs Patienten eine Steatose und vier Patienten eine NASH-Leber besaßen. 13 Patienten hatten eine Leberfibrose. Alle eingestuft Tumore wurden den *Grading*-Stufen G1 und G2 bzw. den *Staging*-Stufen T1 bis T3 zugeordnet. Weitere Charakteristika dieser Kohorte sind in 2.2.1.1 beschrieben.

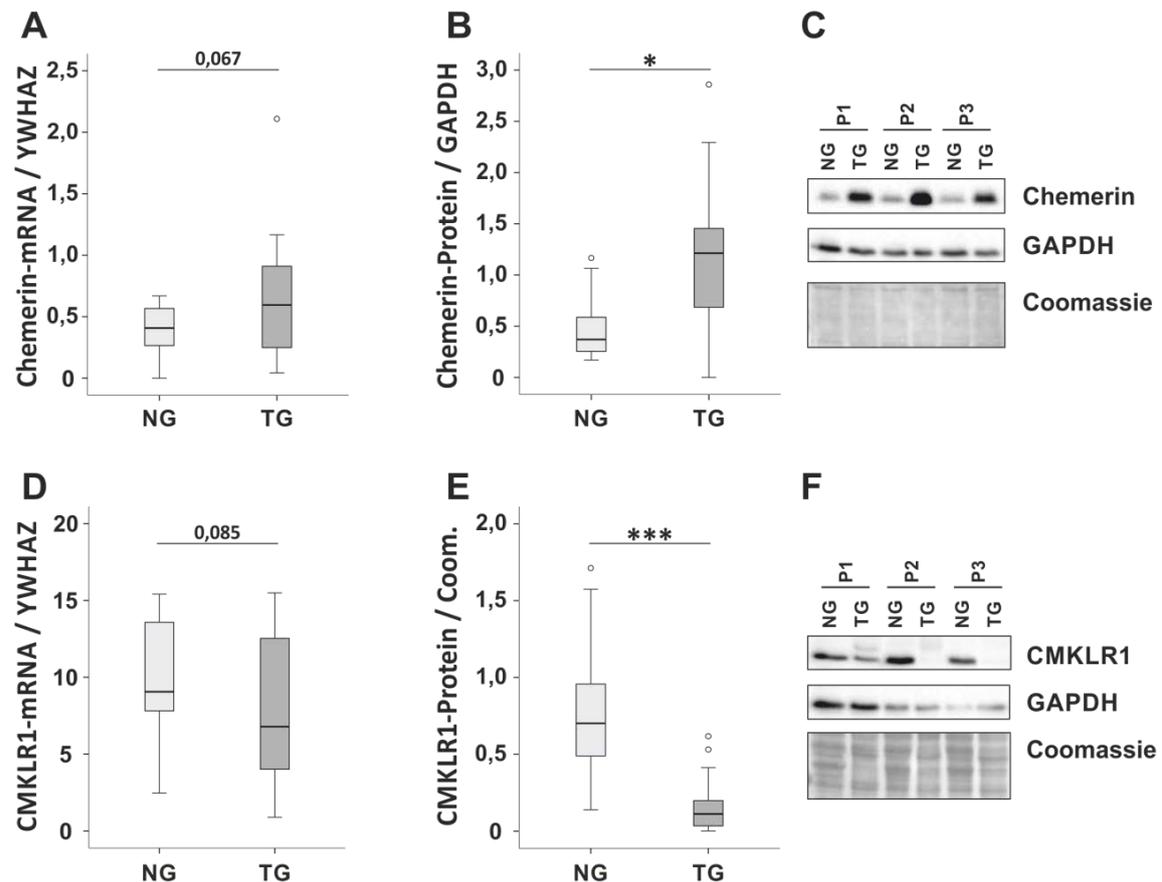
Die Hepatitis-assoziierte Kohorte umfasste 24 Patienten, wovon 18 männlich waren. Der Großteil der Patienten trug das Hepatitis C-Virus (HCV, n = 11), zehn Patienten trugen das Hepatitis B-Virus (HBV), drei Patienten waren mit beiden Hepatitisviren (HBV+HCV) infiziert. Acht der Patienten zeigten eine Steatose, 22 eine Fibrose. Alle eingestuft Tumore dieser Kohorte wurden den *Grading*-Stufen G1 und G2 bzw. den *Staging*-Stufen T1 bis T3 zugeordnet. Weitere Charakteristika dieser Kohorte sind in 2.2.1.2 aufgeführt.

#### 3.3.1 Expression von Chemerin und CMKLR1

Zunächst wurde der systemische Chemerin-Spiegel der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte bestimmt. Dieser lag bei 116,5 ng/ml (Median) bzw. 139,7 ng/ml (Mittelwert). Die Standardabweichung betrug 99,7 ng/ml.

Im Anschluss wurde die hepatische Expression von Chemerin im NG und TG in derselben HCC-Kohorte analysiert. Auf RNA-Ebene fand im TG eine tendenzielle Erhöhung ( $p = 0,067$ ) der Chemerin-Expression statt (Abbildung 28 A), welche auf Proteinebene signifikant war (Abbildung 28 B, C).

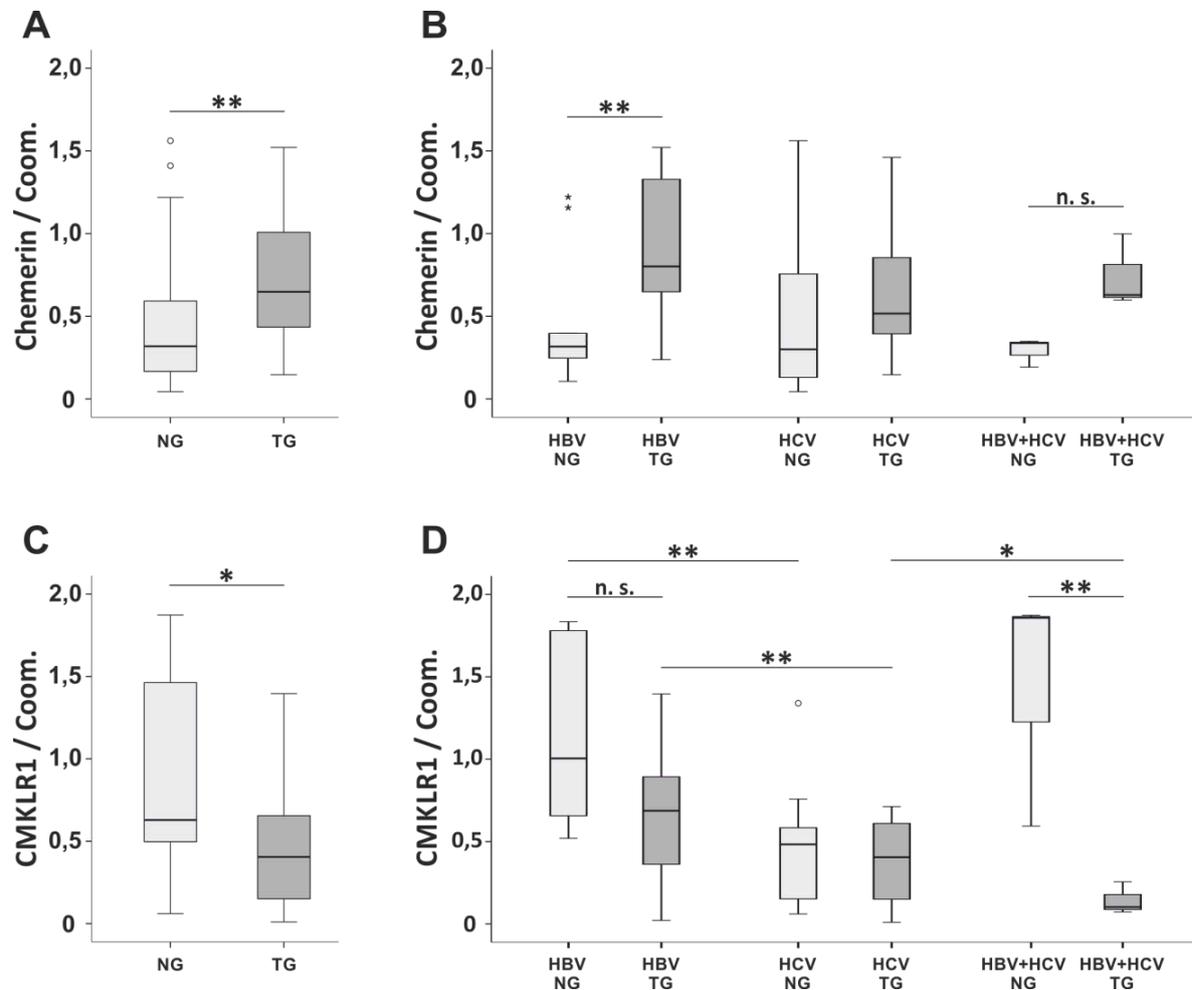
Des Weiteren wurde die Expression des Rezeptors CMKLR1 im NG und TG der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte untersucht. Dabei zeigte sich auf RNA-Ebene eine tendenzielle Reduktion ( $p = 0,085$ ) der CMKLR1-Expression im TG im Vergleich zum NG der Leber (Abbildung 28 D). Diese Reduktion war auf Protein-Ebene höchstsignifikant (Abbildung 28 E, F).



**Abbildung 28: Hepatische Chemerin- und CMKLR1-Expression in NG und TG der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte.** (A) Chemerin-mRNA-Expression. Normalisierung auf den Housekeeper YWHAZ. (B) Quantifizierung der Chemerin-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Normalisierung auf GAPDH. (C) Exemplarischer Immunoblot der Chemerin-Proteinexpression. (D) CMKLR1-mRNA-Expression. Normalisierung auf den Housekeeper YWHAZ. (E) Quantifizierung der CMKLR1-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (F) Exemplarischer Immunoblot der CMKLR1-Proteinexpression. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe, P1-3, Patient 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Ebenso wurde die Expression von Chemerin und CMKLR1 in der Kohorte mit Hepatitis-assoziiertem-HCC untersucht. Dabei zeigte sich ein Muster, das dem der Hepatitisviren-freien Kohorte ähnelt. Die Chemerin-Proteinexpression stieg im TG hochsignifikant an (Abbildung 29 A), wobei dieser Anstieg primär auf die gesteigerte Expression in der HBV-Gruppe zurückging (Abbildung 29 B).

Die CMKLR1-Proteinexpression ging in den TG signifikant zurück (Abbildung 29 C), wobei diese Reduktion in der HBV+HCV-Gruppe hochsignifikant war (Abbildung 29 D). Die geringste CMKLR1-Expression der Normalgewebe zeigte sich in der HCV-Gruppe, die der Tumorgewebe in der HBV+HCV-Gruppe (Abbildung 29 D).

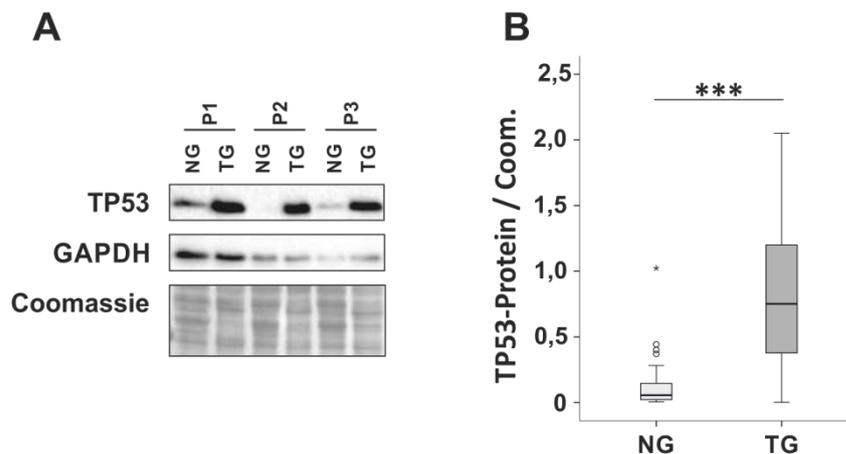


**Abbildung 29: Hepatische Proteinexpression von Chemerin und CMKLR1 in NG und TG der HBV/HCV-HCC-Kohorte.** Quantifizierung der Proteinexpression durch densitometrische Vermessung von Immunoblots. (A) Chemerin-Expression in der gesamten Kohorte. (B) Chemerin-Expression in Patienten mit HBV-, HCV- oder HBV+HCV-Infektion. (C) CMKLR1-Expression in der gesamten Kohorte. (D) CMKLR1-Expression in Patienten mit HBV-, HCV- oder HBV+HCV-Infektion. Normalisierung der Expression auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe, Coom., Coomassie; HBV, Hepatitisvirus B; HCV, Hepatitisvirus C; HBV+HCV, Hepatitisvirus B+C; n. s. nicht signifikant). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.3.2 Expression und Sequenzanalyse des Tumorsuppressors TP53

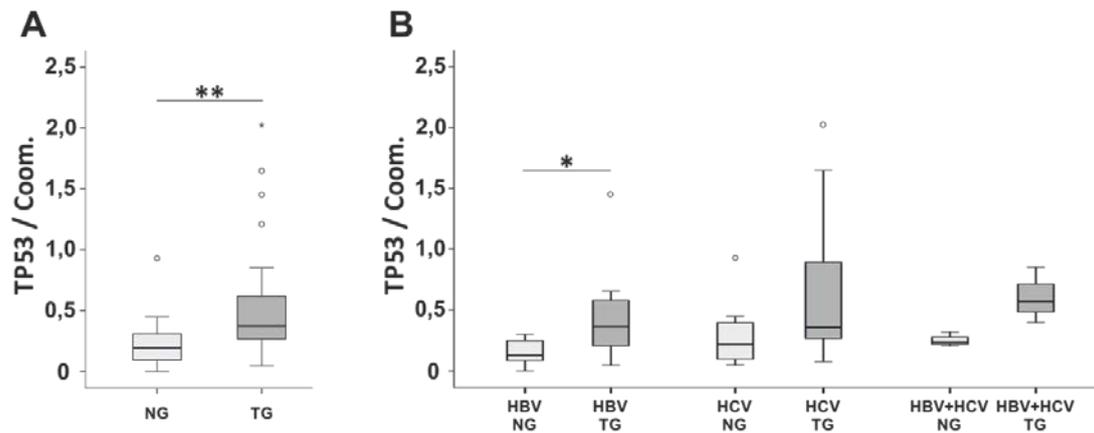
Das Tumorprotein TP53 stellt ein wichtiges Tumorsuppressorgen dar und ist bei vielen Tumorarten überexprimiert [39-41]. Es bewirkt in der gesunden Zelle einen Arrest des Zellzyklus, falls Störungen bei der Replikation der DNA auftreten, wodurch die Zelle Zeit zur Reparatur gewinnt und so mögliche Genveränderungen korrigieren kann [45, 256]. Im Tumor ist es häufig mutiert und akkumuliert im Zellkern. Dabei ist eine hohe TP53-Expression mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert [257]. Die Expression von TP53 wurde sowohl in der Hepatitisviren-freien Kohorte als auch in der Kohorte mit Hepatitis-assoziiertem HCC untersucht.

Zunächst wurde die TP53-Expression der Normal- und Tumorgewebe der Leber der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte untersucht. Dabei konnte eine höchstsignifikante Induktion der TP53-Proteinexpression im TG im Vergleich zum NG beobachtet werden (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Hepatische TP53-Proteinexpression in NG und TG der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte.** (A) Exemplarischer Immunoblot der TP53-Proteinexpression. (B) Quantifizierung der TP53-Proteinexpression durch densitometrische Vermessung. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; P1-3, Patient 1-3; Coom., Coomassie). \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Auch in den Leberproben der HBV/HCV-Kohorte konnte eine hochsignifikante Induktion der TP53-Proteinexpression protokolliert werden (Abbildung 31 A). Dabei zeigten die TG der drei Untergruppen eine tendenzielle (HCV, HBV+HCV) bzw. signifikante (HBV) Erhöhung der TP53-Proteinexpression (Abbildung 31 B).



**Abbildung 31: Hepatische TP53-Proteinexpression in NG und TG der HBV/HCV-HCC-Kohorte.** Quantifizierung der Proteinexpression durch densitometrische Vermessung von Immunoblots. (A) TP53-Expression in der gesamten Kohorte. (B) TP53-Expression in Patienten mit HBV-, HCV- oder HBV+HCV-Infektion. Normalisierung auf Coomassie-gefärbtes Gesamtprotein. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe, Coom., Coomassie; HBV, Hepatitisvirus B; HCV, Hepatitisvirus C; HBV+HCV, Hepatitisvirus B+C). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Zucman-Rossi *et al.* beschreiben, dass bei gut einem Viertel der europäischen HCC-Patienten eine Mutation des p53-Gens vorliegt [192]. Des Weiteren ist bekannt, dass unter anderem Mutationen im TP53-Gen zur Akkumulation des Proteins führen können [43]. Da der TP53-Expressionsunterschied in der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte deutlicher war, war es interessant den TP53-Status dieser Kohorte zu bestimmen. Dabei sollte herausgefunden werden, ob TP53 lediglich hochreguliert oder zusätzlich verändert ist. Aus diesem Grund wurden alle kodierenden Exons des TP53-Gens im Normal- und Tumorgewebe dieser Kohorte sequenziert. Das TP53-Gen besteht aus elf Exons, wobei die Exons 2 bis 11 kodierend sind [258]. Diese wurden einschließlich der Exon/Intron-Übergänge sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte in einer Kooperation mit Prof. Dr. Charalampos Aslanidis vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg.

Die Ergebnisse der TP53-Sequenzierung wurden im August 2016 im Artikel „*Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*“ im Journal *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* veröffentlicht [200].

Die bei der Sequenzierung identifizierten Sequenzvarianten der Exons 2 bis 11 des TP53-Gens sind in den Tabellen 36 und 37 aufgeführt.

## Sequenzanalyse der kodierenden Exons 2 bis 4 des TP53-Gens einschließlich der Exon/Intron-Übergänge

P-ID	Gewebe	Intron 1	Exon 2	Intron 2 c.74+38C>G rs1642785 MAF G = 0,4151 (rev. strand)	Exon 3	Intron 3 * c.96+41_96+56del16 (A1: 1x16 Nt, A2: 2x16 Nt)  * A1 (1x 16 Nukleotid-Sequenz): GGGCTGGG gacctggaggctggg GGGCTGGGGGG  * A2 (2x 16 Nukleotid-Sequenz): GGGCTGGG gacctggaggctggg gacctggaggctggg GGGCTGGGGGG	Intron 3 c.97-29C>A rs17883323 MAF T = 0,077 (rev. strand)	Exon 4 c.215C>G p.Pro72Arg rs1042522 MAF G = 0,457 (rev. strand)
#1	NG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / C	C / G
#2	NG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / A	C / G
#3	NG	-	-	C / C	-	A1 / A1	C / A	C / C
#4	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#5	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#6	NG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / A	C / G
#7	NG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / A	C / G
#8	NG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / A	C / G
#9	NG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / C	C / G
#10	NG	-	-	C / C	-	A1 / A2	C / C	C / G
#11	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#12	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#13	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#14	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#15	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#16	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#17	NG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / C	C / G
#18	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#19	NG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / C	C / G

#20	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#21	NG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#1	TG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / C	C / G
#2	TG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / A	C / G
#3	TG	-	-	C / C	-	A1 / A1	C / A	C / C
#4	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#5	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#6	TG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / A	C / G
#7	TG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / A	C / G
#8	TG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / A	C / G
#9	TG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / C	C / G
#10	TG	-	-	C / C	-	A1 / A2	C / C	C / G
#11	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#12	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#13	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#14	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#15	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#16	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#17	TG	-	-	C / G	-	A1 / A2	C / C	C / G
#18	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#19	TG	-	-	C / G	-	A1 / A1	C / C	C / G
#20	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G
#21	TG	-	-	G / G	-	A1 / A1	C / C	G / G

**Tabelle 36: Sequenzanalyse der kodierenden Exons 2 bis 4 des TP53-Gens einschließlich der Exon/Intron-Übergänge.** Die Exons sind farblich abgesetzt. (P-ID, Patienten-Identifikationsnummer; NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; c, cDNA-Position; rs, *Reference Single Nucleotide Polymorphism*; MAF, *Minor Allele Frequency*; rev., *reverse*; del, *Deletion*; Nt, *Nukleotid*; A1/A2, *Allel-Variante1/2*; G/A/C, *Guanin/Adenin/Cytosin*; X>Y, *Austausch der Base X gegen Base Y*).

In der Region von Exon 2 bis Exon 4 konnten mehrere Sequenzvarianten – im Intron 2 (rs1642785, c.74+38C>G), Intron 3 (rs17883323, c.97-29C>A) und Exon 4 (rs1042522, c.215C>G, p.Pro72Arg) – identifiziert werden (c, cDNA-Position; rs, *Reference Single Nucleotide Polymorphism*). Des Weiteren wurde eine 16 Basenpaar-lange Sequenzvariante im Intron 3 (c.96+41\_96+56del16) identifiziert, die entweder in der Allel-Variante A1 (1 x 16 Nukleotid-Sequenz) oder in der Allel-Variante A2 (2 x 16 Nukleotid-Sequenz) resultiert (Tabelle 36) [200].

In der zweiten (Intron 4, Exon 5, Intron 5, Exon 6), dritten (Intron 6, Exon 7), vierten (Intron 7, Exon 8, Intron 8, Exon 9, Intron 9) und fünften (Intron 9, Exon 10) Sequenzierungseinheit war das TP53-Gen unverändert [200].

In der sechsten und letzten Sequenzierungseinheit (Intron 10, Exon 11) konnte im Intron 10 eine bereits beschriebene Sequenzvariante des TP53-Gens (rs17880847, c.1100+30A>T) sowie eine bisher unbekannte Sequenzvariante (c.1101-34T>G) identifiziert werden (Tabelle 37) [200].

