

# **Die Rolle von Chemerin in Leberzellen und dem hepatozellulären Karzinom**

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

vorgelegt von

**Susanne Feder**

aus  
Erlangen

im Jahr  
2020

# **Die Rolle von Chemerin in Leberzellen und dem hepatozellulären Karzinom**

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

vorgelegt von

**Susanne Feder**

aus  
Erlangen

im Jahr  
2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

14.02.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Unterschrift:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	8
1.1.2 Diagnose und Behandlung .....	9
1.1.3 Pathogenese .....	11
<b>1.2 Chemerin.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Entdeckung, Expressionsorte und Rezeptoren.....	13
1.2.2 Physiologische und pathologische Wirkungen.....	14
1.2.3 Prozessierung.....	16
1.2.4 Chemerin im HCC und anderen Krebserkrankungen .....	19
1.2.4.1 Chemerin und Krebs.....	20
1.2.4.2 Chemerin im HCC .....	22
<b>1.3 Ziel dieser Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	27
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Puffer .....	28
2.1.4 Angefertigte Medien, Puffer und Lösungen.....	30
2.1.4.1 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung.....	30
2.1.4.2 Lösungen und Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
2.1.4.3 Lösungen und Puffer für Western Blot .....	32
2.1.4.4 TAE-Puffer (50x) für die Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.1.4.5 Medien für die Kultur von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) und Zelllinien .....	33
2.1.5 Assay-Kits.....	34
2.1.6 Antikörper.....	36
2.1.6.1 Primäre Antikörper.....	36
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper .....	37

<b>2.1.7 RNA, Oligonukleotide und Plasmide .....</b>	<b>37</b>
2.1.7.1 RNA.....	37
2.1.7.2 Plasmid .....	37
2.1.7.3 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Klonierungsexperimente.....	37
2.1.7.4 Sequenzierprimer .....	38
2.1.7.5 Primer für semi-quantitative Real-Time-PCRs .....	39
<b>2.1.8 Restriktionsendonukleasen .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.9 Zellen und Organismen.....</b>	<b>40</b>
2.1.9.1 Zelllinien .....	40
2.1.9.2 Primäre Zellen .....	40
2.1.9.3 Kompetente <i>E. coli</i> .....	40
<b>2.1.10 Humane Seren.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.11 Software und Online-Tools .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.1 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
2.2.1.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien .....	45
2.2.1.2 Transfektion von Zelllinien mit rekombinanten Plasmiden .....	46
2.2.1.3 Abnahme und Aufbereitung des Zellkulturüberstands von Zelllinien .....	46
2.2.1.4 Stimulation von Makrophagen mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6-Zellen.....	47
2.2.1.5 Stimulation von PBMCs mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen .....	47
2.2.1.6 Zytotoxizitäts-Assay.....	47
2.2.1.7 MTT-Assay zur Messung der Zellviabilität.....	48
2.2.1.8 Bestimmung der Proliferation von Zelllinien anhand der Zellzahl.....	48
2.2.1.9 Migrations-Assay .....	48
<b>2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.2.2.1 Klonierung in Genexpressionsvektoren .....	49
2.2.2.2 RNA-Isolierung.....	53
2.2.2.3 Semi-quantitative Real-Time-PCR .....	54
<b>2.2.3 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>55</b>
2.2.3.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen .....	55
2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Gesamtprotein.....	55
2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	55
2.2.3.4 Western Blot zur Protein-Detektion .....	56

2.2.3.5 Coomassie-Färbung eines Western Blots .....	57
2.2.3.6 Immunpräzipitation von Chemerin .....	57
2.2.3.7 ELISA .....	58
2.2.3.8 Zytokin-Array.....	58
2.2.3.9 Massenspektrometrische Analyse von Lipiden im Lysat von Zelllinien .....	58
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1.1 Klonierung der Chemerin-Isoformen.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1.2 Expression von Chemerin in Hepatom-Zelllinien nach Transfektion mit rekombinanten Plasmiden .....</b>	<b>61</b>
3.1.2.1 Evaluation der Spezifität von Chemerin-Antikörpern.....	61
3.1.2.2 Vergleich der Protein-Expressionen von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien.....	63
3.1.2.3 Vergleich der mRNA-Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien.....	66
<b>3.1.3 Zytotoxizität von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.4 Regulation der Proliferation und Zellviabilität von Hepatom-Zelllinien durch rekombinante Chemerin-Isoformen .....</b>	<b>70</b>
3.1.4.1 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellviabilität von Hepatom-Zelllinien .....	70
3.1.4.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellproliferation von Hepatom-Zelllinien ..	71
<b>3.1.5 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Migration von Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1.6 Einfluss der Überexpression von Chemerin-Isoformen auf Schlüsselproteine .....</b>	<b>80</b>
3.1.6.1 Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen.....	80
3.1.6.2 Aktivierung von Stat3 durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen.....	81
3.1.6.3 Aktivierung von ERK 1/2 durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen.....	83
3.1.6.4 Aktivierung von p38 MAPK durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen .....	85
3.1.6.5 Aktivierung von AKT durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen.....	86
<b>3.1.7 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Tumormarker AFP in Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1.8 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Lipidmetabolismus von Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2 Regulation der Sekretion von Zytokinen in Leberzellen und Immunzellen durch Chemerin-Isoformen .....</b>	<b>92</b>
<b>3.2.1 Auswirkungen der Expression von Chemerin-Isoformen auf das Zytokin-Profil von Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>92</b>

<b>3.2.2 Stimulation von Immunzellen mit dem Zellkulturüberstand Chemerin-exprimierender Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>98</b>
<b>3.2.3 Analyse von durch Chemerin regulierten Zytokinen in Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>104</b>
3.2.3.1 CCL2.....	104
3.2.3.2 CCL20.....	105
3.2.3.3 IL-8.....	105
3.2.3.4 Osteopontin.....	107
3.2.3.5 TNF.....	108
<b>3.2.4 Analyse von durch Chemerin regulierten Zytokinen im Zellkulturüberstand von Immunzellen .....</b>	<b>109</b>
3.2.4.1 CCL2.....	109
3.2.4.2 CCL20.....	110
3.2.4.3 IL-6.....	111
3.2.4.4 IL-8.....	112
3.2.4.5 Osteopontin.....	113
3.2.4.6 TNF.....	114
<b>3.3 Chemerin im humanen HCC im Vergleich zum kolorektalen Karzinom mit Lebermetastasen .....</b>	<b>116</b>
3.3.1 Chemerin in HCC- und CRC-Patienten in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und BMI .....	116
3.3.2 Chemerin und die Tumormarker carcinoembryonic antigen (CEA) und cancer antigen 19-9 (CA19-9) in HCC- und CRC-Patienten .....	117
3.3.3 Chemerin in Abhängigkeit von Komorbiditäten bei HCC- und CRC-Patienten .....	118
3.3.4 Korrelation von Chemerin mit der Leberfunktion von HCC- und CRC-Patienten .....	122
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>125</b>
<b>4.1 Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>125</b>
<b>4.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf Zellprozesse von Hepatom-Zelllinien .....</b>	<b>127</b>
4.2.1 Zytotoxische Aktivität von Chemerin-Isoformen .....	127
4.2.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellproliferation .....	127
4.2.3 Chemerin-Isoformen in der Migration.....	129
4.2.4 Chemerin und die Aktivierung von NF-κB, Stat3, ERK 1/2, p38 MAPK und AKT .....	130

4.2.5 Assoziation von Chemerin mit dem HCC-Tumormarker AFP .....	131
4.2.6 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Lipidmetabolismus.....	131
4.2.7 Schlussfolgerung: Chemerin-Isoformen in Leberzellen .....	133
<b>4.3 Chemerin-Isoformen beeinflussen die Zytokin-Sekretion von Leberzellen und Immunzellen .....</b>	<b>134</b>
<b>4.4 Chemerin im HCC und in CRC-Lebermetastasen.....</b>	<b>140</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>142</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>146</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>9 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>165</b>
10.1 Publikationen .....	165
10.2 Kongressbeiträge .....	167
10.3 Stipendium .....	167



# 1 Einleitung

## 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Krebserkrankungen der Leber stellen laut World Health Organization die vierthäufigsten Krebserkrankungen mit 8,2 % aller krebsbedingten Todesfälle und mit 840.000 neuen Fällen (im Jahr 2018) dar [157, 182]. Unter allen Leberkrebs-Formen ist das hepatozelluläre Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) die am weitesten verbreitete primäre Krebserkrankung [57, 137]: sie macht etwa 90 % der gesamten primären Lebertumoren aus und die Prognose ist meist schlecht [39, 141, 157]. HCC kommt 2,4-mal häufiger bei Männern als bei Frauen vor [10] und wird bei Patienten eines durchschnittlichen Alters von 55 - 65 Jahren diagnostiziert [167].

Im südlich der Sahara liegenden Teil Afrikas und in Ostasien kommt HCC mit einer Prävalenz von 20 von 100.000 Personen besonders oft vor [124]. Dagegen liegt die Häufigkeit in den USA und in West-Europa bei nur 1,8 - 5 von 100.000 Fällen [157]. Es erkranken jedoch immer mehr Menschen an HCC, da dessen Hauptrisikofaktoren immer öfter auftreten [10, 17].

Als Hauptrisikofaktor für eine Erkrankung an HCC gilt die Leberzirrhose, die wiederum meist durch eine virale Hepatitis (Hepatitis C oder Hepatitis B) oder Alkoholmissbrauch verursacht wird [10, 124]. 44 % der HCC-Erkrankungen werden durch eine Hepatitis-B-Virus-Infektion hervorgerufen, 21 % der Fälle durch das Hepatitis-C-Virus und 26 % durch übermäßigen Alkoholkonsum [9].

Weitere Risikofaktoren für HCC sind die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) als Vorerkrankung, Aflatoxin-Exposition und -Aufnahme, Diabetes mellitus, Adipositas, Tabakkonsum und verschiedene genetische Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Wilson [9, 124, 159, 167]. Die durch einen ungesunden Lebensstil (Alkoholkonsum, Tabakkonsum, Fettleibigkeit) verursachten HCC-Fälle kommen in reichen Regionen wie Westeuropa und Nordamerika häufiger vor als die durch virale Infektionen bedingten HCC-Erkrankungen [9]. Wogegen in Asien die meisten HCC-Erkrankungen viralen Ursprungs sind [9]. Es wurde vorausgesagt, dass HCC-Erkrankungen in Zukunft weiter zunehmen werden, da HCV-Infektionen, NASH und Adi-

positas immer öfter auftreten werden [5]. Antiviral wirksame Medikamente ermöglichen jedoch seit kurzer Zeit eine hocheffektive Therapie. Dies könne langfristig die HCC-Inzidenz deutlich vermindern [183].

Die meisten HCC-Erkrankungen könnten vermieden werden, indem durch Impfung, antivirale Behandlungen, sichere Bluttransfusionen und Injektionen, als auch durch Maßnahmen, die den Alkoholkonsum und die Fettsucht präventiv verringern, aktiv dagegen vorgegangen wird [4].

### **1.1.2 Diagnose und Behandlung**

Wie bei allen Krebserkrankungen ist auch beim HCC die Früherkennung besonders wichtig um die bestmögliche Behandlung zu gewährleisten [10]. Leider werden die meisten Diagnosen allerdings erst bei einem fortgeschrittenen Stadium gestellt, sodass nicht mehr alle Behandlungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden können. Regelmäßiges Screening bei Zirrhose-Patienten könnte die Anzahl der Fälle, bei denen HCC früh erkannt wird, steigern. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten, die ein regelmäßiges Screening bekommen, eine geringere Sterberate nach HCC-Diagnose haben [10, 170, 196]. Laut Leitlinie wird empfohlen, dass Patienten mit Leberzirrhose, chronischer Hepatitis B oder Fettleberhepatitis Früherkennungsmaßnahmen wahrnehmen sollen [130]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei über 50 %, wenn HCC früh diagnostiziert wird, während sie nur bei 0 - 10 % liegt, wenn zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Symptome vorhanden sind [115].

Für die Diagnose wird meist eine Ultraschalluntersuchung herangezogen [157]. Die Bestimmung der Konzentration des HCC-Tumormarkers  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) im Blut wird ebenfalls zur Diagnose verwendet, allerdings gilt dieser als wenig sensitiv und wenig spezifisch [167]. Auch einige andere potentielle Tumormarker sind nicht spezifisch genug für die Früherkennung von HCC [157]. Zur präzisen Diagnosestellung wird derzeit die Kombination aus der AFP-Bestimmung im Serum und einer Ultraschalluntersuchung empfohlen [156].

Bei der Feststellung einer HCC-Erkrankung erfolgt ein Staging, das Auskunft über den Fortschritt und die Behandlungsmöglichkeiten gibt. Es gibt drei klinische und vier pathologische

Staging-Systeme, von denen jedoch bisher keines weltweit anerkannt ist [24]. Eines davon ist das Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System, welches häufig in klinischen Studien angewandt wird. Es bezieht das Stadium des Tumors, die vorhandene Leberfunktion, den Allgemeinzustand und krebsbedingte Symptome in die Beurteilung mit ein [10, 25]. Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten empfiehlt die Tumor-Node-Metastasis-(TNM)-Klassifikation, die das Stadium der Erkrankung anhand der Größe des Tumors, des Lymphknotenbefalls und einer eventuellen Fernmetastasierung beurteilt [23].

Abhängig vom Vorhandensein von Zirrhose, von der Tumorgröße und -lokalisierung und der verbleibenden Leberfunktion stehen folgende Behandlungen zu Verfügung: die Resektion, die bei Patienten, die keine Zirrhose haben, und auch abhängig von der Tumorgröße bevorzugt durchgeführt wird [6, 10]. Die Lebertransplantation wird bei dekompensierter Zirrhose herangezogen. Eine Lebertransplantation und die Resektion sind bisher die einzigen kurativen Behandlungen unter den operativen Eingriffen [10]. Als palliative Behandlung gilt die transarterielle Chemoembolisation, bei der chemotherapeutische Substanzen über zum Tumor führende Arterien verabreicht werden können und anschließend die Blockierung dieser Arterien durchgeführt wird [10, 114]. Des Weiteren stehen als palliative Behandlungen die transarterielle Bestrahlung, Radiofrequenzablation, perkutane Ethanol-Injektionstherapie und Mikrowellenablation zur Verfügung [10].

Innerhalb der letzten Jahre wurden mehrere Medikamente zur systemischen Behandlung von HCC zugelassen. Bei fortgeschrittenem HCC, das nicht mittels Resektion oder Lebertransplantation behandelt werden kann, kommt der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib als Erstlinientherapie zum Einsatz, wodurch die Lebenszeit der Patienten um knapp 3 Monate verlängert werden kann [33, 116]. Das Medikament Lenvatinib hat eine ähnliche Wirkung wie Sorafenib und ist in den USA und der EU ebenfalls als Erstlinientherapie zugelassen [108, 173]. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Regorafenib wurde 2017 in den USA als Zweitlinientherapie zugelassen, und zwar bei Patienten, bei denen Sorafenib keine Wirkung zeigte [108, 134]. Cabozantinib, ebenfalls ein Tyrosinkinase-Inhibitor, befindet sich derzeit in einer Phase-III-Studie und wird für die Zulassung für die Zweit-/Drittlinientherapie in Betracht gezogen.

Zwei verschiedene Immuntherapien (Nivolumab und Pembrolizumab), die beide als programmed cell death protein-1-Inhibitoren wirken, werden derzeit in klinischen Studien für die Behandlung von HCC getestet [108]. In einer Phase-II-Studie wurde das onkolytische Vi-

rus JX-594 bei nicht resektablem HCC getestet [22]. Derzeit läuft zudem eine Studie mit einer Kombination dieses Virus und Sorafenib bei fortgeschrittenem HCC [163].

### 1.1.3 Pathogenese

Die meisten HCC-Erkrankungen (80 - 90 %) entstehen aus einer Leberzirrhose, die, wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, verschiedene Ursachen haben kann, wie Virusinfektion, Alkoholkonsum, Fettleibigkeit oder die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) [39]. Die NAFLD beschreibt verschiedene Lebererkrankungen. Das erste Stadium ist die Steatose, bei der sich Triglyzeride in den Leberzellen ansammeln. Die Steatose kann zur NASH voranschreiten. Diese ist durch Leberschädigung, Entzündung der Leber und Fibrose charakterisiert. Aus der NASH kann wiederum eine Leberzirrhose entstehen. Bei dieser werden Hepatozyten durch Narbengewebe ersetzt. Auf dem Boden einer Leberzirrhose kann sich ein HCC entwickeln [34]. Allerdings können auch NAFLD-Patienten, die keine Leberzirrhose haben, an einem HCC erkranken [51].

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der HCC-Pathogenese gibt es zahlreiche Studien. Wie bei vielen Krebserkrankungen können der Entwicklung von HCC genetische Mutationen zugrunde liegen. Bei HCC wurde eine Reihe an Mutationen nachgewiesen, welche zur Karzinogenese beitragen. Beispielsweise wurde eine Mutation im Promoter des Telomerase-Gens telomerase reverse transcriptase (TERT) als kritisch für die Entstehung eines HCC erachtet. Die Telomerase erhält im normalen Zustand die Telomere und verhindert dadurch letztendlich die Initiation der Apoptose. Durch die Mutation kommt es zu einer Aktivitätssteigerung der Telomerase. Dadurch können sich die Zellen unbegrenzt teilen, so dass Tumore entstehen [29, 39, 68, 79].

Neben der TERT-Mutation wurden innerhalb von Studien in bis zu 50 % der HCC-Patienten Mutationen im TP53-Gen gefunden [39], die z. B. durch eine HBV-Infektion hervorgerufen werden können [80]. Die Inaktivierung dieses Gens durch Mutation kann weitere onkogene Signalwege auslösen [39].

Generell ist bekannt, dass genetische Mutationen durch die Infektion mit HBV und HCV entstehen können, und zwar Mangels Proofreading der viralen DNA-Polymerase von HBV mit

Reverser-Transkriptase-(RT)-Aktivität bzw. dem Verursachen von Doppelstrangbrüchen durch Inhibierung von Reparaturmechanismen durch HCV [39, 119]. Auch die Integrierung des HBV-Genoms in das Wirtsgenom führt zur Zerstörung von Genen, zur Änderung der DNA-Kopienzahl, zur viral gesteuerten Transkription oder zur Fusion von viralen und humanen Genen [87]. Auch epigenetische Veränderungen, micro-RNAs und weitere RNA-Varianten tragen zur Karzinogenese von HCC bei [39, 75, 86].

Veränderungen von verschiedenen wichtigen Signalwegen für Zelldifferenzierung, Proliferation, Angiogenese und Tumorgenese sind auch an der Karzinogenese und Entstehung von HCC beteiligt. Die am WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligten Gene weisen in bis zu 50 % der HCCs Mutationen auf, genauso wie der phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)-Signalweg und der Ras/extracellulär signal regulated kinase (ERK)-Signalweg [39]. Letzterer wird durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib supprimiert [111].

Im HCC wurden außerdem Immunevasionsmechanismen entdeckt. In Tumoren wurden regulatorische T-Zellen gefunden, die die Effektor T-Zellen unterdrücken und so die Krebszellen vom Immunsystem verschont bleiben [199].

Die pathologischen Mechanismen der Karzinogenese von HCC sind stark von der Ätiologie der Erkrankung abhängig [39]. Die Entstehung von HCC ist ein mehrstufiger Verlauf an dem verschiedene zelluläre Prozesse beteiligt sind [75].

## 1.2 Chemerin

### 1.2.1 Entdeckung, Expressionsorte und Rezeptoren

Chemerin (auch bekannt als retinoic acid receptor responder 2, RARRES2) ist ein Adipokin, das vor über 20 Jahren im Kontext der Entzündung bei Psoriasis als tazarotene-induced gene-2 (TIG-2) entdeckt wurde [43, 126]. Es wird in frühen Läsionen der psoriatischen Haut exprimiert und in der chronisch erkrankten Haut herunterreguliert. Durch Tazaroten-Behandlung (ein synthetisches Retinoid zur Therapie der Psoriasis) wird Chemerin induziert [126]. Chemerin wurde außerdem in Pankreas, Milz, Prostata, Eierstöcken, Plazenta, Dünndarm und Dickdarm gefunden [59, 126]. Besonders hohe Expressionen wurden in der Leber und im weißen Fettgewebe nachgewiesen [19, 59].

Die Effekte von Chemerin werden über die Bindung an seine Rezeptoren vermittelt. Im Jahr 2003 wurde Chemerin als Ligand des G-Protein gekoppelten Rezeptors chemokine-like receptor 1 (CMKLR1, auch bekannt als ChemR23) identifiziert [122]. CMKLR1 wird von dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert [136, 149]. Dieser Rezeptor galt dadurch als spezifisch für Antigen-präsentierende Zellen [149]. In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass Chemerin chemotaktisch auf dendritische Zellen und Makrophagen wirkt [171, 180, 193]. Die Bindung von Chemerin an CMKLR1 führt zur Kalzium-Mobilisierung. Durch diese Bindung werden beispielsweise der PI3K-Signalweg und die Proteine ERK 1/2, AKT und p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) aktiviert [12, 18, 73, 90]. Später wurde bekannt, dass CMKLR1 auch von Hepatom-Zelllinien, Adipozyten, glatten Muskelzellen, Chondrozyten und Endothelzellen exprimiert wird [12, 19, 92, 93, 107, 142].

G protein-coupled receptor 1 (GPR1) ist ebenfalls ein Rezeptor für Chemerin und eng verwandt mit CMKLR1. Auch bei der Aktivierung dieses Rezeptors wurde eine Kalzium-Mobilisierung und Phosphorylierung von ERK 1/2 nachgewiesen, jedoch deutlich schwächer als bei CMKLR1 [11, 73, 164]. Die Expressionsorte von GPR1 ähneln denen von CMKLR1 [73]. Über die Wirkungsweisen der Bindung von Chemerin and GPR1 ist noch nicht viel bekannt [146, 147].

Auch C-C chemokine receptor-like 2 (CCRL2) wurde als Chemerin-Rezeptor identifiziert. Dieser Rezeptor wird wie CMKLR1 von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert [73, 123]. Die Bindung von Chemerin an CCLR2 führt jedoch nicht zur Kalzium-Mobilisierung [73, 190]. Es wird vermutet, dass Chemerin mit seinem N-Terminus an CCRL2 bindet, sodass der C-Terminus an Chemerin-Rezeptoren, die von benachbarten Zellen präsentiert werden, binden kann. Somit erhöht CCRL2 die lokale Konzentration von Chemerin im Gewebe [191].

### **1.2.2 Physiologische und pathologische Wirkungen**

Chemerin ist ein multifunktionales Protein, das abhängig von der Erkrankung, in die es involviert ist, positive oder negative Auswirkungen haben kann. Die Mechanismen von Chemerin sind jedoch nicht vollständig geklärt. In der Literatur besteht Konsens darüber, dass Chemerin in der Adipositas und häufig mit ihr verbundenen Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom, Diabetes Typ 2 (T2D) und dem Bluthochdruck eine Rolle spielt [121]. Auch in kardiovaskulären Erkrankungen und insbesondere der Tumorgenese wurden Effekte von Chemerin beschrieben [54, 58, 72, 93, 164].

Chemerin wird im Fettgewebe hoch exprimiert und wird daher der Familie der Adipokine zugeordnet [19]. Adipokine sind als Gruppe verschiedenartiger Moleküle definiert, welche hauptsächlich vom Fettgewebe sezerniert werden [104]. Sie umfasst Hormone, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Substanzen, extrazelluläre Matrixproteine und Zytokine [168]. Chemerin wird vom Fettgewebe sezerniert und reguliert dort die Adipogenese und den Metabolismus von Adipozyten [59]. Daher werden Chemerin sowohl autokrine als auch parakrine Funktionen im weißen Fettgewebe zugeschrieben [50]. Auch der Rezeptor CMKLR1 und einige der Proteasen zur Prozessierung von Chemerin werden dort exprimiert, was die Vermutung nahe legt, dass Chemerin dort eine bedeutende Rolle spielt [19, 50, 59, 144].

Systemisches Chemerin war bei adipösen Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht [32, 151]. Es korrelierte außerdem positiv mit Body-Mass-Index (BMI), Blutzucker, Insulin, Triglyzeriden und Cholesterin. Zudem wurde eine negative Korrelation mit high-density lipoprotein-(HDL)-Cholesterin gezeigt [21, 106]. Zusammenhänge von Chemerin mit dem metabolischen Syndrom (abdominelles Übergewicht, Bluthochdruck, Fettstoffwechsel-

störung, Insulinresistenz) und der Adipositas wurden publiziert [19, 60]. Chemerin wurde zudem als unabhängiger Marker für das metabolische Syndrom vorgeschlagen [158]. *In vitro* wurde ebenfalls eine hohe Expression von Chemerin und CMKLR1 in humanen und murinen Adipozyten beschrieben [59]. In einem Adipositas-Mausmodell wurde jedoch gezeigt, dass zwar die Konzentration von Chemerin im Serum erhöht war, jedoch war dadurch die biologische Aktivität von Chemerin nicht entsprechend verstärkt. Es wurde auch keine erhöhte Aktivierung von CMKLR1 gemessen [62].

Die Chemerin-Konzentration im Blut wird nach sportlicher Betätigung vermindert, aber auch nach einer Diät oder nach chirurgischen Eingriffen, die der Fettleibigkeit entgegenwirken, wie z. B. eine Magenverkleinerung [58, 135, 140, 151]. Eine niedrig kalorische Diät für lediglich 60 h führte zu einer Verminderung der Chemerin-Konzentrationen bei gesunden jungen männlichen Probanden [169]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass CMKLR1-Knockout-Mäuse eine geringere Nahrungsaufnahme, vermindertes Körpergewicht und einen geringeren Körperfettanteil aufwiesen [49].

Ob Chemerin in der NAFLD erhöht ist, wurde letztendlich noch nicht geklärt. Da diese Patienten oft am metabolischen Syndrom erkrankt sind und zudem einen erhöhten BMI aufweisen, ist dies schwer zu differenzieren. Während Chemerin in NAFLD-Patienten einiger Studien erhöht war, konnte dies in anderen Studien nicht gezeigt werden [26]. Ähnlich diskrepant ist die Datenlage bezüglich der hepatischen Chemerin-Expression in der NASH. Hier wurden erhöhte, normale und verringerte Werte beschrieben [26]. Allerdings ist Serum-Chemerin in Patienten mit Leberzirrhose vermindert [78]. In einer Patientenstudie wurde nachgewiesen, dass Chemerin mit den Stadien der Leberzirrhose, die mit dem Child-Pugh-Score ermittelt wurden, negativ korreliert [46].

Es wurde bereits erwähnt, dass Chemerin in verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen erhöht ist [144]. Auch bei der Adipositas besteht eine leichte chronische Entzündung im Fettgewebe [27, 50, 178, 184]. Die NASH ist ebenfalls charakterisiert durch die Entzündung der Leber, die sich zur Fibrose entwickeln kann [26]. Die Beteiligung von Chemerin im Entzündungsprozess wurde vielfach untersucht [50].

Wie schon in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, lockt Chemerin unter verschiedenen Bedingungen bestimmte Immunzellen an. Systemisches Chemerin steht in einem positiven Zusammenhang mit den Entzündungsmarkern C-reactive protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6), Tumornek-



rosefaktor (TNF), Resistin und Leptin [106, 177]. Die Chemerin-Level sind bei Patienten mit HCV höher als bei nicht-infizierten Kontrollgruppen [98] und in der Psoriasis hochreguliert [128].

Dagegen wurden auch Hinweise für eine anti-inflammatorische Aktivität von Chemerin gefunden. Beispielsweise inhibierte Chemerin inflammatorische Zytokine wie TNF, Interleukin 1 $\beta$ , IL-6, Interleukin 12 und chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), die von Makrophagen sezerniert wurden [31]. Chemerin erzielte in einem Mausmodell für akute Lungenentzündung, die durch die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöst wurde, eine anti-inflammatorische Wirkung. Dort wurde eine geringere Infiltration von Neutrophilen und eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen beobachtet [118].

Für die Einnahme der Rolle von Chemerin als Vermittler von pro- und anti-inflammatorischen Effekten wurden zwei Hypothesen von Rourke et al. aufgestellt. Zum einen wird Chemerin als Immunmodulator verstanden, der je nach Umstand und Situation ein immunverstärkendes oder -supprimierendes Milieu veranlasst. Zum anderen nehmen die verschiedenen Isoformen von Chemerin unterschiedliche Funktionen in der Immunantwort ein [145].

### 1.2.3 Prozessierung

In den ersten massenspektrometrischen Analysen von Chemerin wurde festgestellt, dass das 163 Aminosäuren (AS) lange Vorläufer-Protein sowohl am N- als auch am C-Terminus geschnitten wird [122]. Das von Meder et al. detektierte, sich im Serum befindliche Chemerin umfasste insgesamt nur noch 134 AS. Es wurde gezeigt, dass die ersten 20 AS am N-Terminus vom ursprünglichen Genprodukt abgespalten werden, welche sich als hydrophobes Signalpeptid herausstellten. Dieses Signalpeptid wird abgetrennt, bevor das nun entstandene Prochemerin (Chemerin-163) von der Zelle sezerniert wird [41].

Meder et al. fanden außerdem heraus, dass am C-Terminus 9 AS abgespalten wurden, so dass Chemerin-154 entstand. (Bei der üblichen Bezeichnung werden die 20 N-terminalen AS nicht subtrahiert, obwohl diese fehlen.) Diese Form von Chemerin hat ein Molekulargewicht

von 15,6 kDa [122]. Das sezernierte Prochemerin (163 AS) hat ein Molekulargewicht von 18 kDa [180].

Die Forschergruppe um Wittamer et al. entdeckte mittels Massenspektrometrie ein 137 AS langes Protein (Chemerin-157) mit einem Molekulargewicht von 15,9 kDa [180]. Sie fand außerdem heraus, dass die verschiedenen Formen unterschiedlich aktiv sind: die am C-Terminus geschnittene und damit aktivierte Form ist etwa 100-mal biologisch aktiver als Prochemerin [19, 180]. Die Aktivität dieser und weiterer Isoformen wurde mit Hilfe der Untersuchung der Kalzium-Mobilisierung nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor CMKLR1 ermittelt [180].

Synthetische Chemerin-Peptide, die den letzten neun AS von Chemerin-156 [153] bzw. Chemerin-157 [181] ähneln, scheinen ähnlich zu wirken wie deren natürliche Äquivalente [31]. Das legt die Vermutung nahe, dass der C-Terminus des Proteins für die Funktion von Chemerin ausschlaggebend ist [50]. Die C-terminale proteolytische Aktivierung von Chemerin findet nicht im sekretorischen Weg im Cytoplasma statt, sondern im extrazellulären Raum [180]. In verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten wie Blut oder Aszites wurden unterschiedliche Chemerin-Isoformen detektiert [50, 144]. Es wurde entdeckt, dass die C-terminale proteolytische Spaltung mittels Serin- bzw. Cysteinproteasen sowohl aktivierende als auch inhibierende Isoformen erzeugen kann [31, 145, 179, 188, 192].

Die Intensität der Aktivität der Chemerin-Isoformen wurde von Roman et al. und Buechler et al. verglichen und zusammengefasst [27, 144]. Demnach gelten die humanen Isoformen Chemerin-158, -155, -154 und -152 als gering aktiv bis inaktiv. Dagegen werden Chemerin-156 als hochaktiv und Chemerin-157 als die höchst aktive Isoform eingestuft. In der Literatur gibt es bezüglich der Aktivitätsbestimmung der Isoformen leichte Unterschiede, was auf das experimentelle Design und die unterschiedlichen Tests zur Aktivitätsmessung zurückzuführen ist [27].

Im Folgenden werden beispielhaft einige proteolytischen Prozessierungen von Chemerin beschrieben. Alle derzeit bekannten Prozessierungen sind im Detail in der Übersicht von Buechler et al. in Abb. 1 abgebildet [27].

Zuerst wurde entdeckt, dass aus Prochemerin (Chemerin-163) verschiedene Isoformen entstehen können, die unterschiedlich aktiv sind. Das Enzym Cathepsin G spaltet dieses zu Chemerin-156, Plasmin spaltet es zu Chemerin-158 und die Proteinase 3 zu Chemerin-155

[50, 61, 185]. Außerdem gibt es Proteasen, die aus bereits prozessierten Isoformen eine andere Isoform erzeugen können. Beispielsweise spalten die Plasma-Carboxypeptidasen N und B Chemerin-158 zum aktiven Chemerin-157 [42, 50]. Die Chymase prozessiert Chemerin-157 und auch Chemerin-156 zu Chemerin-154 [61]. In diesen Fällen werden durch weitere Prozessierungen aus aktiven Isoformen inaktive generiert oder umgekehrt.

Zudem gibt es Proteasen, die mehrere neue Isoformen aus einer Isoform erzeugen können [189]. Das Enzym angiotensin-I converting enzyme schneidet das Peptid Chemerin-145-154 (ein Dekapeptid, das homolog zu den C-terminalen AS von Chemerin-154 ist) zu Chemerin-145-152 [88]. Die Elastase spaltet Prochemerin zu Chemerin-157, Chemerin-155 und Chemerin-152 [50]. Die Tryptase spaltet Chemerin-163 zu Chemerin-158 und Chemerin-155 [50].

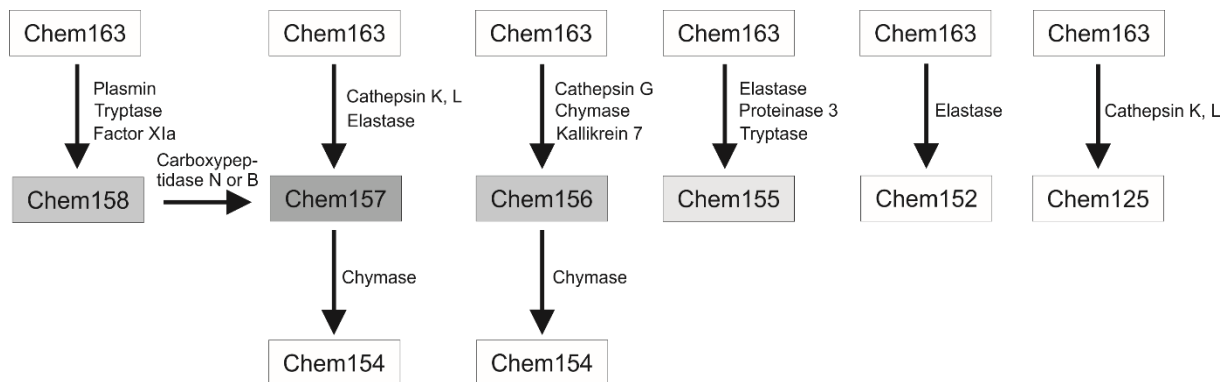


Abb. 1 Prozessierung von Chemerin durch proteolytische Spaltung am C-Terminus (modifiziert) [27]. Die Aktivität der Isoformen wird durch die Graustufen kenntlich gemacht; somit ist Chemerin-155 gering aktiv und Chemerin-157 hochaktiv. Weiß hinterlegte Chemerin-Isoformen sind inaktiv.

Auch bakterielle Proteasen können Chemerin-Isoformen erzeugen. Beispielsweise aktiviert die Protease Staphopain B, die von *Staphylococcus aureus* sezerniert wird, Chemerin durch C-terminale Prozessierung [99, 100].

Die Prozessierung von Chemerin wird als Regulationsmechanismus für die Aktivität von Chemerin angesehen [20, 50].

Das humane Chemerin hat 63 - 64 % genetische Übereinstimmung mit dem murinen Chemerin [41, 202]. Die murinen Chemerin-Isoformen sind jeweils eine AS kürzer als ihr humanes Homolog, wobei die Schnittstellen der Proteasen von murinem und humanem Chemerin

konserviert sind [202]. Das bedeutet, dass Chemerin-163 dem murinen Chemerin-162 entspricht und ebenfalls inaktiv ist. Das hochaktive Chemerin-157 entspricht dem murinen Chemerin-156, aktives Chemerin-156 dem murinen Chemerin-155 und inaktives Chemerin-155 ist homolog zum murinen Chemerin-154. Entsprechend verhält es sich bei den übrigen Chemerin-Isoformen.

Im Serum gesunder Spender machte den größten Anteil des detektierten Chemerins Chemerin-163 aus [32]. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurden im Fettgewebe dagegen die prozessierten Isoformen häufiger gefunden, der größte Anteil davon war Chemerin-157 [32]. Auch Zabel et al. fanden heraus, dass das inaktive Prochemerin im Serum zirkuliert und sich die prozessierten Isoformen an Orten der Entzündung und der Blutgerinnung befinden [19, 193, 194].

Des Weiteren wurde Chemerin-157 als agierende Isoform im Glioblastom gefunden [185]. In der Synovia und der Zerebrospinalflüssigkeit ist Chemerin-158 die häufigste Isoform [201]. In der Synovia wurde allerdings auch Chemerin-156 eine Rolle in der Entzündung zugeschrieben [200].

Über die Funktion der einzelnen Isoformen von Chemerin ist derzeit noch wenig bekannt und bedarf weiterer Erforschung.

#### **1.2.4 Chemerin im HCC und anderen Krebserkrankungen**

Innerhalb der letzten Jahre wurden immer mehr Hinweise dafür gefunden und diskutiert, dass Chemerin an der Entstehung und auch dem Fortschreiten verschiedener Krebserkrankungen mit unterschiedlichen Mechanismen und Auswirkungen beteiligt ist [58, 155].

Bei der Erforschung der Funktion von Chemerin in Krebserkrankungen muss sowohl das systemische Chemerin-Level als auch die im tumorösen Gewebe befindliche Chemerin-Konzentration in Betracht gezogen werden [58].

Die Verbindung von Entzündung und der Entstehung von Krebs ist seit langem anerkannt [35]. Die Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe kann sowohl einen Antitumor-Effekt haben als auch das Tumorwachstum begünstigen, da die Anwesenheit von Immunzel-

len zur Immuntoleranz des Tumors führen kann und die Immunzellen dort z. B. Wachstumsfaktoren freisetzen können, die auf den Tumor wirken [35, 172, 180]. Zusätzlich fördert Chemerin die Angiogenese und Migration von Endothelzellen, was ebenfalls zur Förderung des Tumorwachstums beitragen kann, da neu gebildete Blutgefäße die Zufuhr von Nährstoffen zum Tumor ermöglichen [20, 92, 129].

Eine im Vergleich zu gesunden Patienten oder zum gesunden umliegenden Gewebe erhöhte Chemerin-Expression wurde in einigen Tumorerkrankungen gefunden. Dort kann es sowohl Tumor-fördernde als auch supprimierende Effekte haben. Die Details zur Wirkungsweise von Chemerin sind hier ebenfalls noch nicht geklärt. Im Folgenden werden die Beteiligungen von Chemerin an verschiedenen Krebserkrankungen vorgestellt.

#### **1.2.4.1 Chemerin und Krebs**

Chemerin hat womöglich eine Funktion im Glioblastom, da es bei diesen Patienten erhöht ist [201]. Auch beim Neuroblastom wurde Chemerin eine die Tumorgenese fördernde Rolle zugesprochen [166]. Bei der akuten myeloischen Leukämie wird eine hohe Expression von Chemerin mit einer verbesserten Prognose in Verbindung gebracht. Chemerin wird bei dieser Erkrankung als Tumormarker in Betracht gezogen. [155, 198].

Chemerin war auch in Patienten mit Nebennierenkarzinom verstärkt vorhanden. Dort wird es als prognostischer Marker diskutiert. Wie bei der akuten myeloischen Leukämie korreliert auch beim Nebennierenkarzinom eine höhere Chemerin-Konzentration im Serum mit einem besserem Überleben [113, 155]. Chemerin hat hier offenbar eine protektive Wirkung. Zudem wurde gezeigt, dass das gemessene Chemerin nicht vom Tumorgewebe stammte, sondern von dem Tumor umgebenden gesundem Gewebe. Es wurde zudem gezeigt, dass in Zelllinien des Nebennierenkarzinoms, die mit Chemerin transfiziert wurden, das Tumorwachstum verringert war [112].

Auch beim kolorektalen Karzinom (CRC) ist Serum-Chemerin im Vergleich zu gesunden Patienten hochreguliert [5, 155]. Es ist bekannt, dass erhöhtes Chemerin das Risiko einer Darmkrebserkrankung steigert [44, 48]. Bei Magenkrebs ist Chemerin ebenfalls hochreguliert und

steht hier für eine schlechtere Prognose [174, 197]. Es wird diskutiert, dass Chemerin für diese Erkrankung als Tumormarker eingesetzt werden könnte [197]. In diesen Zellen wird durch Chemerin p38 MAPK und ERK 1/2 phosphoryliert, was letztendlich zum Tumorwachstum führte [155, 174, 197].

Bei Brustkrebs ist Chemerin im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe erhöht und führte zu einer schlechteren Prognose [47]. Dennoch wurde gezeigt, dass Chemerin zu einer stärkeren Infiltration von natürlichen Killerzellen und T-Zellen führte, was das Tumorwachstum verhinderte [131]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass bei Brustkrebspatientinnen Chemerin nicht mit dem Stadium der Erkrankung korreliert [3].

Beim Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre sowie der Zunge [101, 155, 175] war Chemerin im Vergleich zum angrenzenden gesunden Gewebe und zur gesunden Kontrollgruppe hochreguliert. Erhöhte Chemerin-Level gehen auch mit einigen Faktoren einher, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, wie dem Lymphknotenbefall, der Tumorangiogenese und einem fortgeschrittenen klinischen Stadium der Erkrankung. Insgesamt hatten Patienten mit erhöhtem Chemerin eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit [58, 175].

In anderen Krebserkrankungen war Chemerin im Tumorgewebe herunterreguliert. Beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom der Haut war Chemerin (Protein und mRNA) in geringeren Konzentrationen vorhanden als in den Kontrollgeweben [52, 155, 205]. Auch bei Melanom-Patienten war dies der Fall [133]. Bei dieser Erkrankung wurde gezeigt, dass Chemerin das Tumorwachstum supprimiert, indem es natürliche Killerzellen anlockt. [133, 155]. In Tumoren der Haut fördert eine erhöhte Chemerin-Expression die Überlebenschancen [133]. Auch bei Prostatakrebs und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist Chemerin herunterreguliert [132, 155, 203].

Die Suppression von Chemerin im Tumorgewebe wird als Mechanismus der Immunevasion der Tumorzellen vermutet [155]. Es ist bekannt, dass Chemerin verschiedene Immunzellen über Chemotaxis ins Tumorgewebe lockt. Eine Hypothese dazu ist, dass dies eine Reaktion des gesunden Gewebes auf eine Herunterregulation von Chemerin seitens des Tumors sein könnte. Dieses reagiert dann durch Hochregulation von Chemerin, was wiederum zur Infiltration von Immunzellen führt [113, 155].

### 1.2.4.2 Chemerin im HCC

Beim HCC wurde für Chemerin eine protektive Rolle beschrieben [107, 109, 110]. Lin et al. konnten zeigen, dass Chemerin in HCC-Patienten herunterreguliert ist und dort mit Tumorgröße, Differenzierungsgrad und der Intensität der Infiltration von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen korrelierte. Des Weiteren führte eine geringere Chemerin-Konzentration zu einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit [109, 155]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass das Chemerin-Level im Serum von HCC-Patienten keinen Einfluss auf die allgemeine Überlebenswahrscheinlichkeit hatte und auch nicht mit dem Stadium der Erkrankung korrelierte [82]. Daher scheint im HCC die lokale Chemerin-Menge für die protektiven Effekte verantwortlich zu sein.

Darüber hinaus hatten Chemerin-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Sterberate, nachdem Hepa1-6-Zellen in ihre Leber implantiert worden waren und dort Tumore erzeugt hatten. Dagegen verursachte die Überexpression von Chemerin in diesem Modell ein vermindertes Tumorstadium, weniger Lungenmetastasen und eine geringere Sterberate im Vergleich zur Kontrolle [110]. Es wurde erklärt, dass Chemerin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) inhibiert und infolgedessen die Ausschüttung der tumorfördernden Zytokine granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und IL-6 supprimiert wurde. Dadurch wiederum wurde die Infiltration von anti-inflammatorischen Immunzellen, den myeloiden Suppressorzellen, verhindert und die Infiltration von Interferon (IFN)  $\gamma^+$  T-Zellen verstärkt. Zudem führte dies zu einer verminderten Angiogenese im Tumorgewebe.

Chemerin unterdrückte also die Entzündung, die durch den Tumor hervorgerufen wurde. Dies führte letztendlich zu einem protektiven Effekt bei HCC [110]. In einem HCC-Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass die Überexpression von Chemerin in Tumorzellen zu einer verminderten Metastasierung führte [107].

Unsere Arbeitsgruppe verglich in einem NASH-HCC-Mausmodell Serum-Chemerin, hepatisches Chemerin und die CMKLR1-Expression von Mäusen, die eine NASH hatten, mit Tieren, die sowohl eine NASH als auch ein HCC hatten, und stellte innerhalb dieser Gruppen keine Unterschiede diesbezüglich fest [64].

Auch *in vitro* wurden die Effekte von Chemerin untersucht. Die murine Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 wurde mit Chemerin stimuliert, wodurch sich Überleben und Proliferation der Zel-

len nicht veränderten [110]. Jedoch wurde eine Inhibierung der Proliferation durch Chemerin in der Hepatom-Zelllinie SMMC7721 gefunden [160]. In den Hepatom-Zelllinien 7404, PVTT-1 und Hep3B wurde Chemerin überexprimiert, was zur verminderten Migration und Invasion führte [107].

In 18 verschiedenen Hepatom-Zelllinien wurde die Expression von Chemerin mittels Datenbankanalyse untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass Chemerin in jeder dieser Zelllinien im Vergleich zur gesunden Leber reduziert ist [26].

Unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte im Jahr 2019 eine Studie, die die Überexpression der murinen Isoform Chemerin-156 im HCC-Mausmodell untersuchte [63]. Dort wurde gezeigt, dass die Tumorlast durch das als hochaktiv geltende murine Chemerin-156 vermindert wurde. Allerdings war primär die Zahl kleinerer Tumore verringert. Das Tumorstadium wurde jedoch nicht verändert. Mittels massenspektrometrischer Analyse der Isoformen im Tumorgewebe wurde jedoch festgestellt, dass Chemerin-155 die in diesem Gewebe am häufigsten vorhandene Isoform war. Chemerin-156 wurde dagegen nicht detektiert. Dies lässt den Schluss zu, dass Chemerin-156 im HCC-Mausmodell weiter zu Chemerin-155 prozessiert wurde. Welche der beiden Isoformen die protektiven Effekte im murinen HCC-Modell erzielte, ist jedoch nicht geklärt.



### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Im Vordergrund stehen die Untersuchungen zur biologischen Funktion von humanen und murinen, aktiven und inaktiven Chemerin-Isoformen im hepatozellulären Karzinom. Hierfür wird der Einfluss von Chemerin-Isoformen auf das HCC *in vitro* analysiert. Von Interesse ist die Regulation der Proliferation, Zellviabilität, Migration und Entzündungsreaktion in Hepatom-Zelllinien durch die Chemerin-Isoformen. Es ist bekannt, dass Chemerin verschiedene in diese Zellprozesse involvierten Signalwege reguliert, die die Aktivierungen von ERK 1/2, AKT, p38 MAPK und NF- $\kappa$ B nach sich ziehen [12, 90, 107, 110, 180, 186]. Daher sollen diese Schlüsselproteine genauer betrachtet werden. Zusätzlich sollen die Proliferation und Migration in Zell-basierten Assays untersucht werden. Dies soll mittels Überexpression von Chemerin-Isoformen in den humanen Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hep3B und der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 durchgeführt werden. Diese Zelllinien stammen von HCC-Geweben ab und sind klassische Modelle zur Untersuchung von Lebererkrankungen.

Chemerin ist in der Literatur als Adipokin bekannt. Verschiedene Immunzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen besitzen den Chemerin-Rezeptor CMKLR1 [136, 149]. Für Chemerin wurden chemotaktische und entzündungsfördernde Eigenschaften in verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs nachgewiesen. Es soll untersucht werden, inwiefern die Isoformen von Chemerin die Ausschüttung von an der Entzündung beteiligten Zytokinen durch diese Immunzellen auslösen.

Aufgrund der vielfältig in der Literatur aufgestellten Hypothesen, dass Chemerin an der Entstehung des metabolischen Syndroms und der NAFLD beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass Chemerin nicht nur in Entzündungsprozesse, sondern auch in den Lipidmetabolismus involviert ist [27, 59]. Mittels massenspektrometrischer Analyse sollen Änderungen der Lipid-Zusammensetzung von Hepatom-Zelllinien durch Chemerin-Isoformen geprüft werden.

Darüber hinaus soll beurteilt werden, ob sich Serum-Chemerin als Marker zur Differentialdiagnose von HCC und Lebermetastasen des CRC eignet, da es in HCC-Patienten vermindert ist, aber im Serum von CRC-Patienten hochreguliert ist [5, 155].

Im Wesentlichen soll die Frage geklärt werden, ob Chemerin bei einer HCC-Erkrankung und in anderen Lebererkrankungen eine protektive oder krankheitsfördernde Rolle einnimmt und ob Chemerin als Therapeutikum oder als Target einer Therapie dienen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 1 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aufbewahrungsdosen AD02	A. Hartenstein
Ausschwingrotor für Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Autoklav VX-150	Systemec
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories
CO <sub>2</sub> -Inkubator BBD 6220	ThermoFisher Scientific (Heraeus)
Countess™ II FL Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific (Life Technologies)
Countess™ II FL Reusable Slide	ThermoFisher Scientific
Cryo-Einfriergerät Nalgene® Mr. Frosty	Carl Roth
Digestorium	Laborbau Grittmann
Durchlichtmikroskop DM IL HC	Leica Microsystems
Einkanalpipette Research® Plus 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Elektrophorese-Kammer Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Erlenmeyerkolben	DURAN Group
iMark™ Microplate Absorbance Spektrophotometer	Bio-Rad Laboratories
Kreisschüttler 3005	GFL
Kryoboxen mit Rastereinsätzen	VWR
Laboport® Mini-Membran-Vakuumpumpe N 86 KN.18	KNF Lab
Laborglasflaschen	DURAN Group
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics
Leica DFC290 Microscope Camera	Leica Microsystems
LightCycler® (1.5) Instrument	Roche Diagnostics
LightCycler® Sample Carousel	Roche Diagnostics
LightCycler® Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics

Magnetrührer MR 30001 K	Heidolph
Magnetstäbchen	Carl Roth
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Megafuge Rechteckbecher	Heraeus Instruments
Mikrowelle HF12M240	Siemens
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories
Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories
Minizentrifuge Sprout	Biozym
Multikanalpipette 8-Kanal Research® Plus	Eppendorf
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific/ peqlab
Orbital Incubator SI50	Stuart
pH-Meter inoLab pH Level 1	inoLab
Pipette HandyStep Repeating Pipette	BrandTech Scientific
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
PowerPAC 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Röhrchengestell	TPP
Rotilabo-Kryoboxen	Carl Roth
Sicherheitswerkbank Hera Safe	ThermoFisher Scientific (Heraeus Instruments)
Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele
Synergy H1 Hybrid Reader	BioTek®
T Gradient Thermocycler	Biometra
Thermoblock TB1	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD2070 mit Sonotrode MS 72	Bandelin
Vortexer REAK 1 D R	Heidolph Instruments
Wasserbad WNE 14	Memmert
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Verwendetes Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsive Verschlussfolie für ELISA	nerbe plus
Aspirationspipetten Falcon® 5 ml	Corning
Bacteriological Falcon® Petri Dish	Corning
Combitips advanced®, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
Costar® 96-Well Microplate	Corning
Cryogenic Vials 2 ml	Corning
Filterspitzen Biosphere 1250 µl	Sarstedt
Filterspitzen Biosphere 20 µl	Sarstedt
Filterspitzen SafeSeal-Tips professional 100 µl	Biozym
Filterspitzen SafeSeal-Tips professional 200 µl	Biozym
Handschuhe neoProtect Latex puderfrei	neoLab
Injektionskanülen Microlance™ 3 0,8 mm	Becton, Dickinson and Company
Multiwell Cell Culture Plate Falcon®, 12-well	Corning
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1250 µl	Sarstedt
Platte TC 6 Well Cell+ F	Sarstedt
Präzisionstücher Kimtech Science	Kimberly-Clark
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran Immun-Blot® 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories
Rotilabo®-PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Carl Roth
Round Bottom Test Tube Falcon®	Corning
Safe Lock Tubes 1,5 ml, PCR clean	Eppendorf
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
SHIELDskin CHEM NEO Nitril 300	Biozym
Spritzen Injekt-F 1 ml	Braun
TC-Platte TC 96 Well, Standard, F	Sarstedt
Tubes 0,5 ml	ThermoFisher Scientific
Tubes Safe Lock 2,0 ml, PCR clean	Eppendorf
Tubes® 5 ml	Eppendorf
Vakuumfilter Steriflip-GP 0,22 µm	Merck Millipore
Vakuumfiltration „rapid“-Filtermax	TPP

Verschlussfolie Parafilm® M	Hartenstein
Wägeschälchen	Omnilab
Whatman® Filter Paper	Sigma-Aldrich
Zellkulturflasche T75/T175 Cell+ mit Filter	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen 50 ml braun	Sarstedt

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Puffer

Tabelle 3 Kommerziell erworbene Chemikalien, Reagenzien, Medien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol ≥ 99,7 % AnalaR NORMAPUR® ACS	VWR Chemicals
Accutase	PAN Biotech
Acrylamid 40 %	Bio-Rad Laboratories
Agarose SeaKem® LE	Biozym
Akasolv Aqua Care Wasserbadschutz	Carl Roth
Albumin bovine (BSA) Fraktion V	Biomol
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories
Ampicillin-ratiopharm® 1,0 g	Ratiopharm
Bis-Acrylamid-Lösung 2 %	Bio-Rad Laboratories
Bovine Serum Albumin, heat shock fraction	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad Laboratories
CutSmart®-Buffer	New England Biolabs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore
DNA Ladder Quick-Load® 1 kb	New England Biolabs
DNA Ladder Quick-Load® 100 bp	New England Biolabs
Dulbecco's MEM 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/L Glukose, stabiles Glutamin, ohne Na-Pyruvat (DMEM)	Merck Millipore
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Gibco
Essigsäure (Eisessig) 100 % pro analysi	Merck Millipore

Ethanol EMSURE® ACS, ISO	Merck Millipore
Ethanol, technisch	Universität Regensburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs
Glycin Pufferan ≥99 % p.A.	Carl Roth
Glyzerin 87 % pro analysi	Merck
Glyzerin Molecular Biology Grade	Merck Millipore (Calbiochem®)
IGEPAL® Ca-630	Sigma-Aldrich
Instant-Magermilchpulver	Frema
Kaliumchlorid	Merck Millipore
LB Agar Difco™ Miller	Becton, Dickinson and Company
LB-Broth Difco™ Miller	Becton, Dickinson and Company
Lipopolysaccharid, E. coli 055:B5	Sigma-Aldrich
Methanol, technisch	Universität Regensburg
Millipore-Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Merck Millipore
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck Millipore
Natriumazid > 99,5 %	Sigma-Aldrich (Fluka)
Natriumchlorid	Merck Millipore
Natriumdesoxycholsäure Monohydrat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecyl-Sulfat, Pellets (SDS)	Serva
Natriumhydroxid-Lösung 10 mol/L	Merck Millipore
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	ThermoFisher Scientific (Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets PhosSTOP™	Sigma-Aldrich (Roche Diagnostics)
Prestained Protein Marker V peQGold	Peqlab
Protease Inhibitor Cocktail cComplete™ EDTA-free	Roche Diagnostics
Q5® Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	New England Biolabs
RNAse-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen
Roti®-GelStain	Carl Roth
RPMI 1640 Medium 2,0 g/L NaHCO <sub>3</sub> , stabiles Glutamin	Merck Millipore (Biochrom)
Salzsäure Combi-Titrisol® 5 mol/L	Merck
Schwefelsäure 95 - 97 % EMSURE® ISO	Merck Millipore

SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs
T4 DNA Ligase mit Puffer (10x)	New England Biolabs
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= Tris-Base)	Merck Millipore
Tris-Hydrochlorid	Merck Millipore
Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 %	PAN Biotech
Tween® 20	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol ≥ 99 %	Sigma-Aldrich

## 2.1.4 Angefertigte Medien, Puffer und Lösungen

### 2.1.4.1 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung

#### 2.1.4.1.1 PBS mit Proteaseinhibitoren

Für den Proteaseinhibitor-Puffer wurde eine Tablette cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail in 50 ml PBS gelöst.

#### 2.1.4.1.2 Protease- und Phosphataseinhibitoren-Stocklösung für RIPA-Puffer (10x)

Für die Stocklösung wurden 5 Tabletten PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets und 1 Tablette cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail in 5 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, aliquotiert und bei -20° C eingefroren.

#### 2.1.4.1.3 RIPA-Puffer für die Proteinisolierung (1,1x)

NaCl 3 M	2,75 ml
IGEPAL® Ca-630	550 µl
Natriumdesoxycholsäure Monohydrat	0,275 g
SDS-Lösung 20 %	275 µl
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	2,75 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

## 2.1.4.2 Lösungen und Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 2.1.4.2.1 Lämmli-Puffer (5x)

Glycerin 87 %	5 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	300 µl
SDS-Lösung 20 %	2 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml
Bromphenolblau	10 mg
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 ml

### 2.1.4.2.2 Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)

Glycin	244 g
Tris-Base	60 g
SDS-Lösung 20 %	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	Ad 2 L

### 2.1.4.2.3 Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel) für SDS-PAGE

Trenngel-Mix (15 %):

Acrylamid 40 %	30 ml
Bis-Acrylamid-Lösung 2 %	3,4 ml
Tris-HCl 3 M, pH 8,7	10 ml
SDS-Lösung 20 %	400 µl
ddH <sub>2</sub> O	32 ml



Sammelgel-Mix (5 %):

Acrylamid 40 %	5 ml
Bis-Acrylamid-Lösung 2 %	2,6 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	5 ml
SDS-Lösung 20 %	200 µl
ddH <sub>2</sub> O	24 ml

### 2.1.4.3 Lösungen und Puffer für Western Blot

#### 2.1.4.3.1 Antikörperlösung für die Verdünnung primärer Antikörper

BSA	7,5 g
Tween® 20	500 µl
Natriumazid	50 mg
tris-buffered saline (TBS)	ad 500 ml

Nach dem Lösen der Bestandteile wurde die Lösung sterilfiltriert.

#### 2.1.4.3.2 Blocking-Puffer (5 %) für Western Blot

TBS-T	100 ml
Magermilchpulver	5 g

#### 2.1.4.3.3 Tankpuffer (10x) als Bestandteil des Transfer-Puffers

Glycin	280 g
Tris-Base	60 g
SDS-Lösung	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 2 L

**2.1.4.3.4 TBS (10x) zum Waschen von Western Blot Membranen**

NaCl	160 g
Tris-HCl	63,05 g
Titration auf pH 7,6	
ddH <sub>2</sub> O	ad 2 L

**2.1.4.3.5 TBS-T zum Waschen von Western Blot Membranen**

TBS	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml
Tween-20	1 ml

**2.1.4.3.6 Transfer-Puffer für Western Blot**

Methanol	400 ml
Tankpuffer (10x)	160 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 2 L

**2.1.4.4 TAE-Puffer (50x) für die Agarose-Gelelektrophorese**

Tris-Base	121 g
Eisessig	28,55 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**2.1.4.5 Medien für die Kultur von *Escherichia coli* (*E. coli*) und Zelllinien****2.1.4.5.1 Kryomedium für *E. coli***

Glycerin 50 %	500 µl
<i>E. coli</i> -Übernachtskultur	500 µl

#### 2.1.4.5.2 LB-Agarplatten für die Anzucht von *E. coli*

Für die Herstellung von Agar-Platten wurde 40 g Difco™ LB Agar in 1 L ddH<sub>2</sub>O gelöst, autoklaviert und anschließend auf eine Temperatur von 55° C abgekühlt. Nun wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Das Agar-Medium wurde etwa einen halben Zentimeter hoch in sterile Petri-Schalen gegossen, bei Raumtemperatur (RT) ausgehärtet und bei 4° C bis zum Gebrauch gelagert.

#### 2.1.4.5.3 LB-Medium für *E. coli*-Übernachtskulturen

Um LB-Medium herzustellen wurden 25 g Difco™ LB Broth in 1 L ddH<sub>2</sub>O gelöst, autoklaviert und anschließend bei RT gelagert. Ampicillin (100 µg/ml) wurde unmittelbar vor Gebrauch hinzugegeben.

#### 2.1.4.5.4 Kryomedium für Zelllinien pro Kryo-Vial

2 x 10 <sup>6</sup> Zellen in Medium	750 µl
FBS	600 µl
DMSO	150 µl

### 2.1.5 Assay-Kits

Tabelle 4 Verwendete Assay-Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics
Lipofectamine™ 3000 Reagent	ThermoFisher Scientific
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen

MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit	Boster Immunoleader
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific
Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit	ThermoFisher Scientific
Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit	R&D Systems
Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit	R&D Systems
QIAPrep Spin MiniPrep Kit	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit	ThermoFisher Scientific (Invitrogen)

Tabelle 5 Verwendete enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Kits (DuoSet® ELISA Development Systems).

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
AFP	human	DY1369	R & D Systems
AFP	murin	DY5369-05	R & D Systems
CCL2	human	DY279	R & D Systems
CCL2	murin	DY479	R & D Systems
CCL20	human	DY360	R & D Systems
Chemerin	human	DY2324	R & D Systems
Chemerin	murin	DY2325	R & D Systems
CXCL1/KC	murin	DY453	R & D Systems
Interleukin 6	human	DY206	R & D Systems
Interleukin 6	murin	DY406	R & D Systems
Interleukin 8	human	DY208	R & D Systems
Osteopontin	human	DY1433	R & D Systems
PCSK9	human	DY3888	R & D Systems
PCSK9	murin	DY3985	R & D Systems
TNF	murin	DY410	R & D Systems

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primäre Antikörper

Tabelle 6 Verwendete primäre Antikörper für Western Blot und Immunpräzipitationen.

Antigen	Reaktivität	p/m	Wirt	Verdünnung	Produkt-Nr.	Hersteller
AKT	pan	m	Kaninchen	1:1000	4691	Cell Signaling
Chemerin	human	p	Maus	1:500	ab72965	Abcam
Chemerin	human	m	Maus	1:500	MAB2324	R&D Systems
Chemerin	human	p	Ziege	1:1000	AF2324	R&D Systems
Chemerin	murin	p	Ziege	1:1000	AF2325	R&D Systems
ERK 1/2 (p44/42 MAPK)	pan	m	Maus	1:2000	9107	Cell Signaling
GAPDH	pan	m	Kaninchen	1:1000	2118	Cell Signaling
NF-κB p65	pan	m	Kaninchen	1:1000	8242	Cell Signaling
p38-MAPK	pan	p	Kaninchen	1:1000	9212	Cell Signaling
phospho-AKT (Ser473)	pan	m	Kaninchen	1:2000	4060	Cell Signaling
phospho-ERK 1/2 (p44/42 MAPK) (Thr202/ Tyr204)	pan	m	Kaninchen	1:2000	4370	Cell Signaling
phospho-NF-κB p65 (Ser536)	pan	m	Kaninchen	1:1000	3033	Cell Signaling
phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	pan	m	Kaninchen	1:1000	4511	Cell Signaling
phospho-Stat3 (Tyr705)	pan	m	Kaninchen	1:1000	9145	Cell Signaling
Stat3	pan	m	Maus	1:1000	9139	Cell Signaling

m: monoklonal, p: polyklonal.