<b>Sequenzanalyse des kodierenden Exons 11 des TP53-Gens einschließlich des Exon/Intron-Übergangs</b>				
<b>P-ID</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Intron 10</b> c.1100+30A>T rs17880847 MAF A = 0,00321 ( <i>rev. strand</i> )	<b>Intron 10</b> c.1101-34T>G	<b>Exon 11</b>
#1	NG	A / A	T / G	-
#2	NG	A / A	T / G	-
#3	NG	A / A	T / T	-
#4	NG	A / A	T / G	-
#5	NG	A / A	T / T	-
#6	NG	A / T	T / G	-
#7	NG	A / A	T / G	-
#8	NG	A / T	T / T	-
#9	NG	A / A	T / G	-
#10	NG	A / A	T / T	-
#11	NG	A / A	T / T	-
#12	NG	A / A	T / T	-
#13	NG	A / A	T / T	-
#14	NG	A / A	T / T	-
#15	NG	A / A	T / T	-
#16	NG	A / A	T / T	-
#17	NG	A / A	T / T	-

#18	NG	A / A	T / T	-
#19	NG	A / A	T / T	-
#20	NG	A / A	T / T	-
#21	NG	A / A	T / T	-
#1	TG	A / A	T / T	-
#2	TG	A / A	T / T	-
#3	TG	A / A	T / G	-
#4	TG	A / A	T / T	-
#5	TG	A / A	T / T	-
#6	TG	A / T	T / T	-
#7	TG	A / A	T / T	-
#8	TG	A / T	T / T	-
#9	TG	A / A	T / T	-
#10	TG	A / A	T / T	-
#11	TG	A / A	T / T	-
#12	TG	A / A	T / G	-
#13	TG	A / A	T / T	-
#14	TG	A / A	T / T	-
#15	TG	A / A	T / T	-
#16	TG	A / A	T / T	-
#17	TG	A / A	T / T	-
#18	TG	A / A	T / T	-
#19	TG	A / A	T / T	-
#20	TG	A / A	T / T	-
#21	TG	A / A	T / T	-

**Tabelle 37: Sequenzanalyse des kodierenden Exons 11 des TP53-Gens einschließlich des Exon/Intron-Übergangs.** Das Exon ist farblich abgesetzt. (P-ID, Patienten-Identifikationsnummer; NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; c, cDNA-Position; rs, *Reference Single Nucleotide Polymorphism*; MAF, *Minor Allele Frequency*; rev., *reverse*; G/A/T, Guanin/Adenin/Thymin; X>Y, Austausch der Base X gegen Base Y).

Die in dieser Studie identifizierten Sequenzvarianten lagen primär im Bereich von Introns. Es handelte sich dabei durchwegs um gutartige Nukleotid-Polymorphismen ohne Bedeutung für die Funktion von TP53. Weiterhin konnten keine kausalen Sequenzveränderungen in den kodierenden Exons bzw. nahe am Promotor gefunden werden. Letztlich zeigten alle Patienten der HCC-Kohorte eine ähnliche TP53-Sequenz. Dadurch war die HCC-Kohorte diesbezüglich einheitlich und die Patienten bzw. deren Tumore untereinander besser vergleichbar.

Die Ergebnisse der TP53-Sequenzierung wurden im August 2016 im Artikel „*Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*“ im Journal BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA veröffentlicht [200].

### 3.3.3 Analyse der Lipidzusammensetzung

Lipide übernehmen wichtige Funktionen im Körper, indem sie beispielsweise Energie speichern, die Funktionalität von Membranen aufrecht erhalten, aber auch die Proliferation und den Zelltod regulieren [56-59, 62]. In Tumorgewebe kommt es aufgrund des höheren Energiebedarfs zu einer Veränderung des Lipidmetabolismus [60, 61, 63]. Da die Leber eines der wichtigsten Organe in der Lipidhomöostase ist, wird insbesondere bei Erkrankungen der Leber – einschließlich des HCCs – die hepatische und systemische Lipidzusammensetzung beeinflusst [259-264].

Aus diesem Grund wurden die Lipide im Normal- und Tumorgewebe der Leber und im Serum der Hepatitisviren-freien Kohorte massenspektrometrisch analysiert. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (PD Dr. Gerhard Liebisch und Dr. Sabrina Krautbauer).

Die Ergebnisse dieser Studie wurden im August 2016 im Artikel „*Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*“ im Journal *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* veröffentlicht [200].

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden verschiedene Lipide untersucht: zum einen die Phosphoglyzeride Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) sowie Phosphatidylinositol (PI), zum anderen die Sphingolipide Ceramid (Cer) und Sphingomyelin (SM). Zudem wurden freies Cholesterin und Cholesterinester (CE) bestimmt [200]. Hierbei ist anzumerken, dass viele der eben genannten Lipidgruppen durch enzymatische Reaktionen ineinander überführt werden können. So wird PE durch die Aktivität der PEMT (PE-N-Methyltransferase) zu PC konvertiert [265]. PC kann durch die Phospholipase A2 zu LPC abgebaut werden [266]. Alternativ kann LPC auch durch die LCAT (Lecitin-Cholesterin-Acyltransferase) aus PC entstehen. Dabei wird Cholesterin zu CE verestert [267]. LPC kann durch die Aktivität der LPCAT1 (Lyso-PC-Acyltransferase) zu PC konvertiert werden [268]. Des Weiteren kann aus PE und PC durch PS-Synthasen PS hervorgehen [269].

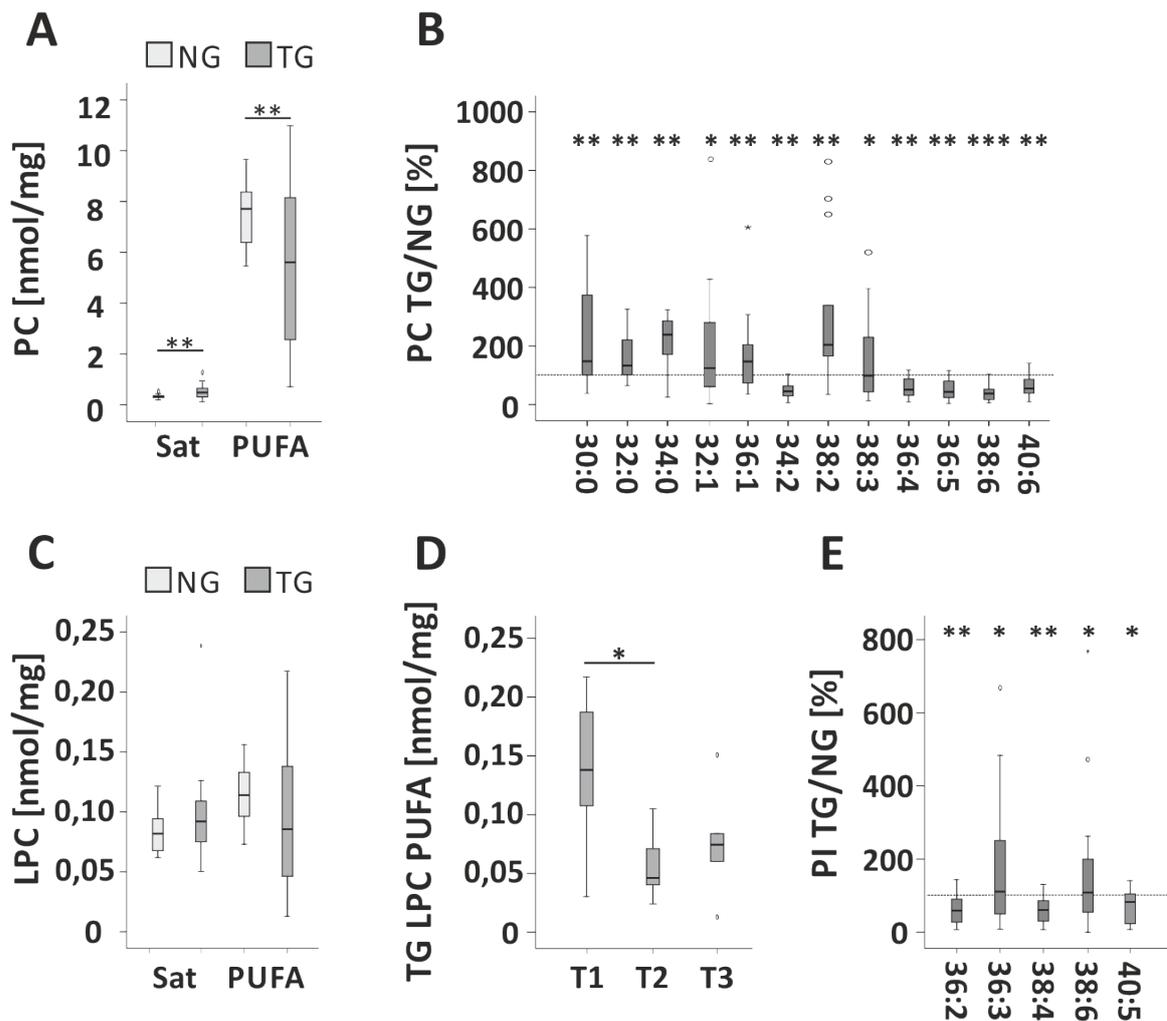
### 3.3.3.1 Analyse der Phosphoglyzeride und Cholesterinester

Zunächst wurden die Phosphoglyzeride im NG und TG der HCC-Kohorte bestimmt [200]. Es ist bekannt, dass die Expression von PC bei chronischen Leberschädigungen und im HCC induziert ist [268]. Dabei ist die Expression der PEMT im humanen HCC reduziert [265], die der LPCAT1 hingegen ist induziert [268]. Letztere schützt vor überschüssigen, mit der Nahrung aufgenommenen, zytotoxisch wirkenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) [270].

Bei den massenspektrometrischen Analysen zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der gesättigten (*saturated*, Sat) PC im TG, sowie ein hochsignifikanter Rückgang der PUFA PC im TG im Vergleich zum NG (Abbildung 32 A) [200]. Die signifikant veränderten PC Spezies sind im Detail nochmals in relativer Expression TG/NG (%) dargestellt. Dabei wird insbesondere der hochsignifikante Anstieg der Sat PC 30:0, 32:0 und 34:0 deutlich. Auch die einfach ungesättigten (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) PC-Spezies 32:1 und 36:1 zeigten einen signifikanten Anstieg im TG (Abbildung 32 B). Dennoch ist das Gesamt-PC im TG gegenüber dem NG unverändert [200].

Bei der massenspektrometrischen Analyse der LPC konnte bei den gesättigten Lipiden kein Unterschied zwischen NG und TG festgestellt werden. Die PUFA LPC waren im TG im Vergleich zum NG tendenziell erniedrigt ( $p = 0,058$ ) (Abbildung 32 C) [200]. Bei der genaueren Betrachtung der PUFA LPC-Expression der TG zeigte sich die stärkste Expression in Tumoren des Tumorstatus T1. In T2 und T3 hingegen war die Expression reduziert (Abbildung 32 D) [200].

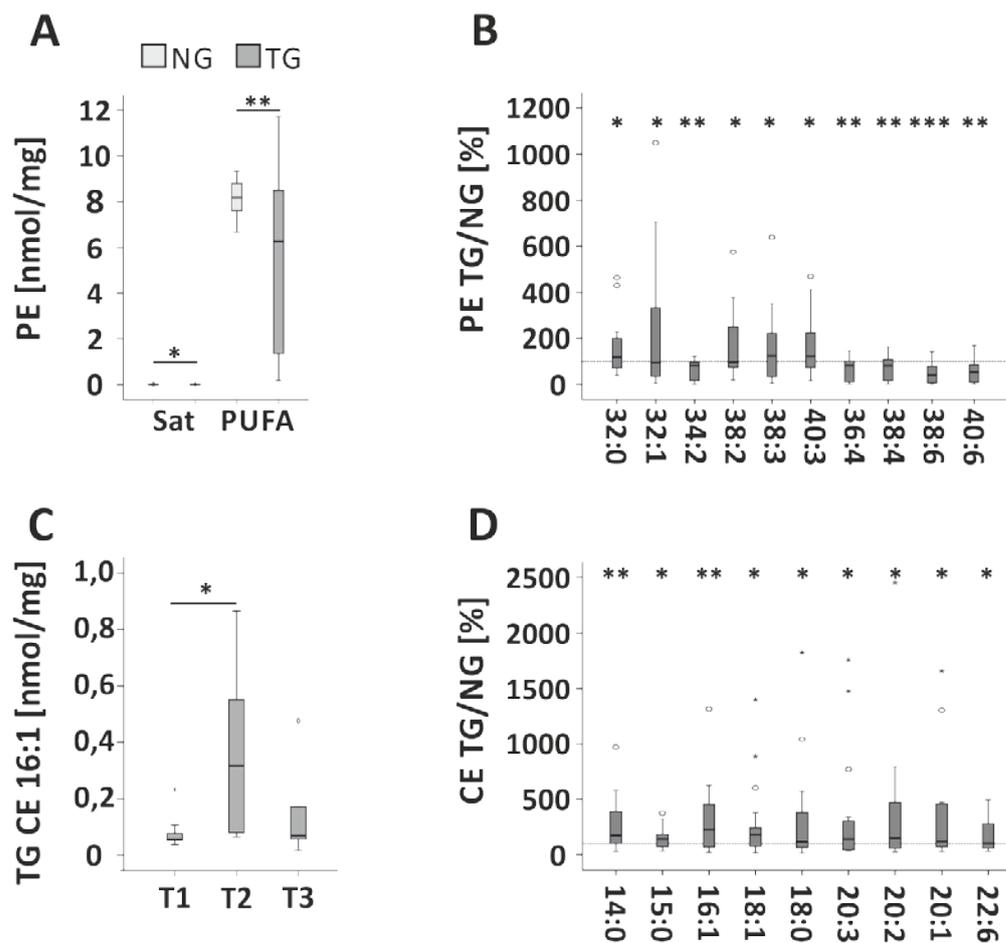
Des Weiteren wurde die Konzentration von PI im NG und TG der HCC-Kohorte untersucht [200]. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der PUFA PI ( $p = 0,015$ ) und der Gesamt-PI ( $p = 0,039$ ) im TG im Vergleich zum NG. Die PI-Spezies mit differenzieller Konzentration sind in Abbildung 32 E dargestellt [200]. Dabei war auch die primäre PI-Spezies der Leber, PI 38:4, hochsignifikant reduziert.



**Abbildung 32: Quantifizierung der hepatischen Phosphoglyzeride Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Phosphatidylinositol (PI) in NG und TG der HCC-Kohorte.** (A) Sat und PUFA PC in NG und TG. (B) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der PC-Spezies in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. (C) Sat und PUFA LPC in NG und TG. (D) Aufgliederung der TG LPC PUFA von (C) nach Tumorstatus. (E) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der PI-Spezies in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. Normalisierung aller Werte auf das Feuchtgewicht. (Sat, gesättigt; PUFA, mehrfach ungesättigt; NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; T1 - T3, Tumorstatus 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboriumsmedizin, UKR).

Bei der Analyse der Sat PE zeigte sich in den TG eine signifikante Induktion, bei den PUFA PE hingegen eine hochsignifikante Reduktion (Abbildung 33 A) [200]. Dies wurde auch nochmals in der relativen Expression von TG/NG (%) deutlich, in der die Mediane der einzelnen PUFAs meist unterhalb der 100 %-Linie lagen (Abbildung 33 B) [200].

Zuletzt wurde eine Induktion der CE im TG im Vergleich zum NG protokolliert. Diese war primär bei den Sat und MUFA CE zu beobachten, am deutlichsten bei der Spezies 16:1. Die PUFA CE waren nahezu unverändert (Abbildung 33 D) [200]. Darüber hinaus konnte bei der CE-Spezies 16:1 eine signifikante, transiente Induktion in Tumoren des Status T2 beobachtet werden (Abbildung 33 C) [200].



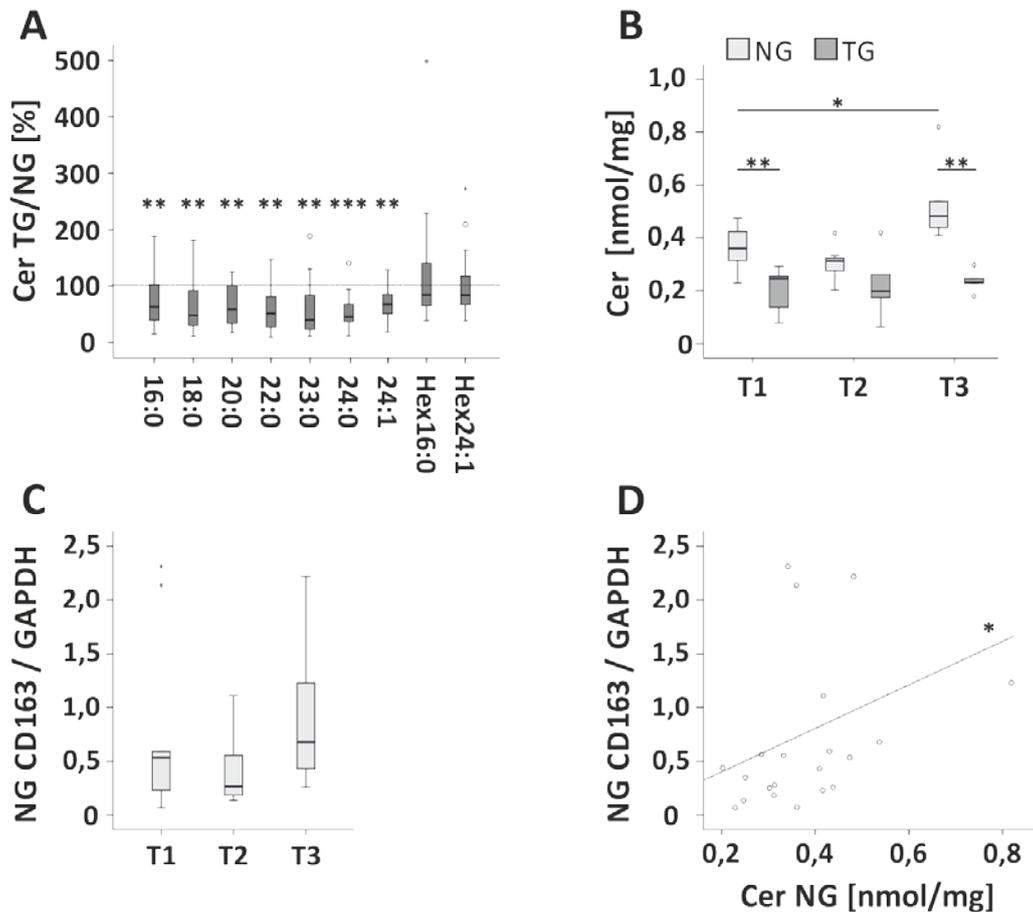
**Abbildung 33: Quantifizierung der hepatischen Phosphatidylethanolamine (PE) und Cholesterinester (CE) in NG und TG der HCC-Kohorte.** (A) Sat und PUFA PE in NG und TG. (B) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der PE-Spezies in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. (C) Aufgliederung der TG CE 16:1 nach Tumorstatus. (D) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der CE-Spezies in %. Normalisierung aller Werte auf das Feuchtgewicht. (Sat, gesättigt; PUFA, mehrfach ungesättigt; NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; T1 - T3, Tumorstatus 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, UKR).

### 3.3.3.2 Analyse der Sphingolipide

Neben den Phosphoglyzeriden wurden auch die Sphingolipide Ceramid (Cer) und Sphingomyelin (SM) in der HCC-Kohorte untersucht [200]. Ceramide sind in vielen Tumorarten reduziert [271-274]. Den Ceramiden wird dabei eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor zugesprochen, da sie das Zellwachstum hemmen und pro-apoptotisch wirken [271]. SM kann durch die Sphingomyelinsynthase aus Ceramid aufgebaut werden [272]. Die rückläufige Reaktion von Ceramid zu SM wird durch die SMase reguliert [275].

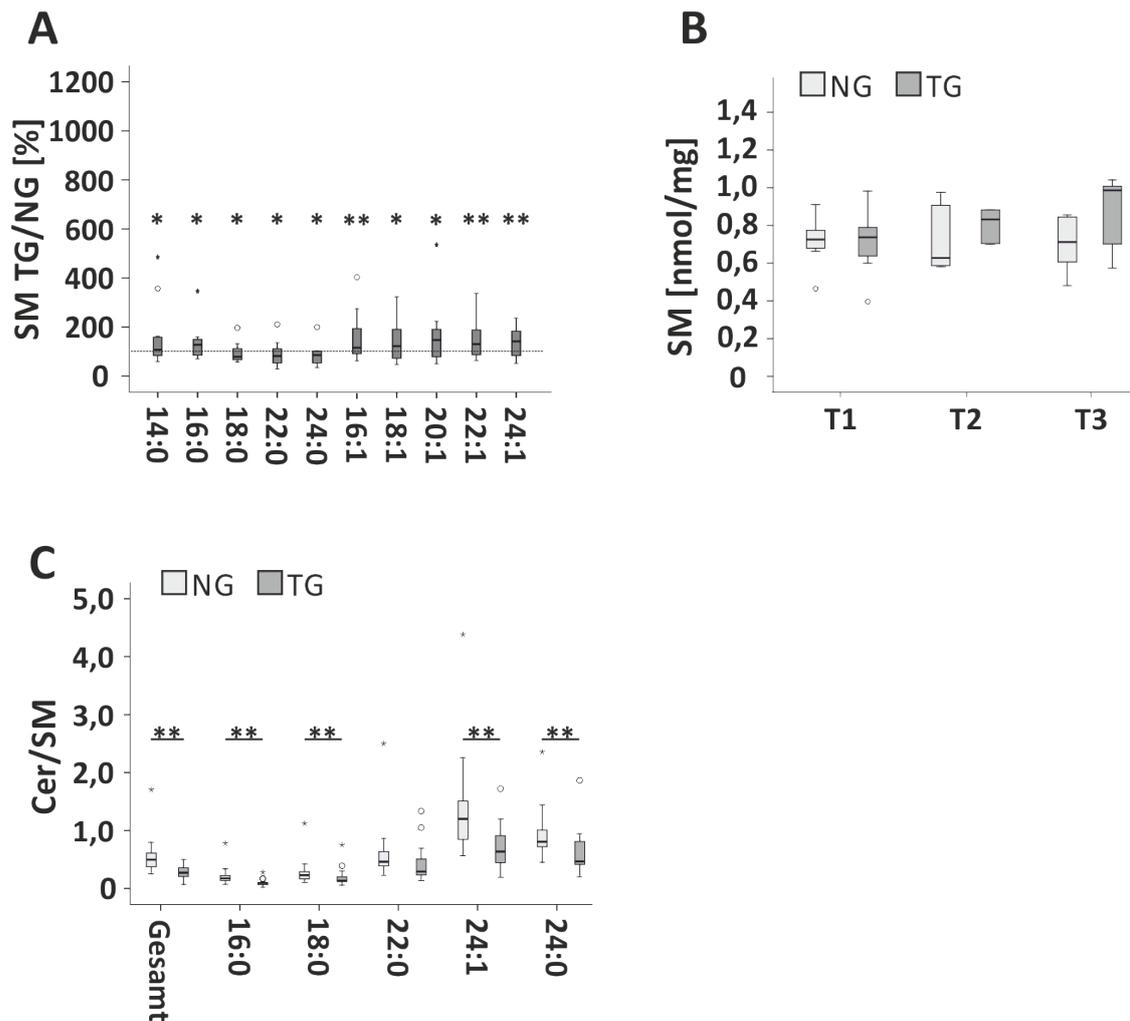
Des Weiteren ist bekannt, dass von Hepatozyten freigesetztes Ceramid alternativ-aktivierte Makrophagen rekrutiert [276-278]. Da diese immunsuppressiv wirken und das Tumorwachstum fördern, wurde auch die Proteinexpression des entsprechenden Markergens CD163 untersucht.

Bei den massenspektrometrischen Analysen der NG und TG der HCC-Kohorte konnte eine hochsignifikante Reduktion der Ceramide im TG um circa 50 % protokolliert werden. Die Konzentration der beiden untersuchten Hexosylceramide, welche durch das Medikament Sorafenib beeinflusst werden können, war unverändert (Abbildung 34 A) [200]. Durch die Aufgliederung der Ceramid-Spezies entsprechend des Tumorstatus T1 bis T3 zeigte sich in den TG der Stadien T1 und T3 eine hochsignifikante Verringerung der Ceramide im Vergleich zu den zugehörigen NG. Es ergab sich jedoch keine Veränderung der TG-Ceramide mit dem Tumorstatus. Des Weiteren zeigen die T3-NG signifikant mehr Ceramide als die T1-NG (Abbildung 34 B) [200]. Dieser Anstieg geht auf die Spezies d18:1/16:0 ( $p = 0,019$ ), d18:1/18:0 ( $p = 0,019$ ), d18:1/20:0 ( $p = 0,007$ ) und d18:1/24:1 ( $p = 0,001$ ) zurück. Weiterhin haben die T3-NG im Vergleich zu den T2-NG eine höhere Konzentration der Ceramide d18:1/20:0, d18:1/24:1, d18:1/24:0 und d18:1/22:0. Bei der Analyse des Makrophagen-Markers CD163 zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung im T3-NG (Abbildung 34 C) [200]. Desweiteren besteht eine positive Korrelation zwischen der Ceramid-Konzentration und der CD163-Proteinexpression im NG ( $r = 0,0497$ ,  $p = 0,02$ ) (Abbildung 34 D) [200].



**Abbildung 34: Quantifizierung des hepatischen Sphingolipids Ceramid (Cer) und des Makrophagenmarkers CD163 der HCC-Kohorte.** (A) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der Ceramid-Spezies in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. (B) Aufgliederung der Ceramid-Spezies in NG und TG nach Tumorstatus. Normalisierung auf das Feuchtgewicht. (C) Aufgliederung der CD163-Proteinexpression der NG nach Tumorstatus. Normalisierung auf GAPDH. (D) Korrelation zwischen Ceramid-Konzentration und CD163-Proteinexpression in NG. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe; T1 - T3, Tumorstatus 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, UKR).

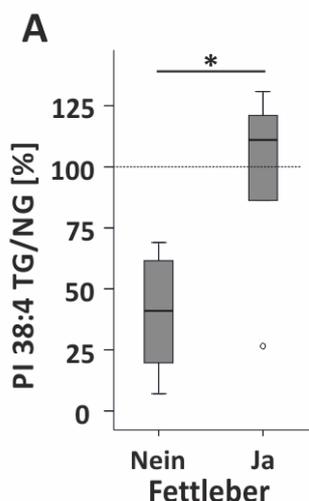
Die Gesamt SM-Expression war im TG im Vergleich zum NG erhöht. Dabei waren die SM-Spezies 14:0, 16:1, 16:0, 18:1, 20:1, 22:1 und 24:1 induziert, 18:0, 22:0 und 24:0 hingegen reduziert (Abbildung 35 A) [200]. Bei Aufgliederung der SM-Spezies entsprechend des Tumorstatus T1 bis T3 konnte keine spezifische Veränderung der SM-Konzentrationen in den verschiedenen HCC-Stadien beobachtet werden (Abbildung 35 B) [200]. Zuletzt wurden die Cer/SM-Quotienten der Spezies mit gleichen Acylkettenlängen berechnet. Dabei zeigte sich bei nahezu allen gemessenen Ceramid-Spezies, sowie bei den Gesamt-Ceramiden, eine hochsignifikante Reduktion der Ceramid-Synthese in den TG im Vergleich zu den NG (Abbildung 35 C) [200]. Dies deutet auf eine gestörte Sphingomyelinase-Aktivität in den Tumoren hin.



**Abbildung 35: Quantifizierung des hepatischen Sphingolipids Sphingomyelin (SM) und Bestimmung der Ceramid/SM-Verhältnisse der HCC-Kohorte.** (A) Signifikant veränderte TG/NG-Verhältnisse der SM-Spezies in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. (B) Aufgliederung der SM-Spezies in NG und TG nach Tumorstatus. Normalisierung auf das Feuchtgewicht. (C) Bestimmung der Cer/SM-Quotienten in NG und TG. (NG, Normalgewebe, TG, Tumorgewebe; T1 - T3, Tumorstatus 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, UKR).

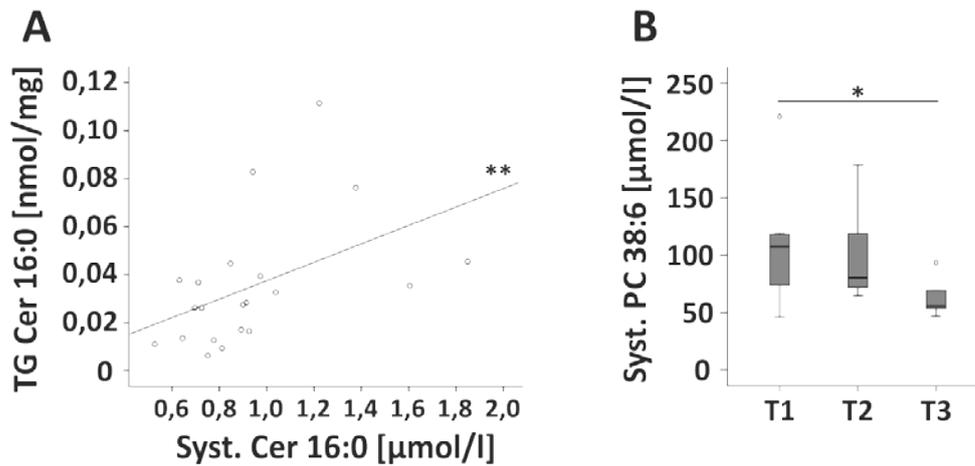
Weiterhin ist bekannt, dass TP53 die Ceramid-Synthese regulieren kann [279]. Wie bereits in 3.3.2 beschrieben wurde, ist die TP53-Expression im TG erhöht. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der TP53-Expression und der Gesamt-Ceramid-Konzentration gefunden werden. Die Ceramid-Spezies Cer d18/16:0 stellt hier eine Ausnahme dar ( $r = -0,655$ ,  $p = 0,001$ ).

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob die in dieser Studie untersuchten Lipide der HCC-Patienten durch Typ-2-Diabetes oder das Vorhandensein einer Fettleber (n = 6) bzw. Steatohepatitis (n = 4) beeinflusst werden. Typ-2-Diabetes nahm keinen Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Lipide. Mit Ausnahme der PUFA-PI, die in der verfetteten Leber im TG im Vergleich zum NG erhöht waren, konnten keine signifikanten Lipidveränderungen beobachtet werden. Dabei ging die Erhöhung des PUFA-PI-Quotienten ausschließlich auf die Spezies PI 38:4 zurück (Abbildung 36 A) [200].



**Abbildung 36: Assoziation zwischen HCC-assoziierten hepatischen Lipidveränderungen und der Lebersteatose in der HCC-Kohorte.** (A) Signifikant verändertes TG/NG-Verhältnis der Phosphatidylinositol (PI)-Spezies 38:4 in %. Die gestrichelte Linie entspricht 100 %. (NG, Normalgewebe; TG, Tumorgewebe). \*  $p \leq 0,05$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, UKR).

Zuletzt wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der hepatischen Expression der im HCC-veränderten Lipide und deren Serum-Werten besteht. Dabei konnte bei einem Großteil der Lipide (SM, PI, PS, PE und CE) keine Korrelation protokolliert werden. Cer d18:1/24:1 ( $r = 0,444$ ,  $p = 0,044$ ) sowie Cer d18:1/16:0 ( $r = 0,583$ ,  $p = 0,006$ ) der TG korrelieren positiv mit den zugehörigen Serum-Werten. Ebenso besteht eine positive Korrelation zwischen PC 38:6 ( $r = 0,2525$ ,  $p = 0,015$ ) und LPC 22:6 ( $r = 0,472$ ,  $p = 0,031$ ) der TG und deren Serum-Werten [200]. Weiterhin konnte durch Aufgliederung der Serum-Werte gegen den Tumorstatus T1 bis T3 eine Reduktion von LPC 22:6 und PC 38:6 in T3-Patienten im Vergleich zu T1-Patienten beobachtet werden. In Abbildung 37 ist zum einen die Korrelation von Cer 16:0 zwischen den hepatischen und systemischen Werten (Abbildung 37 A) exemplarisch dargestellt, zum anderen die T3-spezifische Reduktion von PC 38:6 (Abbildung 37 B) [200].



**Abbildung 37: Assoziationen zwischen HCC-assozierten Lipid-Veränderungen in Serum und Tumorgewebe der HCC-Kohorte.** (A) Korrelation von Cer 16:0 im Serum und im TG. (B) Aufgliederung der systemischen PC 38:6-Konzentration nach dem Tumorstatus. (Cer, Ceramid; PC, Phosphatidylcholin; NG, Normalgewebe, TG, Tumorgewebe; T1 - T3, Tumorstatus 1-3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (Durchführung der ESI-MS/MS durch Dr. Sabrina Krautbauer und PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, UKR).

Die Ergebnisse dieser Studie wurden im August 2016 im Artikel „*Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*“ im Journal BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA veröffentlicht [200].

## 4 Diskussion

### 4.1 Chemerin in der murinen NASH

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, die Rolle von Chemerin und dessen Rezeptor CMKLR1 in der murinen NASH und dem NASH-assoziierten HCC zu untersuchen. Ausgangspunkt war die in der Literatur beschriebene protektive Wirkung von Chemerin im HCC [38, 128] und die Fragestellung, ob ein erhöhtes Chemerin-Protein-Niveau in der murinen NASH möglicherweise die Progression der NASH zum HCC inhibieren kann.

Um dies zu klären, wurde in einem Mausmodell eine NASH-induzierende LMCD-Diät mit der Injektion des Kanzerogens DEN kombiniert. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im Artikel „*Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis*“ im Journal *ANTICANCER RESEARCH* veröffentlicht [280].

Die Haupterkenntnisse dieser Studie waren zum einen, dass in dem hier verwendeten NASH-Mausmodell der systemische Chemerin-Spiegel erhöht war und sich dessen Niveau bei der Progression der NASH hin zum HCC nicht veränderte. Zudem konnte durch *ex vivo*-Analysen gezeigt werden, dass die durch Serum-Chemerin vermittelte Aktivierung von CMKLR1 und GPR1 in der NASH und dem NASH-assoziierten HCC vergleichbar war. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass auch die hepatische Chemerin-Proteinexpression in der NASH-Leber induziert war, dessen Expressionslevel jedoch beim Übergang der NASH-Leber hin zum HCC unverändert blieb. Dies legt den Schluss nahe, dass Lebertumore trotz des hohen Levels des mutmaßlich protektiven Chemerins entstehen können. In einer Studie von Lin *et al.* konnte jedoch durch die Überexpression bzw. Injektion von Ch156 in einem HCC-Modell ein protektiver Effekt bewirkt werden [128]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die konträren Ergebnisse liegt darin, dass diese Isoform in der Leber wohl nur zu einem geringen Anteil vorliegt oder in der NASH-Leber nur unzureichend exprimiert wird. Bei Chemerin-Analysen ist es daher generell von Vorteil, auch die einzelnen Isoformen zu bestimmen und nicht nur die Proteinexpression zu analysieren, da diese keine Rückschlüsse auf die Chemerin-Aktivität ermöglicht. Dies kann beispielsweise über Isoform-spezifische Antikörper oder mittels Massenspektrometrie erfolgen [119]. Derzeit sind verschiedene C-terminal-verkürzte Chemerin-Isoformen bekannt,

deren physiologische Bedeutung jedoch noch nicht im Detail geklärt ist. Die Isoformen haben gemein, dass sie durch ein- oder mehrstufige enzymatische Spaltungen aus dem inaktiven Pro-Chemerin (Ch162) hervorgehen [112, 113]. In der hier vorliegenden NASH-HCC-Studie wurden die verschiedenen Chemerin-Isoformen in der NASH noch nicht analysiert. Es ist also noch nicht geklärt, ob sich die Chemerin-Aktivität oder das Zusammenspiel der Isoformen in der NASH-Leber bzw. im Tumorgewebe unterscheidet. Selbst bei gleichbleibender Expression könnte Chemerin so verschiedene Wirkweisen ausüben. Dementsprechend ist es auch möglich, dass von einer erhöhten Chemerin-Expression in der NASH-Leber nicht unmittelbar eine höhere Aktivität abgeleitet werden kann.

Neben Chemerin kann auch dessen Rezeptor CMKLR1 einen Einfluss auf die Aktivität und Wirkweise von Chemerin nehmen. In der hier vorliegenden Studie konnte keine Expressionsveränderung von CMKLR1 in der NASH- bzw. NASH-HCC-Leber beobachtet werden. Demnach spielt die hepatische Expressionsstärke von CMKLR1 wohl eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der Chemerin-Aktivität. In verschiedenen Publikationen zu CMKLR1 in der murinen und humanen NASH wurde sowohl eine unveränderte, als auch verringerte bzw. induzierte hepatische CMKLR1-Expression beschrieben [132, 149, 281, 282]. Dabei steht unser Ergebnis im Einklang mit der gleichbleibenden CMKLR1-Expression in einem NASH-Mausmodell, welches auf der Verfütterung einer atherogenen Diät beruht [282].

Die in dieser Arbeit verwendete LMCD-Diät bietet gegenüber der häufig für NASH-Studien verwendeten MCD-Diät einen entscheidenden Vorteil. Sie stellt nicht nur die hepatische Genexpression, Steatose und Fibrose der humanen NASH nach, sondern umgeht auch den für die MCD-Diät typischen drastischen Gewichtsverlust der Tiere [283-285]. Auf diese Weise wird auch eine längere Studiendauer ermöglicht, sodass neben der NASH auch die mehrere Monate in Anspruch nehmende Tumorentstehung untersucht werden kann. Die in der Literatur beschriebene LMCD-assoziierte Fibrose und Steatose der Leber [180, 181] konnte in dieser Arbeit histologisch nachgewiesen werden.

Neben der Verfettung der Leber konnte auch eine Veränderung der Lipidhomöostase beobachtet werden. Die Expression von SREBP1c, SREBP2, SCD1, FAS und Caveolin-1 waren

infolge der LMCD-Diät in der NASH-Leber reduziert. Die hier gefütterte Diät führte also ebenso wie die MCD-Diät zu einer Verminderung der endogenen Fettsäuresynthese infolge der geringeren hepatischen SREBP1c-, SCD1- und FAS-Expression [286]. SREBP2 reguliert die Cholesterinsynthese und ist in der MCD-Diät-induzierten NASH-Leber – im Gegensatz zur LMCD-Diät-induzierten NASH-Leber – unverändert [287]. Caveolin-1 hingegen schützt die Zellen vor der Cholesterin-Akkumulation und ist auch bei der Fütterung einer Hochfett-Diät reduziert [288]. Zur Veränderung der Expression von Caveolin-1 in der MCD-Diät wurden bisher noch keine Daten publiziert. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass dessen Expression infolge der MCD-Diät ebenfalls reduziert sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen also eine Reduktion der endogenen Fettsäure- und Cholesterinsynthese in der LMCD-Diät-induzierten NASH-Leber. Demzufolge trägt die in der Literatur beschriebene Cholin-Defizienz der LMCD-Diät zur Verminderung des Lipid-Exports via VLDL-Partikel aus der Leber und somit zu deren Verfettung bei [285].

SCD1 war nicht nur infolge der LMCD-Diät reduziert, sondern auch infolge der DEN-Injektion. In der Literatur wird die SCD1-Expression jedoch meist zwischen Normal- und Tumorgewebe verglichen, wobei SCD1 im Tumor induziert ist [289]. So wie es scheint, sind derzeit keine Studien, die die SCD1-Expression in den nicht-tumorösen Lebergeweben von HCC-Patienten mit den Lebern von Nicht-HCC-Patienten vergleichen, publiziert. Da SCD1 jedoch zur Tumorbildung beiträgt [290], könnte die beobachtete Reduktion der SCD1-Expression protektiv wirken. Mit Ausnahme von SCD1 konnte in der tumorösen Leber keine differenzielle Expression der eben beschriebenen Proteine des Lipidstoffwechsels beobachtet werden. Weiterhin war die Größe der Lipidtröpfchen sowie der Steatose- und Fibrosegrad der Leber unabhängig von deren Tumoralast vergleichbar.

Wie eingangs schon kurz erwähnt, ist die Chemerin-Proteinexpression in der LMCD-Diät-induzierten NASH-Leber erhöht, ebenso wie in der MCD- bzw. atherogenen Diät gefütterten Maus [110]. In Ratten hingegen verhält es sich gegenteilig, sodass die MCD-Diät zu einer Reduktion der hepatischen Chemerin-Expression führt [131]. Aus diesem Grund sollten auch Spezies-spezifische Unterschiede Gegenstand der künftigen Forschung werden. Bei NASH-Patienten wurde bisher nur die hepatische Chemerin-Expression auf RNA-

Ebene untersucht [130, 132]. Da diese mitunter jedoch deutlich von der auf Protein-Ebene abweichen kann [291-294], sollte das Augenmerk vermehrt auf die Proteinexpression gelegt werden, um diese Fragestellung lösen zu können. Darüber hinaus ist die Analyse der Isoformen unabdingbar, um deren Aktivität und physiologische Bedeutung in der NASH und dem HCC aufklären zu können.

Im Serum der hier untersuchten Mäuse konnte ein erhöhter Gesamt-Chemerin-Spiegel infolge der LMCD-Diät beobachtet werden. Dabei ist anzumerken, dass deren Körpergewicht und Fettgewebe, welches entscheidend zur Chemerin-Synthese beiträgt [29-32, 112, 113], nahezu unverändert ist. In weiteren MCD-/LMCD-basierten Untersuchungen sollte daher auch untersucht werden, wie die Fettdepots bzw. die Leber zum systemischen Chemerin-Spiegel beitragen. Weiterhin zeigte sich im murinen NASH-assoziierten HCC weder ein Unterschied im Serum-Chemerin-Spiegel, noch in der *ex vivo*-Aktivierung von CMKLR1 oder GPR1. GPR1 wies eine tendenziell verringerte Aktivierung durch Serum-Chemerin im HCC auf, die auf eine mögliche Abschwächung des GPR1- $\beta$ -Arrestin 2-Signalwegs hindeutet. Die Rolle von GPR1 ist im HCC jedoch noch nicht geklärt. Ein Nachteil des hier verwendeten Aktivitätsassays ist, dass nur der  $\beta$ -Arrestin 2-Signalweg analysiert werden konnte. Es gibt jedoch Hinweise, dass CMKLR1 und GPR1 über weitere Signalwege kommunizieren können [155, 157]. Diese müssen, um die physiologische Bedeutung von Chemerin zu verstehen, in weiteren Studien untersucht werden.

Neben Chemerin wurde ein weiteres Adipokin, Adiponektin, im Serum der LMCD/K-Tiere untersucht. Dabei war der Adiponektin-Spiegel der NASH-HCC-Tiere im Vergleich zu allen anderen Gruppen deutlich vermindert. In der Literatur wird Adiponektin eine protektive Funktion in Bezug auf die Tumorgenese zugeschrieben [27, 214, 295, 296]. Dementsprechend könnte der niedrige Adiponektin-Spiegel zur Tumorprogression beitragen. Anzumerken ist, dass in dem hier untersuchten Mausmodell die Vergleichsgruppe mit niedrigstem Serum-Adiponektin-Spiegel die höchste Tumorlast aufweist.

Generell konnte in dieser Studie mehrfach eine Diskrepanz zwischen der Expression auf RNA- und Proteinebene beobachtet werden, sowohl bei Chemerin als auch bei CMKLR1. In der Regel ist die mRNA differenziell exprimiert, wohingegen das Protein-Niveau unver-

ändert erscheint. Die darin involvierten Mechanismen sind noch nicht geklärt. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die Synthese oder die Stabilität der mRNA bzw. der Proteine in der NASH-Leber und im HCC beeinflusst werden [297-300].

Abschließend kann also gesagt werden, dass bei den Untersuchungen in diesem Tiermodell in der NASH ein Anstieg der systemischen und hepatischen Chemerin-Expression dokumentiert werden konnte, diese sich jedoch während der Tumorgenese nicht veränderten. Folglich scheint die endogen erhöhte Expression von Chemerin in der NASH keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung des HCCs zu nehmen.

#### **4.2 Chemerin im murinen HCC**

Da die Expression von Chemerin im HCC verringert ist und dies mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert ist [38, 128], sollte der Ansatz verfolgt werden, ob eine hepatische Erhöhung der aktiven Chemerin-Isoform Ch156 zu einer Verringerung der Tumorlast führt. Hierfür wurde ein DEN-induziertes HCC-Mausmodell untersucht, dessen Ch156-Überexpression auf Adeno-assoziierten Viren beruht. Da Chemerin chemoattraktiv auf Immunzellen wirkt [34, 38, 114, 153] und eine positive Korrelation zwischen der Chemerin-Expression und der Immunzellinfiltrierung im HCC beschrieben wurde [38], sollte auch der Einfluss von Ch156 auf die Immunzellrekrutierung untersucht werden. Allerdings deuten die Ergebnisse einer Studie an immungeschwächten Mäusen darauf hin, dass Ch156 auch Immunzell-unabhängig einen Tumor-suppressiven Effekt ausüben kann [128].