### 2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 7 Für Western Blot verwendete sekundäre Antikörper.

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
$\alpha$ -Maus	Ziege	1:5000	115-036-072	Jackson ImmunoResearch
$\alpha$ -Kaninchen	Esel	1:5000	711-035-152	Jackson ImmunoResearch
$\alpha$ -Ziege	Esel	1:5000	705-035-147	Jackson ImmunoResearch

Sämtliche sekundäre IgG-Antikörper waren Meerrettichperoxidase-(HRP)-konjugiert.

### 2.1.7 RNA, Oligonukleotide und Plasmide

#### 2.1.7.1 RNA

Zur Amplifikation der DNA-Sequenzen von humanen Chemerin-Isoformen für Klonierungen wurde humane RNA aus der normalen adulten Leber von der Firma BioCat erworben.

#### 2.1.7.2 Plasmid

Das Plasmid (Chemerin-162 im Vektor pHTN-HaloTag<sup>®</sup>-CMV-neo) als Template für weitere murine Chemerin-Isoformen stammte aus unserer Arbeitsgruppe und wurde von Frau Dr. Rebekka Pohl kloniert.

#### 2.1.7.3 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Klonierungsexperimente

Die forward-Primer enthalten am 5'-Ende eine HindIII-Erkennungssequenz und alle reverse-Primer am 3'-Ende des Gens eine SacII-Erkennungssequenz (unterstrichene Sequenzen in Tabelle 8). Sie wurden unter Zuhilfenahme der ApE-Software erstellt. Die NCBI Sequenz-Identifikationsnummer der humanen mRNA des Chemerin-163 lautet NM\_002889.4 und die

der mRNA des murinen Chemerin-162 lautet NM\_001347168.1. Diese Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

Tabelle 8 Primer für die Amplifikation der humanen Chemerin-Isoformen mittels PCR.

Chemerin-Isoform	forward-Primer (5'-3')	reverse-Primer (5'-3')
163	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGCGACGGCTGCTGATCC	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGCTGCGGGGCAGG
157	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGCGACGGCTGCTGATCC	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGGAGAAGGC <del>GA</del> ACTGTCCAGG
156	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGCGACGGCTGCTGATCC	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGAAGGC <del>GA</del> ACTGTCCAGGGAA
155	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGCGACGGCTGCTGATCC	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGGCGAACTGTCCAGGGAAGTA

Unterstrichen: HindIII- und SacII-Erkennungssequenz

Tabelle 9 Primer für die Amplifikation der murinen Chemerin-Isoformen mittels PCR.

Chemerin-Isoform	forward-Primer (5'-3')	reverse-Primer (5'-3')
162	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGAAGTGCTTGCTGATCTCCCTA	CGAC <u>CGCGG</u> TTATTTGTTCTCAGGGCCCTGGA
156	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGAAGTGCTTGCTGATCTCCCTA	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGGAGAAGGC <del>AA</del> ACTGTCCAGG
155	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGAAGTGCTTGCTGATCTCCCTA	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGAAGGC <del>AA</del> ACTGTCCAGGTAG
154	CGAA <u>AAGCTT</u> ATGAAGTGCTTGCTGATCTCCCTA	CGAC <u>CGCGG</u> TTAGGCGAACTGTCCAGGTAGGAA

Unterstrichen: HindIII- und SacII- Erkennungssequenz.

### 2.1.7.4 Sequenzierprimer

Tabelle 10 Primer zur Sequenzierung von DNA-Inserts rekombinanter Vektoren (wie im pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit angegeben)

Bezeichnung	Sequenz
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Diese Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

### 2.1.7.5 Primer für semi-quantitative Real-Time-PCRs

Tabelle 11 Primer für semi-quantitative Real-Time-PCR von Chemerin

Spezies	forward-Primer (5'-3')	reverse-Primer (5'-3')
human	CAGGAGACCAGTGTGGAGA	GTGAGGACCCCCACAGCT
murin	AAACACCCACCTGTGCAGT	TTTTACCCTTGGGGTCCATT

Die Primer wurden mit Hilfe des Roche Assay Design Centers und des Primer-BLAST von NCBI erstellt. Synthetisiert wurden diese Primer von der Firma Metabion.

### 2.1.8 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 12 Verwendete Restriktionsendonukleasen für das Schneiden der Chemerin-PCR-Fragmente und des Vektors pcDNA™3.1/V5-His TOPO®

Enzym	Schnittstelle	Hersteller
HindIII-HF®	AAG CTT	New England Biolabs
SacII	CCG CGG	New England Biolabs



## 2.1.9 Zellen und Organismen

### 2.1.9.1 Zelllinien

Tabelle 13 Verwendete humane und murine Hepatom- und Makrophagen-Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Ursprungsgewebe	Spezies	Wachstum	Bezugsquelle
Hep3B	Hepatozelluläres Karzinom	Tumorgewebe eines 8-Jährigen	Homo sapiens	adhärent	DSMZ
Hepa1-6	Hepatozelluläres Karzinom	BW7756-Tumor einer C57L-Maus	Mus musculus	adhärent	DSMZ
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	Tumorgewebe eines 15-Jährigen	Homo sapiens	adhärent	DSMZ
Huh-7	Hepatozelluläres Karzinom	Tumorgewebe eines 57-Jährigen	Homo sapiens	adhärent	Sigma-Aldrich
RAW264.7	durch murines Leukämievirus transformierte Makrophagen	durch murines Leukämievirus induzierter Tumor	Mus musculus	semi-adhärent	ATCC

### 2.1.9.2 Primäre Zellen

Primäre mononukleäre periphere Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), die unmittelbar vor Lieferung aus dem Blut eines Patienten isoliert und in eine 12-Well-Platte ausgesät wurden, wurden von der Firma Hepacult bezogen.

### 2.1.9.3 Kompetente *E. coli*

Zur Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA wurde diese in NEB5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) von New England Biolabs durch Transformation übertragen.

### **2.1.10 Humane Seren**

Seren von HCC- und CRC-Patienten wurden von Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weiß, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Regensburg und Seren der Kontrollen von PD Dr. med. Doris Schacherer, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg zu Verfügung gestellt.

Das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg führte die Messungen der Routinelaborparameter und der Tumormarker durch.

Die zugehörige Studie wurde durch die Ethikkommission am Universitätsklinikum Regensburg genehmigt (Zulassungsnummer 15-101-0052, genehmigt am 26.03.2015). Jeder Patient gab sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Es wurden nur volljährige Patienten aufgenommen, bei denen im histologischen Befund HCC oder CRC-Metastasen bestätigt wurden. Schwangere wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Seren der CRC-Patienten wurden zwischen Januar 2012 und Juni 2015 entnommen, die der HCC-Patienten zwischen Mai 2012 und Mai 2015. Das histologische Scoring der Leberstadien wurde nach Kleiner et al. durchgeführt [94]. Die gesunden Patienten kamen zur Untersuchung von Oberbauch- oder Magenschmerzen; bei ihnen wurde keine Krebserkrankung festgestellt. Die Seren wurden von Januar bis Juni 2008 entnommen. Es wurden Patienten ausgeschlossen, die an hepatobiliären Krankheiten, bösartigen Tumoren, Aszites, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, einer HIV-Infektion oder familiärer Hyperlipidämie litten oder Lebersteatose-auslösende Medikament einnahmen, Drogen- oder Alkoholmissbrauch vorwiesen oder an anderen Erkrankungen litten, die Einflüsse auf die Laborwerte haben könnten.

Tabelle 14 Parameter der HCC-, CRC-Patienten und der Kontrollen

Parameter	HCC (32 Patienten)	CRC (36 Patienten)	Kontrollen (49 Patienten)	p- Wert
Männlich/weiblich	27/5	24/12	24/25	#*
Alter (Jahre)	63,5 (33,0 - 85,0)	67,0 (36,0 - 79,0) <sup>35</sup>	58,0 (21,0 - 88,0)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,2 (19,7 - 44,6) <sup>31</sup>	26,6 (16,3 - 45,4)	26,2 (20,3 - 39,7)	
Prothrombinzeit (%)	30,8 (26,7 - 307,0) <sup>30</sup>	28,8 (25,2 - 39,0) <sup>35</sup>	n. a.	
Bilirubin (mg/dl)	0,6 (0,2 - 2,5) <sup>31</sup>	0,5 (0,1 - 1,0) <sup>35</sup>	0,5 (0,2 - 1,9)	*
ALT (U/l)	49,5 (17,0 - 378) <sup>30</sup>	28,0 (10,0 - 8,0) <sup>34</sup>	20,0 (12,0 - 44,0)	** #***
AST (U/l)	36,0 (14,0 - 502,0) <sup>31</sup>	20,5 (11,0 - 165,0) <sup>34</sup>	28,0 (20,0 - 48,0)	* #*
GGT (U/l)	105 (25 - 807) <sup>27</sup>	53 (19 - 590) <sup>33</sup>	n. a.	**
T2D	15	6	9	** #**
HC	3	8	8	
HT	18	16	18	
HU	4	3	n. a.	
Tumor-Grad: G1/G2/G3	5/20/4 <sup>29</sup>	1/23/1 <sup>25</sup>		
Primärer Tumor T1/T2/T3/T4	13/9/9/1	7/20/3/0 <sup>30</sup>		
Vaskuläre Invasion nein/ja	20/12	24/2 <sup>26</sup>		
TNM-Stadium IA/IB/IIA/IIB/III/IV	14/8/7/2/1/0	1/4/13/9/1/1/2 <sup>31</sup>		

Die Laborwerte sind als Mediane angegeben, in der Klammer sind jeweils der niedrigste und höchste Wert genannt. Für kategoriale Variablen wurde die jeweilige Patientenanzahl der Untergruppen angegeben. Die hochgestellten Zahlen stellen die Anzahl der Patienten, in denen der jeweilige Parameter gemessen wurde, dar, wenn bei einem oder mehr Patienten keine Werte vorlagen. Die Referenzwerte für AST und ALT liegen bei < 35 U/L bei Frauen und bei < 50 U/L bei Männern, für Bilirubin bei 0,2 - 1,4 mg/dL, für GGT < 40 U/L bei Frauen und < 60 U/L bei Männern und für Prothrombinzeit bei < 70 %. Statistik: Mann-Whitney-U-Test bzw. Chi-Square-Test für die Berechnung der Geschlechter- und Komorbiditätenverteilung. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 in Bezug auf den Vergleich von HCC- und CRC-Patienten. #\* p < 0,05 #\*\* p < 0,01 #\*\*\* p < 0,001 in Bezug auf den Vergleich von HCC-Patienten mit Personen der Kontrollgruppe. ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, GGT:  $\gamma$ -Glutamyltransferase, HC: Hypercholesterinämie, HT: Hypertonie, HU: Hyperurikämie. U: Units.

### 2.1.11 Software und Online-Tools

Für das Design von Oligonukleotiden, Vektoren und zur Messung, Analyse, statistischen Auswertung und Darstellung von Daten wurden folgende Software und Online-Tools verwendet:

Tabelle 15 Software und Online-Tools

<b>Bezeichnung</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop	CS3	Adobe Inc.
ApE – A Plasmid Editor	v2.0.60 und früher	M. Wayne Davis
Citavi	6.3.0.0	Swiss Academic Software
CorelDRAW® Graphics Suite X6	Version 16.1.0.843	Corel Corporation
Emboss Needle	n. a.	EMBL-European Bioinformatics Institute
Gen5™	2.03.1	BioTek®
ImageJ	1.52r	Wayne Rasband, NIH
ImageLab™	Version 6.0.1 build 34 Standard Edition	Bio-Rad Laboratories
Leica Application Suite	Version 4.5.0	Leica Microsystems
LightCycler® 1.5 Software	Version 3.5	Roche Diagnostics
Microplate Manager® Software	Version 6.2	Bio-Rad Laboratories
Microsoft Office	Standard 2016	Microsoft Corporation
MRI Wound Healing Tool Plug-In für ImageJ	n. a.	<a href="http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool">http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool</a>
NanoDrop 2000/2000c	1.4.2	ThermoFisher Scientific
NEBioCalculator™ (Ligation Calculator)	v1.10.0	New England Biolabs
Primer-BLAST	n. a.	National Center for Biotechnology Information (NCBI, NIH)
Protein Array Analyzer Plug-In für ImageJ	1.1.c 27.09.2018	Gilles Carpentier, Faculté des Sciences et Technologie, Université Paris Est Créteil Val-de-Marne, Frankreich

Roche Assay Design Center	n. a.	Roche Diagnostics
SPSS® Statistics	Version 25	IBM®
The Sequence Manipulation Suite - Reverse Complement	n. a.	Paul Stothard

n. a.: not available.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

Für die Untersuchung von humanen und murinen Chemerin-Isoformen wurden die Zelllinien HepG2 [95, 96], Huh7 [127], Hep3B [96] und Hepa1-6 [36] verwendet. Alle Zelllinien stammen von einem hepatozellulären Karzinom ab [36, 95, 96, 127]. Diese Zelllinien werden vielfach zur Erforschung von Lebererkrankungen eingesetzt.

RAW264.7 ist eine murine Makrophagen-Zelllinie, die von einem murinen Tumor abstammt, der durch das Murine Leukämie-Virus induziert wurde [139].

##### 2.2.1.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien HepG2, Huh7, Hep3B, Hepa1-6 und RAW264.7 sind adhärente bzw. semi-adhärente Zellen und wurden daher in T175-Zellkulturflaschen bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Mit Ausnahme der HepG2-Zellen wurden alle Zelllinien in DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin herangezogen. Die HepG2-Zelllinie wurde in RPMI mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

##### 2.2.1.1.2 Passagieren von Zelllinien

Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Accutase bei HepG2-Zellen) auf die Zellen gegeben und bei 37° C für 5 min inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden 7 ml serumhaltiges Medium hinzugegeben und die Zellen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und ein Zehntel der Zellsuspension zusammen mit 20 ml Medium in eine Zellkulturflasche gegeben.

### 2.2.1.1.3 Aussaat von Zelllinien

Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl pro ml bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in die Zählkammer gegeben und im Zellzählgerät (Countess™ II FL, Life Technologies, ThermoFisher Scientific) automatisch gezählt. Hier wurde zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden. Bei jeder Zählung wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die Zellsuspension wurde entsprechend der gewünschten Zellzahl pro Well mit Medium verdünnt und in die Wells pipettiert. Die Zellen konnten sich über Nacht (üN) an den Plattenboden anheften.

Tabelle 16 Zellzahl pro 6-Well und pro 12-Well der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl pro 6-Well	Zellzahl pro 12-Well
Hep3B	$1 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
Hepa1-6	$0,7 - 1 \times 10^6$	$0,3 \times 10^6$
HepG2	$1 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
Huh7	$1 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
RAW264.7	n. a.	$1 \times 10^5$

n. a.: not available.

### 2.2.1.2 Transfektion von Zelllinien mit rekombinanten Plasmiden

Zur Überexpression verschiedener Chemerin-Isoformen in humanen und murinen Hepatom-Zelllinien wurden diese mit den Plasmiden transfiziert. Dazu wurde das Lipofectamine™ 3000 Reagent nach Herstellerangaben verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach 48 h geerntet und das Protein bzw. die RNA isoliert und der Zellkulturüberstand eingefroren.

### 2.2.1.3 Abnahme und Aufbereitung des Zellkulturüberstands von Zelllinien

Nach Beendigung der Behandlung der Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, bei 4000 rpm und 4° C für 5 min zentrifugiert, das Debris verworfen und der Überstand bei -20° C eingefroren.

#### **2.2.1.4 Stimulation von Makrophagen mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6-Zellen**

24 h nach der Aussaat der RAW264.7-Zelllinie wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 750 µl des konditionierten Mediums der mit Chemerin transfizierten Hepa1-6-Zelllinie auf die Makrophagen gegeben und weitere 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand bei -20° C aufbewahrt.

#### **2.2.1.5 Stimulation von PBMCs mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen**

Die PBMCs wurden aus frisch abgenommenem Blut durch die Firma Hepacult isoliert,  $1 \times 10^6$  Zellen pro 12-Well ausgesät und am nächsten Tag geliefert. Das Kulturmedium wurde abgenommen, konditioniertes Medium von Huh7-Zellen, die mit Chemerin transfiziert wurden, auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand bei -20° C aufbewahrt.

#### **2.2.1.6 Zytotoxizitäts-Assay**

Um die Zytotoxizität einer bestimmten Behandlung der Zellen zu bestimmen, wurde ein Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay durchgeführt; dafür wurde das Cytotoxicity Detection Kit verwendet. Die LDH wurde im Zellüberstand noch vor dem ersten Einfrieren gemessen, um eine akkurate Messung der Enzymaktivität zu gewährleisten, welche durch Einfrieren vermindert werden könnte. Dazu wurde der Zellkulturüberstand in einer Doppelbestimmung 1:10 im 96-Well mit serumfreiem DMEM verdünnt. Zusätzlich diente serumfreies DMEM als Hintergrundkontrolle (= Blank). Das Detektionsreagenz wurde nach Herstellerangaben verdünnt und in die Wells pipettiert. Der Assay wurde für bis zu 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und die Absorption mit einer Wellenlänge von 490 nm im Plattenreader gemessen.



### **2.2.1.7 MTT-Assay zur Messung der Zellviabilität**

Um die Zellviabilität von mit Chemerin-Isoformen transfizierten Zellen zu untersuchen, wurde ein Assay ausgewählt, der auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu unlöslichen violetten Formazankristallen basiert. Die Kristalle wurden dadurch gelöst und die violette Farbe konnte bei 570 nm kolorimetrisch gemessen werden [125]. Die Reduktion findet nur in wachsenden bzw. aktiven Zellen statt [13].

Es wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro 96-Well ausgesät, transfiziert und nach 48 h wurde der MTT-Assay nach Herstellerangaben angewandt. Die Inkubationszeit mit der Solubilization Solution betrug 18 h.

### **2.2.1.8 Bestimmung der Proliferation von Zelllinien anhand der Zellzahl**

Um die Proliferation von mit Chemerin-Isoformen transfizierten Zellen zu beurteilen, wurde 1, 2 und 3 Tage nach Transfektion die Zellzahl dokumentiert. Am Tag der Messung wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 200  $\mu$ l Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und diese für 5 min bei 37° C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 800  $\mu$ l serumhaltiges Medium hinzugegeben, um das Ablösen zu stoppen. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500  $\mu$ l PBS mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Mit dem Countess™ II FL Automated Cell Counter wurde die Anzahl der lebenden und der toten Zellen ermittelt.

### **2.2.1.9 Migrations-Assay**

Für die Untersuchung der Migration wurde die Scratch-Methode angewandt. Unmittelbar nach der Transfektion der Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 wurde mit einer sterilen 100  $\mu$ l-Pipettenspitze in der Mitte des Wells (24-Well-Platte) eine Linie in die Monolayer gezogen, um die Zellen zu separieren. Danach wurde jeweils am selben Tag, 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion die Migration der Zellen in Richtung Scratch fotografisch dokumentiert. Die Fotos wurden mit dem MRI Wound Healing Tool Plug-In für ImageJ ausgewertet.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Klonierung in Genexpressionsvektoren

#### 2.2.2.1.1 RT-PCR

Um mittels reverser Transkription cDNA mit einem RNA-Template herzustellen, wurde das Reverse Transcription System verwendet. Die RNA wurde mit den Komponenten für die RT-PCR wie nachfolgend aufgelistet vermischt.

MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 µl
dNTPs Mixture 10 mM	4 µl
Reverse Transcription Buffer 10x	4 µl
Random Primer (500 µg/ml)	1 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
AMV Reverse Transcriptase (High Conc.)	1 µl
RNA	1 µg
H <sub>2</sub> O Nuclease-frei	ad 40 µl

Für die Herstellung der Standards für die Standardkurve wurden 8 x 1 µg RNA der zu testenden Proben miteinander kombiniert und mit vierfachem RT-PCR-Mix vermischt. Anschließend wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe erstellt.

Der Mix wurde 1 Stunde bei 42° C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 95° C für 5 min gestoppt, auf Eis abgekühlt und die cDNA bei -20° C gelagert.

### 2.2.2.1.2 PCR zur Amplifikation des Gene of Interest (GOI)

Der Mix für die PCR wurde wie in der nachfolgenden Tabelle gezeigt zusammengesetzt.

	<b>kleiner Ansatz (analytisch)</b>	<b>großer Ansatz (quantitativ)</b>
Q5® Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	12,5 µl	50 µl
Primer forward 10 µM	1,25 µl	5 µl
Primer reverse 10 µM	1,25 µl	5 µl
Template cDNA	200 ng	400 ng
RNAse-freies H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	ad 100 µl

PCR-Programm für den Gradient Cycler mit einem Temperaturgradienten beim Annealing:

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Initialisierung	98°	30 s
Denaturierung	98° C	10 s
Annealing	69° C	30 s
Elongation	72° C	30 s (35x)
Final Elongation	72° C	120 s
Abkühlung	4° C	

### 2.2.2.1.3 Reinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR wurden die Inserts mit dem MinElute PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt um sie für die weitere Klonierung verwenden zu können.

#### 2.2.2.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um Vektor-DNA und Insert-DNA miteinander kompatibel zu machen, wurden die Enden der DNA mit demselben Enzym geschnitten, sodass Sticky-Ends entstanden.

DNA	1 µg
CutSmart®-Buffer	2 µl
HindIII	1 µl
SacII	1 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Komponenten wurden miteinander vermischt und für 1 h bei 37° C inkubiert. Die DNAs wurden anschließend mit dem MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt.

#### 2.2.2.1.5 Ligation von Vektoren

Für die Ligation von Vektor mit Insert wurde die T4 DNA Ligase und der zugehörige Puffer von New England Biolabs verwendet. Das Protokoll stammte ebenfalls von diesem Hersteller.

T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
Vektor-DNA	x µl*
Insert-DNA	y µl*
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

\*Für die Berechnung der einzusetzenden Vektor-DNA und Insert-DNA wurde der New England Biolabs Ligation Calculator verwendet.

Alle Komponenten wurden miteinander vermischt. Der Ligationsansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert. Mittels Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65° C wurde die Reaktion gestoppt.

#### **2.2.2.1.6 Heat-Shock-Transformation von *E. coli***

Um Plasmid-DNA in *E. coli* einzubringen wurde die Heat-Shock-Transformation angewandt. Dazu wurden NEB5-alpha Competent *E. coli* für 10 min auf Eis aufgetaut. Es wurden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 5 µl gereinigtes Plasmid auf die Zellen gegeben, mit ihnen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 - 45 s auf 42° C erhitzt, um die Membran kurzfristig zu permeabilisieren und dem Plasmid den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 900 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen bei 37° C für eine Stunde geschüttelt. Von der Zellsuspension wurden eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 100 µl auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und üN bei 37° C inkubiert.

#### **2.2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Zur Herstellung eines Agarosegels (1 %) wurde 150 ml TAE-Puffer (1x) mit 1,5 g Agarose vermischt, in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose auflöste und die Flüssigkeit klar wurde. Diese wurde anschließend etwas abgekühlt und Roti®-GelStain in einer 1:20000 Verdünnung hinzugegeben. Die Mischung wurde in eine Agarosegel-Gussform gegeben, ein Kamm für die Geltaschen eingesteckt und bei RT für etwa 20 min ausgehärtet. Danach wurde das Gel in die Laufkammer gelegt und die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit Gel Loading Dye verdünnt und in die Geltaschen pipettiert. Die Proben liefen für 40 min bei 90 Volt durch das Gel. Die Banden wurden unter Verwendung des ChemiDoc™ XRS+ System unter UV-Licht detektiert.

#### **2.2.2.1.8 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel**

Nach dem Ausschneiden der DNA-Banden aus dem Agarosegel unter UV-Licht wurden die Gelstücke in 2 ml Tubes gesammelt und die DNA mit dem MinElute Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert.

#### **2.2.2.1.9 DNA-Isolierung aus *E. coli***

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin gewachsene Kolonie in 40 ml LB-Medium transferiert, Ampicillin hinzugegeben und üN bei 37° C geschüttelt. Das Medium wurde auf zehn 2 ml Tubes verteilt und 1 min bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde mit dem restlichen Medium wiederholt. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAPrep Spin MiniPrep Kits nach Herstellerangaben isoliert und die 10 Elutionen zum Schluss gepoolt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer gemessen.

#### **2.2.2.1.10 Messung der DNA-/RNA-Konzentration und Reinheit**

Mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer wurden DNA- und RNA-Konzentrationen nach Isolierung aus Zelllinien gemessen. Dazu wurde 1 µl Elutionspuffer bzw. RNase-freies H<sub>2</sub>O als Hintergrundkontrolle verwendet. Je Probe wurde 1 µl gemessen. Die Reinheit der DNA bzw. RNA wurde mittels 260/280-Ratio ermittelt.

#### **2.2.2.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma ThermoFisher Scientific durchgeführt. Ein Alignment zur Überprüfung der Sequenzen wurde mit dem Online-Tool von Emboss-Needle durchgeführt. Zur Konvertierung der Reverse-Sequenz wurde das Online-Tool RevComp verwendet.

#### **2.2.2.2 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen: zum RLT-Puffer wurde pro ml Puffer 10 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt, um RNasen zu deaktivieren. Davon wurden 500 µl statt der empfohlenen 350 µl auf jedes Well gegeben. Nach Zuga-

be des RNase-freien H<sub>2</sub>O zur Elution wurde dieses 5 min inkubiert bevor die RNA eluiert wurde.

### 2.2.2.3 Semi-quantitative Real-Time-PCR

Nachdem die RNA aus Zelllinien isoliert und die cDNA mittels RT-PCR hergestellt wurde, wurde zur Quantifizierung der relativen mRNA-Expression des GOI eine semi-quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Dazu wurden die Komponenten wie folgt zusammengefügt.

Primer-Mix:

H <sub>2</sub> O RNase-frei	45 µl
Primer forward (10 µM)	2,5 µl
Primer reverse (10 µM)	2,5 µl

qPCR-Mix:

H <sub>2</sub> O RNase-frei	11,6 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl
Primer-Mix	2 µl
LC-Mix	2 µl
cDNA	2 µl

Neben dem MgCl<sub>2</sub> und dem RNase-freien H<sub>2</sub>O stammte auch der LC-Mix aus dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit und wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Bei jeder semi-quantitativen Real-Time-PCR wurde zusätzlich zu den Proben eine Verdünnungsreihe des Standards und eine Negativkontrolle mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O statt cDNA getestet. Die Standard-cDNA wurde aus einem Mix aus 8 verschiedenen RNA-Samples des zu messenden Datensets hergestellt.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Um die Zellen für die Proteinisolierung zu ernten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 500 µl kaltes PBS mit Protease-Inhibitoren in die einzelnen Wells gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst, im PBS resuspendiert und zuerst bei 4° C für 5 min bei 4000 rpm und anschließend 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 30 - 50 µl RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Ultraschall-Homogenisator für 10 s bei einer Amplitudeneinstellung von 20 % aufgeschlossen. Zum Schluss wurde das Lysat bei 4000 rpm und 4° C für 5 min zentrifugiert und der Überstand bei -20° C eingefroren.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Gesamtprotein

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Zelllysate, aber auch nach einer Immunpräzipitation wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Für eine Dreifachbestimmung wurde das Lysat zunächst 1:10 in PBS verdünnt. Der Albumin-Standard wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe ebenfalls in PBS verdünnt. Als Hintergrundkontrolle diente PBS. Das Detektionsreagenz wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und dem Lysat beigegeben. Der Assay wurde für 30 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 540 nm im Plattenreader gemessen.

### 2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dafür wurden 20 µg Proteinlysate mit Lämmli-Puffer auf Eis gemischt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Proben wurden 5 min bei 95° C gekocht, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurde ein Polyacrylamid-Gel hergestellt. Hierfür wurde das Set Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems verwendet.



Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels:

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Gel-Mix	6 ml	2 ml
APS	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	18 $\mu$ l	6 $\mu$ l

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach ca. 15 min war das Gel polymerisiert. Das 2-Propanol wurde entfernt, die Mischung für das Sammelgel hinzugegeben und die Kämme für 10 bzw. 15 Taschen eingesteckt. Nach weiteren 15 min war das Sammelgel polymerisiert und das Gel konnte nach Entfernung des Kamms und dem Absaugen von Gel-Resten aus den Taschen mit einer Kanüle für die SDS-PAGE verwendet werden. Die Proben und der Proteinstandard (5  $\mu$ l) wurden in die Geltaschen pipettiert und das Gel wurde in eine Laufkammer gegeben, die an ein Power Supply angeschlossen war. Die Kammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und die Proben wurden bei 25 mA pro Gel für ca. 70 min aufgetrennt.

### **2.2.3.4 Western Blot zur Protein-Detektion**

Für die spezifische, indirekte Detektion von Proteinen wurde der Western Blot angewandt. Dafür wurden nach Auftrennung des Gesamtproteins in einer SDS-PAGE die Proteine mittels Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen, anschließend für den indirekten Nachweis mit spezifischen Antikörpern inkubiert und über Chemilumineszenz detektiert. Zum Blotting wurde das Mini Trans-Blot® Cell Set benutzt.

Zunächst wurde das Gel auf eine zuvor für 1 min in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und zwischen Filterpapieren und Schwämmen eingeschlossen in eine Blotting-Kassette gegeben. Diese wurde gemeinsam mit einer Kühleinheit in eine Transferkammer gegeben, welche mit Transferpuffer aufgefüllt wurde. Die Elektrophorese wurde bei 80 Volt für 90 min durchgeführt. Danach wurde die Membran für 1 h in Blocking-Puffer gegeben, um proteinfreie Membranbereiche abzusättigen und so unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden. Die Membran wurde viermal für 15 min in TBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper wurde nach Herstellerangaben in Antikörperlösung verdünnt, auf die Membran ge-

geben und üN bei 4° C auf einem Orbital-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgenommen und die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen. Danach wurde der sekundäre, HRP-konjugierte Antikörper in Blocking-Puffer 1:5000 verdünnt und die Membran damit für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und danach zweimal für 5 min in TBS. Dann wurde die Membran zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt. Auf die Membran wurden die Reagenzien des Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kits nach Herstellerangaben gegeben, durch Bedecken der Membran mit der Folie verteilt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Dadurch wurde eine durch HRP katalysierte chemische Reaktion ausgelöst, die in Chemilumineszenz resultierte. Diese wurde mit dem ChemiDoc™ XRS+ System detektiert.

### **2.2.3.5 Coomassie-Färbung eines Western Blots**

Für die Färbung des Gesamtproteins auf einem Western Blot wurde die PVDF-Membran für 30 min in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und die Membran in voll entsalztem Wasser gewaschen, bis die gewünschte Entfärbung erreicht war. Mit dem ChemiDoc™ XRS+ System wurde der Blot dokumentiert.

### **2.2.3.6 Immunpräzipitation von Chemerin**

Um das rekombinante Chemerin aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Für die Präzipitation wurde das Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 2000 µg Protein eingesetzt. Für die Präzipitation der humanen Chemerin-Isoformen wurde der humane Chemerin-Antikörper AF2324 von R&D Systems verwendet, für die der murinen Chemerin-Isoformen der murine Chemerin-Antikörper AF2325. Das präzipitierte Chemerin wurde mittels Protein-Detektion im Western Blot nachgewiesen.

### **2.2.3.7 ELISA**

Alle DuoSet® ELISA Development Systems wurden nach Herstellerangaben verwendet mit Ausnahme der Verdünnung des Standardproteins: dieses wurde nicht 1:2 sondern 1:2,5 verdünnt.

### **2.2.3.8 Zytokin-Array**

Die Proteome Profiler Human/Mouse XL Cytokine Array Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 500 µl Zellkulturüberstand zur Untersuchung verwendet. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde mit dem ChemiDoc™ XRS+ System detektiert. Die densitometrische Auswertung wurde mit der ImageJ-Software und dem Protein Array Analyzer Plug-In durchgeführt.

### **2.2.3.9 Massenspektrometrische Analyse von Lipiden im Lysat von Zelllinien**

Um die Lipid-Zusammensetzung in mit Vektoren zur Expression von Chemerin transfizierten Hepatom-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit 0,5 ml 0,2 % SDS-Lösung je 6-Well lysiert. Danach wurden die Wells mit je 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O gespült und dieser Milliliter pro Probe bei -20° C eingefroren.

Nach Ultraschall-Homogenisierung und der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden die Lipide von Herrn PD Dr. Gerhard Liebisch, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, massenspektrometrisch untersucht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf Hepatom-Zelllinien

#### 3.1.1 Klonierung der Chemerin-Isoformen

Zur Untersuchung der physiologischen Funktionen von Chemerin in Hepatom-Zelllinien wurden Chemerin-Isoformen mit Hilfe geeigneter Expressionsvektoren in humanen und murinen Zelllinien überexprimiert. Es wurden vier humane Chemerin-Isoformen kloniert: Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 und Chemerin-155. Außerdem wurden die jeweiligen murinen homologen Isoformen kloniert: Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 und Chemerin-154.

Dazu wurde der Vektor pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> von Invitrogen verwendet (Abb. 2). Das Insert wurde jeweils über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen HindIII und SacII eingefügt.

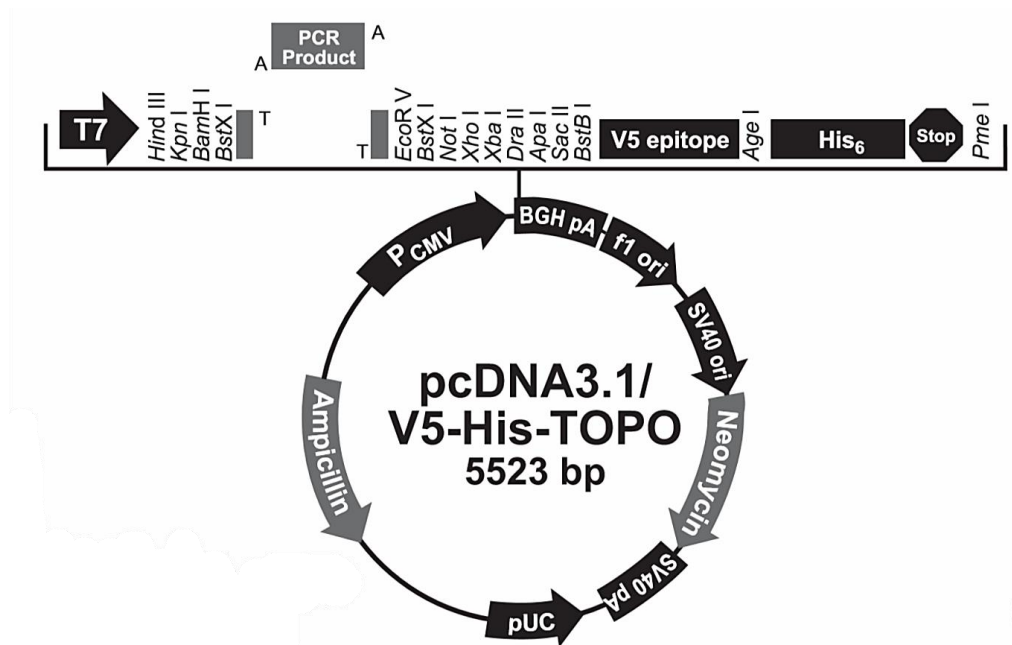


Abb. 2 Plasmidkarte von pcDNA3.1/V5-His-TOPO [83].

Die Aminosäure- und DNA-Sequenzen der humanen und murinen Chemerin-Isoformen sind nachfolgend aufgelistet (Abb. 3).

### Chemerin human

#### Aminosäure-Sequenz

Signalpeptid  
 MRRLLIPLALWLGAVGVGVA|ELTEAQRRLQVALEEFHKHPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVRLEFKLQQTSCRKRDWKKPECKVRPNGR  
 KRKCLACIKLGSSEKVLGRLVHCPJETQVLRREAEHQETQCLRVQRAGEDPHSFYFPGQFA|F|S|KALPRS

#### DNA-Sequenz

DNA-Sequenz für das Signalpeptid

ATGCGACGGCTGCTGATCCCTCTGGCCCTGTGGCTGGGTGCGGTGGGCGTGGGCGTCGCCGAG|CTCACGGAAGCCCAGCGCCGGGGCCT  
 GCAGTGGCCCTGGAGGAATTTACAAGCACCCGCCCTGCAGTGGGCCTTCCAGGAGACCAGTGTGGAGAGCGCCGTGGACACGCCCTT  
 CCCAGTGGAAATTTGTGAGGCTGGAATTTAAGCTGCAGCAGACAAGCTGCCGGAAGAGGGACTGGAAGAAACCCGAGTGCAAAGTCAG  
 GCCCAATGGGAGGAAACGAAATGCCTGGCCTGCATCAAACCTGGGCTCTGAGGACAAAAGTTCTGGGCCGGTTGGTCCACTGCCCCATAGAG  
 ACCCAAGTTCTGCGGGAGGCTGAGGAGCACCAGGAGACCCAGTGCCTCAGGGTGCAGCGGGCTGGTGGAGGACCCCCACAGCTTCTACTTC  
 CCTGGACAGTTCCGCTTTC|TCC|AAGGCCCTGCCCGCAGCTAA

↑   ↑   ↑   ↑  
 155 156 157   163

### Chemerin murin

#### Aminosäure-Sequenz

Signalpeptid  
 MKCLLISLALWLGTVGTRGT|EPELSETQRRSLQVALEEFHKHPPVQLAFQEIGVDRAEEVLFSAGTFVRLEFKLQQTNCPKKDWKKPECTIKPNGR  
 RRKCLACIKMDPKGKILGRIVHCPILKQGPQDPQELQCIIAQAGEDPHGYFLPGQFA|F|S|RALRTK

#### DNA-Sequenz

DNA-Sequenz für das Signalpeptid

ATGAAGTGCTTGCTGATCTCCCTAGCCCTATGGCTGGGCACAGTGGGCACACGTGGGACAGAG|CCCGAACTCAGCGAGACCCAGCGCAGG  
 AGCCTACAGGTGGCTCTGGAGGAGTTCCACAAACACCCACCTGTGCAGTTGGCCTTCCAAGAGATCGGTGTGGACAGAGCTGAAGAAGTG  
 CTCTTCTCAGCTGGCACCTTTGTGAGGTTGGAATTTAAGCTCCAGCAGACCAACTGCCCAAGAAGGACTGGAAAAAGCCGGAGTGACAAA  
 TCAAACCAAACGGGAGAAGGCGGAAATGCCTGGCCTGCATTAATGACCCCAAGGGTAAATTTAGGCGCGATAGTCCACTGCCCAATT  
 CTGAAGCAAGGGCCTCAGGATCCTCAGGAGTTGCAATGCATTAAGATAGCACAGGCTGGCGAAGACCCCCACGGCTACTTCTACTCTGGAC  
 AGTTTGCC|TTC|TCC|AGGGCCCTGAGAACCAATAA

↑   ↑   ↑   ↑  
 154 155 156   162

Abb. 3 Aminosäure- und DNA-Sequenzen der humanen und murinen Chemerin-Isoformen.

Im Anschluss an die inserierten DNA-Sequenzen folgt bei jedem Konstrukt das Stopcodon TAA. Dies führte dazu, dass die im Vektor zu Verfügung stehenden Sequenzen für das V5-Epitop und für einen Histidin-Tag nicht translatiert wurden, da nach TAA die Translation abbricht. Ein C-terminaler Tag wurde als nicht sinnvoll erachtet, um die Funktion der Chemerin-Isoformen *in vitro* zu untersuchen, da die unterschiedlichen physiologischen Effekte der

Chemerin-Isoformen durch den jeweiligen C-Terminus des Proteins bestimmt werden [27, 181, 188].

### **3.1.2 Expression von Chemerin in Hepatom-Zelllinien nach Transfektion mit rekombinanten Plasmiden**

#### **3.1.2.1 Evaluation der Spezifität von Chemerin-Antikörpern**

Um herauszufinden, welcher humane Antikörper sich für den Nachweis von humanem Chemerin eignet, wurden drei verschiedene Antikörper getestet. Ein monoklonaler (MAB2324, R&D Systems) und zwei polyklonale Antikörper von Abcam (ab72965) bzw. R&D Systems (AF2324). Alle drei Antikörper sind  $\alpha$ -Chemerin-Antikörper und detektieren laut Angaben der Hersteller alle Chemerin-Isoformen.

Die Zelllysate der mit den Vektoren zur Expression der Chemerin-Isoformen transfizierten HepG2-Zelllinie wurden in der Western Blot Analyse untersucht. Hierfür wurden drei Western Blots mit jeweils identischen Zelllysaten erstellt und diese jeweils mit einem der drei Chemerin-Antikörper inkubiert (Abb. 4).

Schon nach kurzer Belichtungszeit ( $\leq 10$  s) konnte das Signal des polyklonalen Chemerin-Antikörpers von R&D Systems bei 18 kDa detektiert werden. In den Kontroll-transfizierten Zellen wurde Chemerin kaum exprimiert, während in den Zellen, die mit den humanen rekombinanten Chemerin-Plasmiden transfiziert wurden, ein Signal deutlich erkennbar war. Das Signal war hier 30-mal bis über 44-mal stärker als in der Kontrolle (Tabelle 17). Dies lässt darauf schließen, dass der Antikörper spezifisch für Chemerin ist.

Im Gegensatz dazu konnte mit dem Chemerin-Antikörper von Abcam kein Unterschied zwischen den Kontroll-transfizierten und Chemerin-transfizierten Zellen bezüglich der Intensität der Chemilumineszenz nachgewiesen werden: Chemerin schien in allen Zellen gleich stark exprimiert zu sein. In den Chemerin-Proben war das Signal nur zwischen 80 - 170 % erhöht. Daraus kann geschlossen werden, dass der Antikörper ab72965 (zumindest unter den hier gewählten Versuchsbedingungen) nicht spezifisch mit Chemerin reagiert.

Der monoklonale Chemerin-Antikörper von R&D Systems (MAB2324) zeigte ebenfalls nur einen kleinen Unterschied zwischen den Expressionsstärken von Chemerin in der Kontrolle (hier wurden die Zellen mit dem Vektor ohne Insertion transfiziert) und in den Chemerin-Überexpressionen. Außerdem wurde das Signal erst nach langer Belichtungszeit von über 10 min sichtbar. Auch dieser Antikörper wurde als wenig geeignet eingestuft.

Als Resultat dieser Untersuchung wurde in weiteren Versuchen wie Western Blot und Immunpräzipitation der polyklonale Chemerin-Antikörper (AF2324) verwendet.

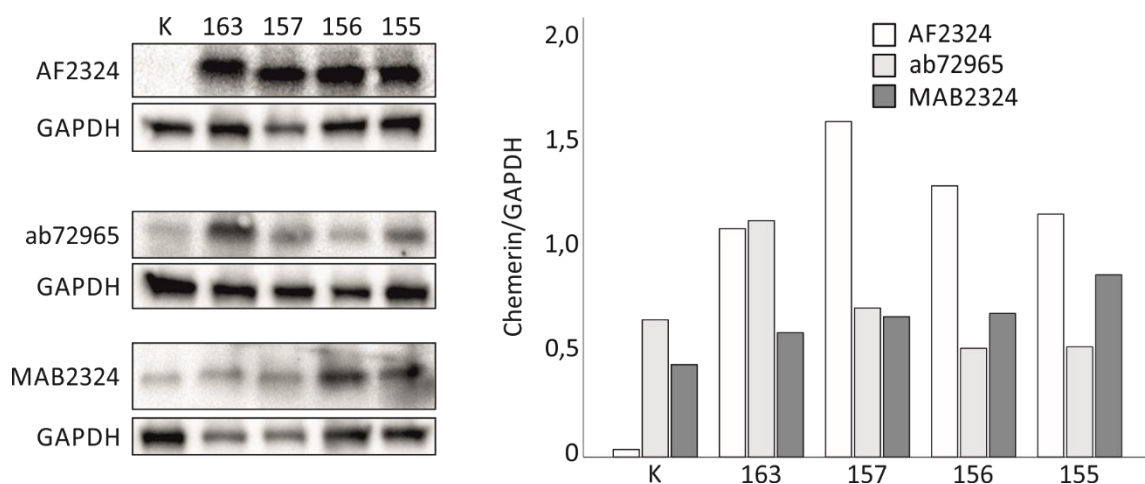


Abb. 4 Test der Spezifität von drei verschiedenen humanen Chemerin-Antikörpern mittels Western Blot von Lysaten von HepG2-Zellen, die die Chemerin-Isoformen exprimierten.

Tabelle 17 Expression der rekombinanten Chemerin-Isoformen in HepG2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Chemerin-Isoformen	AF2324	ab72965	MAB2324
163	30,2	1,2	1,3
157	44,4	1,1	1,5
156	35,9	0,8	1,6
155	32,1	0,8	2,0

Die Expression der rekombinanten humanen Chemerin-Isoformen im Vergleich zur Kontrolle wurde mit drei verschiedenen Chemerin-Antikörpern in HepG2-Zellen nachgewiesen (n = 2). Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten.

Um murines Chemerin in der Western Blot Analyse zu detektieren und in der Immunpräzipitation zu isolieren, wurde der polyklonale Chemerin-Antikörper (AF2325) von R&D Systems eingesetzt. Ein Nachweis für die Spezifität dieses Antikörpers wurde in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe erbracht und in dieser Arbeit durch den Nachweis von Chemerin-Isoformen in transfizierten Hepa1-6-Zellen bestätigt (Abb. 5).

### **3.1.2.2 Vergleich der Protein-Expressionen von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien**

Neben dem Nachweis der Überexpression von Chemerin in der HepG2-Zelllinie wurde auch die humane Hepatom-Zelllinie Huh7 und die murine Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 diesbezüglich untersucht. Sie wurden mit den Vektoren zur Expression rekombinanter humaner bzw. muriner Chemerin-Isoformen transfiziert und die Expression von Chemerin im Zelllysate mittels Western Blot nachgewiesen.

In allen drei Zelllinien konnte ein deutlicher Unterschied zwischen der Chemerin-Expression der Kontrollen und den Chemerin-Transfektionen gezeigt werden (Abb. 5). In HepG2-Zellen war die Expression von Chemerin nach Transfektion mit den Vektoren zur Überexpression von Chemerin-163 ( $p = 3,2 \times 10^{-5}$ ), Chemerin-157 ( $p = 1,2 \times 10^{-7}$ ), Chemerin-156 ( $p = 2 \times 10^{-6}$ ) und Chemerin-155 ( $p = 7,6 \times 10^{-8}$ ) im Vergleich zur Expression des endogenen Chemerins in den Kontroll-transfizierten Zellen signifikant erhöht (Abb. 5 A).

In Huh7-Zellen war die Chemerin-Expression ebenfalls deutlich erhöht, jedoch ist nur die Expression in den Chemerin-157 synthetisierenden Zellen gegenüber den Kontrollen signifikant ( $p = 5,38 \times 10^{-4}$ ) (Abb. 5 B).

In der humanen Hepatom-Zelllinie Hep3B wurde ebenfalls eine Überexpression von rekombinanten Chemerin-Isoformen im Zelllysate nach Transfektion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In Hepa1-6-Zellen war die Chemerin-Konzentration im Lysate nach der Expression der Isoformen Chemerin-162 ( $p = 0,011$ ), Chemerin-156 ( $p = 0,003$ ) und Chemerin-155 ( $p = 0,004$ ) signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen. Bei Chemerin-154 verhielt es sich ähnlich, wenn auch der Unterschied nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle war (Abb. 5 C). Zu-



dem war Chemerin nach der Expression von Chemerin-162 signifikant geringer als nach der Expression von Chemerin-156 bzw. Chemerin-155.

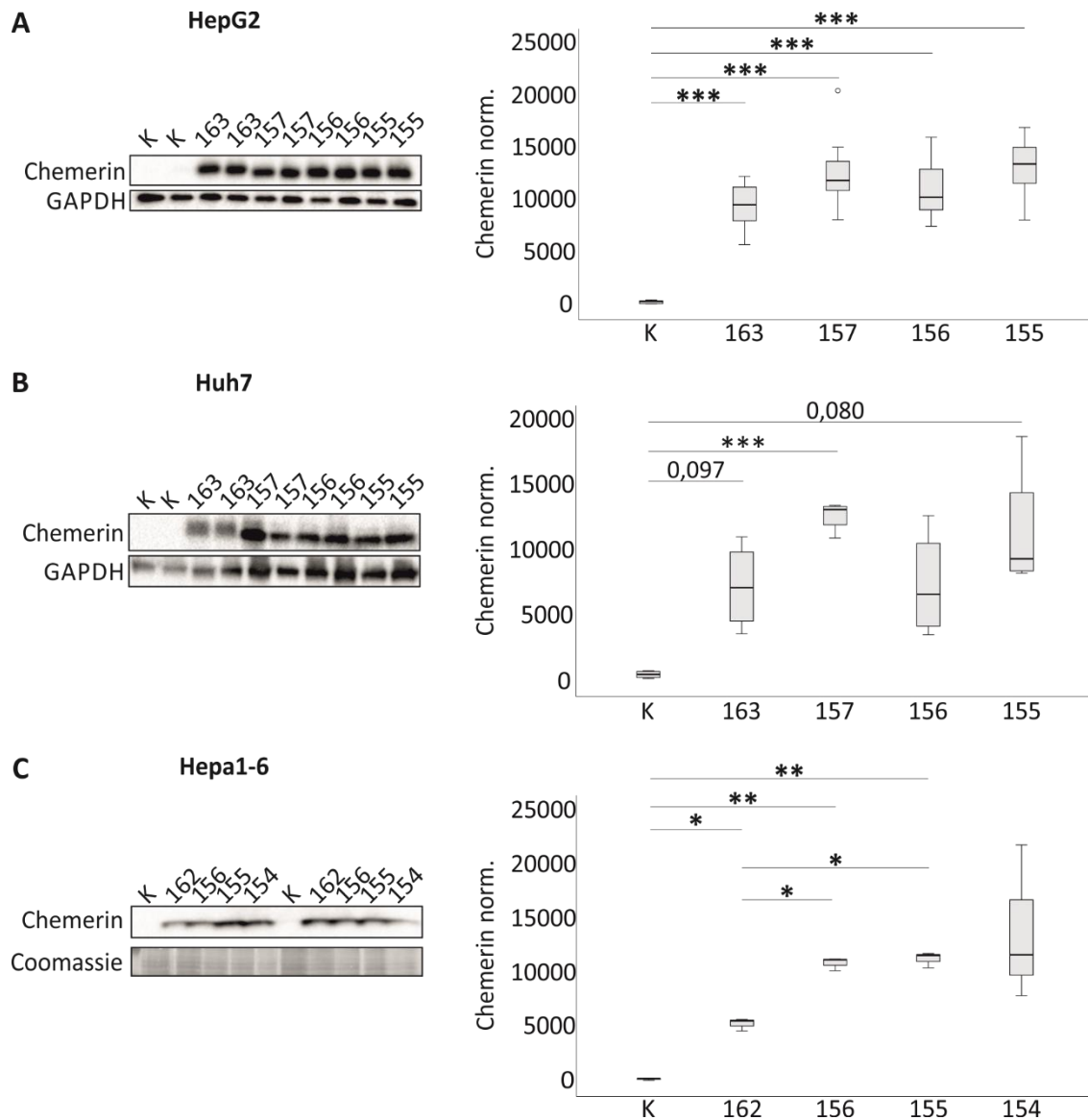


Abb. 5 Chemerin-Expression im Zelllysats humaner und muriner Hepatom-Zelllinien. (A) HepG2-Zellen (n = 6 - 7), (B) Huh7-Zellen (n = 4) und (C) Hepa1-6-Zellen (n = 3). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

Im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien wurde lösliches Chemerin nach Überexpression der Isoformen mittels ELISA nachgewiesen. Diese Assays konnten nicht zwischen ver-

schiedenen Chemerin-Isoformen unterscheiden. Es wurde hier die Gesamtkonzentration von Chemerin gemessen.

In den Zellkulturüberständen der Kontroll-transfizierten Zellen konnte Chemerin nicht detektiert werden, da die Chemerin-Konzentration in den Kontrollen in der jeweiligen Verdünnung zu gering war. Die Konzentration des niedrigsten Standards des ELISA-Kits lag bei 20,48 pg/ml (human) bzw. 4,10 pg/ml (murin). Wenn die Verdünnung der eingesetzten Proben herausgerechnet wurde, ergab sich als Detektionsgrenze 7,2 ng/ml (HepG2-Zellen), 1,0 ng/ml (Huh7-Zellen) und 8,2 ng/ml (Hepa1-6-Zellen). Nach Berücksichtigung der Verdünnung ergab sich in den Chemerin-transfizierten Zellen eine mindestens 11,5-fache Steigerung von Chemerin in HepG2-Zellen, eine mindestens 15-fache Steigerung in Huh7-Zellen und eine mindestens 36-fache Steigerung in Hepa1-6-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Konzentration von Chemerin im Zellkulturüberstand unterschied sich in den humanen Zelllinien HepG2 und Huh7 nach Transfektion mit den verschiedenen Isoformen nicht (Abb. 6 A, B). In HepG2-Zellen spiegeln die Konzentrationen im Zellkulturüberstand die Mengenverhältnisse von Chemerin im Lysat wider. In Huh7-Zellen ist Chemerin nach Expression der Isoform Chemerin-157 sowohl im Lysat als auch im Zellüberstand am stärksten exprimiert. Jedoch weicht dessen Konzentration dort nicht signifikant von denen der anderen Isoformen ab.

In der murinen Zelllinie Hepa1-6 zeigte sich, wie auch im Lysat, eine etwas geringere Expression nach Transfektion mit Chemerin-162 als mit den anderen Isoformen (Abb. 6 C).

Insgesamt verhalten sich die Konzentrationen von Chemerin im Lysat und im Zellkulturüberstand innerhalb einer Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle ähnlich. Dennoch sind leichte Differenzen in der Chemerin-Expression zwischen den Zelllinien zu verzeichnen.

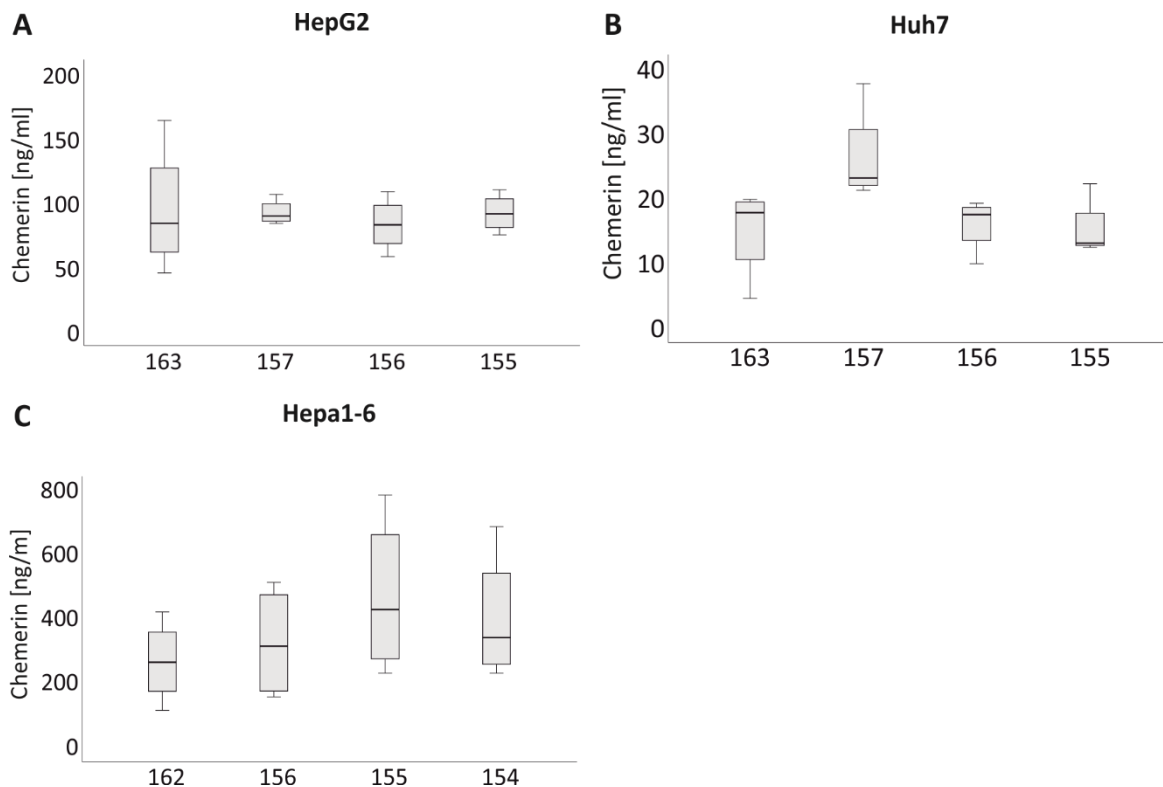


Abb. 6 Chemerin im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien (A) HepG2, (B) Huh7 und (C) Hepa1-6 nach Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. Die Zahlen in der Abbildung stellen p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### 3.1.2.3 Vergleich der mRNA-Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien

Mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR wurden die mRNA-Expressionen der Chemerin-Isoformen miteinander verglichen. Es wurden sowohl die mRNA des endogenen als auch des rekombinanten Chemerins mit denselben Primern amplifiziert.

Zwischen den vier Chemerin-Isoformen und auch verglichen mit der Kontrolle zeigte sich in der humanen Zelllinie HepG2 (Abb. 7 A) und der murinen Hepa1-6-Zelllinie (Abb. 7 C) zwar kein signifikanter Unterschied bezüglich der mRNA-Expressionsstärke, dennoch ist eine stark erhöhte Expression nach Transfektion zu erkennen. Die Werte der Chemerin-Isoformen-mRNA liegen bei HepG2-Zellen im Mittel zwischen 0,65 - 0,86 in Bezug auf die 18S rRNA,

während der Wert der Kontrolle bei 0,00 liegt. Bei Hepa1-6-Zellen liegen die Werte bei 0,70-1,54 und die Kontrolle ebenfalls bei 0,00.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dagegen in der humanen Huh7-Zelllinie: sie exprimierte nach Transfektion mit dem humanen Vektor zur Expression von Chemerin-156 signifikant ( $p = 0,046$ ) mehr Chemerin als nach Transfektion mit dem Kontrollplasmid. Bei den anderen Isoformen war ebenfalls eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle zu sehen (Abb. 7 B).

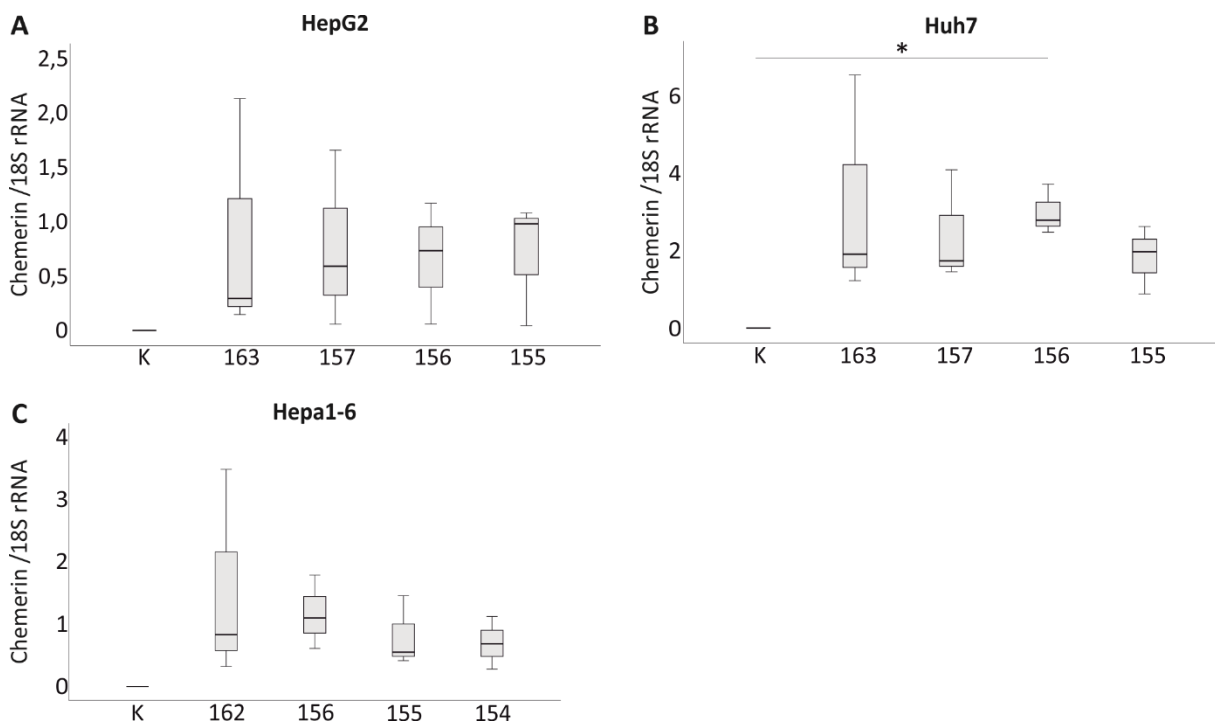


Abb. 7 mRNA-Expression von Chemerin, normalisiert mit 18S rRNA, in den Hepatom-Zelllinien (A) HepG2 ( $n = 3$ ), (B) Huh7 ( $n = 3$ ) und (C) Hepa1-6 ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ .

### **3.1.3 Zytotoxizität von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien**

Im Folgenden wurde die Zytotoxizität der Expression von rekombinanten aktiven und inaktiven Chemerin-Isoformen in den Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7, Hep3B und Hepa1-6 untersucht. Hierfür wurde der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Assay durchgeführt, mit dem die Zellschädigung quantifiziert werden konnte. Die LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde 48 h nach der Transfektion der Zelllinien mit den rekombinanten Chemerin-Plasmiden gemessen.

Bei keiner der vier Zelllinien zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen und auch nicht im Vergleich zur Kontroll-Transfektion (Abb. 8). Lediglich in der humanen Hep3B-Zelllinie wurde eine leicht erhöhte Zellschädigung nach Transfektion mit Chemerin-155 im Vergleich zur Überexpression von Chemerin-163 gemessen (Abb. 8 C).

Die rekombinanten Chemerin-Isoformen hatten offenbar keinen Einfluss auf die Zellschädigung. Chemerin wirkte somit nicht zytotoxisch auf diese Hepatom-Zelllinien.