Die Haupteckdaten der hier vorliegenden Studie waren, dass die hepatische Überexpression von Ch156 zu einer deutlichen Reduktion der Tumorlast führte. In der Leber ließ sich vermehrt die aktive Isoform Ch156 nachweisen und im Serum stieg die Bioaktivität parallel zum Gesamt-Chemerin-Spiegel an. Allerdings ergab sich weder für CMKLR1, noch für die Expression von Immunzell-spezifischen Genen ein Unterschied zwischen den Ch156-exprimierenden und den Kontroll-Tieren. Die weitestgehend vergleichbare Expression von HCC-assoziierten Genen in den TG beider Gruppen deutet an, dass Ch156 die

Tumorgenese zwar verzögert, im Endeffekt aber keinen Einfluss auf dessen Malignität hat.

Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die Adeno-assoziierte Überexpression der aktiven Chemerin-Isoform Ch156 durch Analyse des Serum-Chemerin-Spiegels verfolgt. Die Überexpression in der Ch156-AAV-Gruppe war bereits eine Woche nach der AAV-Injektion detektierbar und stets höher als in der Kontroll-Gruppe. Bei Versuchsabschluss war sowohl das systemische als auch das hepatische Chemerin-Protein im Schnitt auf das Doppelte der Kontroll-AAV-Gruppe angestiegen. Dabei fand infolge der Ch156-Überexpression keine Veränderung des Körper-, Milz-, Leber- oder Fettdepot-Gewichts statt. Bedingt durch die DEN-Behandlung bildeten alle Mäuse Hepatome aus. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Tumore der Lebern nicht nur quantifiziert, sondern auch entsprechend ihres Durchmessers kategorisiert. Der Großteil der Tumore war kleiner als 1 mm im Durchmesser (Kategorie 1), wobei die E-AAV-Mäuse im Schnitt 44 Tumore dieser Kategorie pro Leber aufwiesen, die Ch156-AAV-Mäuse hingegen nur 26 Tumore. Dieser Unterschied war signifikant. In den weiteren Kategorien K2 bis K5 (K2:  $1 \leq \varnothing < 2$  mm, K3:  $2 \leq \varnothing < 5$  mm, K4:  $5 \leq \varnothing < 10$  mm, K5:  $\varnothing \geq 10$  mm) zeigten ebenfalls stets die Ch156-AAV-Tiere tendenziell weniger Tumore als die E-AAV-Mäuse. Die Gesamtumorzahl pro Leber lag bei den Kontroll-Mäusen im Schnitt bei knapp 80 Tumoren, bei den Ch156-AAV-Mäusen nur bei 53 Tumoren. Dies entsprach einer signifikanten Reduktion der Tumorlast um circa 30 % in der Ch156-AAV-Gruppe. Trotz der unterschiedlich starken Tumorlast, war das Lebergewicht der Tiere der beiden AAV-Gruppen vergleichbar. Dies erklärt sich dadurch, dass der Großteil der differentiellen Tumorlast auf den kleinen Tumoren (K1) beruht, die nur eine geringe Masse haben. Demgegenüber entwickelten Chemerin-defiziente Mäuse in einer Hepa1-6-Xenograft-Studie von Lin *et al.* größere Tumore als die Wildtyp-Kontrollmäuse (WT) und folglich auch hochsignifikant schwerere Lebern [128]. Des Weiteren konnte das Lebergewicht von WT-Tieren durch die Überexpression von Ch156 im Hepa1-6-Xenograft infolge eines geringeren Tumorwachstums reduziert werden [128]. Da jedoch bei diesen Studien keine Bestimmung der Tumoranzahl stattfand, kann hier kein direkter Vergleich gezogen werden. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass Lin *et al.* keine Normalisierung des Lebergewichts auf das Körpergewicht vornahmen. Da in dieser Veröffentlichung weiterhin kein Hinweis auf eine signifikante Veränderung des Körpergewichts gegeben wird, sollte dieses jedoch zwischen den Gruppen vergleichbar sein

und somit den Leber/Körpergewichts-Quotienten nicht beeinflussen. Dies macht einen direkten Vergleich der Lebergewichte und damit der Tumorlast der Mäuse der Studie von Lin *et al.* mit denen dieser Arbeit in einem gewissen Rahmen möglich.

Durch die getrennte Analyse von Tumorgewebe (TG) und angrenzendem Normalgewebe (NG) der beiden AAV-Gruppen konnten gewebsspezifische Unterschiede beobachtet werden. Auf mRNA-Ebene war zwischen NG und TG der Kontroll-AAV-Gruppe keine differenzielle Chemerin-Expression zu verzeichnen. In einer humanen Studie konnten Lin *et al.* hingegen eine Reduktion der Chemerin-mRNA-Expression im TG von 24 HCC-Patienten beobachten [128]. Im humanen ACC (Adrenocorticales Karzinom) ist die Chemerin-mRNA-Expression im Vergleich zum NG ebenfalls verringert und korreliert positiv mit der Proteinexpression [163]. Daten zur Chemerin-mRNA-Expression in NG und TG im murinen HCC sind derzeit nicht veröffentlicht. In der Ch156-AAV-Gruppe war die hepatische Chemerin-mRNA-Expression im NG infolge der Überexpression im Vergleich zu den E-AAV-Tieren höchstsignifikant erhöht. Im TG der Ch156-AAV-Gruppe hingegen lag die Chemerin-mRNA-Expression auf einem Niveau mit dem NG und TG der E-AAV-Gruppe. Im TG scheint daher die Adeno-assoziierte Chemerin-Expression supprimiert zu sein. Dabei könnte die Stabilität der mRNA durch eine veränderte Prozessierung im TG, z. B. durch Verkürzung des Poly-A-Schwanzes, verringert sein. Zudem ist bekannt, dass insbesondere die mRNA-Stabilität von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sehr komplex reguliert ist [297, 298]. Welcher Mechanismus sich dahinter verbirgt, ist jedoch noch nicht geklärt.

Auf Protein-Ebene zeigte sich innerhalb der Kontroll-AAV-Gruppe lediglich eine tendenzielle Erhöhung der Chemerin-Expression im TG im Vergleich zum NG. Relativ gesehen war die Chemerin-Proteinexpression im TG der E-AAV-Gruppe circa 2,5-fach höher als im NG. Dies widerspricht bisherigen Publikationen, die im humanen HCC-Gewebe in der Regel eine geringere Chemerin-Proteinexpression als im parakarzinomatösen NG beschreiben [38, 128]. Zur Chemerin-Proteinexpression im NG und TG muriner HCC-Modelle sind derzeit keine Daten veröffentlicht.

Aufgrund der Ch156-Überexpression zeigten die NG der Ch156-AAV-Gruppe ein höchstsignifikant höheres Chemerin-Protein-Grundniveau als die NG der E-AAV-Gruppe. Die Chemerin-Expression im NG und TG der Ch156-AAV-Gruppe war vergleichbar. Auf Protein-Ebene ist also der supprimierende Effekt, der auf mRNA-Ebene beobachtet werden

konnte, aufgehoben. Möglicherweise spielt hier die Verzögerung des Chemerin-Proteinabbaus im TG eine Rolle [301]. Wie genau die Stabilität der mRNA und die Translation ineinandergreifen ist jedoch noch nicht genau verstanden [298].

Die Überexpression von Ch156 war weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene mit einer Veränderung der CMKLR1-Expression assoziiert. Dennoch wurde in den TG beider AAV-Gruppen weniger CMKLR1-Protein exprimiert als in den NG. Damit übereinstimmend zeigen die von *Medicalgenomics* frei zur Verfügung gestellten Microarray-Daten in 14 von 18 untersuchten hepatischen Zelllinien, darunter HepG2, HUH7 und Hep3B, eine reduzierte CMKLR1-mRNA-Expression im Vergleich zum Kontroll-Lebergewebe von 19 Spendern [302]. Da dieses Kontroll-Lebergewebe jedoch nicht ausschließlich Hepatozyten, sondern unter anderem auch Sternzellen und Kupfferzellen enthält, die ebenfalls CMKLR1 exprimieren, könnten diese das Ergebnis des Microarrays beeinflussen. Auf Protein-Ebene hingegen wurden von Wanniger *et al.* in HUH7 und Hep3B höhere CMKLR1-Niveaus als in primären nicht-transformierten Hepatozyten nachgewiesen [149]. Derzeit sind die Daten zur CMKLR1-Expression divergent und daher kann noch kein abschließendes Fazit zur CMKLR1-Expression im HCC-Gewebe gezogen werden.

Die Chemerin-Bioaktivität im Serum erhöhte sich in beiden Vergleichsgruppen parallel zum Gesamt-Chemerin-Spiegel. Dies deutet darauf hin, dass die hepatisch überexprimierte Isoform Ch156 ins Serum sekretiert wird und dort auch aktiv ist. Wie bereits erwähnt liegt der Nachteil dieses Bioaktivitäts-Assays darin, dass nur der  $\beta$ -Arrestin 2-Signalweg analysiert werden kann.

Die primär im HCC-Gewebe beider AAV-Gruppen vorkommende Isoform ist Ch155. Diese Isoform ist biologisch aktiv und wird ausschließlich endogen durch die Spaltung von Prochemerin Ch162 durch Cathepsin G gebildet [112]. Diese Isoform kann nicht aus Ch156 gebildet werden. Interessanterweise war inaktives Ch153, das durch die Spaltung mittels Chymase aus Ch156 entsteht [112], etwas häufiger in der Ch156-AAV-Gruppe detektierbar als in der E-AAV-Gruppe. Das überexprimierte Ch156 scheint also über diesen Weg inaktiviert zu werden. Obwohl Ch156 auch endogen aus der Spaltung von Ch162 mittels Elastase [112] hervorgehen kann, wurde diese Isoform ausschließlich in der Ch156-AAV-

Gruppe detektiert. Dies spricht dafür, dass Ch156 – unabhängig von seiner Überexpression – im HCC schnell abgebaut wird und daher möglicherweise keine oder nur kurzzeitig eine Wirkung ausüben kann. Dies wäre auch ein möglicher Erklärungsansatz, weshalb in der Ch156-AAV-Gruppe trotz der höheren Chemerin-Proteinexpression keine vermehrte NK- und Immunzell-Rekrutierung nachgewiesen werden konnte. Damit übereinstimmend konnten Lin *et al.* in einer HCC-Studie ebenfalls keine vermehrte NK-Zell-Rekrutierung durch Chemerin beobachten [38].

Hierbei ist anzumerken, dass durch *in vivo*-Studien bewiesen werden konnte, dass Ch156 unabhängig von seiner chemotaktischen Aktivität bezüglich der Immunzellen einen Tumor-protectiven Effekt ausüben kann [128, 163]. Dabei wirkt Ch156 direkt auf die Tumorzellen und die HCC-assoziierten Endothelzellen, indem es deren NF- $\kappa$ B-Aktivierung (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) inhibiert [128]. Dies resultiert in einer Verringerung der Tumor-Infiltration mit Tumor-assoziierten Makrophagen und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*), die wegen ihrer immun-suppressiven Aktivität gegenüber T-Zellen die Tumorgenese fördern. Auf diese Weise führt Ch156 zu einer verstärkten Immunantwort von Interferon- $\gamma^+$  (IFN $\gamma^+$ ) T-Zellen, die eine anti-tumorale Wirkung ausüben, sowie zu einer verringerten Angiogenese [128]. Es ist also durchaus möglich, dass das Adeno-viral überexprimierte Ch156 im hier untersuchten HCC-Modell auch ohne eine vermehrte Immunzellrekrutierung einen anti-tumoralen Effekt ausüben kann.

Bei der Analyse der Sternzellaktivierung, die einen Hinweis auf die Schädigung des Lebergewebes gibt, konnte in den TG eine gesteigerte Expression von  $\alpha$ SMA beobachtet werden. Des Weiteren war das Kollagen Col4a3 im TG stärker exprimiert, während TGF $\beta$  nicht signifikant erhöht war. Die Ch156-Überexpression nahm dabei keinen Einfluss auf deren Expression und somit moduliert Ch156 weder den Grad der Entzündung noch die Fibrosierung des Gewebes. Döcke *et al.* fanden in der humanen NAFLD eine Assoziation zwischen der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression und dem Fibrosegrad sowie der Entzündung der Leber [132]. Da jedoch die Daten zur Chemerin-Expression in der NAFLD divergent sind [110, 113, 129-132] und sich von denen des HCCs mitunter stark unterscheiden, ist hier nur schwer eine Bewertung möglich.

Gene, die das Zellwachstum, die Proliferation und die Tumorgenese beeinflussen, waren häufig im TG im Vergleich zum NG differenziell exprimiert. So wirken Slc12a1 [231] und Spink1 [232, 233] Tumor-fördernd und sind im TG erhöht exprimiert. Egr1 war ebenfalls im TG stärker exprimiert und kann gewebsspezifisch sowohl Tumor-suppressiv [234, 235] als auch Tumor-fördernd [236] wirken. G6PC war im TG niedriger exprimiert, was eine stärkere Regulierung des Zellzyklus nach sich ziehen kann [237]. Daher hat G6PC im DEN-Mausmodell wohl eine Tumor-suppressive Wirkung. Der Tumorsuppressor Ccng2 [239, 240] hingegen zeigte keine differenzielle Expression. Dennoch sind die hier beschriebenen Expressionsänderungen ausschließlich auf das NG und TG beschränkt, wohingegen die Ch156-Überexpression keines der hier beschriebenen Gene für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese beeinflusst.

Im hier untersuchten HCC-Mausmodell mit hepatischer Ch156-Überexpression war die endogene Fettsäuresynthese (SREBP1c, SCD1, FAS) und ein Großteil der im Cholesterin-metabolismus involvierten Gene (LDLR, PGC1 $\alpha$ , SREBP2, SND1, Cav-1) weder im Vergleich von NG zu TG, noch im Vergleich zu den E-AAV-Geweben differenziell exprimiert. Demgegenüber konnte im humanen HCC eine gesteigerte Expression von SREBP1c [303], SCD1 [289, 290], FAS [289], SND1 [304], und Caveolin-1 [305] nachgewiesen werden.

Eine Ausnahme bezüglich der Regulation der hier untersuchten Gene stellten die HMG-CoA-Reduktase sowie das Apolipoprotein ApoA1 dar. Aufgrund der Induktion der HMG-CoA-Reduktase-Expression im TG kann davon ausgegangen werden, dass in den TG beider AAV-Gruppen eine verstärkte Cholesterinsynthese stattfindet. Dabei schien die Ch156-Überexpression nochmals verstärkend auf die HMG-CoA-Reduktase-Expression einzuwirken. Des Weiteren war die ApoA1-Expression in den TG beider AAV-Gruppen reduziert. Folglich könnte der reverse Cholesterin-Transport des Tumorgewebes zur Leber eingeschränkt sein, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das Cholesterin in den Zellen verbleibt. Dort kann es für die Proliferation und die Bildung neuer Membranen verwendet werden. ApoA1 ist auch im Serum von HCC-Patienten verringert, wobei hier eine Assoziation mit deren Prognose beschrieben wurde [306].

In einer von Yokoyama *et al.* untersuchten HCC-Kohorte war ApoA1 in der Leber hingegen nicht reguliert [307]. Stattdessen konnte in dieser Studie eine gesteigerte ApoE-Expression in den TG nachgewiesen werden. Da ApoE als Ligand des LDL-Rezeptors fun-

giert und ein Bestandteil der VLDL-Partikel ist, vermuteten Yokoyama *et al.* in der hepatischen ApoE-Akkumulation eine mögliche Ursache der Hepatosteatose und der HCC-Entstehung [307]. Letztlich lassen die Daten dieser und unserer Studie darauf schließen, dass im HCC-Gewebe mehr Cholesterin verbleibt, wenngleich der Mechanismus unterschiedlich ist.

Alox5 ist an der Bildung verschiedener Leukotriene aus Arachidonsäure beteiligt, die eine pro-tumorale Wirkung haben [249]. In der hier vorliegenden HCC-Studie war Alox5, ebenso wie in Hepatomen von Menschen und Ratten [250], im TG stärker exprimiert als im NG. Dabei beeinflusste Ch156 die Expression von Alox5 nicht. Interessanterweise ist Alox5 an der Konversion von Eicosapentaensäure zu Resolvin E1 beteiligt, welches ein Mediator bei der Auflösung von Entzündungen ist [308, 309]. Resolvin E1 ist zudem ein Ligand von CMKLR1 [310]. In der Diät-induzierten NASH zeigte die Injektion von Resolvin E1 keine Wirkung auf die Expression inflammatorischer und pro-fibrotischer Gene [282]. Demgegenüber konnten Kuang *et al.* nachweisen, dass Resolvin E1 bei Concanavalin A-induzierten Hepatomen einen protektiven Effekt hat [311]. Die Analyse der Resolvin E1-Expression im NG und TG könnte demnach einen Hinweis auf die Rolle von Alox5 im HCC geben.

Ein weiteres Gen, das im Lipidmetabolismus eine Rolle spielt, ist Fabp5. Es kann die Aufnahme, den Transport und den Metabolismus von Fettsäuren und die Metastasierung beeinflussen [46, 247, 248]. Übereinstimmend mit der hier induzierten Fabp5-Expression im TG, wurde auch in weiteren Tumorgeweben [47, 49, 52, 312] sowie dem HCC [46] eine gesteigerte Fabp5-Expression beschrieben. Der verstärkende Effekt der Ch156-Überexpression auf die Fabp5-Expression auf RNA-Ebene war auf Protein-Ebene nicht mehr gegeben. In der Literatur wurde bisher weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene ein Zusammenhang zwischen Fabp5 und Chemerin publiziert.

Pnpla5 ist zum einen bei der Bildung von Autophagosomen von Bedeutung [252], zum anderen ist es in den Lipidmetabolismus involviert und inhibiert die Transacetylierung von Enzymen der Fettsäuresynthese [248]. So ist z. B. bei Ratten auf einer isokalorischen Hochfett-Diät die Pnpla5-Expression, und damit einhergehend wohl die Fettsäuresynthe-

se, stark reduziert [248]. In der hier vorliegenden Studie war die Pnpla5-Expression ausschließlich im TG bei gleichzeitiger Ch156-Überexpression erhöht. Im Gegensatz dazu konnten Chen *et al.* in einem DEN-HCC-Modell (unabhängig von der Chemerin-Expression) im TG eine erhöhte Pnpla5-Expression im Vergleich zum NG beobachten, wenngleich diese nicht signifikant war [313].

In Bezug auf die Autophagosomen könnte Pnpla5 eine duale Rolle einnehmen. Die Autophagie kann Tumor-suppressiv wirken, da es durch den Abbau geschädigter Proteine oder Zellorganelle die Stresstoleranz der Zellen erhöht und so zu deren Viabilität beiträgt [314, 315]. Eine eingeschränkte Autophagie wiederum kann im Zelltod, in chronischen Entzündungen oder in genetischer Instabilität resultieren, was die Tumorentstehung begünstigt [316]. Deshalb sollte eine gesteigerte Autophagie gerade in der Tumorprävention eine Rolle spielen [316, 317]. Demgegenüber kann die Autophagie bei bereits transformierten Tumorzellen auch nachteilige Effekte mit sich bringen, da sie bei metabolischem Stress, wie er beispielsweise auch im Rahmen einer Chemotherapie auftritt, auch die Tumorzellen vor dem Altern und dem Zelltod schützt [314, 316]. Hierbei sollte angemerkt werden, dass Li *et al.* in HCC-Zelllinien und primären HCC-Zellen *in vitro* durch IFN $\gamma$  die Autophagie induzieren konnten. Diese trug zur Hemmung des Zellwachstums sowie zum Zelltod der Tumorzellen bei [318]. In Bezug auf die Rolle von Pnpla5 in der Bildung von Autophagosomen und deren duale Bedeutung könnte die erhöhte Pnpla5-Expression also sowohl eine protektive als auch eine schädigende Wirkung haben. Weitere Analysen sind notwendig, um diese Frage zu klären.

Abschließend ist zu sagen, dass die erhöhte hepatische Ch156-Expression in einer deutlichen Reduktion der Tumorlast resultierte, jedoch keine erhöhte Serum-Bioaktivität nach sich zog. Der Einfluss der Immunzellen am protektiven Effekt der Ch156-Überexpression ist nach bisherigem Stand zu vernachlässigen. Möglicherweise übt Ch156 also einen direkten Effekt auf die parenchymalen Zellen aus. Ob die Tumorzellen das vermehrt synthetisierte Cholesterin abgeben oder für die Proliferation und die Bildung neuer Membranen benötigen, muss noch geklärt werden. Ebenso gilt es noch herauszufinden, ob die reduzierte Tumorlast möglicherweise auf einer Steigerung der Autophagie oder einer erhöhten Resolvin E1-Konzentration basiert.

### 4.3 Chemerin im humanen HCC

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von Chemerin und CMKLR1 in der Pathophysiologie des HCCs im Menschen besser zu verstehen. Hierfür wurden zwei HCC-Patienten-Kohorten mit unterschiedlicher Ätiologie näher untersucht: Die Patienten der einen Kohorte hatten ein NASH-assoziiertes HCC, die der anderen ein Hepatitis-assoziiertes HCC. Es sollten mögliche Unterschiede zwischen NG und TG der HCC-Patienten – auch in Bezug zur Ätiologie der Erkrankung – eruiert werden. Die Expressionsunterschiede zwischen der Hepatitis-assoziierten und der NASH-assoziierten HCC-Kohorte sind gering. Dabei hatten beide Kohorten gemein, dass die Chemerin-Expression im HCC-Gewebe erhöht, die CMKLR1-Expression hingegen erniedrigt war. Bezüglich der Chemerin- und CMKLR1-Expression konnten in der Hepatitis-assoziierten HCC-Kohorte deutliche Unterschiede zwischen den NG und TG der drei Untergruppen (HBV, HCV, HBV+HCV) beobachtet werden.

Chemerin war in beiden untersuchten HCC-Kohorten im TG im Vergleich zum parakarzinomatösen NG signifikant erhöht. Sofern sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von Chemerin untersucht wurden, ergab sich für beide Analysen eine erhöhte Chemerinmenge in den HCC-Geweben. Interessanterweise scheint es bezüglich der Chemerin-Expression Unterschiede innerhalb der Hepatitis-assoziierten HCC-Kohorte zu geben. Während die HBV-infizierten HCC-Patienten einen hochsignifikanten Anstieg der Chemerin-Expression im TG zeigten, war bei HCV- sowie HBV+HCV-infizierten Patienten lediglich ein Trend zu sehen. Die Chemerin-Expression in den Normal- und Tumorgeweben der beiden humanen HCC-Kohorten stimmte auch mit den in dieser Arbeit ermittelten murinen Expressionsdaten überein. Demnach war sowohl im NASH-HCC-Modell als auch in der Kontrollgruppe des AAV-Modells die Chemerin-Proteinexpression im HCC-Gewebe tendenziell erhöht. Im Gegensatz dazu stehen Publikationen, die eine verringerte Chemerin-Expression im humanen HCC-Gewebe nachweisen konnten [38, 128]. Lin *et al.* konnten dabei – ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit – übereinstimmende Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene präsentieren [128]. In der zweiten Veröffentlichung, wurde die Chemerin-Expression anhand der Intensität der immunhistologischen Färbung kategorisiert, jedoch nicht über eine weitere Methode, wie z. B. Real-Time RT-PCR oder Immuno-

blot, bestimmt [38]. Momentan kann nicht erklärt werden, warum die Daten bezüglich der Chemerin-Expression im HCC divergieren.

Weiterführend sollten zudem die Chemerin-Isoformen genauer analysiert werden, was mittels Isoform-spezifischer Antikörper [119] für Western Blot oder ELISA, mittels Bioaktivitätsmessungen [121] oder massenspektrometrischer Analysen [119] möglich ist. Diesbezüglich sind keine weiteren Publikationen zur Chemerin-Expression bzw. Aktivität im HCC verfügbar.

CMKLR1 war in beiden humanen HCC-Kohorten (hoch)signifikant im TG im Vergleich zum NG reduziert. Hierbei stellt sich die Frage, ob möglicherweise ein negativer *feedback loop* zwischen der Chemerin- und der CMKLR1-Expression besteht, da sich diese genau gegengleich verhielten. Diesbezüglich konnte in dieser Arbeit gleichwohl gezeigt werden, dass die Isoform Ch156 keinen Einfluss auf die CMKLR1-Proteinmenge hat.

Auch im Hinblick auf die CMKLR1-Expression scheinen innerhalb der Hepatitis-assoziierten HCC-Kohorte Unterschiede zu bestehen. Während die HBV+HCV-HCC-Patienten im TG einen hochsignifikanten Rückgang der CMKLR1-Expression zeigten, war dieser Rückgang bei den HBV-Patienten ebenfalls zu beobachten, jedoch war dieser nicht signifikant. Demgegenüber war bei den HCV-HCC-Patienten keinerlei Expressionsunterschied zwischen NG und TG detektierbar. Erwähnenswert ist hierbei, dass im TG der HCV-HCC-Patienten signifikant weniger CMKLR1 exprimiert wurde als in den TG der anderen beiden Hepatitis-Gruppen und auch das NG nur eine sehr geringe CMKLR1-Expression zeigte. Bei der genaueren Betrachtung der Chemerin- und CMKLR1-Expression innerhalb der HBV- und der HBV+HCV-HCC-Gruppe fällt auch hier auf, dass sich Chemerin und CMKLR1 stets gegengleich verhielten, wohingegen sowohl Chemerin als auch CMKLR1 in NG und TG der HCV-Gruppe unverändert waren. Die Expressionsanalysen deuten also auf einen negativen *feedback loop* von Chemerin und CMKLR1 im humanen HCC hin. Damit übereinstimmend konnten Wittamer *et al.* bereits zeigen, dass in der gesunden Leber eine hohe Chemerin-Expression einer niedrigen CMKLR1-Expression gegenübersteht [114]. Es bleibt zu klären, welche Chemerin-Isoform hieran beteiligt ist. In der Differenzierung der Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 hingegen deuten *in vitro*-Studien auf einen positiven *feedback loop* hin [109, 319].

Da jedoch nicht nur Hepatozyten, sondern auch in der Leber befindliche Immunzellen [143, 152-154] sowie Sternzellen und Kupfferzellen [149] CMKLR1 exprimieren, muss bei den Gewebeanalysen bedacht werden, dass etwaige Expressionsänderungen auch auf diese Zellpopulationen zurück gehen können. Somit würde eine verringerte CMKLR1-Expression auf eine abgeschwächte Immunantwort im Tumorgewebe hinweisen.

Bei der Analyse des Tumorsuppressorgens TP53 konnte sowohl in der NASH-assoziierten HCC-Kohorte als auch in der Hepatitisviren-assoziierten HCC-Kohorte im TG eine signifikant stärkere Expression beobachtet werden. In der HBV/HCV-HCC-Kohorte war der Anstieg vor allem in den Geweben der HBV-infizierten HCC-Patienten zu beobachten, wobei die drei Untergruppen (HBV, HCV, HBV+HCV) untereinander keine signifikanten Unterschiede zeigten. Es ist bekannt, dass Mutationen im TP53-Gen zur Stabilisierung des Proteins führen und dessen Akkumulation im Nukleus nach sich ziehen [39, 320]. Mutationen in diesem Gen sind wiederum mit verschiedenen Tumorarten, darunter auch mit dem HCC, assoziiert [192, 321-324]. Bei der Sequenzanalyse von TP53 in der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte konnten jedoch trotz der hohen TP53-Proteinexpression keine kausalen Sequenzveränderungen entdeckt werden [200]. In verschiedenen Veröffentlichungen zum TP53 schwankt der Anteil der HCC-Patienten mit mutiertem TP53 je nach untersuchter Kohorte zwischen 7 % [325] und 30 % [192]. Dies würde erklären, weshalb bei der relativ geringen Größe der hier untersuchten Kohorte (n = 21) keine Mutationen, sondern lediglich Sequenz-Polymorphismen identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse der TP53-Sequenzierung wurden im August 2016 im Artikel „*Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*“ im Journal *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* veröffentlicht [200].

In ebendiesem Artikel [200] wurden auch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen des Tumoralipidoms publiziert. Lipide wie Cholesterin und Ceramide sind für die Zellproliferation und Viabilität von entscheidender Bedeutung. Obwohl mehrere Studien eine erniedrigte Ceramid-Konzentration in Tumoren nachweisen konnten und dem eine anti-apoptotische Wirkung zukommt [271], wurde dies bisher im HCC nicht untersucht.

Durch die massenspektrometrischen Analysen der Normal- und Tumorgewebe der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte sollten Erkenntnisse zu deren Lipidom gewonnen werden.

Dabei konnte in den TG im Vergleich zu den NG zum einen eine Reduktion der Ceramide und der mehrfach ungesättigten (PUFA) Phospholipide beobachtet werden, zum anderen eine Erhöhung der Cholesterinester (CE) und Sphingomyeline (SM). Zudem konnten bei einigen der Lipidspezies im NG bzw. TG Assoziationen mit dem Tumor-*Staging* nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung der entsprechenden Lipidspezies in der Progression des HCCs schließen lässt [200].

Die Hepatosteatose und Typ-2-Diabetes gelten als Risikofaktoren für die Entstehung eines HCCs [28]. Wie gezeigt werden konnte, waren die im Vergleich zum NG im HCC-veränderten Lipidspezies nicht mit Typ-2-Diabetes assoziiert. Ebenso bestand bei nahezu allen im HCC differenziell vorliegenden Lipiden kein Bezug zur Hepatosteatose. Eine Ausnahme stellte hier PI 38:4 dar, welches ausschließlich im TG der HCC-Patienten mit Fettleber erhöht war. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass weder Typ-2-Diabetes, noch die Hepatosteatose die Lipid-Veränderung im HCC in Relation zum NG maßgeblich beeinflussen [200].

Bei der Analyse der CE konnte insbesondere eine Steigerung der gesättigten (Sat) und einfach ungesättigten (MUFA) CE nachgewiesen werden, wohingegen die mehrfach ungesättigten (PUFA) CE nicht verändert waren [200]. Des Weiteren war freies Cholesterin, das zytotoxisch wirkt [263], nicht verändert. Dies stimmt mit publizierten Daten überein, die einen Anstieg der CE im HCC-Gewebe zeigen konnten [263, 326, 327]. Da Serum-Cholesterin in HCC-Patienten nicht erhöht ist [328], kann davon ausgegangen werden, dass das erhöhte Cholesterin in den Tumorgeweben nicht auf einen gestörten Cholesterin-Efflux, sondern möglicherweise auf eine Erhöhung der Cholesterin-Biosynthese zurückgeht. Diese kann durch den Transkriptionsfaktor SREBP2 induziert werden, der im HCC akkumuliert [327]. Ebenso kann auch eine reduzierte Cholesterin-Exkretion infolge einer gestörten Gallensäuresynthese zur Akkumulation von Cholesterin führen [263]. Welcher Mechanismus hierbei in der untersuchten Kohorte beteiligt ist, ist noch zu klären.

Bei der Analyse der Phospholipide konnte in den TG eine Verschiebung der PC und PE hin zu den gesättigten Spezies beobachtet werden. Zusätzlich waren die PUFA PC-, PI-, PE- und LPC-Spezies vermindert [200]. Eine Reduktion der PUFA PC, PI, PE konnte bereits in

verschiedenen Tumoren, darunter auch im HCC, gezeigt werden [326, 329]. Ebenso sind unter anderem im Colon- und Magenkarzinom sowohl die MUFA PC als auch die SCD1, die deren Synthese katalysiert, erhöht [329]. Im HCC ist SCD1 ebenfalls überexprimiert und fördert die Zellproliferation [289, 290, 330]. In den hier untersuchten TG waren die gesättigten PC und PE erhöht [200], wohingegen Abel *et al.* reduzierte Sat-Spezies im HCC dokumentierten [326]. Übereinstimmend mit dieser Studie konnte eine Reduktion der PUFA Phospholipide im TG beobachtet werden [326, 329]. Tumorzellen zeigen aufgrund ihrer hohen Proliferation eine gesteigerte *de novo* Lipogenese und damit einhergehend eine zunehmende Sättigung der Lipide [331]. Möglicherweise ist also die Reduktion der PUFA Phospholipide eine Folge der erhöhten endogenen Fettsäuresynthese. Die dabei entstehenden gesättigten Lipide in den Membranen der Tumorzellen könnten diese vor dem durch oxidativen Stress induzierten Zelltod schützen [331].

Bei der massenspektrometrischen Analyse der PI-Spezies konnte auch eine Reduktion der Spezies PI 38:4 im TG identifiziert werden [200]. Diese stellt die vorrangige PI-Spezies der Leber dar und seine Verringerung ist im murinen Pankreaskarzinom mit mutiertem TP53 assoziiert [332]. Die dabei im Pankreaskarzinom beobachtete Verschiebung der PI hin zu kurzkettigeren Spezies [332] konnte in den hier untersuchten HCC-Geweben nicht dokumentiert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für den Erhalt der langkettigen PI-Spezies im HCC liegt im TP53. Im Gegensatz zur Studie von Naguib *et al.* [332] konnten, wie zuvor beschrieben, bei der TP53-Sequenzanalyse der NG und TG der HCC-Kohorte keine kausalen Sequenzveränderungen entdeckt werden.

Wie bereits zu Beginn erwähnt, konnte eine Assoziation zwischen den PUFA LPC und dem Tumorstatus der HCC-Patienten dokumentiert werden. Dabei war deren Konzentration in T2- und T3-Tumoren deutlich reduziert [200], was auf eine Rolle der PUFA LPC in der HCC-Progression hindeutet. Da Phospholipide einen wesentlichen Bestandteil der Zellmembran ausmachen [333], könnte sich eine Reduktion der PUFA LPC auch auf Prozesse wie die Proliferation und die Apoptose auswirken und so das Tumorwachstum beeinflussen [334]. So ist beispielsweise für Omega-3 und Omega-6 PUFAs, die mit der Nahrung aufgenommen werden, ein protektiver Effekt bezüglich des HCC-Risikos bereits erwiesen [335, 336].

Eine Reduktion des systemischen LPC wiederum ist mit chronischen Lebererkrankungen assoziiert [264, 337] und auch im humanen HCC konnte bereits eine differenzielle Expression verschiedener LPC-Spezies dokumentiert werden [338]. In der hier untersuchten Kohorte war LPC 22:6 im Tumorgewebe reduziert. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen LPC 22:6 im TG und im Serum dokumentiert werden. Zudem war systemisches LPC 22:6 in Patienten mit Tumorstatus T3 geringer konzentriert als in Patienten mit Tumorstatus T1 [200]. Dies bestätigt Daten von Patterson *et al.*, in welchen das systemische LPC 22:6 in HCC-Patienten im Vergleich zu zirrhotischen Patienten reduziert war [264]. Weitere humane Studien sind nötig, um die LPC-Spezies 22:6 als möglichen HCC-Biomarker zu etablieren.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der Sphingolipide konnte eine Reduktion der Ceramide im TG im Vergleich zum NG beobachtet werden [200]. Tumorzellen sind in der Lage die pro-apoptotisch wirkenden Ceramide zu verringern und dabei Sphingosin-1-Phosphat, das die Proliferation der Zellen fördert, anzureichern [271, 272]. Dies konnte bei verschiedenen Tumorarten bereits beobachtet werden [272, 273], wobei bis jetzt keine Daten zur Ceramid-Konzentration im HCC-Gewebe publiziert wurden. Dennoch deuten *in vivo*- und *in vitro*-Studien darauf hin, dass die Ceramide auch eine Rolle im HCC spielen und deren Verminderung zur Zellproliferation beitragen [339-343]. Die Reduktion der Ceramid-Konzentration im TG basiert also möglicherweise auf der Konversion von Ceramid zu Sphingosin-1-Phosphat, einem Endprodukt des Sphingosinlipid-Katabolismus [271, 272]. Da Sphingosin-1-Phosphat nicht gemessen wurde, kann nur vermutet werden, dass es infolge des verringerten Ceramid-Spiegels erhöht ist. Des Weiteren deuten erhöhte Sphingomyelin-Konzentrationen darauf hin, dass im HCC-Gewebe die Sphingomyelinase-Aktivität [344] eingeschränkt ist und so weniger Ceramid gebildet wird, was ebenfalls zum geringen Ceramid-Spiegel beitragen könnte. Ein weiterer Mechanismus, der von Tumorzellen angewandt wird, um den Ceramid-Spiegel zu senken, ist dessen Konvertierung zum Glukosylceramid durch die Glukosylceramidsynthase (GCS) [345, 346]. In vielen Tumorzellen ist die GCS zu deren Schutz überexprimiert [347] und die Inhibition der GCS führt im HCC-Mausmodell zu einer höheren Effektivität der Sorafenib-Behandlung [345]. Im HCC-Gewebe der hier untersuchten Kohorte scheint die GCS-Expression keinen Einfluss zu nehmen, da die Hexosylceramid-Konzentrationen nicht verändert waren [200].

Obwohl die Ceramid-Konzentration innerhalb der Tumorgewebe verschiedener *Staging*-Stufen nicht verändert war, konnte ein Anstieg der Ceramide in den NG der Patienten mit Tumorstatus T3 beobachtet werden [200]. Diesbezüglich ist bekannt, dass Hepatozyten Ceramid-angereicherte Vesikel zur Rekrutierung von Makrophagen freisetzen können [276]. Des Weiteren ist beschrieben, dass die Tumor-assoziierten myeloiden Zellen mit unkontrolliertem Tumorwachstum und einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert sind [278]. Folglich könnte eine höhere Ceramid-Konzentration im Tumor-umliegenden Gewebe zur Rekrutierung von Makrophagen beitragen. Um alternativ aktivierte Makrophagen nachzuweisen, wird häufig CD163 herangezogen, das auch von Tumor-assoziierten Makrophagen exprimiert wird [277, 278]. Interessanterweise konnte eine positive Korrelation zwischen der CD163-Proteinexpression und der Ceramid-Konzentration in den NG der HCC-Patienten nachgewiesen werden [200]. Dies spricht für eine duale Funktion der Ceramide in der Pathogenese des HCCs. Dabei könnten geringe Ceramid-Konzentrationen in den Tumorzellen diese vor der Apoptose schützen, wohingegen höhere Ceramid-Konzentrationen im Tumor-umliegenden Gewebe anti-inflammatorisch-wirkende Makrophagen rekrutieren könnten und somit das Tumorstadium fördern würden.

Des Weiteren waren die systemischen Ceramid-Spezies d18:1/16:0 und d18:1/24:1 erhöht und zeigten eine positive Korrelation mit den Ceramiden in den NG der HCC-Patienten [200]. In einer Studie, in der zirrhotische und nicht-zirrhotische HCC-Patienten verglichen wurden, konnte ebenfalls eine Induktion des systemischen Ceramid d18:1/16:0 beobachtet werden, wohingegen systemisches Ceramid d18:1/24:1 unverändert war [348]. Folglich spiegeln die systemischen Ceramid-Konzentrationen nicht direkt die Konzentrationen im HCC- oder Normalgewebe wider und scheinen daher nicht als Serum-Marker für die HCC-Prognose geeignet zu sein.

Durch die massenspektrometrischen Analysen konnte also gezeigt werden, dass viele Lipid-Spezies im HCC eine differenzielle Expression zeigen und dadurch das Tumorstadium und das Überleben der Tumorzellen beeinflusst werden kann. Insbesondere die Ceramide scheinen in der Pathogenese des HCCs eine entscheidende Rolle zu spielen und weitere Studien sollten deren Bedeutung für mögliche Therapien erforschen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Adipokins Chemerin und seines Rezeptors CMKLR1 im hepatozellulären Karzinom (HCC) näher zu untersuchen. Chemerin ist ein von Adipozyten und Hepatozyten freigesetztes Protein [109, 110], das durch C-terminale Proteolyse aktiviert wird und als Chemoattraktant für Immunzellen fungiert. Dabei können durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins verschiedene C-terminal verkürzte Isoformen entstehen, wobei Chemerin<sub>156</sub> (Ch<sub>156</sub>) die höchste biologische Aktivität zeigt [112]. Neben seiner Funktion als Chemoattraktant wurden auch Immunzell-unabhängige protektive Effekte von Chemerin beschrieben [38, 128].

Um das NASH-assoziierte HCC im murinen Modellorganismus näher untersuchen zu können, wurde eine LowMethionin-Cholin-defiziente Diät (LMCD-Diät) zur Induktion der NASH sowie das Kanzerogen Diethylnitrosamin (DEN) eingesetzt. Die LMCD-Diät führte zur Hepatosteatose und Fibrose. Dabei war die hepatische Expression von Proteinen für die endogene Fettsäure- und Cholesterinsynthese sowie für den Cholesterin-Efflux reduziert. Zudem war in den Mäusen mit NASH-Leber die endogene hepatische und systemische Chemerin-Proteinexpression induziert, die des Rezeptors CMKLR1 in der Leber hingegen unverändert. All diese Parameter waren nicht durch die DEN-Injektion beeinflusst. Bei der Bestimmung der Chemerin-Bioaktivität im Serum zeigte sich keine Veränderung in der CMKLR1-, jedoch eine tendenziell verringerte GPR1-Aktivierung in den NASH-HCC-Mäusen im Vergleich zu den NASH-Mäusen. Das protektiv wirkende Serum-Adiponektin war ausschließlich in den NASH-HCC-Tieren verringert. Interessanterweise bildete diese Gruppe die meisten Lebertumore aus, wobei auch die DEN-Injektion allein zur Tumorinduktion führte. Bei der vergleichenden Analyse der Chemerin- und CMKLR1-Expression in den Normal- und Tumorgewebe (NG, TG) der Tiere auf LMCD- bzw. Kontroll-Diät deutete sich im TG der NASH-HCC-Mäuse eine gesteigerte Chemerin-Proteinexpression an.

Da sich der Anstieg der systemischen und hepatischen Chemerin-Expression in der NASH und dem NASH-HCC nicht unterschied, scheint die endogen erhöhte Expression von Chemerin in der NASH keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung des HCCs zu haben.

Die Bedeutung der aktiven Isoform Ch<sub>156</sub> wurde in einem DEN-induzierten HCC-Modell mit Adeno-assoziiierter Ch<sub>156</sub>-Überexpression (Ch<sub>156</sub>-AAV, ÜE) näher untersucht. Die

hepatische ÜE von Ch156 resultierte in einer deutlichen Reduktion der Tumorlast um ca. 30 %. Der Serumspiegel von Chemerin war ebenfalls erhöht, wobei dessen Bioaktivität parallel dazu anstieg. Die hepatische CMKLR1-Expression war durch die Ch156-ÜE nicht beeinflusst, diese war jedoch in den TG der Ch156-AAV- und der Kontroll-AAV-infizierten Tiere niedriger als in den NG. In der Leber konnte primär die aktive Isoform Ch155 nachgewiesen werden, das hochaktive Ch156 war hingegen nur selten und ausschließlich in der ÜE-Gruppe zu detektieren. Entzündungs- und NK-Zell-Marker waren durch die Ch156-ÜE nicht reguliert, was einen protektiven Einfluss durch eine veränderte Rekrutierung von Immunzellen ausschließt. In den HCC-Geweben beider AAV-Gruppen fand eine vermehrte Kollagensynthese und Sternzellaktivierung statt und die Expression von Markern für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese war erhöht. Die Expression von Genen für die hepatische Fettsäuresynthese wurde durch die Ch156-ÜE nicht beeinflusst und war in NG und TG vergleichbar. Die Ch156-ÜE führte aber zu einer verstärkten Induktion der HMG-CoA-Reduktase-Expression. Ob von den Tumorzellen vermehrt Cholesterin für die Bildung neuer Membranen synthetisiert wird oder dieses ins Serum abgegeben wird, gilt es noch zu klären. Ebenso muss noch analysiert werden, ob die reduzierte Tumorlast möglicherweise auf einer Steigerung der Autophagie oder einer Erhöhung des anti-inflammatorisch wirkenden Resolvins E1 beruht.

Für die humanen Studien standen zwei HCC-Patienten-Kohorten mit NASH- bzw. Hepatitis-assoziiertem HCC zur Verfügung, welche vergleichend untersucht wurden. Die Chemerin-Expression war in beiden Kohorten in den TG im Vergleich zu den NG induziert, die CMKLR1-Expression hingegen reduziert. Dabei ließ die gegengleiche Regulation von Chemerin und CMKLR1 in beiden HCC-Kohorten auf einen möglichen negativen *feedback loop* im HCC-Gewebe schließen.

Das Tumorstoff TP53 war in beiden Kohorten im HCC-Gewebe stärker exprimiert. In der NASH-assoziierten HCC-Kohorte zeigt das TP53-Gen jedoch keine Mutationen, die eine Akkumulation des Proteins begünstigen würden. In derselben Kohorte wurde das Lipidom genauer untersucht. Dabei waren in den TG die Ceramide und mehrfach ungesättigten Phospholipide reduziert, die Cholesterinester (CE) und Sphingomyeline (SM) erhöht. Insbesondere scheint die Konversion der anti-karzinogen wirkenden Ceramide eine Rolle in der Pathogenese des HCCs zu spielen.