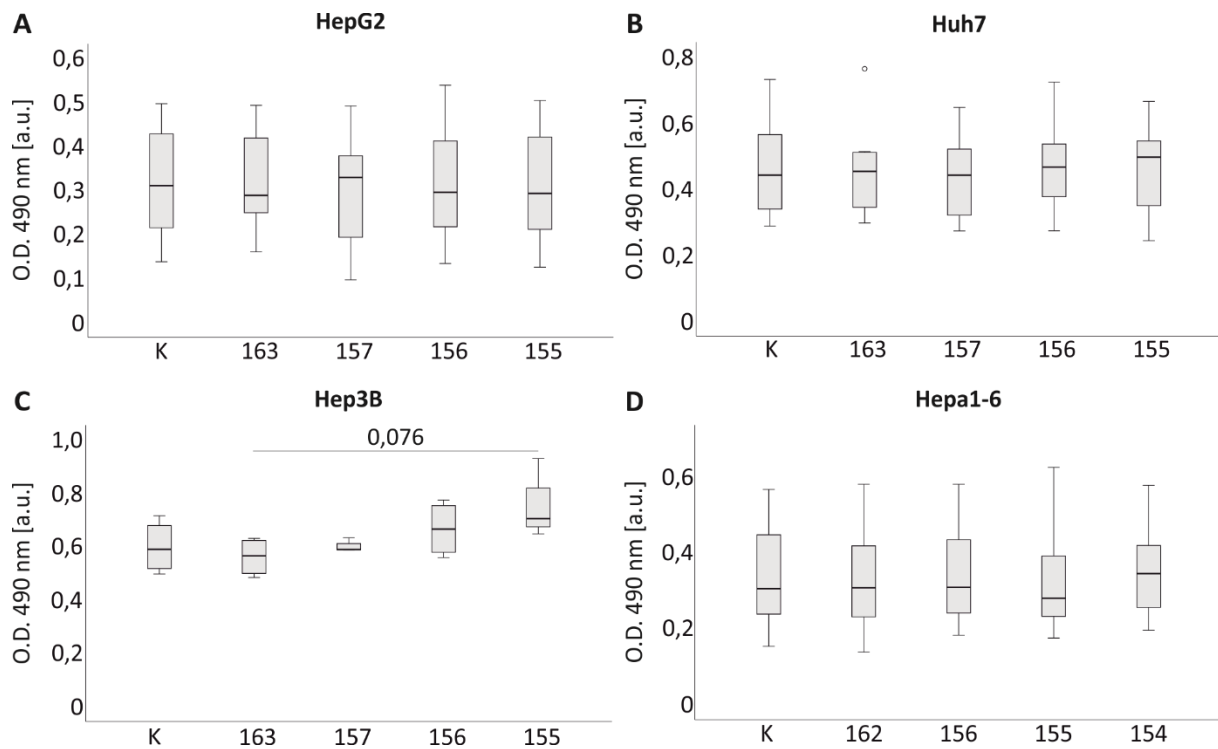


Abb. 8 O. D.-Werte der LDH-Messung in den Zellkulturüberständen der humanen Hepatom-Zelllinien 48 h nach Transfektion (A) HepG2 (n = 13), (B) Huh7 (n = 12), (C) Hep3B (n = 4) und der murinen Hepatom-Zelllinie (D) Hepa1-6 (n = 13). a. u.: arbitrary unit, K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. Die Zahl in der Abbildung stellt den p-Wert nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### **3.1.4 Regulation der Proliferation und Zellviabilität von Hepatom-Zelllinien durch rekombinante Chemerin-Isoformen**

In verschiedenen Studien wurde die Regulation der Zellproliferation durch Chemerin beschrieben: in der Myoblastenzelllinie C2C12 wurde durch Chemerin die Zellproliferation gefördert [187]. Auch in glatten Muskelzellen steigerte Chemerin die Proliferation [102]. Dagegen gibt es auch Untersuchungen, die zeigten, dass Chemerin die Proliferation in den humanen Hepatom-Zelllinien 7404 und PVTT-1 nicht beeinflusste [107]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Chemerin in den Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 auf die Zellproliferation und -viabilität wirkt und ob sich die Chemerin-Isoformen in ihrer Aktivität diesbezüglich unterscheiden.

#### **3.1.4.1 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellviabilität von Hepatom-Zelllinien**

Die Zellviabilität der mit den Chemerin-Isoformen transfizierten Hepatom-Zelllinien wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. Mit diesem Assay werden lebende, aktive Zellen quantifiziert. Die Zellproliferation wurde in drei humanen Hepatom-Zelllinien (HepG2, Huh7, Hep3B) und einer murinen Hepatom-Zelllinie (Hepa1-6) untersucht. Die Zellen wurden zunächst mit Vektoren zur Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen bzw. mit dem Kontrollplasmid transfiziert und der MTT-Assay wurde 48 h später begonnen.

In den Zelllinien HepG2 und Hepa1-6 war die Zellviabilität aller Klone etwa gleich hoch (Abb. 9 A, D). Bei Huh7-Zellen wurde eine 35 %-ige Verringerung der Zellviabilität bei Expression von Chemerin-163 im Vergleich zur Kontrolle gemessen (Abb. 9 B). Diese Isoform hatte in der Zelllinie Hep3B einen ähnlichen Effekt (ca. 30 %) (Abb. 9 C). Bei Chemerin-155 war die Zellviabilität nur um ca. 22 % niedriger.

Chemerin-163 scheint einen leicht hemmenden, Zelllinien-spezifischen Effekt auf die Viabilität zu haben.

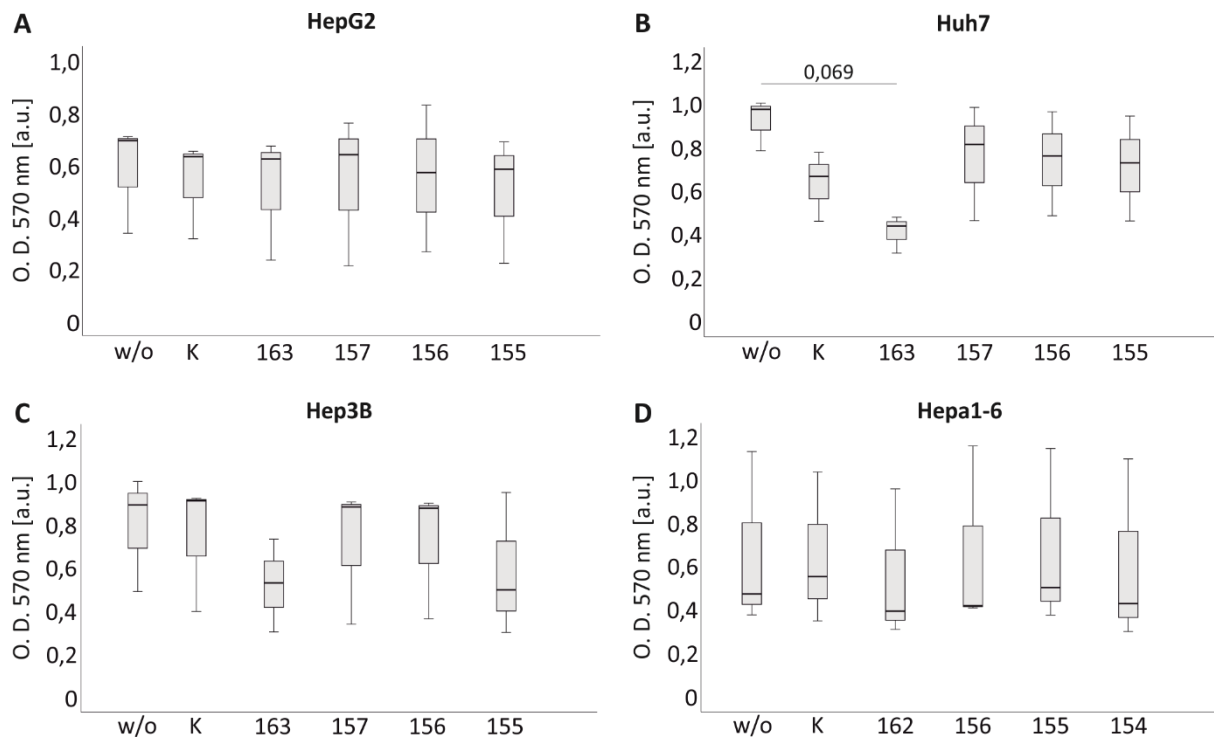


Abb. 9 Zellviabilität der humanen und murinen Hepatom-Zelllinien (A) HepG2, (B) Huh7, (C) Hep3B und (D) Hepa1-6 nach Transfektion mit Plasmiden zur Expression der Chemerin-Isoformen, ermittelt mit Hilfe des MTT-Assays ( $n = 3$ ). Die optische Dichte (O. D.) wurde bei 570 nm gemessen. a. u.: arbitrary unit, K: Kontrolle, w/o: ohne Transfektion. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. Die Zahl in der Abbildung stellt den p-Wert nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### 3.1.4.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellproliferation von Hepatom-Zelllinien

Die Zellviabilität dieser Hepatom-Zelllinien bei Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen wurde nicht nur anhand der Reduktionsreaktion von MTT in Mitochondrien gemessen, sondern auch, indem die Zellen jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion der Hepatom-Zelllinien gezählt wurden und die Proliferationsrate der Zellen untersucht wurde.

Die Expression von Chemerin in HepG2-Zellen verursachte zwischen 24 h und 48 h nach der Transfektion eine leicht verringerte Zellteilung, insbesondere bei den Isoformen Chemerin-163 ( $p = 0,055$ ) und Chemerin-157 ( $p = 0,057$ ) (Abb. 10 A). Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.



In der humanen Huh7-Zelllinie zeigte sich dagegen eine erhöhte Zellproliferation mit der Expression des inaktiven Chemerin-163 im ersten gemessenen Zeitabschnitt (24 - 48 h) (Abb. 10 B).

In diesem Zeitraum wurde in der murinen Zelllinie Hepa1-6 eine vermehrte Zellteilung nach Transfektion mit der Isoform Chemerin-155 gemessen, diese war jedoch ebenfalls nicht signifikant (Abb. 10 C). Im zweiten Zeitabschnitt (48 - 72 h) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Isoformen.

Die Messung der Zellzahl nach Chemerin-Transfektion lässt vermuten, dass die regulatorischen Effekte von Chemerin auf die Zellproliferation hauptsächlich innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Transfektion stattfanden.

Die Gesamtproliferation (24 - 72 h) wies dennoch leichte Unterschiede zu der Messung der mitochondrialen Funktion mit dem MTT-Assay auf. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die MTT-Messung nur einen aktuellen Zustand 48 h nach der Transfektion erfasst, während die Zellzählung mögliche Auswirkungen über einen längeren Zeitraum dokumentiert. Die Effekte der Chemerin-Isoformen auf die Proliferation scheinen sich im zeitlichen Verlauf zu ändern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Unterschiede in der Zellproliferation nach Expression der Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien vorhanden waren, diese waren aber eher marginal.

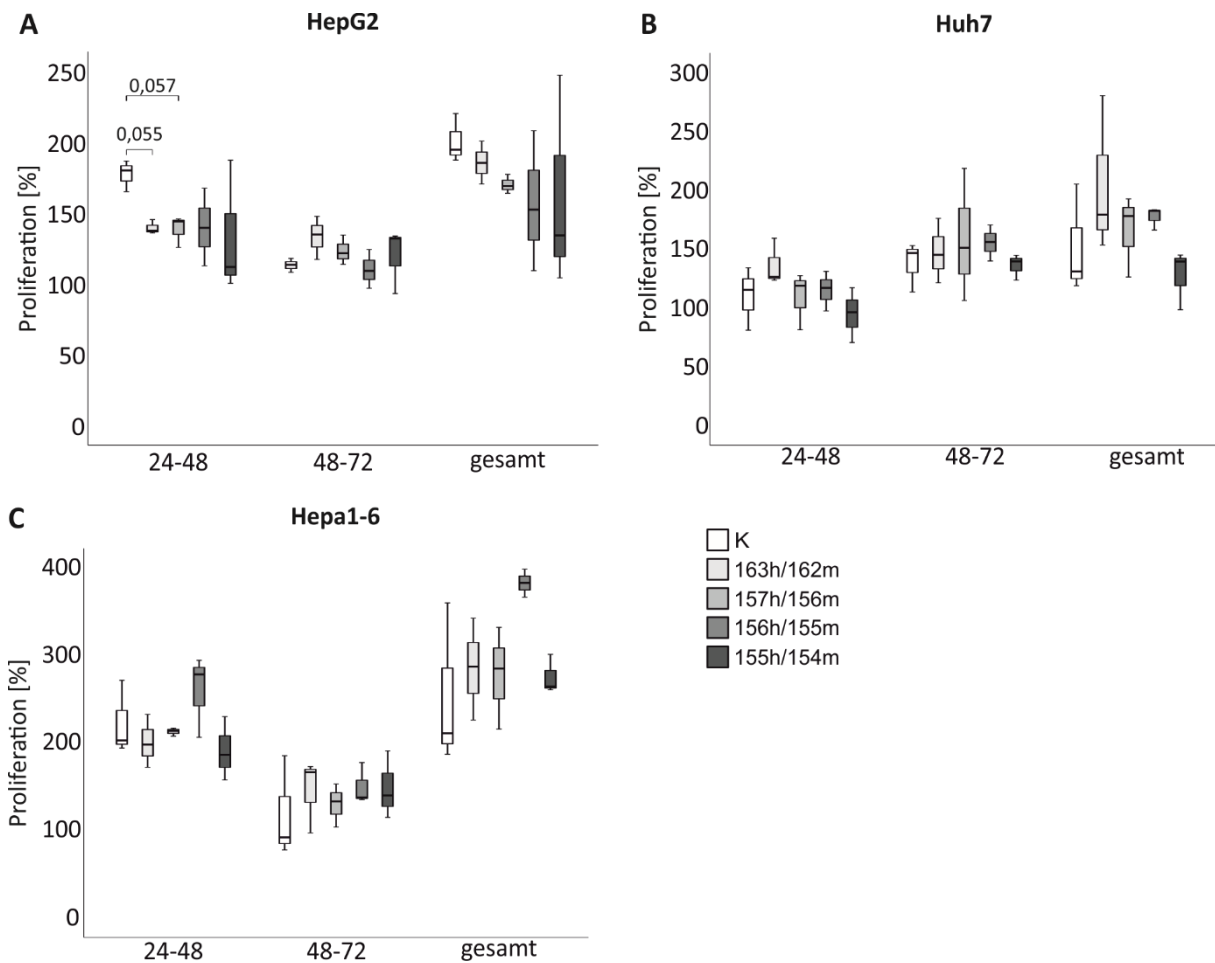


Abb. 10 Proliferation der humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 und Huh7 und der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6, die verschiedene Chemerin-Isoformen exprimierten. Dargestellt ist die Proliferation der Zellen zwischen 24 h und 48 h und die Proliferation zwischen 48 h und 72 h. Außerdem wird die gesamte Proliferation der Zellen zwischen 24 h und 72 h gezeigt (n = 3). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. Die Zahlen in der Abbildung stellen p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### 3.1.5 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Migration von Hepatom-Zelllinien

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Chemerin die Migration von Leberzellen *in vitro* beeinflusst: es wurde eine Verminderung der Migration der humanen Hepatom-Zelllinie 7404, PVTT-1 und Hep3B durch die Überexpression von Chemerin berichtet [107]. Dagegen fanden Kunimoto et al. heraus, dass Chemerin die Migration in glatten Muskelzellen verstärkte [102].

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Expression der unterschiedlichen Isoformen von Chemerin die Migration der Hepatom-Zelllinien reguliert. Dazu wurden vier Chemerin-Isoformen und ein Kontrollvektor in humanen bzw. murinen Hepatom-Zelllinien überexprimiert und anschließend ein sogenannter Scratch in die Monolayer der Zellen eingefügt. Daraufhin wanderten die Zellen in den darauffolgenden Tagen wieder aufeinander zu. Bis zu drei Tage anschließend an die Transfektion mit den rekombinanten Chemerin-Plasmiden und dem Einfügen des Scratches wurde die Migration der Zellen mikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Die metrische Auswertung wurde mit dem ImageJ MRI Wound Healing Tool Plug-In durchgeführt.

Der freie Bereich zwischen den Zellen wurde an drei bzw. vier Zeitpunkten vermessen. Die Migration vom ersten bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt wurde in Prozent berechnet. Zusätzlich wurde der Verlauf der Migration zu allen Zeitpunkten dargestellt (Abb. 11).

Die Migration der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Abb. 11 A und Abb. 12) zeigte keine signifikante Veränderung nach Expression der kürzeren Chemerin-Isoformen im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings ist eine deutlich verlangsamte Migration bei Überexpression der Isoformen Chemerin-163 (39 %) und -157 (58 %) im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abb. 11 A).

Bei der humanen Huh7-Zelllinie wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Allerdings war auch hier im Vergleich zur Kontrolle eine verringerte Migration bei Zellen mit einer Expression der Isoform Chemerin-163 (71 %) zu sehen. Ebenso war auch die Migration der Zellen mit der Expression von Chemerin-156 (67 %) und Chemerin-155 (64 %) geringer (Abb. 11 B und Abb. 13).

In der Zelllinie Hepa1-6 dagegen wurde eine signifikant langsamere Migration der Zellen, die das aktive Chemerin-156 exprimierten, beobachtet. Diese Zellen migrierten langsamer als die Kontroll-transfizierten ( $p = 0,015$ ) Zellen und die Zellen mit Chemerin-155-Expression ( $p = 0,010$ ) und Chemerin-154-Expression ( $p = 0,043$ ) (Abb. 11 C und Abb. 14). Es wurde zwar keine Signifikanz zwischen den Isoformen Chemerin-156 und Chemerin-162 berechnet, allerdings war auch hier die Tendenz zu erkennen, dass das aktive Chemerin-156 die Migration im Vergleich zu inaktivem Chemerin-162 hemmte (ca. 40 %).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Chemerin die Migration von Hepatom-Zelllinien verlangsamt. Die Effekte der Chemerin-Isoformen waren jedoch je nach Zelllinie unterschiedlich. Während in HepG2- und Hepa1-6-Zellen nur die aktive Isoform Chemerin-157 bzw. Chemerin-156 die Migration verlangsamt, zeigten in Huh7-Zellen alle Isoformen bis auf Chemerin-157 einen hemmenden Effekt.

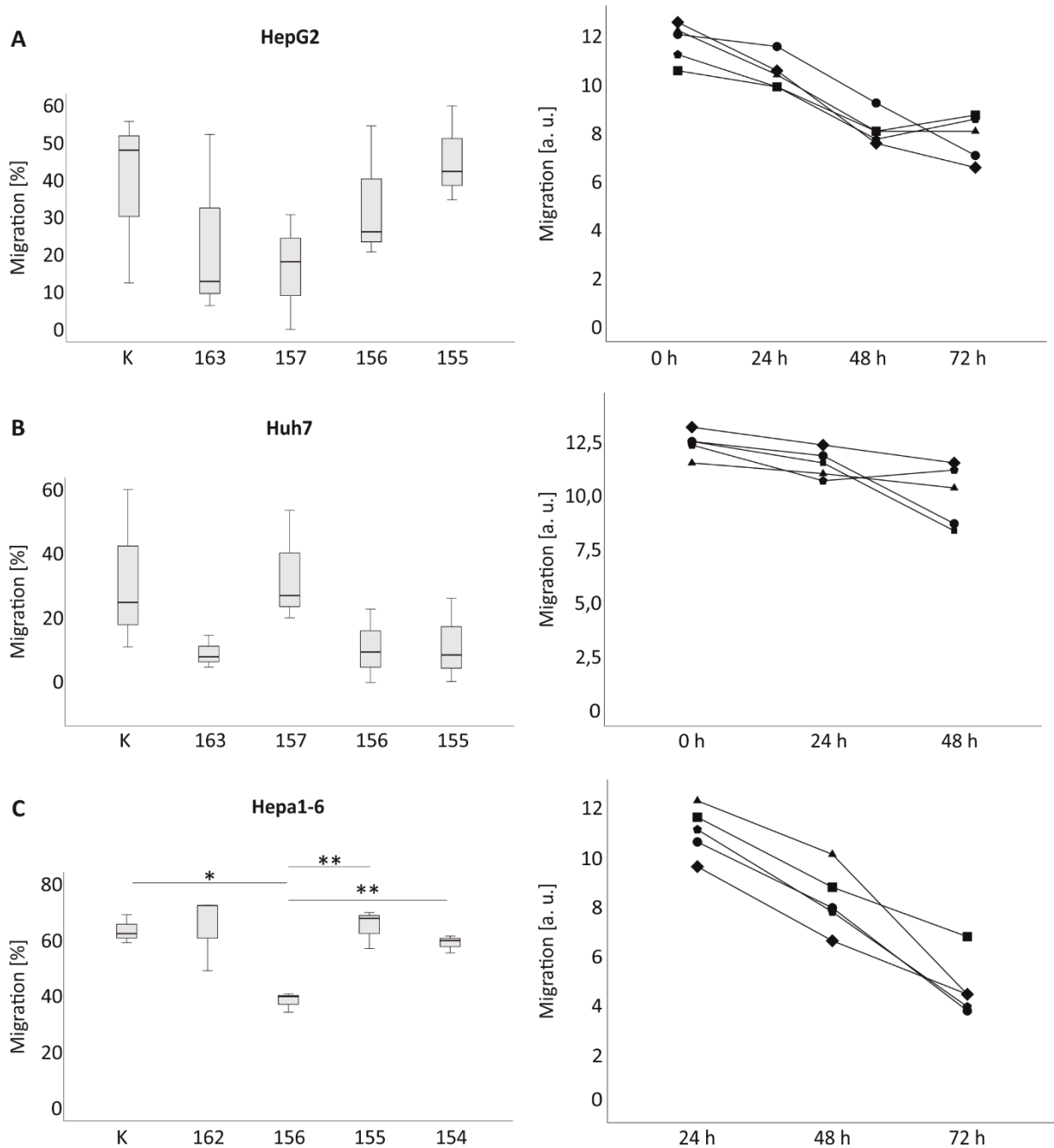


Abb. 11 Migration der humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 und Huh7 und der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 nach Transfektion mit Vektoren zur Expression von Chemerin-Isoformen mittels Scratch-Methode (n = 3). Die prozentuale Abnahme der Größe des Scratches nach 48 h bzw. 72 h im Vergleich zur ersten Messung stellt die Migration dar. a. u.: arbitrary unit, K: Kontrolle. Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test • K ◆ 163/162 ■ 157/156 ▲ 156/155 ◆ 155h/154. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01.

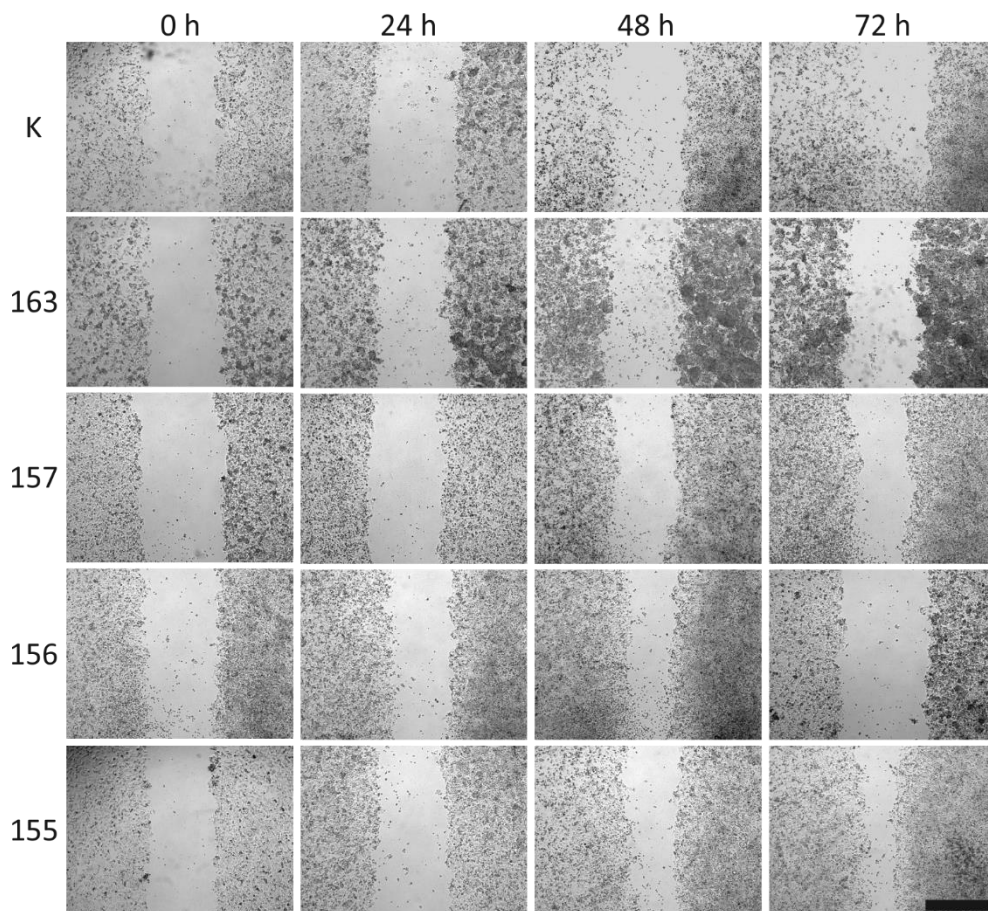


Abb. 12 Migrations-Assay der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit den rekombinanten Plasmiden zur Expression der Chemerin-Isoformen (n = 3). K: Kontrolle. Vergrößerung: 40x. Der Maßstab entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

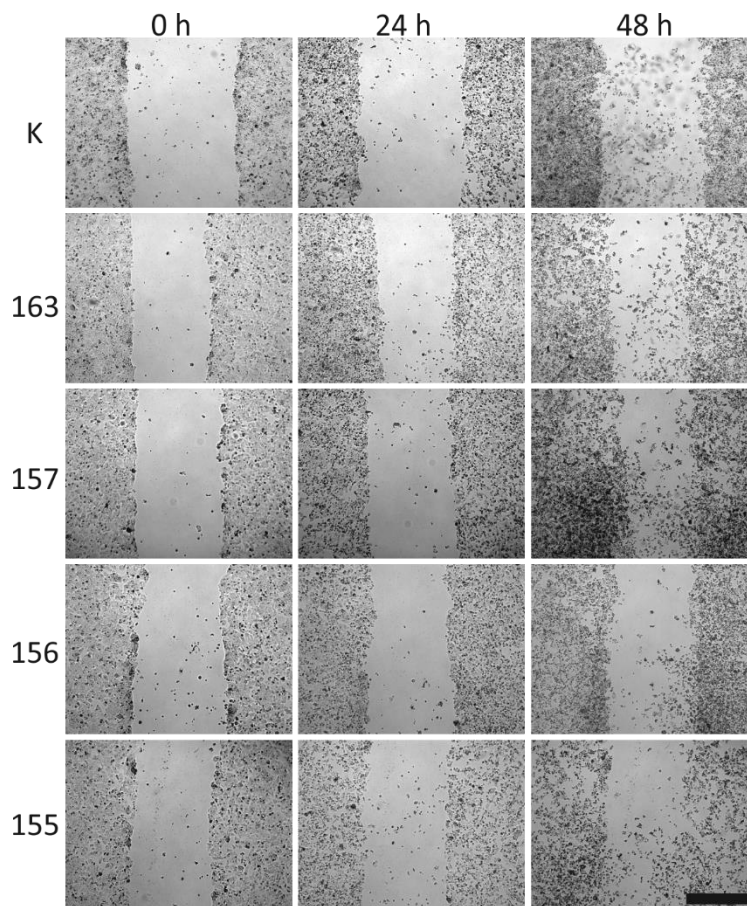


Abb. 13 Migrations-Assay der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7 0 h, 24 h und 48 h nach Transfektion mit den rekombinanten Plasmiden zur Expression der Chemerin-Isoformen (n = 3). K: Kontrolle. Vergrößerung: 40x. Der Maßstab entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

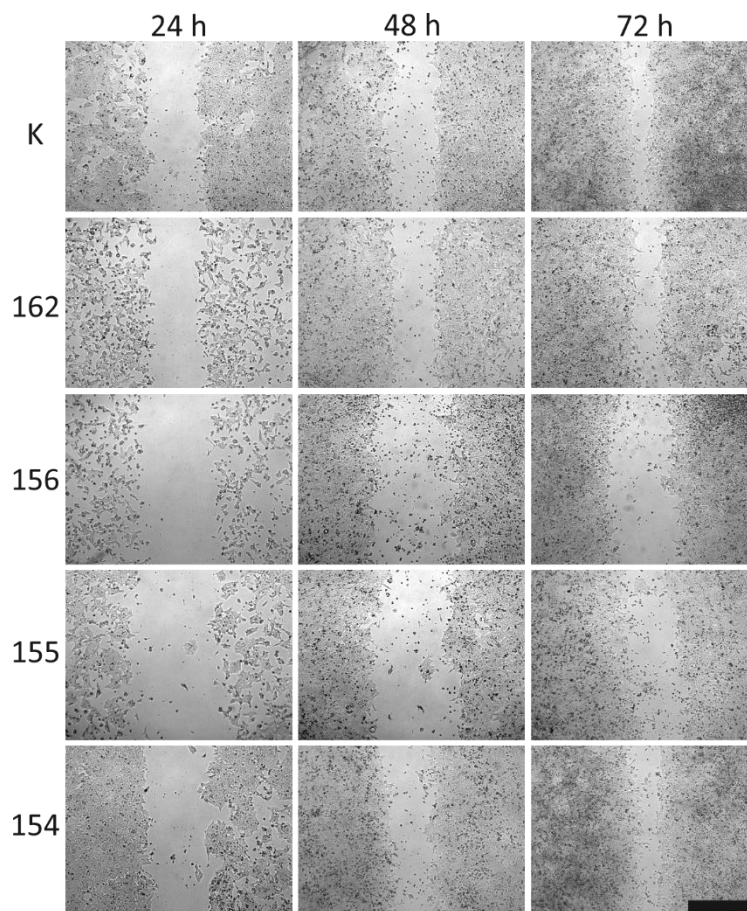


Abb. 14 Migrations-Assay der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit den rekombinanten Plasmiden zur Expression der Chemerin-Isoformen ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Vergrößerung: 40x. Der Maßstab entspricht 500  $\mu\text{m}$ .



### **3.1.6 Einfluss der Überexpression von Chemerin-Isoformen auf Schlüsselproteine**

In der Literatur wurde beschrieben, dass Chemerin verschiedene wichtige Schlüsselproteine in zahlreichen Signalwegen aktiviert, die für Zellproliferation, Zellwachstum, Zellüberleben, Entzündung, Apoptose, Differenzierung und/oder Tumorgenese entscheidend sind. Zu diesen gehören der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, die Kinasen ERK 1/2 und p38 MAPK und AKT [12, 59, 67, 73, 90, 107, 110, 180, 186]. Der Transkriptionsfaktor signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) spielt in der Tumorgenese von HCC eine Rolle [69, 70]. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Chemerin-Isoformen auf diese Faktoren in Hepatom-Zelllinien beschrieben.

#### **3.1.6.1 Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen**

NF- $\kappa$ B hat sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen. In verschiedenen Krebserkrankungen besitzt dieser Transkriptionsfaktor eine ambivalente Rolle: es kann das einerseits Immunsystem aktivieren, hat aber auch Tumor-fördernde Eigenschaften [76, 105].

In der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 und in Endothelzellen der Nabelschnur inhibierte Chemerin die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, was letztendlich zu einer verminderten Tumorlast führte [110, 186].

Um zu klären, ob dies auch bei Überexpression der verschiedenen Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien zutrifft, wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in dieser Arbeit untersucht. Jedoch wurde weder in HepG2-Zellen noch in Hepa1-6-Zellen eine Aktivierung oder Inhibierung von N- $\kappa$ B p65 durch eine der Chemerin-Isoformen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 15).