## 6 Anhang

### 6.1 Publikationen und Kongressbeiträge

### 6.2 Publikationen

#### 6.2.1 Erstautorenschaften

**Haberl EM**, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Feder S, Sinal CJ, Buechler C. *Chemerin in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis*. *Anticancer Res*. 2018 May; 38(5):2649-2657.

**Haberl EM**, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Feder S, Eisinger K, Krautbauer S, Sinal CJ, Buechler C. *Ex vivo analysis of serum chemerin activity in murine models of obesity*. *Cytokine*. 2018 Apr;104:42-45. doi: 10.1016/j.cyto.2018.02.004. Epub 2018 Feb 6.

**Meier EM**, Rein-Fischboeck L, Pohl R, Wanninger J, Hoy AJ, Grewal T, Eisinger K, Krautbauer S, Liebisch G, Weiss TS, Buechler C. *Annexin A6 protein is downregulated in human hepatocellular carcinoma*. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jul; 418(1-2):81-90. doi: 10.1007/s11010-016-2735-9. Epub 2016 Jun 23.

**Meier EM**, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Schacherer D, Eisinger K, Wiest R, Krautbauer S, Buechler C. *Circulating lipocalin 2 is neither related to liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease nor to residual liver function in cirrhosis*. *Cytokine*. 2016 Sep; 85:45-50. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.004. Epub 2016 Jun 9.

#### 6.2.2 Koautorenschaften

Eisinger K, Rein-Fischboeck L, Neumeier M, Schmidhofer S, Pohl R, **Haberl EM**, Liebisch G, Kopp A, Schmid A, Krautbauer S, Buechler C. *Alpha-syntrophin deficient mice are protected from adipocyte hypertrophy and ectopic triglyceride deposition in obesity*. *Exp Mol Pathol*. 2018 Apr 24. pii: S0014-4800(17)30607-X. doi: 10.1016/j.yexmp.2018.04.003.

Rein-Fischboeck L, Pohl R, **Haberl EM**, Weiss TS, Buechler C. *The adaptor protein alpha-syntrophin is reduced in human non-alcoholic steatohepatitis but is unchanged in hepatocellular carcinoma*. Exp Mol Pathol. 2017 Sep 19.

Rein-Fischboeck L, Pohl R, **Haberl EM**, Zimny S, Neumann M, Eisinger K, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C. *Tubulin alpha 8 is expressed in hepatic stellate cells and is induced in transformed hepatocytes*. Mol Cell Biochem. 2017 Apr; 428(1-2):161-170. doi: 10.1007/s11010-016-2926-4. Epub 2017 Jan 7.

Krautbauer S, Rein-Fischboeck L, **Haberl EM**, Pohl R, Wiest R, Buechler C. *Circulating fibroblast growth factor 21 in patients with liver cirrhosis*. Clin Exp Med. 2017 Jul 25. doi: 10.1007/s10238-017-0468-z.

Zimny S, Pohl R, Rein-Fischboeck L, **Haberl EM**, Krautbauer S, Weiss TS, Buechler C. *Chemokine (CC-motif) receptor-like 2 mRNA is expressed in hepatic stellate cells and is positively associated with characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in mice and men*. Exp Mol Pathol. 2017 Jun 15;103(1):1-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.06.001.

Pohl R, **Haberl EM**, Rein-Fischboeck L, Zimny S, Neumann M, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, Eisinger K, Weiss TS, Buechler C. *Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis*. Eur J Clin Invest. 2017 Jan;47(1):7 -18. doi: 10.1111/eci.12695. Epub 2016 Nov 21.

Krautbauer S, **Haberl EM**, Eisinger K, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Rentero C, AlvarezGuaita A, Enrich C, Grewal T, Buechler C, Neumeier M. *Annexin A6 regulates adipocyte lipid storage and adiponectin release*. Mol Cell Endocrinol. 2017 Jan 5; 439:419-430. doi: 10.1016/j.mce.2016.09.033. Epub 2016 Oct 1.

Krautbauer S, **Meier EM**, Rein-Fischboeck L, Pohl R, Weiss TS, Sigruener A, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. *Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*. Biochim Biophys Acta. 2016 Nov; 1861(11):1767-1774. doi: 10.1016/j.bbailip.2016.08.014. Epub 2016 Aug 26.

Neumann M, **Meier EM**, Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Aslanidis C, Pohl R, Weiss TS, Buechler C. *Chemokine-Like Receptor 1 mRNA Weakly Correlates with Non-Alcoholic Steatohepatitis Score in Male but Not Female Individuals*. Int J Mol Sci. 2016 Aug 18; 17(8). pii: E1335. doi: 10.3390/ijms17081335.

Eisinger K, Rein-Fischboeck L, Pohl R, **Meier EM**, Krautbauer S, Buechler C. *The adaptor protein alpha-syntrophin regulates adipocyte lipid droplet growth*. Exp Cell Res. 2016 Jul 1; 345(1):100-7. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.020. Epub 2016 May 27.

Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Pohl R, **Meier EM**, Weiss TS, Buechler C. *Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease*. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 13; 467(2):377-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.149. Epub 2015 Sep 30.

Pohl R, Rein-Fischboeck L, **Meier EM**, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. *Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*. Exp Mol Pathol. 2015 Apr; 98(2):295-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.02.005. Epub 2015 Feb 12.

Hebel T, Eisinger K, Neumeier M, Rein-Fischboeck L, Pohl R1, **Meier EM**, Boettcher A, Froehner SC, Adams ME, Liebisch G, Krautbauer S, Buechler C. *Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1*. Biochim Biophys Acta. 2015 May; 1851(5):527-36. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.01.012. Epub 2015 Jan 24

### 6.2.3 Koautorenschaften - Übersichtsartikel

Buechler C, **Haberl EM**, Rein-Fischboeck L, Aslanidis C. *Adipokines in Liver Cirrhosis*. Int J Mol Sci. 2017 Jun 29; 18(7). pii: E1392. doi: 10.3390/ijms18071392.

## 6.3 Kongressbeiträge

### 6.3.1 Vorträge

**Haberl EM, et al.**; *The Role of the Adipokine Chemerin and its receptor CMKLR1 in Hepatocellular Carcinoma*. Summer School of the RiGeL BIOMED Section, Nürnberg, 13.10.-15.10.2016

### 6.3.2 Poster

**Haberl EM, et al.;** *Hepatic tumour burden is reduced by endogenous overexpression of chemerin-157.* 52<sup>nd</sup> EASL International Liver Congress<sup>TM</sup>, Amsterdam, 19.04.-23.04.2017

**Meier EM, et al.;** *Hepatic Chemerin mRNA expression is reduced in human non-alcoholic statohepatitis.* 39th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 0.09.-08.09.2016

**Meier EM, et al.;** *Serum chemerin is not associated with liver steatosis.* 38<sup>th</sup> European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 07.09.-10.09.2015

### 6.4 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Progression der NAFLD zum HCC. ....	2
<b>Abbildung 2:</b> Übersicht der Chemerin-mRNA-Expression des <i>Human Protein Atlas</i> . ....	9
<b>Abbildung 3:</b> Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem und murinem Präprochemerin. ....	11
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht der CMKLR1-Expression des <i>Human Protein Atlas</i> auf mRNA- und Proteinebene. ....	15
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des NASH-HCC-Mausmodells .....	61
<b>Abbildung 6:</b> Gewicht der Leber und des epididymalen Fettgewebes der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	62
<b>Abbildung 7:</b> Bestimmung des Steatosegrads der Lebern der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	64
<b>Abbildung 8:</b> Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	66
<b>Abbildung 9:</b> Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	67
<b>Abbildung 10:</b> Bestimmung des Fibrosegrads der Lebern der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	68
<b>Abbildung 11:</b> Bestimmung des oxidativen Stresses der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	69

<b>Abbildung 12:</b> Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.....	70
<b>Abbildung 13:</b> Quantifizierung und Messung der Bioaktivität von Serum-Chemerin der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.....	71
<b>Abbildung 14:</b> Serum-Adiponektin und Tumoranzahl der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	72
<b>Abbildung 15:</b> Hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1 in NG und TG der DEN-injizierten C3H/HeNRj-Mäuse nach 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	74
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des HCC-Mausmodells. ...	75
<b>Abbildung 17:</b> Körpergewicht und Lebergewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	76
<b>Abbildung 18:</b> Systemischer Chemerin-Spiegel und hepatische Chemerin-Expression der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression..	78
<b>Abbildung 19:</b> Tumorquantifizierung der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	79
<b>Abbildung 20:</b> Hepatische Chemerin-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	80
<b>Abbildung 21:</b> Hepatische CMKLR1-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	81
<b>Abbildung 22:</b> Messung der Bioaktivität von Serum-Chemerin der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	82
<b>Abbildung 23:</b> Massenspektrometrische Isoform-Analyse von Chemerin aus hepatischem Tumorgewebe der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	84
<b>Abbildung 24:</b> Hepatische Expression von Fibrose-Markern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.. ....	87
<b>Abbildung 25:</b> Hepatische Expression von Markern für Zellwachstum, Proliferation und Tumorgenese in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	89
<b>Abbildung 26:</b> Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Genen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	93
<b>Abbildung 27:</b> Hepatische Expression von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	95

<b>Abbildung 28:</b> Hepatische Chemerin- und CMKLR1-Expression in NG und TG der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte.....	98
<b>Abbildung 29:</b> Hepatische Proteinexpression von Chemerin und CMKLR1 in NG und TG der HBV/HCV-HCC-Kohorte. Quantifizierung der Proteinexpression durch densitometrische Vermessung von Immunoblots. ....	99
<b>Abbildung 30:</b> Hepatische TP53-Proteinexpression in NG und TG der Hepatitisviren-freien HCC-Kohorte.....	100
<b>Abbildung 31:</b> Hepatische TP53-Proteinexpression in NG und TG der HBV/HCV-HCC-Kohorte.....	101
<b>Abbildung 32:</b> Quantifizierung der hepatischen Phosphoglyzeride Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Phosphatidylinositol (PI) in NG und TG der HCC-Kohorte.....	108
<b>Abbildung 33:</b> Quantifizierung der hepatischen Phosphatidylethanolamine (PE) und Cholesterinester (CE) in NG und TG der HCC-Kohorte.....	109
<b>Abbildung 34:</b> Quantifizierung des hepatischen Sphingolipids Ceramid (Cer) und des Makrophagenmarkers CD163 der HCC-Kohorte.....	111
<b>Abbildung 35:</b> Quantifizierung des hepatischen Sphingolipids Sphingomyelin (SM) und Bestimmung der Ceramid/SM-Verhältnisse der HCC-Kohorte.. ....	112
<b>Abbildung 36:</b> Assoziation zwischen HCC-assoziierten hepatischen Lipidveränderungen und der Lebersteatose in der HCC-Kohorte. ....	113
<b>Abbildung 37:</b> Assoziationen zwischen HCC-assoziierten Lipid-Veränderungen in Serum und Tumorgewebe der HCC-Kohorte.....	114

## 6.5 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte .....	20
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Kit-Systeme .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Chemikalien .....	23
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete primäre Antikörper.....	28
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete sekundäre Antikörper.....	28
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Primer für die Amplifikation muriner Gene. ....	29
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Primer für die Amplifikation humaner Gene.....	30
<b>Tabelle 9:</b> Primer für die Sequenzierung des TP53-Gens.....	30

---

<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Adeno-assoziierte Viren. ....	31
<b>Tabelle 11:</b> Charakteristika der HCC-Kohorte. ....	32
<b>Tabelle 12:</b> Charakteristika der HBV/HCV-HCC-Kohorte.....	33
<b>Tabelle 13:</b> Kategorisierung der Tumore anhand ihres Durchmessers [mm].....	38
<b>Tabelle 14:</b> Standardansatz für die Taq-Core-PCR. ....	40
<b>Tabelle 15:</b> Taq-Core-PCR-Programm 1. ....	40
<b>Tabelle 16:</b> Taq-Core-PCR-Programm 2. ....	40
<b>Tabelle 17:</b> Standardansatz für die Cycle-Sequencing-PCR. ....	41
<b>Tabelle 18:</b> Cycle-Sequencing-PCR-Programm.....	41
<b>Tabelle 19:</b> RT-PCR-Ansatz für eine Probe bzw. den Standard. ....	44
<b>Tabelle 20:</b> Standardreaktionsansatz der semiquantitativen Real-Time RT-PCR .....	46
<b>Tabelle 21:</b> Real-Time RT-PCR-Programm.....	46
<b>Tabelle 22:</b> Entparaffinierung und absteigende Alkoholreihe zur Rehydratisierung. ....	56
<b>Tabelle 23:</b> Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratisierung. ....	56
<b>Tabelle 24:</b> Körpergewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät.....	62
<b>Tabelle 25:</b> Gewicht der subkutanen Fettdepots der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	63
<b>Tabelle 26:</b> Gewicht der perirenaln Fettdepots der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. ....	63
<b>Tabelle 27:</b> Milzgewicht der C3H/HeNRj-Mäuse nach H <sub>2</sub> O/DEN-Injektion und 16-wöchiger Fütterung der LMCD/K-Diät. Normalisierung des Milzgewichts auf das Körpergewicht....	63
<b>Tabelle 28:</b> Gewichte verschiedener Gewebe der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	77
<b>Tabelle 29:</b> Kategorisierung der Tumore anhand ihres Durchmessers [mm] in fünf Kategorien. ....	78
<b>Tabelle 30:</b> Hepatische Expression von Entzündungsmarkern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression..	85
<b>Tabelle 31:</b> Hepatische Expression von NK-Zell-Markern in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	86
<b>Tabelle 32:</b> Hepatische Ccng2-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	90

<b>Tabelle 33:</b> Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	91
<b>Tabelle 34:</b> Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligter Proteine in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression.....	92
<b>Tabelle 35:</b> Hepatische Cpt1c-Expression in NG und TG der C3H/HeNRj-Mäuse nach DEN-Injektion und Adeno-assoziiertes Ch156-Überexpression. ....	96
<b>Tabelle 36:</b> Sequenzanalyse der kodierenden Exons 2 bis 4 des TP53-Gens einschließlich der Exon/Intron-Übergänge. ....	103
<b>Tabelle 37:</b> Sequenzanalyse des kodierenden Exons 11 des TP53-Gens einschließlich des Exon/Intron-Übergangs. ....	105

## 6.6 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
18S rRNA	18S ribosomale RNA
AAV	Adeno-assoziiertes Virus (Serotyp 8)
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
AFP	Alpha-Fetoprotein
AFP-L3	<i>lens culinaris agglutinin-reactive fraction of AFP</i>
Akt/mTOR	Aktivierte Proteinkinase B / <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
Alox5	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
Apm	Adiponektin
ApoA1	Apolipoprotein A1
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i> [kg/m <sup>2</sup> ]
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	cDNA-Position
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cav-1	Caveolin-1
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
Ccng2	cyclin G2
CCRL2	<i>C-C motif chemokine receptor like 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CE	Cholesterinester
Cer	Ceramid

CEUS	<i>Contrast-enhanced ultrasound</i>
Ch	Chemerin
CMKLR1, ChemR23	<i>Chemokine receptor-like 1</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1a1	Collagen, Typ I, alpha 1
Col4a3	Collagen, Typ IV, alpha 3
CP	<i>crossing point</i>
Cpt1c	<i>carnitine palmitoyltransferase 1c</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Cu	Cuprum, Kupfer
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DC	<i>Dendritic cells</i> , Dendritische Zellen
DCP	Des-γ-Carboxy Prothrombin
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
del	Deletion
DEN	Diethylnitrosamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Empty
EASL	<i>european association for the study of the liver</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	<i>early growth response 1</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
epi	epididymal
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii (lat., und andere)</i>
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FFS	freie Fettsäure
FNB	<i>Fine-Needle Biopsy</i>
FS	Fettsäure
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Gauge
G	Tumor-Grading-Stufe
G/A/T/C	Guanin/Adenin/Thymin/Cytosin
G6PC	<i>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glukosylceramidsynthase
gDNA	Genomische DNA
GLUT4	Glukosetransporter 4
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR1	<i>G protein-coupled receptor 1</i>
GSH	Glutathion
h	Human
h	Stunde
H&E	Hämalaun & Eosin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBV	Hepatitis B-Virus
HBV/HCV	Infektion mit Hepatitisvirus B und / oder C
HBV+HCV	Doppelinfection mit Hepatitisvirus B und C
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> , Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus

HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HDM2	<i>humane Double Minute 2</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merrettichperoxidase)
HSL	Hormon-sensitive Lipase
HTCR	<i>Human Tissue and Cell Research</i>
i. p.	intraperitoneal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
IP3	Inositoltriphosphat
K	Kontrolle
k	Kilo
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
l	Liter
LCAT	Lecitin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LMCD-Diät	LowMethionin Cholin-defiziente Diät
LPC	(PC), Lysophosphatidylcholin (LPC),
Ly49c	<i>killer cell lectin-like receptor</i>
m	Murin
m	Männlich
m	milli
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCD-Diät	Methionin-Cholin-defiziente Diät
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA	Malondialdehyd
MDM2	<i>murine Double Minute 2</i>
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i> , einfach ungesättigte Fettsäuren
n. d.	nicht definiert
n. s.	nicht signifikant
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i> , Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i> , Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ncr1	<i>natural cytotoxicity triggering receptor 1</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NG	Normalgewebe
NK	Natürliche Killerzellen
Nt	Nukleotid
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
P	Patient
p	pico
p. A.	<i>pro analysi</i> (lat., für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PEMT	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase
PGC1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math></i>
PGQFAFS	Prolin-Glycin-Glutamin-Phenylalanin-Alanin-Phenylalanin-Serin
PI	Phosphatidylinositol
P-ID	Patienten-Identifikationsnummer
Pnpla5	<i>patatin-like phospholipase domain containing 5</i>
PR3	Proteinase 3
Pro	Prolin
PS	Phosphatidylserin
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Korrelationskoeffizient
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RARRES2	<i>Retinoic Acid Receptor Responder 2</i>
rev	<i>reverse</i>
RFA	Radiofrequenzablation
RhoA/ROCK	<i>RhoA/rho-associated protein kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
rs	<i>Reference Single Nucleotide Polymorphism</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Svedberg; nicht-metrische Einheit der Sedimentationsrate
s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-Methionin
Sat	<i>saturated fatty acids</i> , gesättigte Fettsäuren
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie
Slc12a1	<i>solute carrier family 12, member 1</i>
SM	Sphingomyelin
SND1	<i>Staphylococcal Nuclease Domain-Containing Protein 1</i>
SOD2	Superoxiddismutase 2
Spink1	<i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
T	Tumor-Staging-Stufe
T2D	Typ-2-Diabetes
TACE	Transarterielle Chemo-Embolisation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TBA	Thiobarbitursäure
TBS	<i>tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®20
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TEV	<i>Tabacco Etch Virus</i>
TG	Tumorgewebe
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TIG2	<i>Tazarotene-induced Gene 2</i>
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNM	Tumor – <u>N</u> odus <u>l</u> ymphoideus, Lymphknoten – <u>M</u> etastasen
TP53, p53	Tumorprotein 53

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
ü. N.	Über Nacht
uni	universe
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i>
w	Weiblich
WT	Wildtyp
YWHAZ	<i>Tyrosine 3/Tryptophan 5 -Monoxygenase Activation Protein, Zeta Polypeptide</i>
α	alpha
α-SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
β	beta
γ	gamma

## 6.7 Literaturverzeichnis

### Journalartikel und Homepages:

1. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. 2(9): p. 533-43.
2. El-Serag, H.B., *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2012. 142(6): p. 1264-1273 e1.
3. Massarweh, N.N. and H.B. El-Serag, *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma*. Cancer Control, 2017. 24(3): p. 1073274817729245.
4. Rahbari, N.N., et al., *Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future*. Ann Surg, 2011. 253(3): p. 453-69.
5. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. 371(9612): p. 569-78.
6. Yu, Z., et al., *Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2013. 8(4): p. e61627.
7. Yu, J., et al., *Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma*. Semin Cancer Biol, 2013. 23(6 Pt B): p. 483-91.
8. Larsson SC, W.A., *Epidemiology of obesity and diabetes: prevalence trends*. In: Mantzoros C, ed. Obesity and diabetes. Boston: Humana Press; 2006: 15- and 36, 2006.
9. Rinella, M.E., *Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review*. JAMA, 2015. 313(22): p. 2263-73.
10. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. CMAJ, 2005. 172(7): p. 899-905.
11. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. 41(6): p. 1313-21.
12. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. 346(16): p. 1221-31.
13. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. 332(6037): p. 1519-23.
14. Preiss, D. and N. Sattar, *Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations*. Clin Sci (Lond), 2008. 115(5): p. 141-50.
15. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference*. Hepatology, 2003. 37(5): p. 1202-19.
16. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. 115(2): p. 209-18.
17. Albanis, E. and S.L. Friedman, *Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy*. Clin Liver Dis, 2001. 5(2): p. 315-34, v-vi.
18. Yasui, K., et al., *Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. 9(5): p. 428-33; quiz e50.
19. Margini, C. and J.F. Dufour, *The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment*. Liver Int, 2016. 36(3): p. 317-24.
20. Baffy, G., E.M. Brunt, and S.H. Caldwell, *Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace*. J Hepatol, 2012. 56(6): p. 1384-91.