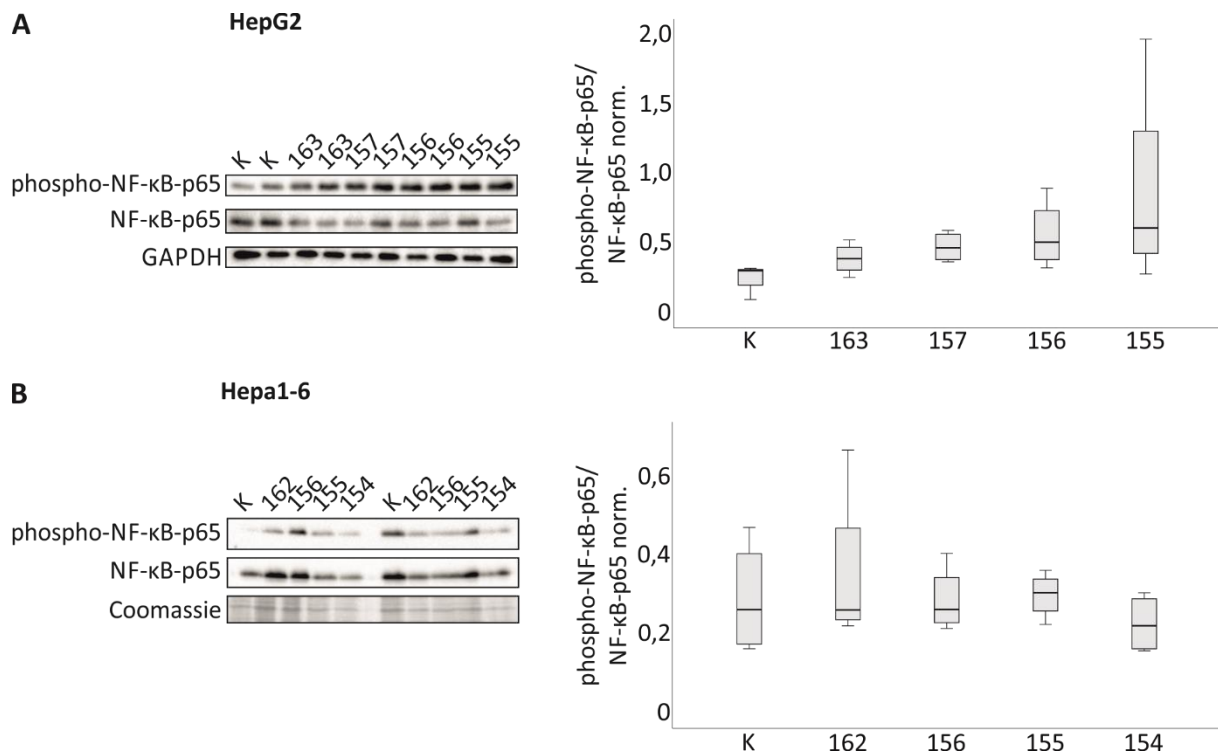


Abb. 15 Expression und Aktivierung von (phospho-)NF-κB p65 nach Transfektion von (A) HepG2-Zellen und (B) Hepa1-6-Zellen mit Vektoren zur Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen (n = 4). Das mit GAPDH bzw. Gesamtprotein normalisierte Verhältnis von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem NF-κB-p65 ist dargestellt. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test.

### 3.1.6.2 Aktivierung von Stat3 durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen

Dem Transkriptionsfaktor Stat3 wurde eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des HCC zugeschrieben. Stat3 ist in aggressiven Lebertumoren, die eine schlechte Prognose haben, im Gegensatz zu normalem Lebergewebe aktiviert und für das Wachstum des Tumors verantwortlich [69, 70]. Es wurde beschrieben, dass Stat3 über NF-κB negativ reguliert wird. Entsprechend wurde ein negativer Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NF-κB und Stat3 in HCC gezeigt [70].

Da die Chemerin-Expression im HCC vermindert ist und das zu einer schlechteren Prognose, größeren Tumoren und einer geringeren Infiltration von Immunzellen führte [109, 110],

wurde ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von Stat3 mit der erhöhten Expression von Chemerin-Isoformen untersucht.

Nach Expression der Isoformen Chemerin-155 in HepG2-Zellen wurde eine signifikant erhöhte Aktivierung von Stat3 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet ( $p = 0,012$ ) (Abb. 16 A). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht in der murinen Zelllinie Hepa1-6 mit der entsprechenden murinen Isoform Chemerin-154 (Abb. 16 B). Nach Expression aller anderen Chemerin-Isoformen war die Phosphorylierung von Stat3 vergleichbar mit der Kontrolle.

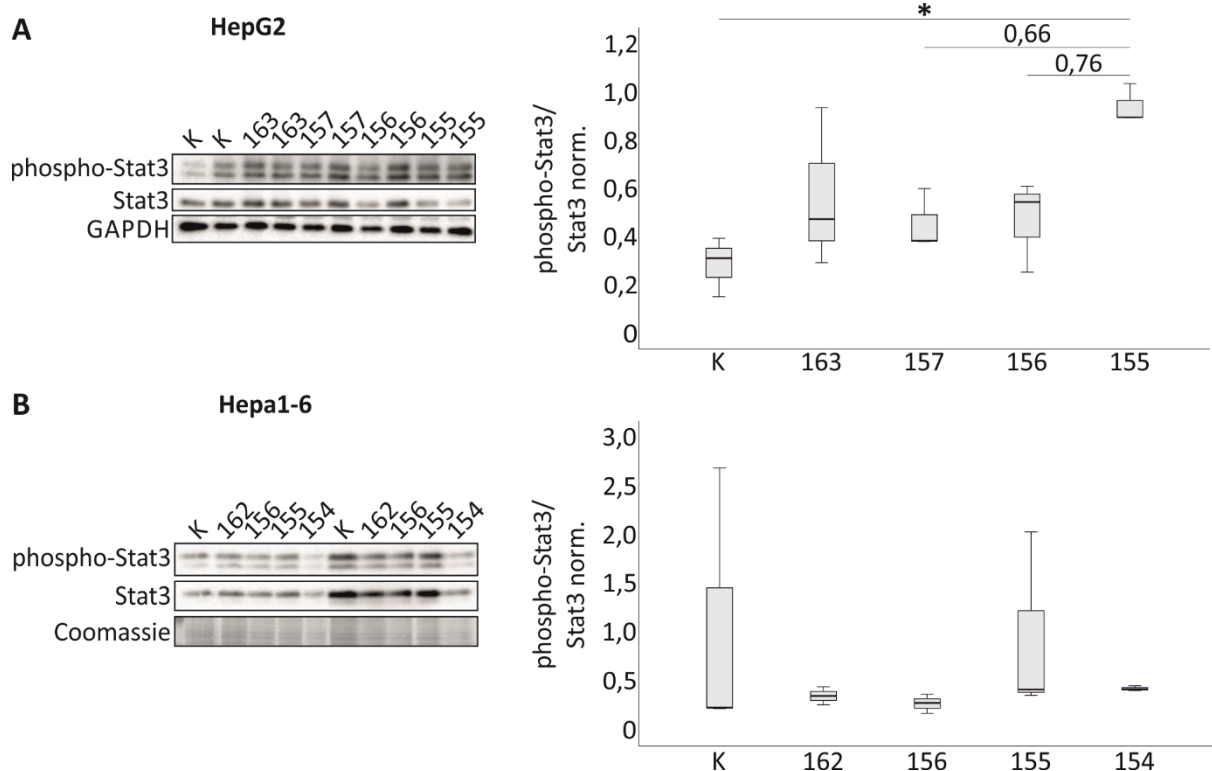


Abb. 16 Expression und Aktivierung von (phospho-)Stat3 nach Transfektion von (A) HepG2 und (B) Hepa1-6-Zellen mit Vektoren zur Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen. Das mit GAPDH bzw. Gesamtprotein normalisierte Verhältnis von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Stat3 ist dargestellt ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ . Die Zahlen in der Abbildung stellen p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### **3.1.6.3 Aktivierung von ERK 1/2 durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen**

Die ERK-Kaskade ist Teil des MAPK-Signalwegs, an deren Ende ERK 1 und ERK 2 über Phosphorylierung aktiviert werden und unter anderem Zellproliferation und -migration steuern. Wie der Name dieser Kinasen schon sagt, werden sie durch externe Stimuli aktiviert, wie z. B. durch Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix-Interaktionen und über Signale von anderen Zellen [28, 161].

In mehreren Studien mit verschiedenen Zelltypen wurde die Phosphorylierung von ERK 1/2 nach Binden von Chemerin an seinen Rezeptor CMKLR1 beschrieben [12, 59, 73, 180]. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von ERK 1/2 durch die Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zellen untersucht.

Diese in der Literatur beschriebene Regulation konnte in diesen drei Hepatom-Zelllinien jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 17).

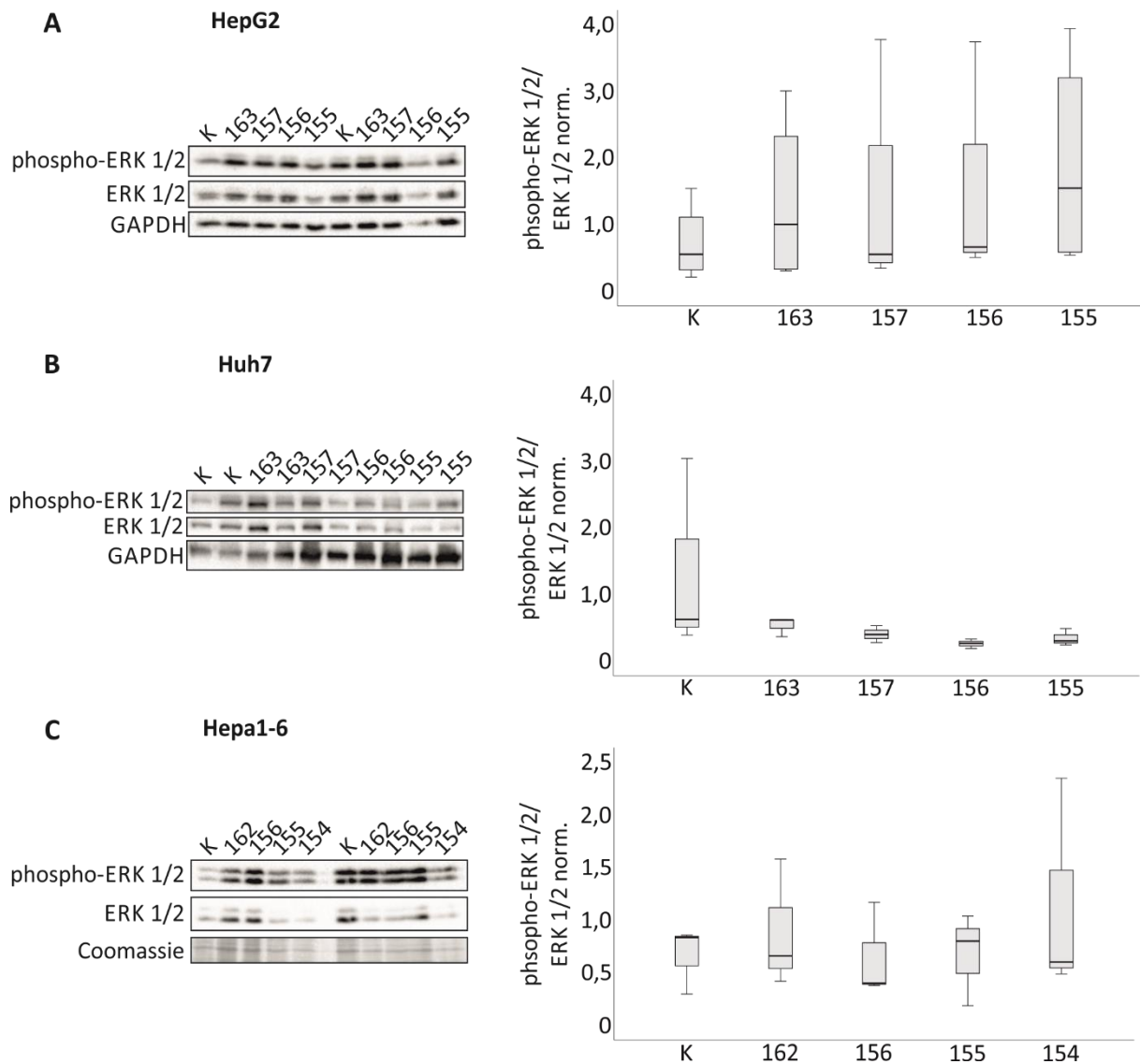


Abb. 17 Expression und Aktivierung von (phospho-)ERK 1/2 nach Transfektion von (A) HepG2-Zellen (n = 4), (B) Huh7-Zellen (n = 3) und (C) Hepa1-6-Zellen (n = 3) mit Vektoren zur Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen. Das mit GAPDH bzw. Gesamtprotein normalisierte Verhältnis von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem ERK 1/2 ist dargestellt. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test.

### **3.1.6.4 Aktivierung von p38 MAPK durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen**

Die p38 Kinase-Familie ist ebenfalls Teil des MAPK-Signalwegs. Die Phosphorylierung von p38 MAPK wird mit Entzündungsprozessen assoziiert [195]. In den Zelllinien HepG2 und Huh7 wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von p38 MAPK und der Apoptose festgestellt [85].

Die p38 MAPK (und auch ERK 1/2) wurde durch Chemerin in Synoviozyten aktiviert, was zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6 führte [90]. Der Effekt von Chemerin auf diese Kinase spielt auch bei der Zelladhäsion eine Rolle [67].

Die Phosphorylierung der p38 MAPK wurde nach Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen untersucht (Abb. 18). Es wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung durch Chemerin im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

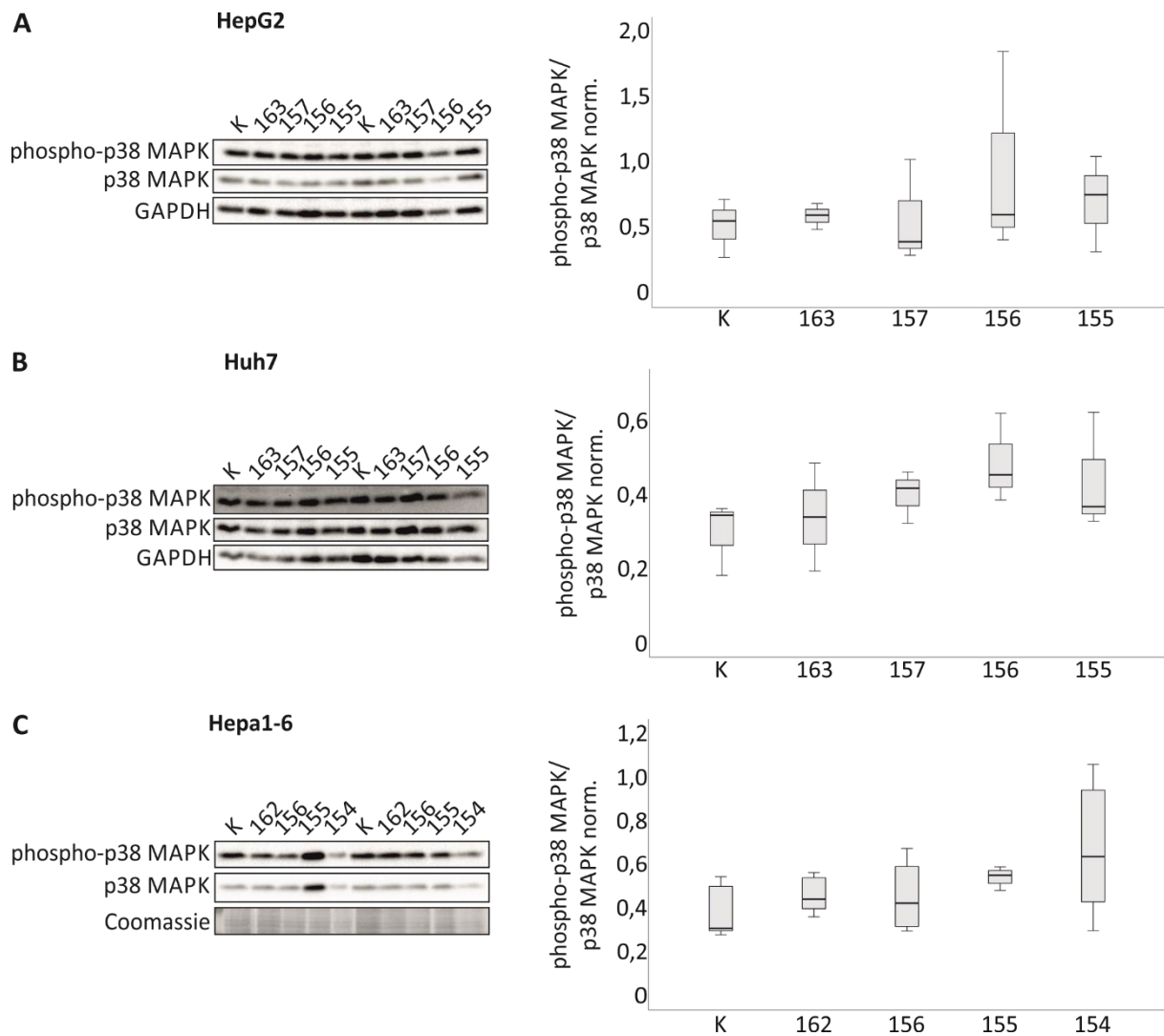


Abb. 18 Expression und Aktivierung von (phospho-)p38 MAPK nach Transfektion von (A) HepG2-Zellen (n = 3), (B) Huh7-Zellen (n = 3) und (C) Hepa1-6-Zellen (n = 4-5) mit Vektoren zur Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen. Das mit GAPDH bzw. Gesamtprotein normalisierte Verhältnis von phosphorylierter und nicht-phosphorylierter p38 MAPK ist dargestellt. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test.

### 3.1.6.5 Aktivierung von AKT durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen

Die Kinase AKT reguliert einige Zellprozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Überleben, welche bei Fehlregulation die Entstehung von Krebs fördern können [7]. AKT ist aufgrund

von Upstream-Mutationen in vielen Krebserkrankungen aktiviert [120]. Auch die Chemerin-Stimulation von Chondrozyten resultierte in der Phosphorylierung von AKT [12]. Zudem führte die Inaktivierung von AKT über das CMKLR1/phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase (PTEN)-Signaling in Hepatozyten zur verminderten Zellmigration, -invasion und Metastasierung [107]. In dieser Arbeit wurde die Aktivierung von AKT durch die Überexpression rekombinanter Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien überprüft.

Die Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepa1-6-Zellen scheint die Phosphorylierung von AKT nicht zu regulieren. Die Aktivierung von AKT verhält sich mit dem Einfluss von rekombinanten Chemerin-Isoformen ähnlich wie die Kontrolle (Abb. 19).

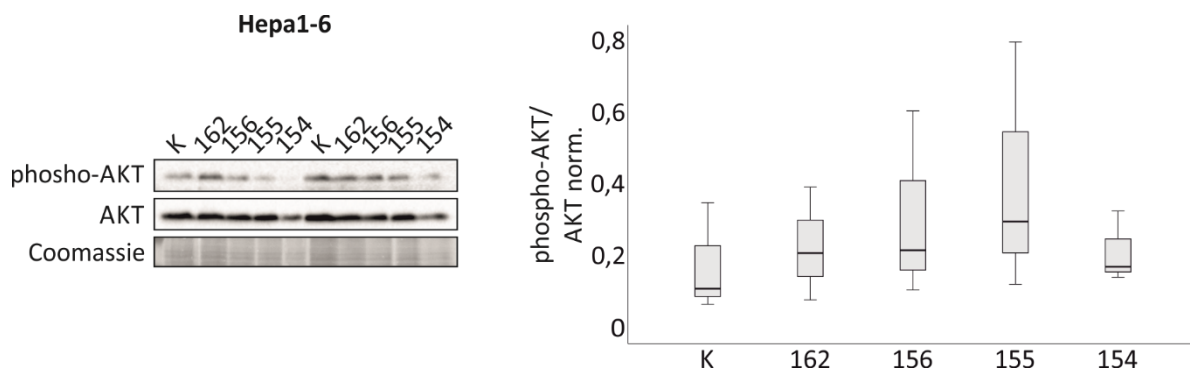


Abb. 19 Expression und Aktivierung von (phospho-)AKT nach Transfektion von Hepa1-6-Zellen mit Vektoren zur Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen (n = 3). Das mit Gesamtprotein normalisierte Verhältnis von phosphorylierter und nicht-phosphorylierter AKT ist dargestellt. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test.

Die Schlüsselproteine NF- $\kappa$ B, ERK 1/2, p38 MAPK und AKT werden unter verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Bedingungen durch Chemerin aktiviert [12, 59, 67, 73, 90, 107, 110, 180, 186]. In den Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 rief Chemerin diese Wirkung jedoch auf keine dieser Proteine hervor. Ausschließlich der Transkriptionsfaktor Stat3 wies eine Aktivierung durch das als inaktiv geltende Chemerin-155 auf.



### 3.1.7 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Tumormarker AFP in Hepatom-Zelllinien

Der einzige bisher in der Klinik verwendete Biomarker für HCC ist AFP. Dieses ist normalerweise nicht im Serum von Erwachsenen nachzuweisen [56]. Die Frage, ob AFP in Hepatom-Zelllinien durch Chemerin reguliert wird, soll nachfolgend beantwortet werden. AFP wurde in den Zellkulturüberständen der Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 gemessen, die Chemerin-Isoformen exprimierten, um eventuelle Unterschiede zwischen den Isoformen zu beobachten.

AFP wurde in großen Mengen von den verwendeten Hepatom-Zelllinien sezerniert. Es wurden bis zu ca. 5 µg/ml gemessen. Keine der humanen Chemerin-Isoformen regulierte die AFP-Konzentration im Zellkulturüberstand (Abb. 20) mit Ausnahme von Chemerin-154 in Hepa1-6-Zellen. Dort stieg die Konzentration von AFP leicht an (Abb. 20 C).

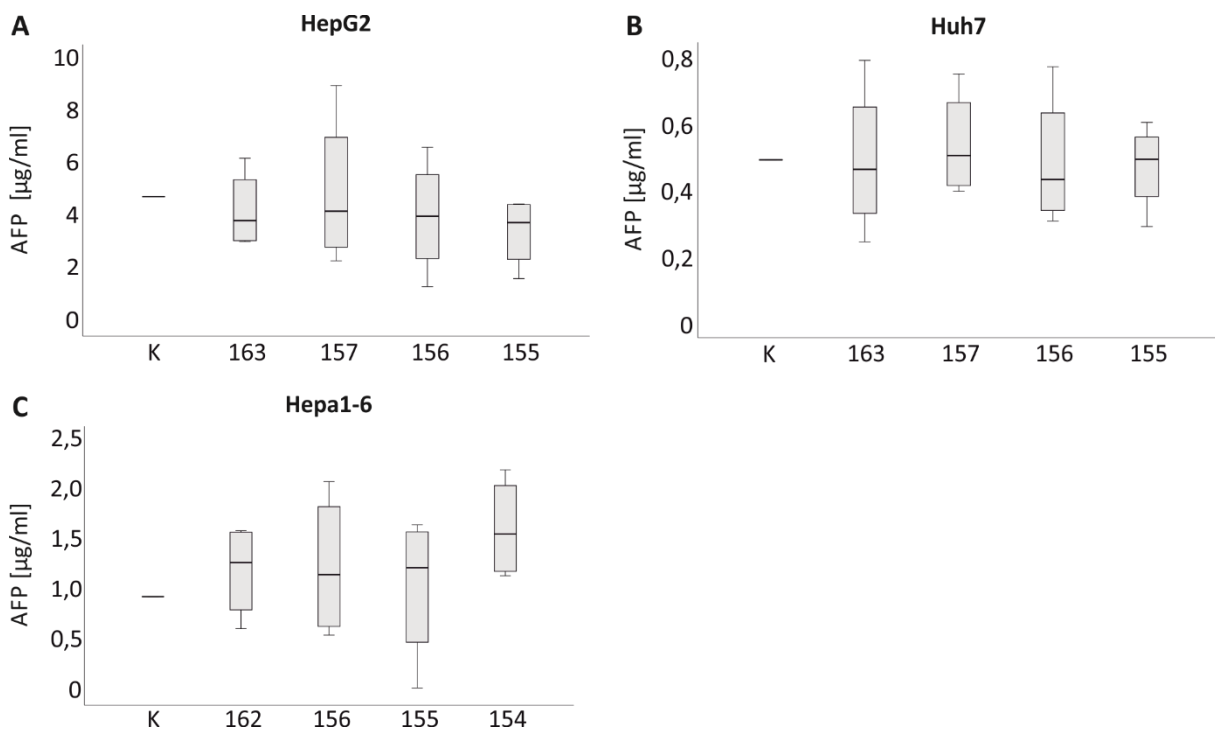


Abb. 20 Der HCC-Tumormarker AFP im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien (A) HepG2 (n = 4), (B) Huh7 (n = 4) und (C) Hepa1-6 (n = 5), die rekombinante Chemerin-Isoformen überexprimierten. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test.

### **3.1.8 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Lipidmetabolismus von Hepatom-Zelllinien**

In der Literatur wurde die Rolle von Chemerin auf die Adipogenese und den Metabolismus in Adipozyten beschrieben. Zudem spielt Chemerin in der Adipositas, dem metabolischen Syndrom und in kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle [20, 27, 54]. Serum-Chemerin korrelierte außerdem positiv mit low-density-lipoprotein-(LDL)-Cholesterin [145] und negativ mit HDL-Cholesterin [117, 158]. Aus diesem Grund sollten die Effekte der Chemerin-Isoformen auf den Cholesterin-Stoffwechsel untersucht werden.

Dafür wurde das Lysat von Hepatom-Zelllinien, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten, massenspektrometrisch untersucht und das Verhältnis von Cholesterinestern und freiem Cholesterin berechnet.

In der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7 und der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 waren die Verhältnisse von Cholesterinestern und freiem Cholesterin zwischen allen Isoformen und der Kontrolle vergleichbar (Abb. 21 B, C). In HepG2-Zellen wurde dieses Verhältnis nach der Expression von Chemerin-156 signifikant reduziert ( $p = 0,010$ ) (Abb. 21 A).

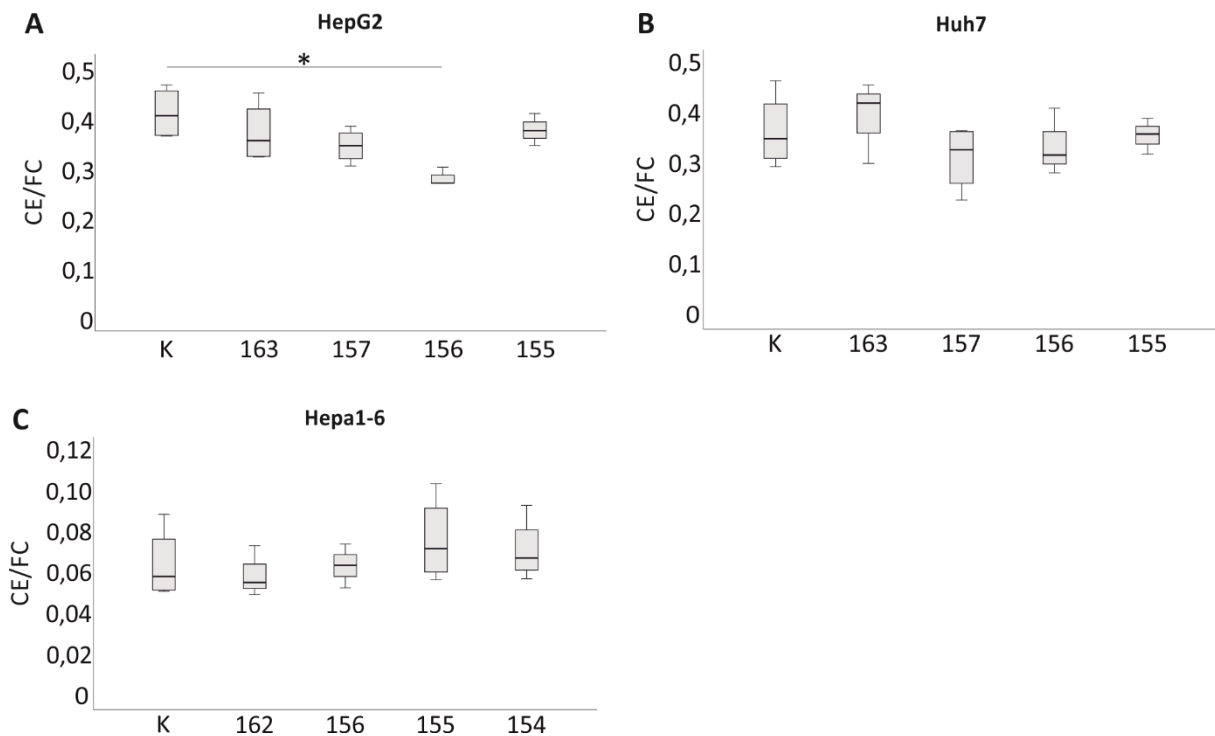


Abb. 21 Verhältnis von Cholesterinestern und freiem Cholesterin in Hepatom-Zelllinien, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten. (A) HepG2 (B) Huh7 (C) Hepa1-6. CE: Cholesterinester, FC: freies Cholesterin, K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ .

Im Cholesterin-Metabolismus ist der LDL-Rezeptor von Bedeutung. Er dient zur Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zellen. Die Expression des LDL-Rezeptors wird durch proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) reguliert. PCSK9 fördert den Abbau von LDL-Rezeptoren [14]. Der Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Expression von PCSK9 in Hepatom-Zelllinien wurde untersucht.

In HepG2-Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Effekten der Chemerin-Isoformen auf die PCSK9-Expression (Abb. 22 A). In Huh7-Zellen war PCSK9 nach Überexpression von Chemerin-156 ( $p = 0,055$ ) und Chemerin-155 leicht vermindert (Abb. 22 B). Bei der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 wurde die Expression von PCSK9 durch alle Chemerin-Isoformen leicht erhöht (Abb. 22 C).

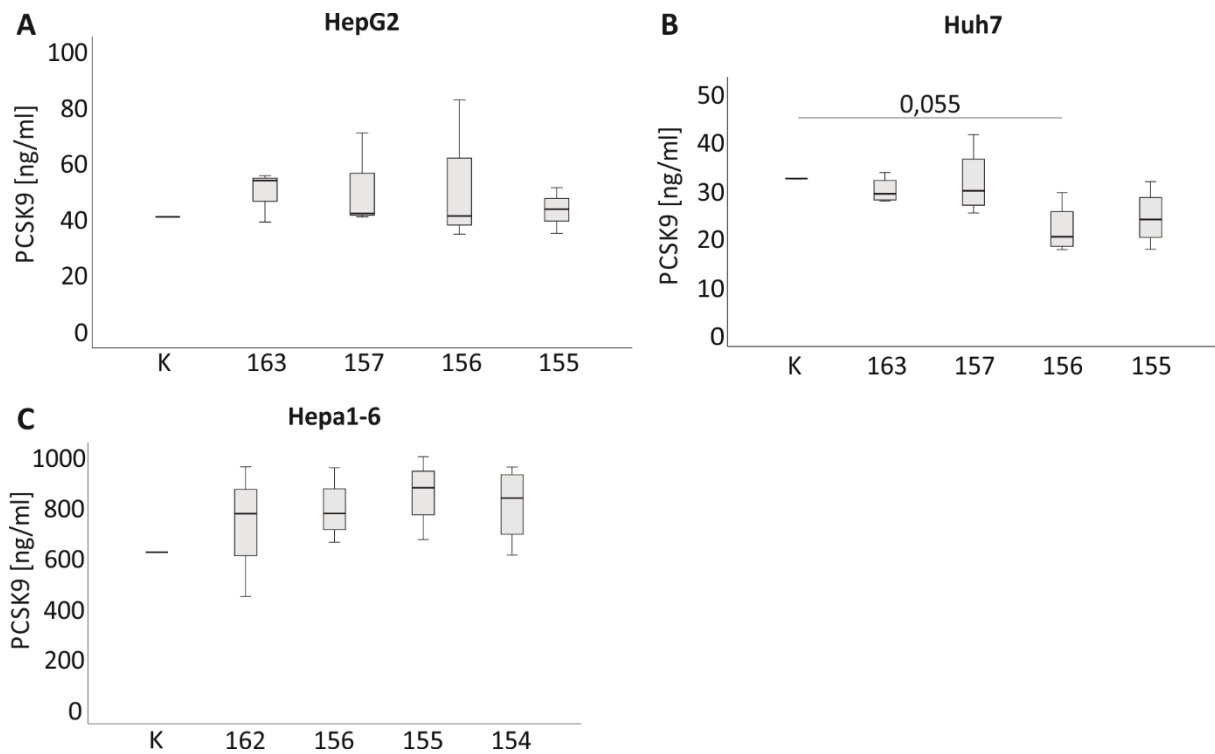


Abb. 22 PCSK9 im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien (A) HepG2, (B) Huh7 und (C) Hepa1-6 bei Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. Die Zahl in der Abbildung stellt den p-Wert nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

Der Effekt von Chemerin-Isoformen auf die PCSK9-Expression und den Cholesterin-Haushalt ist abhängig von der Zelllinie, in der diese Prozesse untersucht werden.

## **3.2 Regulation der Sekretion von Zytokinen in Leberzellen und Immunzellen durch Chemerin-Isoformen**

Chemerin ist ein multifunktionales Protein, dessen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Chemerin die Expression verschiedener Zytokine beeinflusst. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Stimulation von Chondrozyten mit Chemerin eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, Interleukin 8 (IL-8), TNF und die Stimulation von Synoviozyten die Sekretion von IL-6 und chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) auslöste [12, 90]. Zudem korrelierte Chemerin im Serum mit den Zytokinen CRP, IL-6, TNF, Resistin und Leptin [106]. In Makrophagen wurde jedoch eine Suppression von TNF, Interleukin 1 $\beta$ , IL-6, Interleukin 12 und CCL5 beobachtet [31].

Vor diesem Hintergrund wurden im Folgenden die Auswirkungen der Isoformen Chemerin-163/162, Chemerin-157/156, Chemerin-156/155 und Chemerin-155/154 auf die Konzentration von Zytokinen in den Zellkulturüberständen von Hepatom-Zelllinien analysiert. Weiterhin wurde untersucht, ob durch die Stimulation mit den Chemerin-Isoformen in besagten Zellkulturüberständen eine veränderte Wirkung in der Zytokin-Expression von Immunzellen auftritt.

### **3.2.1 Auswirkungen der Expression von Chemerin-Isoformen auf das Zytokin-Profil von Hepatom-Zelllinien**

Um herauszufinden, inwiefern verschiedene Chemerin-Isoformen das Zytokinprofil von Hepatom-Zelllinien beeinflussen, wurden Zytokin-Arrays mit den Zellkulturüberständen von HepG2-, Huh7- und Hepa1-6-Zellen durchgeführt, die zuvor mit Vektoren zur Überexpression von Chemerin-Isoformen transfiziert wurden. Dadurch konnte ein Überblick über die von diesen Zellen exprimierten Zytokine und über den Einfluss der Chemerin-Isoformen auf eben diese Zytokine gewonnen werden.

Die Antikörper der zu untersuchenden Zytokine befanden sich auf Membranen, die mit den Zellüberständen inkubiert wurden. Diese Zytokin-Arrays wurden mit dem Protein Array Ana-

lyzer Plug-In für ImageJ densitometrisch ausgewertet. Diese Software kann die Positiv- und Negativkontrollen erkennen und die Werte aller Protein-Arrays, die miteinander verglichen werden sollen, somit gemeinsam normalisieren. Dadurch wurde gewährleistet, dass eventuelle Unterschiede in der Behandlung der Membranen herausgerechnet wurden.

Die Software gab auch Werte für die Punkte heraus, die mit dem Auge nicht zu erkennen waren. Da es sich hier um sehr niedrig exprimierte Zytokine handeln musste oder sogar um falsch positive Werte, wurden nur Messungen von Signalen verwendet, die auch mit dem bloßen Auge sichtbar waren.

Um nun die Zytokine herauszufinden, bei denen eine Zu- bzw. Abnahme durch die Überexpression der einzelnen Chemerin-Isoformen erfolgt, wurden die gemessenen Werte durch die Kontrollwerte geteilt.

Die hoch- und herunterregulierten Zytokine im Zellkulturüberstand von mit Chemerin-Isoformen transfizierten HepG2-Zellen sind in Tabelle 18 zu sehen. Die der Überstände von Huh7-Zellen in Tabelle 19 und die der Hepa1-6-Zellen können der Tabelle 20 entnommen werden. Diese Arrays wurden einmal pro Zelllinie durchgeführt. Die Arrays dienten dazu, einen Überblick über die Zytokinprofile der Zelllinien zu gewinnen.

Tabelle 18 Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der HepG2-Zelllinie, die die rekombinanten Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten.

<b>Zytokin</b>	<b>163</b>	<b>157</b>	<b>156</b>	<b>155</b>
Angiogenin	0,71	0,93	0,73	1,01
Apolipoprotein AI	1,02	1,51	0,97	0,91
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	0,77	0,88	0,87	1,24
Complement Component C5/C5a	1,00	0,71	0,83	0,79
Cystatin C	1,20	1,60	1,02	0,82
Dickkopf-related protein 1 (DKK-1)	0,88	0,81	0,89	0,87
Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV)	1,15	2,28	0,93	n. a.
Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)	0,77	1,04	0,87	1,40
Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2)	1,15	1,02	1,48	n. a.

Interleukin 8	0,80	0,80	0,91	1,03
Lipocalin-2	n. a.	1,05	n. a.	n. a.
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	0,89	1,48	0,98	n. a.
Osteopontin	0,76	0,96	0,86	0,86
Platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA)	0,53	n. a.	0,70	n. a.
Retinol binding protein 4 (RBP4)	1,36	2,80	0,93	n. a.
Serpin E1	1,09	1,11	1,00	1,36
Thrombospondin-1	1,13	0,70	1,20	0,96
Trefoil factor 3 (TFF3)	1,35	1,40	1,39	0,87
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	1,04	n. a.	1,02	1,74

Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten (n = 1). Hochregulierte Zytokine sind grau hinterlegt. n. a.: not available.

Tabelle 19 Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der Huh7-Zelllinie, die die rekombinanten Isoformen Chemerin-157 oder Chemerin-156 überexprimierten.

Zytokin	157	156
Angiogenin	1,22	0,70
Angiopoietin-2	0,95	n. a.
Apolipoprotein A-I	1,09	0,32
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	1,10	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	1,46	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)	0,76	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	0,64	0,74
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12)	0,78	n. a.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5)	0,67	0,48
Complement Component C5/C5a	1,04	n. a.
Dickkopf-related protein 1 (DKK-1)	0,70	0,65
Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV)	0,76	0,59
Extracellular matrix metalloproteinase inducer (Emmprin)	0,67	0,37
Fibroblast growth factor 19 (FGF-19)	0,78	0,51

Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)	0,83	0,85
Growth-regulated oncogene $\alpha$ (GRO $\alpha$ )	0,59	n. a.
Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2)	0,56	0,44
Interleukin 8	1,75	1,05
Interleukin 24	0,70	0,48
Interleukin 27	1,75	n. a.
Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	0,39	n. a.
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	0,35	0,68
Osteopontin	0,84	0,25
Pentraxin 3	1,24	n. a.
Platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA)	2,21	n. a.
Retinol binding protein 4 (RBP4)	0,61	0,60
Serpin E1	0,53	0,85
Thrombospondin-1	0,65	0,45
Transferrin receptor protein 1 (Tfr1)	0,76	n. a.
Vitamin D-binding protein	7,08	n. a.

Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten (n = 1). Hochregulierte Zytokine sind grau hinterlegt. n. a.: not available.

Tabelle 20 Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der Hepa1-6-Zelllinie, die die rekombinanten Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten.

<b>Zytokin</b>	<b>162</b>	<b>156</b>	<b>155</b>	<b>154</b>
Amphiregulin	n. a.	0,33	0,41	1,02
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	0,38	1,14	1,37	1,47
Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5/RANTES)	0,24	1,38	1,40	1,67
Chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17)	n. a.	n. a.	1,39	1,03
Chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19)	n. a.	n. a.	1,18	0,54
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	n. a.	0,49	2,75	0,85
Chemokine (C-C motif) ligand 22 (CCL22)	n. a.	n. a.	1,09	n. a.



Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)	n. a.	n. a.	n. a.	0,68
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1/KC (CXCL1/KC)	n. a.	0,43	0,91	1,03
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	n. a.	0,58	0,78	0,93
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5)	0,41	0,84	0,75	1,23
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	n. a.	0,68	1,17	1,50
Chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (CXCL16)	n. a.	0,91	1,32	1,20
Chitinase 3-like 1	n. a.	n. a.	n. a.	0,88
Cluster of differentiation 40 (CD40)	n. a.	n. a.	0,86	0,71
Coagulation Factor III	0,27	0,73	1,30	1,19
Cystatin C	n. a.	0,55	1,46	1,40
Dickkopf-related protein 1 (DKK1)	n. a.	n. a.	n. a.	1,49
Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV)	n. a.	n. a.	0,71	0,77
Endostatin	n. a.	0,35	0,60	0,68
Fetuin	1,20	n. a.	1,29	0,86
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	n. a.	n. a.	n. a.	0,61
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	n. a.	0,57	1,06	0,80
Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)	0,30	0,93	1,17	0,95
Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP-1)	0,17	0,64	0,59	0,80
Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2)	0,29	0,39	0,61	0,26
Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3)	0,33	0,38	0,11	1,36
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)	n. a.	n. a.	0,24	0,43
Interferon $\gamma$	n. a.	n. a.	n. a.	0,41
Interleukin 1	n. a.	n. a.	n. a.	0,98
Interleukin 1 $\alpha$	n. a.	n. a.	n. a.	0,88
Interleukin 1 receptor agonist	n. a.	0,38	0,50	1,17
Interleukin 3	n. a.	n. a.	n. a.	0,46
Interleukin 5	n. a.	n. a.	n. a.	1,20
Interleukin 6	n. a.	n. a.	n. a.	0,89
Interleukin 7	n. a.	0,45	0,84	0,73
Interleukin 13	n. a.	n. a.	n. a.	0,74
Interleukin 15	n. a.	n. a.	n. a.	0,87

Interleukin 17A	n. a.	n. a.	n. a.	0,89
Interleukin 23	n. a.	0,83	0,60	0,46
Interleukin 28 A/B	n. a.	0,95	1,19	1,67
Interleukin 33	n. a.	0,66	0,68	0,57
Low density lipoprotein receptor (LDL-R)	n. a.	1,35	1,21	2,45
Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	n. a.	0,51	1,20	1,24
Matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)	n. a.	1,56	1,46	1,53
Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)	n. a.	1,10	0,83	1,49
Myeloperoxidase	n. a.	1,18	n. a.	1,22
Osteopontin	0,19	1,02	1,16	1,45
Osteoprotegerin	0,38	0,89	0,98	1,26
Pentraxin 3	n. a.	n. a.	n. a.	1,69
Periostin	n. a.	n. a.	1,12	1,87
Preadipocyte factor 1 (Pref-1)	n. a.	n. a.	n. a.	0,88
Proliferin	n. a.	n. a.	n. a.	1,45
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	0,15	1,30	1,49	1,38
Regenerating islet-derived protein 3 gamma (Reg3G)	n. a.	3,13	1,06	2,19
Retinol binding protein 4 (RBP4)	n. a.	1,61	1,00	1,55
Serpin E1	0,29	0,93	n. a.	1,39
Serpin F1	n. a.	n. a.	n. a.	3,44
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	n. a.	1,33	n. a.	1,95
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	0,22	1,04	1,03	1,34

Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten (n = 1). Hochregulierte Zytokine sind grau hinterlegt. n. a.: not available.

### 3.2.2 Stimulation von Immunzellen mit dem Zellkulturüberstand Chemerin-exprimierender Hepatom-Zelllinien

Chemerin ist ein Chemokin, das nachgewiesenermaßen chemotaktisch auf bestimmte Immunzellen wirkt. Es reguliert die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen, die den Chemerin-Rezeptor CMKLR1 exprimieren [109, 180]. Daher ist von Interesse, die biologischen Vorgänge in diesen Zellen nach Exposition mit verschiedenen Chemerin-Isoformen genauer zu beleuchten. Da auch Immunzellen über Zytokine kommunizieren, wurde deren Zytokinprofil analysiert. Hierfür wurde, wie auch schon bei den Hepatozyten, ein Zytokin-Array angewandt.

Auf humane PBMC wurde Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen als Stimulanz gegeben. Um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen wurden zusätzlich zum konditionierten Medium zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben (Tabelle 21).

Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 wurde mit dem Zellkulturüberstand von Hepa1-6-Zellen inkubiert. Diese Leberzellen waren zuvor mit rekombinanten Chemerin-Plasmiden transfiziert worden. So konnten die Chemerin-Isoformen und auch alle weiteren Zytokine für 24 h auf die Makrophagen wirken. Anschließend wurden diese Zellkulturüberstände im Zytokin-Array untersucht (Tabelle 22).

Die Auswahl und Berechnung der Werte wurden wie zuvor für die Hepatom-Zelllinien (Abschnitt 3.2.1) beschrieben durchgeführt.

Tabelle 21 Zytokin-Array von Zellkulturüberständen von humanen PBMC

Zytokin	163	157	156	155
Angiogenin	1,22	1,09	0,85	0,60
Apolipoprotein A-I	0,69	0,44	0,47	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	0,25	0,59	1,22	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 3 and 4 (CCL3/4)	n. a.	1,79	1,94	0,99
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	1,97	2,28	2,37	1,32
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5)	0,86	1,51	1,18	1,06

Chitinase 3-like 1	1,31	1,22	1,82	1,36
Cluster of Differentiation 31 (CD31)	0,89	0,87	1,03	n. a.
Dickkopf-related protein 1 (DKK-1)	1,40	1,51	1,50	1,12
Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV)	0,62	1,00	1,10	n. a.
Fibroblast growth factor 19 (FGF-19)	0,90	1,67	0,90	0,40
Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)	1,23	1,50	1,24	0,96
Growth-regulated oncogene $\alpha$ (GRO $\alpha$ )	0,60	0,46	1,83	0,49
Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2)	1,07	1,82	0,71	0,45
Interleukin 8	1,05	1,69	1,23	1,01
Interleukin 24	0,77	n. a.	n. a.	n. a.
Lipocalin-2	0,51	1,14	0,81	0,81
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	1,21	1,94	0,86	1,14
Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)	1,07	1,56	1,03	1,16
Osteopontin	0,48	2,00	0,58	n. a.
Resistin	2,00	2,91	1,85	1,75
Serpin E1	0,51	0,71	1,15	0,92
Thrombospondin-1	1,11	2,72	1,96	1,15
Urokinase receptor (uPAR)	0,99	1,91	4,71	1,64

Die humanen PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten. Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten (n = 1). Hochregulierte Zytokine sind grau hinterlegt. n. a.: not available.

Tabelle 22 Zytokin-Array mit Zellkulturüberständen der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Zytokin	162	156	155	154
Adiponectin	0,60	n. a.	n. a.	n. a.
Amphiregulin	0,58	0,33	0,58	0,17
Angiopoietin-1	0,46	n. a.	0,26	0,73

Angiopoietin-2	0,64	n. a.	0,41	n. a.
Angiopoietin-like 3	0,40	n. a.	n. a.	n. a.
B-cell activating factor (BAFF)	0,54	n. a.	n. a.	n. a.
Chemerin	4,23	3,05	2,77	4,59
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	0,85	0,71	0,66	0,81
Chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3)	0,96	0,73	0,59	0,93
Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)	0,46	0,53	0,69	0,40
Chemokine (C-C motif) ligand 6 (CCL6)	0,27	0,40	0,43	0,46
Chemokine (C-C motif) ligand 11 (CCL11)	0,62	n. a.	n. a.	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 12 (CCL12)	0,75	1,03	0,84	1,22
Chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17)	0,48	0,11	0,18	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19)	0,75	n. a.	n. a.	n. a.
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	1,17	0,49	0,52	0,71
Chemokine (C-C motif) ligand 22 (CCL22)	0,53	0,24	0,93	0,18
Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)	0,81	n. a.	0,55	n. a.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 /KC (CXCL1/KC)	0,88	0,53	0,38	0,38
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	0,87	0,63	0,57	0,72
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5)	0,85	0,83	0,66	0,45
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)	0,47	n. a.	0,35	n. a.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	0,58	0,43	0,61	0,40
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11)	0,53	n. a.	0,29	n. a.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13)	0,29	n. a.	n. a.	0,25
Chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (CXCL16)	0,82	0,28	0,24	1,21
Chitinase 3-like 1	0,44	n. a.	n. a.	n. a.
Cluster of differentiation 14 (CD14)	0,71	0,31	0,37	0,22
Cluster of differentiation 40 (CD40)	0,83	0,39	n. a.	n. a.
Cluster of differentiation 93 (CD93)	0,54	n. a.	n. a.	n. a.
Cluster of differentiation 160 (CD160)	0,47	n. a.	0,30	n. a.
Coagulation Factor III	0,46	0,29	0,30	0,39
Complement Component C5/C5a	0,56	n. a.	n. a.	n. a.
Cystatin C	1,24	0,20	0,25	0,76

Dickkopf-related protein 1 (DKK-1)	0,80	n. a.	n. a.	n. a.
Dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV)	1,09	n. a.	n. a.	n. a.
Endostatin	1,34	0,41	0,49	0,48
Epidermal growth factor (EGF)	1,28	n. a.	n. a.	n. a.
E-Selectin	0,96	n. a.	0,96	n. a.
Fibroblast growth factor – acidic (FGF-acidic)	0,40	n. a.	0,32	n. a.
Fibroblast growth factor 21 (FGF-21)	0,59	n. a.	0,46	n. a.
Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3 Ligand)	0,36	0,13	0,33	0,33
Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)	0,29	n. a.	n. a.	0,73
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	1,49	n. a.	n. a.	n. a.
Growth arrest-specific 6 (Gas 6)	0,34	n. a.	0,17	0,51
Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)	0,79	0,33	0,43	0,92
Hepatocyte growth factor (HGF)	1,01	n. a.	0,41	n. a.
Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP-1)	1,27	0,91	0,84	0,90
Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3)	0,50	0,53	0,76	0,52
Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5)	0,57	n. a.	0,43	n. a.
Insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP-6)	0,52	0,08	0,30	n. a.
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)	1,34	n. a.	n. a.	n. a.
Interferon $\gamma$	1,42	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 1 $\alpha$	0,31	n. a.	0,32	0,20
Interleukin 1 $\beta$	0,51	n. a.	n. a.	0,76
Interleukin 1 receptor agonist	0,24	0,07	0,18	0,76
Interleukin 2	0,84	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 3	0,56	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 5	0,95	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 6	1,24	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 7	1,59	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 10	0,60	n. a.	0,52	n. a.
Interleukin 11	0,40	n. a.	0,47	n. a.
Interleukin 12 p40	0,50	n. a.	0,41	n. a.
Interleukin 13	0,70	n. a.	0,40	n. a.

Interleukin 15	0,60	n. a.	0,34	n. a.
Interleukin 17A	0,79	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 22	1,17	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 23	1,43	0,47	0,39	0,76
Interleukin 27 p28	1,47	n. a.	n. a.	n. a.
Interleukin 28A/B	1,78	n. a.	n. a.	0,37
Interleukin 33	1,92	n. a.	n. a.	n. a.
Leptin	0,46	n. a.	0,41	n. a.
Leukemia inhibitory factor (LIF)	0,68	n. a.	0,70	n. a.
Lipocalin-2	0,35	0,47	1,03	n. a.
Low density lipoprotein receptor (LDL-R)	1,66	1,15	1,40	0,46
Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	1,02	n. a.	0,75	0,56
Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)	1,29	n. a.	0,57	1,69
Matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)	0,66	0,35	0,40	0,72
Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)	0,45	0,37	0,42	0,47
Myeloperoxidase	0,80	n. a.	0,59	n. a.
Osteopontin	1,20	0,59	0,61	0,72
Osteoprotegerin	1,05	0,71	0,73	0,74
Pentraxin 2	0,75	n. a.	0,42	n. a.
Pentraxin 3	0,69	n. a.	0,65	n. a.
Periostin	0,80	0,54	1,24	n. a.
Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)	0,47	0,67	0,82	0,24
Preadipocyte factor 1 (Pref-1)	1,29	n. a.	0,50	n. a.
Proliferin	1,73	n. a.	n. a.	n. a.
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	1,12	1,16	0,86	1,67
Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)	1,04	n. a.	0,79	n. a.
Regenerating islet-derived protein 3 gamma (Reg3G)	0,77	0,44	0,32	n. a.
Retinol binding protein 4 (RBP4)	0,55	0,61	0,51	0,47
Serpin E1	1,01	1,04	0,98	0,82
Serpin F1	0,60	n. a.	n. a.	n. a.
T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1)	1,27	n. a.	0,97	n. a.

Thrombopoietin	0,72	n. a.	0,53	n. a.
Thrombozyten-Selectin (P-Selectin)	0,55	n. a.	0,60	n. a.
Tumornekrosefaktor (TNF)	0,50	0,76	1,03	0,87
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	1,03	0,57	0,48	n. a.
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	0,83	0,96	0,73	0,85

Die Makrophagen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6 inkubiert, die die Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten. Die angegebenen Werte beschreiben die x-fachen Zu- bzw. Abnahmen im Vergleich zu den Kontrollwerten (n = 1). Hochregulierte Zytokine sind grau hinterlegt. n. a.: not available.

Innerhalb der am stärksten zu- und abgenommenen Zytokine wurden im Vergleich von allen Chemerin-Überexpressionen diejenigen Zytokine herausgesucht, die laut Literaturrecherchen für biologische Vorgänge im Kontext von Chemerin in der Leber und/oder im HCC als relevant beurteilt wurden. Dabei ergaben sich folgenden Zytokine: CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), IL-6, IL-8 bzw. chemokine (C-X-C motif) ligand 1/KC (CXCL1-KC), Osteopontin, TNF und PCSK9 (Abb. 22). Die Regulationen dieser Zytokine wurden im nachfolgenden Abschnitt mittels ELISA überprüft.



### 3.2.3 Analyse von durch Chemerin regulierten Zytokinen in Hepatom-Zelllinien

Die mittels der Zytokin-Arrays bestimmten Zytokine, die vergleichsweise hoch konzentriert waren und die durch die Überexpression von Chemerin-Isoformen verstärkt oder vermindert waren, wurden mittels ELISA überprüft. Im Folgenden werden die Analysen der Zytokine gezeigt, die in Hepatom-Zelllinien beeinflusst wurden.

#### 3.2.3.1 CCL2

CCL2 ist ein bekannter Chemoattraktant für Makrophagen [143]. Durch die Stimulation mit LPS wird die Expression von CCL2 in Makrophagen gefördert [165]. CCL2 nahm um das 0,38-fache im Zytokin-Array der Hepa1-6-Zellen durch die Expression von Chemerin-162 ab (Tabelle 20). Im ELISA war CCL2 nach Expression von Chemerin-162 jedoch vergleichbar mit der Kontrolle. Allerdings war CCL2 nach Expression von Chemerin-156 und Chemerin-155 erhöht, dieser Effekt jedoch war nicht signifikant (Abb. 23).

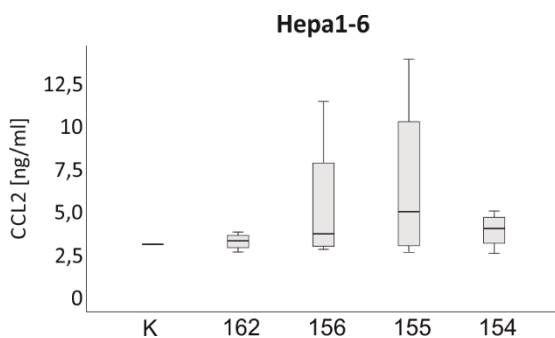


Abb. 23 CCL2 im Zellkulturüberstand der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimiert (n = 4). Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. K: Kontrolle.

### 3.2.3.2 CCL20

Das Chemokin CCL20 ist proinflammatorisch [74], fördert die Entwicklung einer Leberfibrose in der NAFLD [66] und ist im HCC hochreguliert [148]. Aus diesem Grund ist die Erforschung eines möglichen Zusammenhangs von CCL20 und Chemerin in Hepatom-Zelllinien relevant und daher wurde die Konzentration dieses Zytokins im Zellkulturüberstand mittels ELISA überprüft.

In den Zelllinien HepG2 und Huh7 wurde bei der Messung der Konzentration mit ELISA nur eine geringe Abnahme von bis zu 22 % bzw. bis zu 15 % bei der Überexpression kurzer Chemerin-Isoformen beobachtet, d. h. die Ergebnisse der ELISA (Abb. 24) und der Zytokin-Arrays (Tabelle 18 und Tabelle 19) waren vergleichbar.

Die Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen reguliert die Expression von CCL20 in humanen Hepatom-Zelllinien nicht.

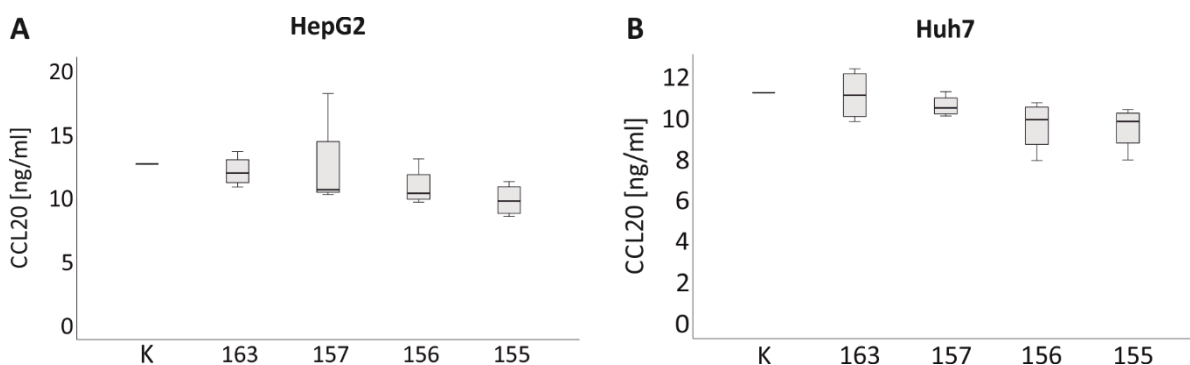


Abb. 24 CCL20 im Zellkulturüberstand der humanen Hepatom-Zelllinien (A) HepG2 (n = 4) und (B) Huh7 (n = 4), die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. K: Kontrolle.

### 3.2.3.3 IL-8

Das Zytokin IL-8 hat starke proinflammatorische Effekte. Es wird unter anderem von Makrophagen exprimiert und lockt Neutrophile an [15]. Des Weiteren fördert es die Zellmigration und -proliferation [91]. Das zum humanen IL-8 als Homolog geltende murine CXCL1/KC wurde hier in den murinen Zellkulturüberständen von Hepa1-6-Zellen untersucht [77].

In den Zelllinien Hepa1-6 und Huh7 waren die IL-8 bzw. CXCL1/KC Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle unverändert bis leicht vermindert. Im Array war Chemerin-157 in Huh7-Zellen 1,75-fach erhöht (Tabelle 19), d.h. diese Ergebnisse unterschieden sich voneinander. In Hepa1-6-Zellen, die Chemerin-156 überexprimierten war CXCL1/KC auf das 0,43-fache vermindert (Tabelle 20). Auch dieses Ergebnis konnte im ELISA nicht gezeigt werden. Innerhalb der verschiedenen Chemerin-Isoformen gab es bei beiden Zelllinien jedoch keinen Unterschied (Abb. 25 B, C).

In HepG2-Zellen dagegen war IL-8 bei der Expression von Chemerin-163 ( $p = 0,045$ ) und Chemerin-156 ( $p = 0,044$ ) signifikant erhöht (Abb. 25 A). Auch die Isoformen Chemerin-157 und Chemerin-155 schienen eine vergleichbare Wirkung zu haben. Dies war im Zytokin-Array zuvor nicht beobachtet worden (Tabelle 18).

Zusammengefasst hatten die Chemerin-Isoformen abhängig von der Zelllinie proinflammatorische, gering anti-inflammatorische oder keine Auswirkungen bezüglich des Zytokins IL-8.

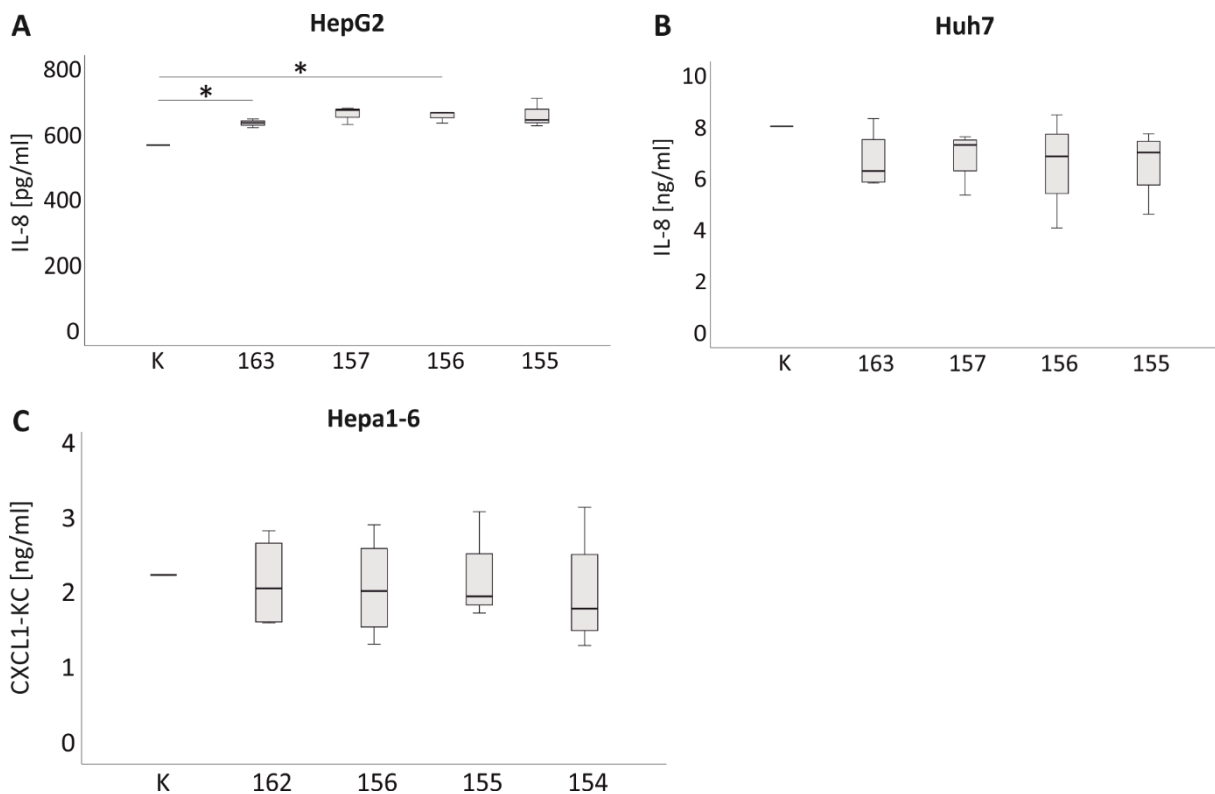


Abb. 25 IL-8 bzw. CXCL1-KC im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien (A) HepG2 ( $n = 3$ ), (B) Huh7 ( $n = 4$ ) und (C) Hepa1-6 ( $n = 4$ ), die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten. Statistik:

einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. K: Kontrolle. \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.3.4 Osteopontin

Das unter anderem im Entzündungsprozess und der Wundheilung involvierte Osteopontin [81] war laut Zytokin-Array von Huh7-Zellen bei Chemerin-157-Überexpression stark herunterreguliert, nämlich auf das 0,25-fache (Tabelle 19), in HepG2-Zellen nahm Osteopontin bei Chemerin-Expression nur leicht ab (höchstens auf das 0,76-fache) (Tabelle 18). Eine geringe Abnahme wurde auch im Osteopontin-ELISA des HepG2-Zellkulturüberstands gezeigt (Abb. 26 A). Die Abnahme von Osteopontin nach Chemerin-157-Transfektion in Huh7-Zellen wurde im ELISA jedoch nicht bestätigt. Vielmehr zeigte sich hier eine signifikante Hochregulation von Osteopontin ( $p = 0,024$ ) (Abb. 26 B).