21. Schwimmer, J.B., et al., *Heritability of nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2009. 136(5): p. 1585-92.
22. Schaeffler, A., J. Schoelmerich, and C. Buechler, *Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. 2(6): p. 273-80.
23. Gentric, G., et al., *Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2015. 125(3): p. 981-92.
24. Dongiovanni, P., S. Romeo, and L. Valenti, *Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors*. World J Gastroenterol, 2014. 20(36): p. 12945-55.
25. Dalamaga, M., K.N. Diakopoulos, and C.S. Mantzoros, *The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence*. Endocr Rev, 2012. 33(4): p. 547-94.
26. Duan, X.F., et al., *Obesity, adipokines and hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2013. 133(8): p. 1776-83.
27. Sharma, D., et al., *Adiponectin antagonizes the oncogenic actions of leptin in hepatocellular carcinogenesis*. Hepatology, 2010. 52(5): p. 1713-22.
28. Marengo, A., C. Rosso, and E. Bugianesi, *Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis*. Annu Rev Med, 2016. 67: p. 103-17.
29. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome*. Endocrinology, 2007. 148(10): p. 4687-94.
30. Weigert, J., et al., *Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. 72(3): p. 342-8.
31. Bauer, S., et al., *Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes*. Endocrinology, 2011. 152(1): p. 26-35.
32. Sell, H., et al., *Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. 95(6): p. 2892-6.
33. Fernandez-Ranvier, G.G., et al., *Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling*. Arch Surg, 2008. 143(9): p. 841-6; discussion 846.
34. Pachynski, R.K., et al., *The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses*. J Exp Med, 2012. 209(8): p. 1427-35.
35. Segditsas, S., et al., *Putative direct and indirect Wnt targets identified through consistent gene expression changes in APC-mutant intestinal adenomas from humans and mice*. Hum Mol Genet, 2008. 17(24): p. 3864-75.
36. Stamey, T.A., et al., *Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2001. 166(6): p. 2171-7.
37. Zheng, Y., et al., *Downregulation of tazarotene induced gene-2 (TIG2) in skin squamous cell carcinoma*. Eur J Dermatol, 2008. 18(6): p. 638-41.
38. Lin, W., et al., *Reduced Expression of Chemerin is Associated with a Poor Prognosis and a Lowed Infiltration of Both Dendritic Cells and Natural Killer Cells in Human Hepatocellular Carcinoma*. Clin Lab, 2011. 57(11-12): p. 879-885.
39. Zhang, M.F., et al., *Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma*. J Transl Med, 2009. 7: p. 110.
40. Naka, T., et al., *Protein expression of p53, p21WAF1, and Rb as prognostic indicators in patients with surgically treated hepatocellular carcinoma*. Anticancer Res, 1998. 18(1B): p. 555-64.
41. Sung, C.O., et al., *Prognostic significance of p53 overexpression after hepatic resection of hepatocellular carcinoma*. Korean J Gastroenterol, 2005. 45(6): p. 425-30.
42. Hussain, S.P., et al., *TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer*. Oncogene, 2007. 26(15): p. 2166-2176.
43. Meng, X., et al., *MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2014. 74(24): p. 7161-7.
44. Brown, C.J., et al., *Reactivation of p53: from peptides to small molecules*. Trends Pharmacol Sci, 2011. 32(1): p. 53-62.
45. Midgley, C.A. and D.P. Lane, *p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding*. Oncogene, 1997. 15(10): p. 1179-89.
46. Ohata, T., et al., *Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Med, 2017. 6(5): p. 1049-1061.

47. Alshalalfa, M., T.A. Bismar, and R. Alhadj, *Detecting cancer outlier genes with potential rearrangement using gene expression data and biological networks*. Adv Bioinformatics, 2012. 2012: p. 373506.
48. Morgan, E.A., et al., *Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumorigenicity-suppression*. Int J Oncol, 2008. 32(4): p. 767-75.
49. Ogawa, R., et al., *Identification of candidate genes involved in the radiosensitivity of esophageal cancer cells by microarray analysis*. Dis Esophagus, 2008. 21(4): p. 288-97.
50. Kowalewska, M., et al., *Estimation of groin recurrence risk in patients with squamous cell vulvar carcinoma by the assessment of marker gene expression in the lymph nodes*. BMC Cancer, 2012. 12: p. 223.
51. Schug, T.T., et al., *Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(21): p. 7546-51.
52. Levi, L., et al., *Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis*. Cancer Res, 2013. 73(15): p. 4770-80.
53. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1420-8.
54. Zeisberg, M., et al., *Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2007. 282(32): p. 23337-47.
55. Furuta, E., et al., *Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1805(2): p. 141-52.
56. Gibbons, G.F., K. Islam, and R.J. Pease, *Mobilisation of triacylglycerol stores*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1483(1): p. 37-57.
57. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. 1(1): p. 31-9.
58. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. Science, 2010. 327(5961): p. 46-50.
59. Spiegel, S., D. Foster, and R. Kolesnick, *Signal transduction through lipid second messengers*. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(2): p. 159-67.
60. Santos, C.R. and A. Schulze, *Lipid metabolism in cancer*. FEBS J, 2012. 279(15): p. 2610-23.
61. Wymann, M.P. and R. Schneiter, *Lipid signalling in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(2): p. 162-76.
62. Reddy, J.K. and M.S. Rao, *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. 290(5): p. G852-8.
63. Jiang, J., P. Nilsson-Ehle, and N. Xu, *Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism*. Lipids Health Dis, 2006. 5: p. 4.
64. Liebisch, G., et al., *High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(1): p. 121-8.
65. Liebisch, G., et al., *Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. J Lipid Res, 1999. 40(8): p. 1539-46.
66. Gross, J.H., *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, 2012, Springer Spektrum.
67. Singal, A.G., A. Pillai, and J. Tiro, *Early detection, curative treatment, and survival rates for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: a meta-analysis*. PLoS Med, 2014. 11(4): p. e1001624.
68. Beneduce, L., et al., *Improvement of liver cancer detection with simultaneous assessment of circulating levels of free alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-IgM complexes*. Int J Biol Markers, 2004. 19(2): p. 155-9.
69. Tomasi, T.B., Jr., *Structure and function of alpha-fetoprotein*. Annu Rev Med, 1977. 28: p. 453-65.
70. AlSalloom, A.A., *An update of biochemical markers of hepatocellular carcinoma*. Int J Health Sci (Qassim), 2016. 10(1): p. 121-36.
71. Taketa, K., *Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology*. Hepatology, 1990. 12(6): p. 1420-32.
72. Trevisani, F., et al., *Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status*. J Hepatol, 2001. 34(4): p. 570-5.
73. Zhou, H., et al., *Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis*. Eur J Cancer, 2010. 46(6): p. 1056-61.

74. Wong, R.J., A. Ahmed, and R.G. Gish, *Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis - hepatocellular carcinoma and other disorders*. Clin Liver Dis, 2015. 19(2): p. 309-23.
75. Miyakawa, H., et al., *Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C*. Autoimmunity, 2000. 33(1): p. 23-32.
76. Okuda, H., et al., *Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinicopathologic features of solitary hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2000. 88(3): p. 544-9.
77. Yasui, K., et al., *Clinical and pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2012. 42(8): p. 767-73.
78. Volk, M.L., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3*. Cancer Biomark, 2007. 3(2): p. 79-87.
79. Toyoda, H., et al., *Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. 4(1): p. 111-7.
80. Sassa, T., et al., *Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. 11(12): p. 1387-92.
81. Best, J., et al., *The GALAD scoring algorithm based on AFP, AFP-L3, and DCP significantly improves detection of BCLC early stage hepatocellular carcinoma*. Z Gastroenterol, 2016. 54(12): p. 1296-1305.
82. Yamamoto, K., et al., *AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC*. J Gastroenterol, 2010. 45(12): p. 1272-82.
83. Forner, A., et al., *Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. 47(1): p. 97-104.
84. Sangiovanni, A., et al., *The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis*. Gut, 2010. 59(5): p. 638-44.
85. Minami, Y., N. Nishida, and M. Kudo, *Therapeutic response assessment of RFA for HCC: contrast-enhanced US, CT and MRI*. World J Gastroenterol, 2014. 20(15): p. 4160-6.
86. European Association for the Study of the Liver, E.O.f.R.a.T.o.C., *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. 56(4): p. 908-43.
87. Llovet, J.M., C. Bru, and J. Bruix, *Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification*. Semin Liver Dis, 1999. 19(3): p. 329-38.
88. Tang, Z., et al., *Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis*. Chin Med J (Engl), 1999. 112(10): p. 887-91.
89. Figueras, J., et al., *Resection or transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: outcomes based on indicated treatment strategy*. J Am Coll Surg, 2000. 190(5): p. 580-7.
90. Bismuth, H., et al., *Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients*. Ann Surg, 1993. 218(2): p. 145-51.
91. Rossi, S., et al., *Percutaneous radiofrequency interstitial thermal ablation in the treatment of small hepatocellular carcinoma*. Cancer J Sci Am, 1995. 1(1): p. 73-81.
92. Sala, M., et al., *Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2004. 40(6): p. 1352-60.
93. Shiina, S., et al., *Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors*. Am J Gastroenterol, 2012. 107(4): p. 569-77; quiz 578.
94. Franco, D., et al., *Resection of hepatocellular carcinomas. Results in 72 European patients with cirrhosis*. Gastroenterology, 1990. 98(3): p. 733-8.
95. Doyon D, M.A., Jourde AN, Regensberg C, Frileux C., *L'embolisation artérielle hépatique dans les tumeurs malignes du liver*. Ann Radiol, 1974(17:593—603).
96. Breedis C, Y.G., *The blood supply of neoplasm in the liver*. Am J Pathol 1954. 30:969-77
97. Boulin, M., et al., *Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: An old method, now flavor of the day*. Diagn Interv Imaging, 2015. 96(6): p. 607-15.
98. Veltri, A., et al., *Radiofrequency thermal ablation (RFA) after transarterial chemoembolization (TACE) as a combined therapy for unresectable non-early hepatocellular carcinoma (HCC)*. Eur Radiol, 2006. 16(3): p. 661-9.
99. Yamakado, K., et al., *Radiofrequency ablation combined with chemoembolization in hepatocellular carcinoma: treatment response based on tumor size and morphology*. J Vasc Interv Radiol, 2002. 13(12): p. 1225-32.

100. Salem, R., et al., *Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes*. *Gastroenterology*, 2010. 138(1): p. 52-64.
101. Ibrahim, S.M., et al., *Radioembolization for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: a clinical review*. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(11): p. 1664-9.
102. Medicine, U.S.N.L.o. *Efficacy Evaluation of TheraSphere in Patients With Inoperable Liver Cancer (STOP-HCC), NCT01556490*. 2017 [cited 2018 07.03.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01556490?term=NCT01556490&rank=1>.
103. Medicine, U.S.N.L.o. *Efficacy Evaluation of TheraSphere to Treat Inoperable Liver Cancer With Blockage of the Portal Vein (YES-P), NCT01887717*. 2017 [cited 2018 07.03.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01887717>.
104. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. *Hepatology*, 2011. 53(3): p. 1020-2.
105. Chang, Y.S., et al., *Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. 59(5): p. 561-74.
106. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. *N Engl J Med*, 2008. 359(4): p. 378-90.
107. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. *Cancer Res*, 2004. 64(19): p. 7099-109.
108. Nagpal, S., et al., *Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin*. *J Invest Dermatol*, 1997. 109(1): p. 91-5.
109. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. *J Biol Chem*, 2007. 282(38): p. 28175-88.
110. Krautbauer, S., et al., *Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver*. *Exp Mol Pathol*, 2013. 95(2): p. 199-205.
111. Atlas, T.H.P. *RARRES2 RNA and Protein Expression Summary*. 2018 [cited 2018 09.03.2018]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106538-RARRES2/tissue>.
112. Ernst, M.C. and C.J. Sinal, *Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. 21(11): p. 660-7.
113. Rourke, J.L., H.J. Dranse, and C.J. Sinal, *Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease*. *Obes Rev*, 2013. 14(3): p. 245-62.
114. Wittamer, V., et al., *Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids*. *J Exp Med*, 2003. 198(7): p. 977-85.
115. Zabel, B.A., et al., *Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades*. *J Biol Chem*, 2005. 280(41): p. 34661-6.
116. HomoloGene, N. *HomoloGene:2167. Gene conserved in Amniota*. 2018 [cited 2018 12.03.2018]; Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=NP\\_002880.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=NP_002880.1).
117. Schultz, S. and A.G. Beck-Sickinger, *Chemerin and vaspin: possible targets to treat obesity?* *ChemMedChem*, 2013. 8(4): p. 549-59.
118. Wittamer, V., et al., *The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency*. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): p. 9956-62.
119. Chang, S.S., et al., *Chemerin activation in human obesity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2016. 24(7): p. 1522-9.
120. Toulany, J., et al., *CMKLR1 activation ex vivo does not increase proportionally to serum total chemerin in obese humans*. *Endocr Connect*, 2016. 5(6): p. 70-81.
121. Haberl, E.M., et al., *Ex vivo analysis of serum chemerin activity in murine models of obesity*. *Cytokine*, 2018. 104: p. 42-45.
122. Zhao, L., et al., *Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma*. *J Biol Chem*, 2011. 286(45): p. 39520-7.
123. Adrych, K., et al., *Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis*. *Dig Liver Dis*, 2012. 44(5): p. 393-7.
124. Weigert, J., et al., *Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. 16(4): p. 630-7.
125. Yilmaz, Y., et al., *Serum levels of omentin, chemerin and adipsin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2011. 46(1): p. 91-7.

126. Eisinger, K., et al., *Reduced serum chemerin in patients with more severe liver cirrhosis*. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(2): p. 208-13.
127. Imai, K., et al., *Impact of serum chemerin levels on liver functional reserves and platelet counts in patients with hepatocellular carcinoma*. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(7): p. 11294-306.
128. Lin, Y., et al., *Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation*. *Oncogene*, 2017. 36(25): p. 3599-3608.
129. Kajor, M., et al., *Hepatic chemerin mRNA in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Pol J Pathol*, 2017. 68(2): p. 117-127.
130. Pohl, R., et al., *Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis*. *Eur J Clin Invest*, 2017. 47(1): p. 7-18.
131. Deng, Y., et al., *Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis*. *Endocrinology*, 2013. 154(5): p. 1794-801.
132. Doecke, S., et al., *Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease*. *Eur J Endocrinol*, 2013. 169(5): p. 547-57.
133. Roh, S.G., et al., *Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 362(4): p. 1013-8.
134. Ernst, M.C., et al., *Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes*. *Endocrinology*, 2010. 151(5): p. 1998-2007.
135. Lehrke, M., et al., *Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis*. *Eur J Endocrinol*, 2009. 161(2): p. 339-44.
136. Stejskal, D., et al., *Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2008. 152(2): p. 217-21.
137. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(8): p. 3085-8.
138. Kennedy, A.J., et al., *Chemerin Elicits Potent Constrictor Actions via Chemokine-Like Receptor 1 (CMKLR1), not G-Protein-Coupled Receptor 1 (GPR1), in Human and Rat Vasculature*. *J Am Heart Assoc*, 2016. 5(10).
139. Kaur, J., et al., *Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 391(4): p. 1762-8.
140. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(5): p. 2476-85.
141. Yoshimura, T. and J.J. Oppenheim, *Chemerin reveals its chimeric nature*. *J Exp Med*, 2008. 205(10): p. 2187-90.
142. Du, X.Y. and L.L. Leung, *Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. 41(12): p. 973-9.
143. Cash, J.L., et al., *Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23*. *J Exp Med*, 2008. 205(4): p. 767-75.
144. Guillabert, A., et al., *Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation*. *J Leukoc Biol*, 2008. 84(6): p. 1530-8.
145. Banchereau, J., et al., *Dendritic cells as vectors for therapy*. *Cell*, 2001. 106(3): p. 271-4.
146. Atlas, T.H.P. *CMKLR1 RNA and Protein Expression Summary*. 2018 [13.03.2018]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174600-CMKLR1/tissue>.
147. Mognetti, B., et al., *HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates*. *Clin Exp Immunol*, 2000. 119(3): p. 486-92.
148. Martensson, U.E., et al., *Characterization of the human chemerin receptor--ChemR23/CMKLR1--as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains*. *Virology*, 2006. 355(1): p. 6-17.
149. Wanninger, J., et al., *Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 349(2): p. 248-54.
150. Gantz, I., et al., *Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors*. *Cytogenet Cell Genet*, 1996. 74(4): p. 286-90.
151. Owman, C., C. Nilsson, and S.J. Lolait, *Cloning of cDNA encoding a putative chemoattractant receptor*. *Genomics*, 1996. 37(2): p. 187-94.

152. Samson, M., et al., *ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains*. Eur J Immunol, 1998. 28(5): p. 1689-700.
153. Parolini, S., et al., *The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues*. Blood, 2007. 109(9): p. 3625-32.
154. Zabel, B.A., A.M. Silverio, and E.C. Butcher, *Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood*. J Immunol, 2005. 174(1): p. 244-51.
155. De Henau, O., et al., *Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2*. PLoS One, 2016. 11(10): p. e0164179.
156. Bondue, B., V. Wittamer, and M. Parmentier, *Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. 22(5-6): p. 331-8.
157. Rourke, J.L., H.J. Dranse, and C.J. Sinal, *CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway*. Mol Cell Endocrinol, 2015. 417: p. 36-51.
158. Barnea, G., et al., *The genetic design of signaling cascades to record receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(1): p. 64-9.
159. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin*. Sci STKE, 2005. 2005(308): p. cm10.
160. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 3): p. 455-65.
161. Regan-Komito, D., et al., *Absence of the Non-Signalling Chemerin Receptor CCRL2 Exacerbates Acute Inflammatory Responses In Vivo*. Front Immunol, 2017. 8: p. 1621.
162. Zabel, B.A., et al., *Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis*. J Exp Med, 2008. 205(10): p. 2207-20.
163. Liu-Chittenden, Y., et al., *RARRES2 functions as a tumor suppressor by promoting beta-catenin phosphorylation/degradation and inhibiting p38 phosphorylation in adrenocortical carcinoma*. Oncogene, 2017. 36(25): p. 3541-3552.
164. IARC. *International Agency for Research on Cancer, Detection of TP53 mutations by direct sequencing*. Protocol update 2010 15.02.2018]; Available from: [http://p53.iarc.fr/Download/TP53\\_DirectSequencing\\_IARC.pdf](http://p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf).
165. Greene, F.L. and L.H. Sobin, *A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC*. J Surg Oncol, 2009. 99(5): p. 269-72.
166. Strong, L.C., *The Establishment of the C3H Inbred Strain of Mice for the Study of Spontaneous Carcinoma of the Mammary Gland*. Genetics, 1935. 20(6): p. 586-91.
167. Janvier Labs. *Forschungsmodelle - Maus - C3H*. 2018 31.01.2018]; Available from: <https://www.janvier-labs.com/forschungsmodelle/per-arten/inzucht-maeuse/product/c3h.html>.
168. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. Cell, 1999. 99(5): p. 451-4.
169. Heindryckx, F., I. Colle, and H. Van Vlierberghe, *Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research*. Int J Exp Pathol, 2009. 90(4): p. 367-86.
170. Rechache, N.S., et al., *DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. 97(6): p. E1004-13.
171. Argus, M.F. and C. Hoch-Ligeti, *Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines*. J Natl Cancer Inst, 1961. 27: p. 695-709.
172. Schmaehl, D., R. Preussmann, and H. Hamperl, *Leberkrebs erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten*. Naturwissenschaften, 1960. 47.
173. Bakiri, L. and E.F. Wagner, *Mouse models for liver cancer*. Mol Oncol, 2013. 7(2): p. 206-23.
174. Diwan, B.A., et al., *Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL/6Ncr, C3H/HeNcrMTV- and DBA/2Ncr mice*. Carcinogenesis, 1986. 7(2): p. 215-20.
175. Qi, Y., et al., *Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2008. 122(12): p. 2682-8.
176. Takizawa, D., et al., *Constitutive active/androstane receptor promotes hepatocarcinogenesis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis*. Carcinogenesis, 2011. 32(4): p. 576-83.

177. Toriguchi, K., et al., *Attenuation of steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis in mice fed a methionine-choline deficient diet by CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein deficiency*. J Gastroenterol Hepatol, 2014. 29(5): p. 1109-18.
178. Caballero, F., et al., *Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione*. J Biol Chem, 2010. 285(24): p. 18528-36.
179. Jha, P., et al., *Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1842(7): p. 959-70.
180. Kodama, Y., et al., *c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice*. Gastroenterology, 2009. 137(4): p. 1467-1477 e5.
181. Denda, A., et al., *Development of hepatocellular adenomas and carcinomas associated with fibrosis in C57BL/6J male mice given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet*. Jpn J Cancer Res, 2002. 93(2): p. 125-32.
182. Becker, M., et al., *Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels, and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high-fat diet*. Diabetes, 2010. 59(11): p. 2898-903.
183. McCarty, D.M., S.M. Young, Jr., and R.J. Samulski, *Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors*. Annu Rev Genet, 2004. 38: p. 819-45.
184. Deyle, D.R. and D.W. Russell, *Adeno-associated virus vector integration*. Curr Opin Mol Ther, 2009. 11(4): p. 442-7.
185. McClure, C., et al., *Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors*. J Vis Exp, 2011(57): p. e3348.
186. Tenney, R.M., C.L. Bell, and J.M. Wilson, *AAV8 capsid variable regions at the two-fold symmetry axis contribute to high liver transduction by mediating nuclear entry and capsid uncoating*. Virology, 2014. 454-455: p. 227-36.
187. Wooddell, C.I., et al., *Sustained liver-specific transgene expression from the albumin promoter in mice following hydrodynamic plasmid DNA delivery*. J Gene Med, 2008. 10(5): p. 551-63.
188. Wang, X., et al., *AAV-based RNAi silencing of NADPH oxidase gp91(phox) attenuates cold-induced cardiovascular dysfunction*. Hum Gene Ther, 2012. 23(9): p. 1016-26.
189. Hajitou, A., et al., *Design and construction of targeted AAVP vectors for mammalian cell transduction*. Nat Protoc, 2007. 2(3): p. 523-31.
190. Yasuda, M., et al., *AAV8-mediated gene therapy prevents induced biochemical attacks of acute intermittent porphyria and improves neuromotor function*. Mol Ther, 2010. 18(1): p. 17-22.
191. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. 88(3): p. 323-31.
192. Zucman-Rossi, J., et al., *Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma*. Gastroenterology, 2015. 149(5): p. 1226-1239 e4.
193. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
194. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
195. Bhuyan, A.K., *On the mechanism of SDS-induced protein denaturation*. Biopolymers, 2010. 93(2): p. 186-99.
196. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. 9(7): p. 671-5.
197. Grover, R.K., et al., *A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union*. Science, 2014. 343(6171): p. 656-661.
198. Gawel, S., et al., *Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker*. Wiad Lek, 2004. 57(9-10): p. 453-5.
199. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. 11(4): p. 447-55.
200. Krautbauer, S., et al., *Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1861(11): p. 1767-1774.
201. Liebisch, G., et al., *High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1686(1-2): p. 108-17.

202. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. 37(8): p. 911-7.
203. Haberl, E.M., et al., *Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis*. Anticancer Res, 2018. 38(5): p. 2649-2657.
204. Ferre, P. and F. Foufelle, *Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c*. Diabetes Obes Metab, 2010. 12 Suppl 2: p. 83-92.
205. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. 109(9): p. 1125-31.
206. Sampath, H. and J.M. Ntambi, *The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1243: p. 47-53.
207. Katsurada, A., et al., *Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver*. Eur J Biochem, 1990. 190(2): p. 427-33.
208. Frank, P.G., et al., *Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. 295(1): p. C242-8.
209. Fu, Y., et al., *Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells*. J Biol Chem, 2004. 279(14): p. 14140-6.
210. Sanchez-Valle, V., et al., *Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review*. Curr Med Chem, 2012. 19(28): p. 4850-60.
211. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases*. World J Gastroenterol, 2011. 17(23): p. 2801-11.
212. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 257(1): p. 79-83.
213. Speliotes, E.K., et al., *Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study*. Hepatology, 2010. 51(6): p. 1979-87.
214. Man, K., et al., *Suppression of liver tumor growth and metastasis by adiponectin in nude mice through inhibition of tumor angiogenesis and downregulation of Rho kinase/IFN-inducible protein 10/matrix metalloproteinase 9 signaling*. Clin Cancer Res, 2010. 16(3): p. 967-77.
215. Wang, Y., et al., *Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009. 53(2): p. 201-12.
216. Kamada, Y., et al., *Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model*. J Hepatol, 2007. 47(4): p. 556-64.
217. Wieser, V., A.R. Moschen, and H. Tilg, *Adipocytokines and hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2012. 30(5): p. 508-13.
218. Jablonski, K.A., et al., *Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages*. PLoS One, 2015. 10(12): p. e0145342.
219. Leonard, E.J. and T. Yoshimura, *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)*. Immunol Today, 1990. 11(3): p. 97-101.
220. Mehta, K., U. Shahid, and F. Malavasi, *Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions*. FASEB J, 1996. 10(12): p. 1408-17.
221. Robertson, M.J., et al., *Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia*. Exp Hematol, 1996. 24(3): p. 406-15.
222. Bouhrel, M.A., et al., *PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties*. Cell Metab, 2007. 6(2): p. 137-43.
223. Wensveen, F.M., et al., *NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance*. Nat Immunol, 2015. 16(4): p. 376-85.
224. McCullen, M.V., et al., *Analysis of Ly49 gene transcripts in mature NK cells supports a role for the Pro1 element in gene activation, not gene expression*. Genes Immun, 2016. 17(6): p. 349-57.
225. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(5): p. 392-401.
226. Kalluri, R., *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. 16(9): p. 582-98.
227. Moreira, R.K., *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Arch Pathol Lab Med, 2007. 131(11): p. 1728-34.
228. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. 275(4): p. 2247-50.
229. Carpino, G., et al., *Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation*. Dig Liver Dis, 2005. 37(5): p. 349-56.

230. Rubel, D., et al., *Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice*. Matrix Biol, 2014. 34: p. 13-21.
231. Teng, F., et al., *Treatment with an SLC12A1 antagonist inhibits tumorigenesis in a subset of hepatocellular carcinomas*. Oncotarget, 2016. 7(33): p. 53571-53582.
232. Marshall, A., et al., *Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker*. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59459.
233. Räsänen, K., et al., *Emerging Roles of SPINK1 in Cancer*. Clin Chem, 2016. 62(3): p. 449-57.
234. Huang, R.P., et al., *Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation*. Int J Cancer, 1997. 72(1): p. 102-9.
235. Liu, C., et al., *Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1*. Cancer Gene Ther, 1998. 5(1): p. 3-28.
236. Virolle, T., et al., *Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes*. J Biol Chem, 2003. 278(14): p. 11802-10.
237. Guo, T., et al., *Genetic and molecular analyses reveal G6PC as a key element connecting glucose metabolism and cell cycle control in ovarian cancer*. Tumour Biol, 2015. 36(10): p. 7649-58.
238. Mutel, E., et al., *Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas*. J Hepatol, 2011. 54(3): p. 529-37.
239. Zimmermann, M., et al., *Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to doxorubicin*. J Biol Chem, 2012. 287(27): p. 22838-53.
240. Hasegawa, S., et al., *MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2014. 111(8): p. 1572-80.
241. Grundy, S.M., *HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia*. N Engl J Med, 1988. 319(1): p. 24-33.
242. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol*. J Lipid Res, 1984. 25(13): p. 1450-61.
243. Fredenrich, A. and P. Bayer, *Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data*. Diabetes Metab, 2003. 29(3): p. 201-5.
244. Shin, D.J., et al., *PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis*. J Biol Chem, 2003. 278(50): p. 50047-52.
245. Shin, D.J. and T.F. Osborne, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha activation of CYP7A1 during food restriction and diabetes is still inhibited by small heterodimer partner*. J Biol Chem, 2008. 283(22): p. 15089-96.
246. Armengol, S., et al., *SREBP-2-driven transcriptional activation of human SND1 oncogene*. Oncotarget, 2017. 8(64): p. 108181-108194.
247. Hertzfel, A.V. and D.A. Bernlohr, *The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function*. Trends Endocrinol Metab, 2000. 11(5): p. 175-80.
248. Diaz-Rua, R., et al., *Isocaloric high-fat feeding directs hepatic metabolism to handling of nutrient imbalance promoting liver fat deposition*. Int J Obes (Lond), 2016. 40(8): p. 1250-9.
249. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(3): p. 181-93.
250. Xu, X.M., et al., *5-Lipoxygenase contributes to the progression of hepatocellular carcinoma*. Mol Med Rep, 2011. 4(6): p. 1195-200.
251. Kienesberger, P.C., et al., *Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions*. J Lipid Res, 2009. 50 Suppl: p. S63-8.
252. Dupont, N., et al., *Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis*. Curr Biol, 2014. 24(6): p. 609-20.
253. Carracedo, A., L.C. Cantley, and P.P. Pandolfi, *Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight*. Nat Rev Cancer, 2013. 13(4): p. 227-32.
254. Zaugg, K., et al., *Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress*. Genes Dev, 2011. 25(10): p. 1041-51.
255. Ascha, M.S., et al., *The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2010. 51(6): p. 1972-8.
256. Kuerbitz, S.J., et al., *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(16): p. 7491-5.
257. Zhan, P. and Y.N. Ji, *Prognostic significance of TP53 expression for patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis*. Hepatobiliary Surg Nutr, 2014. 3(1): p. 11-7.

258. Bourdon, J.C., et al., *p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity*. *Genes Dev*, 2005. 19(18): p. 2122-37.
259. Eggens, I., et al., *The lipid composition of highly differentiated human hepatomas, with special reference to fatty acids*. *Br J Exp Pathol*, 1988. 69(5): p. 671-83.
260. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes*. *Exp Mol Pathol*, 2014. 97(1): p. 37-43.
261. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice*. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(2): p. 2991-3002.
262. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. *Nature*, 2011. 473(7348): p. 528-31.
263. Lu, M., et al., *A specific cholesterol metabolic pathway is established in a subset of HCCs for tumor growth*. *J Mol Cell Biol*, 2013. 5(6): p. 404-15.
264. Patterson, A.D., et al., *Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling*. *Cancer Res*, 2011. 71(21): p. 6590-600.
265. Tessitore, L., et al., *Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinomas*. *Oncology*, 2003. 65(2): p. 152-8.
266. Pappu, A.S., P. Fatterpaker, and A. Sreenivasan, *Phospholipase A2 of rat liver mitochondria in vitamin E deficiency*. *Biochem J*, 1978. 172(2): p. 349-52.
267. Sülentrop, F., et al., *<sup>31</sup>P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma*. *NMR Biomed*, 2002. 15(1): p. 60-8.
268. Morita, Y., et al., *Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression*. *J Hepatol*, 2013. 59(2): p. 292-9.
269. Vance, J.E. and G. Tasseva, *Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(3): p. 543-54.
270. Akagi, S., et al., *Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protects against cytotoxicity induced by polyunsaturated fatty acids*. *FASEB J*, 2016. 30(5): p. 2027-39.
271. Oskouian, B. and J.D. Saba, *Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. 688: p. 185-205.
272. Pralhada Rao, R., et al., *Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases*. *J Lipids*, 2013. 2013: p. 178910.
273. Selzner, M., et al., *Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer*. *Cancer Res*, 2001. 61(3): p. 1233-40.
274. Riboni, L., et al., *Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors*. *Glia*, 2002. 39(2): p. 105-13.
275. Drobnik, W., et al., *Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients*. *J Lipid Res*, 2003. 44(4): p. 754-61.
276. Kakazu, E., et al., *Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1alpha-dependent manner*. *J Lipid Res*, 2016. 57(2): p. 233-45.
277. Buechler, C., K. Eisinger, and S. Krautbauer, *Diagnostic and prognostic potential of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2013. 12(6): p. 391-402.
278. Wan, S., et al., *Myeloid cells in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2015. 62(4): p. 1304-12.
279. Fekry, B., et al., *CerS6 Is a Novel Transcriptional Target of p53 Protein Activated by Non-genotoxic Stress*. *J Biol Chem*, 2016. 291(32): p. 16586-96.
280. Haberl, E., et al., *Chemerin in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis*. *Anticancer Research*, 2018.
281. Neumann, M., et al., *Chemokine-Like Receptor 1 mRNA Weakly Correlates with Non-Alcoholic Steatohepatitis Score in Male but Not Female Individuals*. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(8).
282. Pohl, R., et al., *Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(2): p. 295-9.
283. Teufel, A., et al., *Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients*. *Gastroenterology*, 2016. 151(3): p. 513-525 e0.
284. Schattenberg, J.M. and P.R. Galle, *Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man*. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 247-54.
285. Matsumoto, M., et al., *An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis*. *Int J Exp Pathol*, 2013. 94(2): p. 93-103.

286. Rizki, G., et al., *Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1*. J Lipid Res, 2006. 47(10): p. 2280-90.
287. Behari, J., et al., *Liver-specific beta-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis*. Am J Pathol, 2010. 176(2): p. 744-53.
288. Li, M., et al., *Caveolin1 protects against diet induced hepatic lipid accumulation in mice*. PLoS One, 2017. 12(6): p. e0178748.
289. Muir, K., et al., *Proteomic and lipidomic signatures of lipid metabolism in NASH-associated hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2013. 73(15): p. 4722-31.
290. Ma, M.K.F., et al., *Stearoyl-CoA desaturase regulates sorafenib resistance via modulation of ER stress-induced differentiation*. J Hepatol, 2017. 67(5): p. 979-990.
291. Anderson, L. and J. Seilhamer, *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. Electrophoresis, 1997. 18(3-4): p. 533-7.
292. de Sousa Abreu, R., et al., *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. Mol Biosyst, 2009. 5(12): p. 1512-26.
293. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. 13(4): p. 227-32.
294. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. 583(24): p. 3966-73.
295. Adolph, T.E., et al., *Adipokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Multiple Interactions*. Int J Mol Sci, 2017. 18(8).
296. Stickel, F. and C. Hellerbrand, *Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for hepatocellular carcinoma: mechanisms and implications*. Gut, 2010. 59(10): p. 1303-7.
297. Benjamin, D. and C. Moroni, *mRNA stability and cancer: an emerging link?* Expert Opin Biol Ther, 2007. 7(10): p. 1515-29.
298. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells*. Microbiol Rev, 1995. 59(3): p. 423-50.
299. Li, M., et al., *Balancing Protein Stability and Activity in Cancer: A New Approach for Identifying Driver Mutations Affecting CBL Ubiquitin Ligase Activation*. Cancer Res, 2016. 76(3): p. 561-71.
300. Wang, B., et al., *The Bcl-2/xL inhibitor ABT-263 increases the stability of Mcl-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells*. Mol Cancer, 2014. 13: p. 98.
301. Seglen, P.O., B. Grinde, and A.E. Solheim, *Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin*. Eur J Biochem, 1979. 95(2): p. 215-25.
302. Teufel, A. 2012 [cited 2018 24.04.2018]; CellMinerHCC revision 1]. Available from: [http://www.medicalgenomics.org/details\\_view\\_limited?gene\\_id=1240](http://www.medicalgenomics.org/details_view_limited?gene_id=1240).
303. Li, C., et al., *SREBP-1 has a prognostic role and contributes to invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma*. Int J Mol Sci, 2014. 15(5): p. 7124-38.
304. Li, S., et al., *LHBs can elevate the expression of MDR1 through HIF-1alpha in patients with CHB infection: a comparative proteomic study*. Oncotarget, 2017. 8(3): p. 4549-4562.
305. Tang, Y., et al., *Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer*. Med Oncol, 2012. 29(2): p. 977-84.
306. Ma, X.L., et al., *Apolipoprotein A1: a novel serum biomarker for predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection*. Oncotarget, 2016. 7(43): p. 70654-70668.
307. Yokoyama, Y., et al., *Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma*. Int J Oncol, 2006. 28(3): p. 625-31.
308. Kilburg-Basnyat, B., et al., *Specialized pro-resolving lipid mediators regulate ozone-induced pulmonary and systemic inflammation*. Toxicol Sci, 2018.
309. Demarquoy, J. and F. Le Borgne, *Biosynthesis, metabolism and function of protectins and resolvins*. Clin. Lipidol., 2014. 9(6): p. 683-693.
310. Ohira, T., et al., *Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis*. J Biol Chem, 2010. 285(5): p. 3451-61.
311. Kuang, H., et al., *Resolvin D1 and E1 alleviate the progress of hepatitis toward liver cancer in long-term concanavalin A-induced mice through inhibition of NF-kappaB activity*. Oncol Rep, 2016. 35(1): p. 307-17.
312. Fang, L.Y., et al., *Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2010. 39(4): p. 342-8.

313. Chen, X., et al., *Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and non-cirrhotic conditions*. *Cancer Sci*, 2015. 106(8): p. 972-81.
314. White, E. and R.S. DiPaola, *The double-edged sword of autophagy modulation in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(17): p. 5308-16.
315. Mathew, R., et al., *Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62*. *Cell*, 2009. 137(6): p. 1062-75.
316. White, E., et al., *Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(2): p. 212-7.
317. Okada, H., et al., *Peretinoin, an acyclic retinoid, suppresses steatohepatitis and tumorigenesis by activating autophagy in mice fed an atherogenic high-fat diet*. *Oncotarget*, 2017. 8(25): p. 39978-39993.
318. Li, P., et al., *Interferon-gamma induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1)*. *Cancer Lett*, 2012. 314(2): p. 213-22.
319. MacDougald, O.A. and C.F. Burant, *The rapidly expanding family of adipokines*. *Cell Metab*, 2007. 6(3): p. 159-61.
320. Fritsche, M., C. Haessler, and G. Brandner, *Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents*. *Oncogene*, 1993. 8(2): p. 307-18.
321. Nasierowska-Guttmejer, A., et al., *p53 protein accumulation and p53 gene mutation in colorectal cancer*. *Pathol Oncol Res*, 2000. 6(4): p. 275-9.
322. Angelopoulou, K., et al., *p53 gene mutation, tumor p53 protein overexpression, and serum p53 autoantibody generation in patients with breast cancer*. *Clin Biochem*, 2000. 33(1): p. 53-62.
323. Ngan, H.Y., et al., *Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer--a study at protein, RNA and DNA levels*. *Genitourin Med*, 1997. 73(1): p. 54-8.
324. Kihana, T., et al., *High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy*. *Jpn J Cancer Res*, 1992. 83(9): p. 978-84.
325. Woo, H.G., et al., *Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2011. 140(3): p. 1063-70.
326. Abel, S., et al., *Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009. 81(5-6): p. 391-9.
327. Calvisi, D.F., et al., *Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2011. 140(3): p. 1071-83.
328. Nezami Ranjbar, M.R., et al., *GC-MS Based Plasma Metabolomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Cohort*. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0127299.
329. Guo, S., et al., *Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging*. *Sci Rep*, 2014. 4: p. 5959.
330. Bansal, S., et al., *Stearoyl-CoA desaturase plays an important role in proliferation and chemoresistance in human hepatocellular carcinoma*. *J Surg Res*, 2014. 186(1): p. 29-38.
331. Rysman, E., et al., *De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation*. *Cancer Res*, 2010. 70(20): p. 8117-26.
332. Naguib, A., et al., *p53 mutations change phosphatidylinositol acyl chain composition*. *Cell Rep*, 2015. 10(1): p. 8-19.
333. Antonny, B., et al., *From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function*. *Trends Cell Biol*, 2015. 25(7): p. 427-36.
334. Baxter, A.A., M.D. Hulett, and I.K. Poon, *The phospholipid code: a key component of dying cell recognition, tumor progression and host-microbe interactions*. *Cell Death Differ*, 2015. 22(12): p. 1893-905.
335. Gao, M., et al., *Fish consumption and n-3 polyunsaturated fatty acids, and risk of hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis*. *Cancer Causes Control*, 2015. 26(3): p. 367-76.
336. Koh, W.P., et al., *Dietary fatty acids and risk of hepatocellular carcinoma in the Singapore Chinese health study*. *Liver Int*, 2016. 36(6): p. 893-901.
337. Zhou, L., et al., *Serum metabolic profiling study of hepatocellular carcinoma infected with hepatitis B or hepatitis C virus by using liquid chromatography-mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2012. 11(11): p. 5433-42.

338. Liu, S.Y., et al., *Human liver tissue metabolic profiling research on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2013. 19(22): p. 3423-32.
339. Imgrund, S., et al., *Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas*. J Biol Chem, 2009. 284(48): p. 33549-60.
340. Riley, R.T., et al., *Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 2001. 109 Suppl 2: p. 301-8.
341. Morales, A., et al., *Hepatocarcinogenesis and ceramide/cholesterol metabolism*. Anticancer Agents Med Chem, 2012. 12(4): p. 364-75.
342. Jiang, S., et al., *C2-ceramide enhances sorafenib-induced caspase-dependent apoptosis via PI3K/AKT/mTOR and Erk signaling pathways in HCC cells*. Appl Microbiol Biotechnol, 2017. 101(4): p. 1535-1546.
343. Liu, M., et al., *C6 ceramide sensitizes the anti-hepatocellular carcinoma (HCC) activity by AZD-8055, a novel mTORC1/2 dual inhibitor*. Tumour Biol, 2016. 37(8): p. 11039-48.
344. Obeid, L.M. and Y.A. Hannun, *Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis*. J Cell Biochem, 1995. 58(2): p. 191-8.
345. Stefanovic, M., et al., *Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2016. 7(7): p. 8253-67.
346. Ponnusamy, S., et al., *Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance*. Future Oncol, 2010. 6(10): p. 1603-24.
347. Liu, Y.Y., R.A. Hill, and Y.T. Li, *Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance*. Adv Cancer Res, 2013. 117: p. 59-89.
348. Grammatikos, G., et al., *Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16-ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2016. 7(14): p. 18095-105.

## 6.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Christa Büchler bedanken. Du hast mich in den gut dreieinhalb Jahren meiner Doktorarbeit stets unterstützt, motiviert und hervorragend betreut. Ganz besonderes möchte ich dir für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dein stetes Engagement uns Doktoranden gegenüber danken.

Meinem ersten Mentor, Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm, danke ich ganz herzlich für die hilfreichen Besprechungen sowie für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen und das Amt des Zweitprüfers in meinem Kolloquium zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Betreuung meiner Doktorarbeit als zweiter Mentor und die Übernahme des Amtes des Drittprüfers. Vielen Dank für deine Hilfe bei Problemen und auch dafür, dass du mir es ermöglicht hast, Sequenzierungsarbeiten bei euch im Labor durchzuführen.

Neben den beiden Mentoren möchte ich auch Herrn Dr. Wolfgang Mages meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für deine Hilfsbereitschaft!

Herrn Prof. Dr. Thomas Weiß danke ich für die Bereitstellung der humanen HCC-Proben.

Bei Frau Dr. Sabrina Krautbauer und Herrn Dr. Gerhard Liebisch möchte ich mich für die massenspektrometrischen Analysen der Lipide danken.

Frau Dr. Astrid Bruckmann danke ich für die Durchführung der Protein-Massenspektrometrie und für ihre Hilfe bei der Interpretation der Daten.

Ganz herzlich möchte ich meinen Freundinnen und Kolleginnen Lisa und Becky danken, mit denen ich jeden Tag im Labor zusammenarbeiten durfte. Vielen Dank für eure tatkräftige Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die manchmal notwendigen aufmunternden Worte, die tolle Arbeitsatmosphäre und vor allem die unglaublich lustige Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Wir waren und sind ein unschlagbar gutes Team und mussten so einiges durchstehen, was uns zusammengeschweißt hat.

Und das wichtigste ist: Am Ende haben wir es geschafft!

Frau Dr. Pohl, Frau Dr. Rein-Fischböck, vielen Dank!

Insbesondere möchte ich auch Susi und Gani für die schöne gemeinsame Zeit danken. Ich wünsch' euch beiden viel Erfolg! Und auch wenn die Promotion manchmal anstrengend und nervenaufreibend ist, ihr schafft das!

Auch bei meinen beiden ehemaligen Kolleginnen Dr. Sabrina Krautbauer und Dr. Kristina Eisinger möchte ich mich bedanken. Ihr habt durch euer Wissen und eure Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich seit dem ersten Tag meiner Promotion unterstützt. Bei Sabrina bedanke ich mich ganz herzlich dafür, dass sie auch noch als „externer“ Postdoc bis zum letzten Tag meiner Promotion stets für meine Fragen offen war. Danke für deine vielen guten Ratschläge und Anregungen und auch für deine Freundschaft.

Mein Dank geht auch an alle anderen Kollegen außerhalb der Arbeitsgruppe: an Madlen Melzer, Hubert Stangl, Antoaneta Toncheva, Bettina Federhofer, Tanja Späth, und an alle anderen Mitarbeiter der AG Straub, AG Kabesch und AG Treeck sowie an Barbara Tille von der Klinischen Chemie. Vielen Dank für die vielen netten Gespräche, das gute Miteinander und die schöne Zeit!

Ganz besonders möchte ich meinen Freunden danken, die immer ein offenes Ohr für mich haben, mit denen ich wahnsinnig viel Spaß habe und bestimmt noch viel Tolles erleben darf.

Meiner Familie gilt ein ganz herzlicher Dank. Mama und Papa, Vroni und Martin, Michi und Lisa sowie meinen Schwiegereltern Agnes und Bernhard, meinen Schwagern und Schwägerinnen Matthias und Markus, Michael und Steffi sowie Theresa und Naveen.

Ihr gebt mir stets Rückhalt, unterstützt mich in all meinen Vorhaben und schafft es, mich zum Lachen zu bringen. Insbesondere meinen Eltern, die mir schon immer mit Rat und Tat zur Seite stehen und die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich bin, möchte ich besonders danken.

Christian, mein Ehemann, mit dir an meiner Seite weiß ich, dass wir alles schaffen können. Wir haben schon viel erreicht und auch die weiteren auf uns wartenden Herausforderungen werden wir gemeinsam meistern! Vielen Dank dafür, dass ich mich immer auf dich verlassen kann und dass wir gemeinsam glücklich sind. ♥