Der Effekt der Chemerin-Isoformen auf die Sekretion von Osteopontin ist demnach Zelllinien-spezifisch.

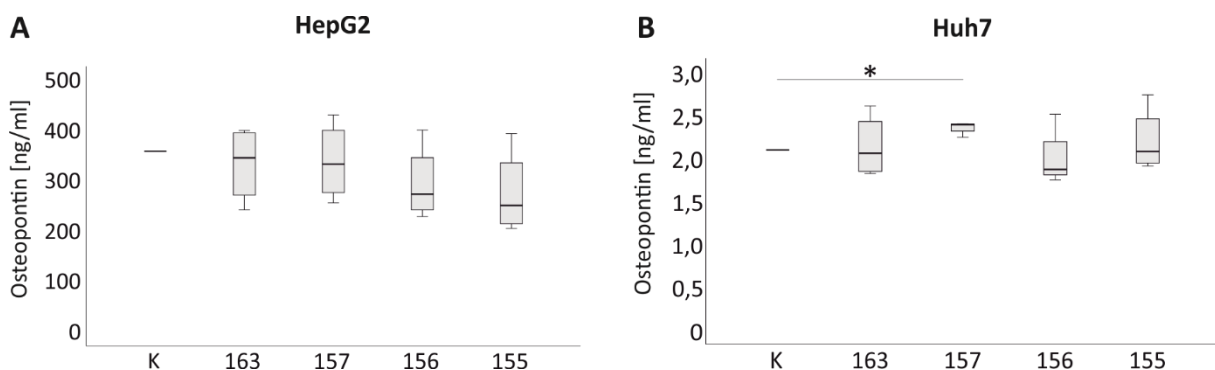


Abb. 26 Osteopontin im Zellkulturüberstand der humanen Hepatom-Zelllinien (A) HepG2 ( $n = 4$ ) und (B) Huh7 ( $n = 4$ ), die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten. K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.3.5 TNF

TNF ist ein Zytokin, das vorrangig von Makrophagen produziert wird und in viele immunologische Prozessen involviert ist [71]. Es ist bekannt, dass Chemerin die Entzündungsreaktion fördern oder hemmen kann, die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht im Detail geklärt [27].

In Hepa1-6-Zellen riefen die Isoformen Chemerin-155 und Chemerin-154 eine Zunahme von 75 % bzw. 66 % des löslichen TNF hervor, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant (Abb. 27). TNF war im Zytokin-Array von Hepa1-6-Zellen nicht gemessen worden, dafür aber im Zytokin-Array der murinen Makrophagen, die mit dem Zellkulturüberstand der Hepa1-6-Zellen stimuliert wurden. Daher war es von Interesse, die im Zellkulturüberstand vorhandene TNF-Konzentration nach der Expression der Chemerin-Isoformen zu evaluieren.

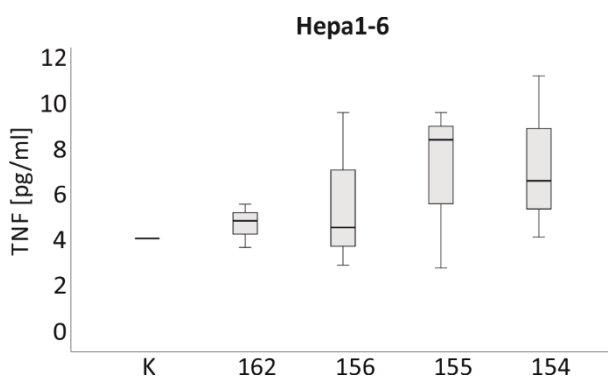


Abb. 27 TNF im Zellkulturüberstand der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten (n = 3). Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. K: Kontrolle.

### 3.2.4 Analyse von durch Chemerin regulierten Zytokinen im Zellkulturüberstand von Immunzellen

Nachfolgend werden die Effekte der Zellkulturüberstände von Hepatom-Zelllinien, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten, auf die Zytokine im Zellkulturüberstand von Immunzellen beschrieben. Die hier untersuchten Zytokine wurden anhand der Ergebnisse der Zytokin-Arrays aus den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 ausgewählt.

#### 3.2.4.1 CCL2

In humanen PBMC wurden die Unterschiede in der CCL2-Konzentration nach 24 h Kultur in konditioniertem Hepatozyten-Medium gemessen (Abb. 28 A). Zusätzlich wurde ein Teil dieser Zellen mit LPS stimuliert. Diese Stimulation zeigte bei keiner der Isoformen einen Einfluss auf die CCL2-Expression. Es ist bekannt, dass eine LPS-Stimulation die Expression von CCL2 steigert [165]. Dieser Effekt wurde bei den PBMC nicht festgestellt. Womöglich wird durch das im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinie Huh7 vorhandene Transfektionsreagenz der Effekt von LPS auf die CCL2-Expression unterdrückt.

Bei der CCL2-Konzentration der Zellen, die mit Chemerin-156 stimuliert wurden, bestand eine signifikante Hochregulation im Vergleich zu den Zellen, die mit Chemerin-155 stimuliert wurden ( $p = 0,017$ ) (Abb. 28 A). Auch bei Chemerin-157 war CCL2 im Vergleich zu Chemerin-155 erhöht. Die als inaktiv geltenden Isoformen Chemerin-163 und Chemerin-155 verminderten die CCL2-Expression um ca. 50 %. Im Zytokin-Array der PBMC wurde CCL2 nicht detektiert (Tabelle 21).

In den murinen Makrophagen wurden ebenfalls leicht erhöhte Konzentrationen nach Stimulation mit dem Zellkulturüberstand von Hepa1-6-Zellen, die Chemerin-156 und Chemerin-155-exprimierten, gemessen. Diese Regulationen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 28 B). Des Weiteren war im Zytokin-Array der RAW267.4-Zellen CCL2 bei allen Isoformen geringfügig herunterreguliert und daher nicht mit diesen Ergebnissen vergleichbar (Tabelle 22).

Die Stimulationen mit den aktiven Chemerin-Isoformen förderten die CCL2-Expression in Immunzellen.

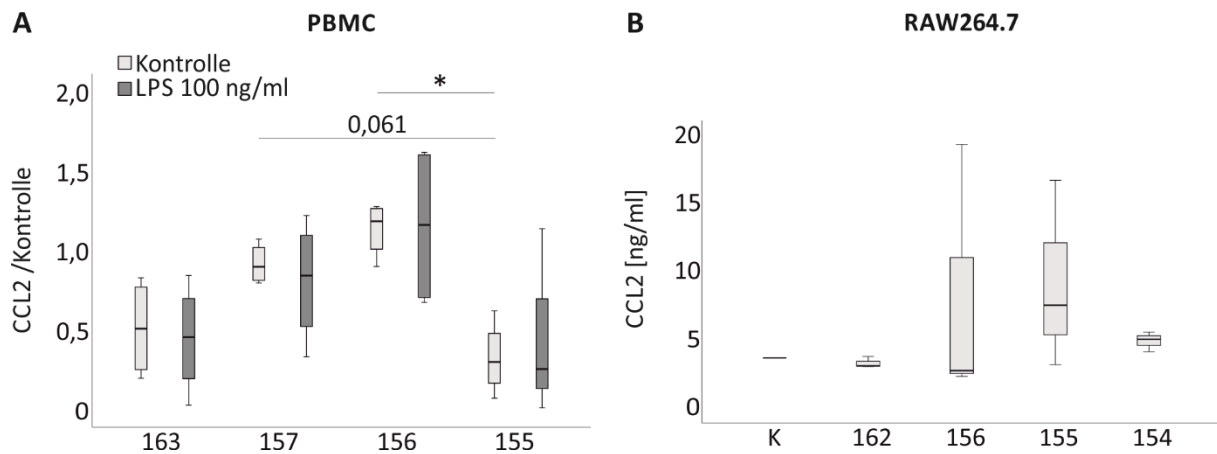


Abb. 28 CCL2 im Zellkulturüberstand von humanen PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. (A) Die humanen PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten ( $n = 4$ ). Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen CCL2-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. (B) Die Makrophagen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6 inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ . Die Zahl in der Abbildung stellt p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### 3.2.4.2 CCL20

Das proinflammatorische Zytokin CCL20 ist im HCC erhöht und ist an der Entstehung der Leberfibrose beteiligt [66, 74]. Im Zytokin-Array der PBMC zeigte sich eine Zunahme von CCL20 bei Chemerin-163 um das 1,97-fache (Tabelle 21). Eine Zunahme wurde auch bei Chemerin-157 (um das 2,28-fache) und Chemerin-156 (um das 2,37-fache) beobachtet. Diese Beobachtungen konnten mittels ELISA jedoch nicht bestätigt werden. Die Expression von CCL20 wurde durch die Chemerin-Isoformen nicht beeinflusst. LPS hatte hier offenbar keinen Effekt (Abb. 29). Eine Wirkung von LPS auf CCL20 wurde möglicherweise durch das Transfektionsreagenz überdeckt.

Die Expression von CCL20 wurde nicht durch die Chemerin-Isoformen reguliert.

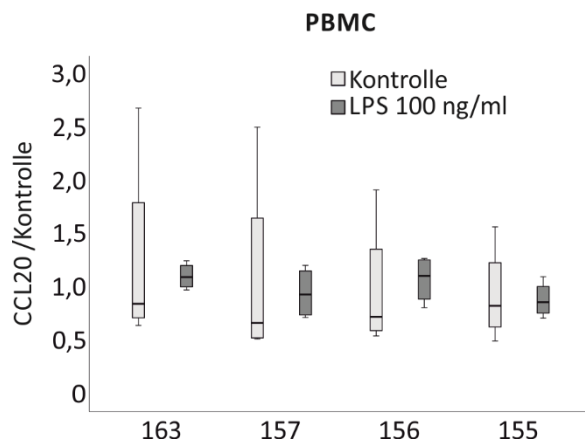


Abb. 29 CCL20 im Zellkulturüberstand humaner PBMC (n = 4). Die PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten. Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen CCL20-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. K: Kontrolle. Statistik: Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test.

### 3.2.4.3 IL-6

IL-6 kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken und befindet sich an der Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem [89]. Die Stimulation von Makrophagen mit einem synthetischen Chemerin-Peptid (homolog zum C-Terminus des murinen Chemerin-154) suppressierte die Expression von IL-6 [31]. Folglich wurde untersucht, ob die unterschiedlich aktiven Isoformen von Chemerin verschiedene Auswirkungen auf die Expression von IL-6 haben.

In humanen PBMC wurde gezeigt, dass die Expression von IL-6 durch die Stimulation von Chemerin, insbesondere der inaktiven Isoformen Chemerin-163 und Chemerin-155 suppressiert wurde. Durch die Stimulation mit LPS wurde diese Suppression von IL-6 bei allen Isoformen außer Chemerin-155 aufgehoben (Abb. 30 A).

In der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 wurde die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand nach Exposition mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6-Zellen, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimierten, vermindert (Abb. 30 B). Im Zytokin-Array war IL-6 bei Chemerin-162 dagegen leicht erhöht (um das 1,24-fache) (Tabelle 22).



Die Chemerin-Isoformen, insbesondere die inaktiven Formen Chemerin-155 bzw. Chemerin-154 (murin) unterdrückten die Expression von IL-6.

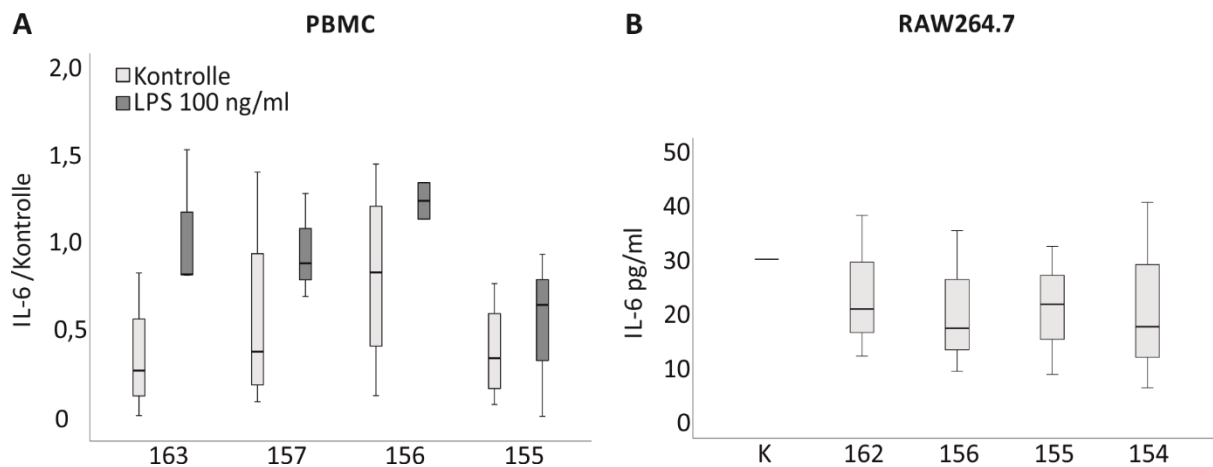


Abb. 30 IL-6 im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. (A) Die humanen PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten (n = 2 - 4). Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen IL-6-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. (B) Die Makrophagen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6 inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten (n = 3). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. \* p < 0,05.

### 3.2.4.4 IL-8

IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin [15] und wurde in humanen PBMC untersucht. CXCL1-KC gilt als murines Homolog zu IL-8 und wurde daher in den RAW264.7-Zellen untersucht.

Die Expression von IL-8 wurde in den PBMC durch LPS mehrheitlich nicht beeinflusst. Offenbar verminderte auch hier das im Zellkulturüberstand enthaltende Transfektionsreagenz die Wirkung von LPS. Die Sekretion von IL-8 wurde durch die Chemerin-Isoformen leicht supprimiert (Abb. 31 A). Diese Wirkung schien Chemerin-156 nicht hervorzurufen, wenn die Zellen mit LPS stimuliert wurden. Es bestand ein signifikanter Unterschied bei den LPS-stimulierten

Zellen, die Chemerin-156 oder Chemerin-155 exprimierten ( $p = 0,030$ ). Der unterdrückende Effekt von Chemerin-155 auf IL-8 erschien hier am stärksten. Im Zytokin-Array war IL-8 bei Chemerin-157 um das 1,69-fache hochreguliert, was im ELISA jedoch nicht zutrif (Tabelle 21).

In RAW264.7 wurde ebenfalls eine starke, jedoch nicht signifikante Reduktion von CXCL1/KC durch alle Chemerin-Isoformen beobachtet (Abb. 31 B). Der Zytokin-Array zeigte ebenfalls herunterreguliertes CXCL1/KC, insbesondere durch die kürzeren Isoformen (0,38-fach) (Tabelle 22).

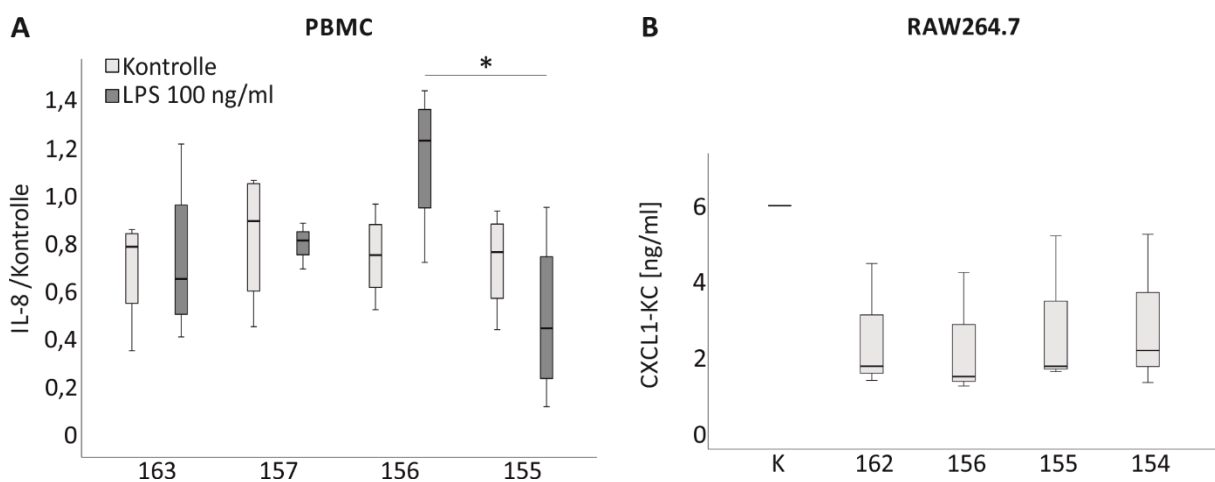


Abb. 31 IL-8 bzw. CXCL1-KC im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. (A) Die humanen PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten ( $n = 4$ ). Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen IL-8-Werte bzw. CXCL1/KC-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. (B) Die Makrophagen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6 inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.4.5 Osteopontin

Osteopontin ist ein Zytokin, das an der Entzündung beteiligt ist [81]. Durch die Stimulation von humanen PBMC mit LPS wurde die Expression von Osteopontin im Vergleich zu den

nicht-stimulierten Zellen nur geringfügig hochreguliert. Dieses Zytokin wurde in PBMC durch die Chemerin-Isoformen nicht stark reguliert. Lediglich Chemerin-155 verursachte eine leichte Suppression von Osteopontin, sowohl bei den mit LPS stimulierten als auch den nicht-stimulierten Zellen (Abb. 32). Diese Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen des Zytokin-Arrays nicht überein (Tabelle 21).

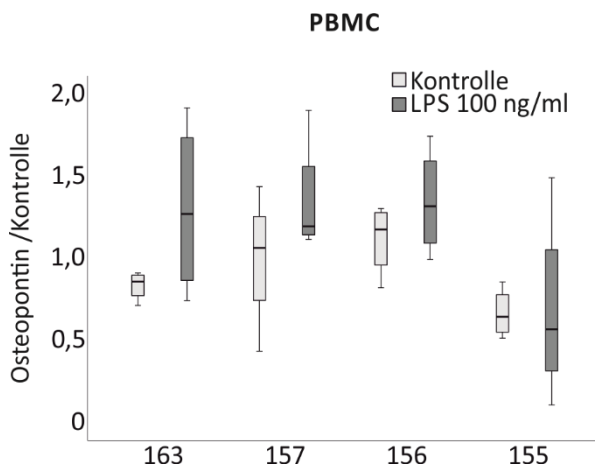


Abb. 32 Osteopontin im Zellkulturüberstand humaner PBMC (n = 3 - 5). Diese Zellen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten. Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen Osteopontin-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. K: Kontrolle. Statistik: ein-faktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test. \* p < 0,05.

### 3.2.4.6 TNF

TNF ist ein Zytokin, das vorrangig von Makrophagen produziert wird und in viele immunologische Prozessen involviert ist [71]. Chemerin dagegen supprimiert oder fördert die Entzündungsreaktion unter verschiedenen Bedingungen [27]. Zudem wurde in Makrophagen eine Reduktion der Expression von TNF nach Chemerin-Stimulation gezeigt [31]. Aus diesem Grund sind die Effekte durch die unterschiedlich aktiven Chemerin-Isoformen auf TNF in Makrophagen interessant.

In humanen PBMC hatten die Chemerin-Isoformen keinen Effekt auf die Sekretion von TNF. Auch durch die Stimulation mit LPS wurden keine Regulationen von TNF durch Chemerin hervorgerufen (Abb. 33 A). Im Zytokin-Array wurde TNF nicht detektiert (Tabelle 21).

Der Zytokin-Array der murinen Makrophagen zeigte eine unveränderte bis leicht geringere Expression von TNF (Tabelle 22). In RAW264.7-Zellen schien die Stimulation mit Chemerin, insbesondere mit Chemerin-154 die Expression von TNF zu supprimieren, wenn auch nicht signifikant ( $p = 0,076$ ) (Abb. 33 B). Die Effekte der einzelnen Isoformen unterschieden sich hier nicht. Die Ergebnisse des Zytokin-Arrays und des ELISA sind vergleichbar. Das Ergebnis steht im Einklang mit Berichten aus der Literatur [31].

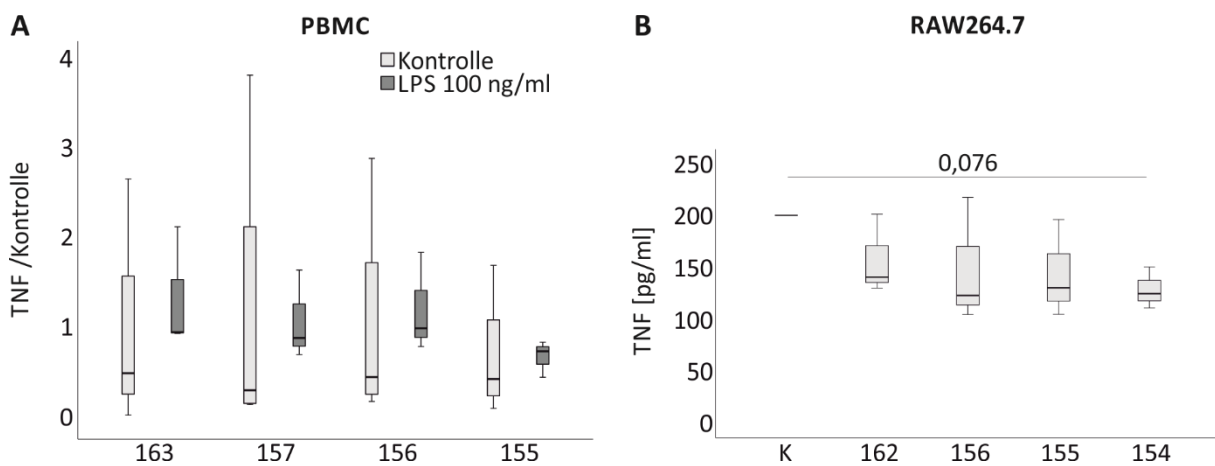


Abb. 33 TNF im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. (A) Die humanen PBMC wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-163, Chemerin-157, Chemerin-156 oder Chemerin-155 überexprimierten ( $n = 3 - 4$ ). Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden zu einem Teil der Zellen 100 ng/ml LPS hinzugegeben. Die gemessenen TNF-Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Kontrollen dividiert. (B) Die Makrophagen wurden für 24 h mit Zellkulturüberstand von Hepa1-6 inkubiert, die die Chemerin-Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156, Chemerin-155 oder Chemerin-154 überexprimierten ( $n = 3$ ). K: Kontrolle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test bzw. Welch-Test mit Games-Howell post-hoc Test. \*  $p < 0,05$ . Die Zahl in der Abbildung stellt p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (0,05) dar.

### **3.3 Chemerin im humanen HCC im Vergleich zum kolorektalen Karzinom mit Lebermetastasen**

Neben den *in-vitro*-Untersuchungen für die Aufklärung der Rolle von Chemerin in den Hepatozyten war es auch von Interesse die Messung von Chemerin als möglichen klinisch relevanten Parameter zu etablieren. Da Serum-Chemerin bei Patienten mit CRC erhöht ist [5, 155] und bei HCC-Patienten möglicherweise vermindert ist [109], könnte es als Marker zur Differentialdiagnose kolorektaler Lebermetastasen und primärer Lebertumore herangezogen werden.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden im International Journal of Molecular Sciences unter dem Titel „Serum Chemerin Does Not Differentiate Colorectal Liver Metastases from Hepatocellular Carcinoma“ im Jahr 2019 veröffentlicht [53].

#### **3.3.1 Chemerin in HCC- und CRC-Patienten in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und BMI**

Um zu untersuchen, ob sich Chemerin als Marker zur Unterscheidung von HCC und CRC-Metastasen eignet, wurde Chemerin im Serum in einer Kohorte von 32 HCC-Patienten, 36 CRC-Patienten und 49 Patienten ohne Tumorerkrankungen gemessen. Die Parameter und Tumormarker dieser Kohorte wurden im Routinelabor gemessen und sind in Tabelle 14 aufgelistet. In der HCC-Patientengruppe befanden sich weniger Frauen als in der Kontrollgruppe.

In HCC-Patienten wurde höheres Bilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) als in CRC-Patienten gemessen. In diesen Patienten war ALT und AST im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Tabelle 14). Auch die Komorbiditäten Hypercholesterinämie, Hypertonie und Hyperurikämie innerhalb der Gesamtkohorte wurden erfasst. Des Weiteren wurden Tumor-Grad, Stadium des Primärtumors, vaskuläre Invasion und TNM-Stadium dokumentiert (Tabelle 14).

Die Serum-Konzentrationen von Chemerin wurden in HCC und CRC und der Kontrollgruppe gemessen und verglichen (Abb. 34 A). Innerhalb dieser drei Gruppen gab es keine Unterschiede bezüglich der Chemerin-Konzentrationen. Auch zwischen Männern und Frauen der Krebspatientengruppe wurde kein Unterschied von Chemerin festgestellt. Auch wenn die Gruppen der Kontrollpatienten, der HCC-Patienten und der CRC-Patienten einzeln betrachtet wurden, bestand zwischen den Geschlechtern kein Unterschied. Chemerin korrelierte auch nicht mit dem Alter oder dem BMI der Krebspatienten. Jedoch war Chemerin mit dem Alter, aber nicht mit dem BMI in der Kontrollgruppe assoziiert ( $r = 0,368$ ,  $p = 0,009$ ).

### **3.3.2 Chemerin und die Tumormarker carcinoembryonic antigen (CEA) und cancer antigen 19-9 (CA19-9) in HCC- und CRC-Patienten**

Neben Chemerin wurden der bereits etablierte HCC-Tumormarker AFP und der CRC-Tumormarker CEA in den Seren gemessen [30]. Auch CA19-9 kann als weiterer Tumormarker dienen und wurde ebenfalls untersucht [154].

Die AFP-Level unterschieden sich zwischen den HCC- und CRC-Patienten nicht (Daten nicht gezeigt). Dagegen waren die Marker CEA und CA19-9 im Serum von CRC-Patienten signifikant erhöht (Abb. 34 B, C). In keiner der beiden Patientengruppen korrelierte Chemerin mit den Tumormarkern AFP, CEA oder CA19-9 (Daten nicht gezeigt). Chemerin korrelierte ebenfalls nicht mit der TumorgroÙe, dem Differenzierungsgrad oder dem TNM-Stadium der HCC-Patienten (Abb. 34 D). Krebspatienten mit und ohne vaskuläre Invasion hatten eine ähnliche Chemerin-Konzentration im Serum (Abb. 34 E). Außerdem hatten Personen, die eine neoadjuvante Therapie bekamen, eine ähnliche Serum-Chemerin-Konzentration, wie Personen, die diese Therapie nicht bekamen (Abb. 34 F).

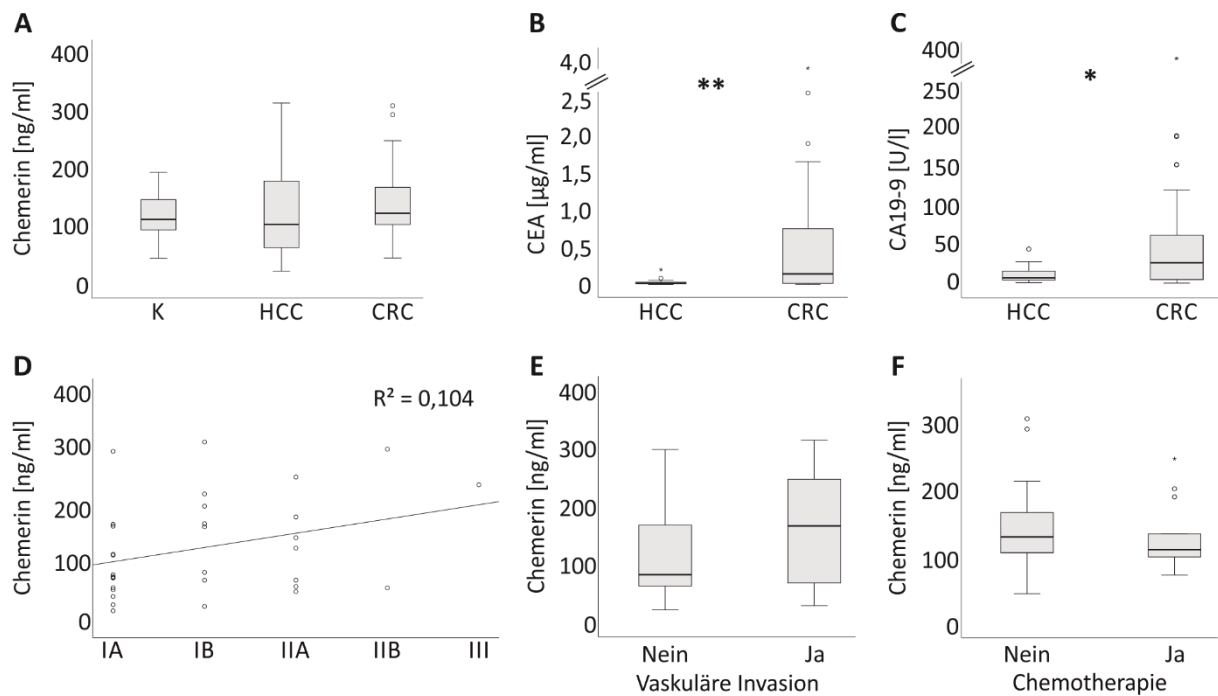


Abb. 34 Chemerin und die Tumormarker CEA und CA19-9. (A) Chemerin im Serum von Kontrollen (n = 49), HCC-Patienten (n = 32) und CRC-Patienten (n = 36). (B) CEA im Serum von HCC- (n = 20) und CRC-Patienten (n = 32). (C) CA19-9 im Serum von HCC- (n = 19) und CRC-Patienten (n = 31). (D) Korrelation von Serum-Chemerin mit den TNM-Stadien von HCC-Patienten. (E) Chemerin im Serum von HCC-Patienten mit (n = 12) und ohne (n = 20) vaskuläre Invasion. (F) Serum-Chemerin in CRC-Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie bekamen (n = 13) und Patienten, die diese Therapie bekamen (n = 23). Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test bzw. Mann-Whitney-U-Test bzw. Spearman-Korrelation. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01.

### 3.3.3 Chemerin in Abhängigkeit von Komorbiditäten bei HCC- und CRC-Patienten

Neben den direkt auf die Krebserkrankungen bezogenen Faktoren wurde die Korrelation von Chemerin mit Komorbiditäten untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass Chemerin in T2D erhöht ist und mit Kennzeichen des metabolischen Syndroms zusammenhängt [20, 27, 145, 177]. Die Chemerin-Konzentrationen von 21 Patienten, die sowohl an Krebs als auch T2D erkrankt waren, wurden diesbezüglich untersucht. Jedoch war Chemerin in Patienten mit T2D nicht erhöht im Vergleich zu Krebspatienten ohne T2D. Auch wenn die HCC- und CRC-

Patienten und die Kontrollgruppe einzeln berechnet wurden, konnte keine Korrelation gefunden werden (Abb. 35 A und Daten nicht gezeigt). In der Gruppe der HCC-Patienten gab es mehr Menschen mit T2D als in der CRC-Gruppe und in der Kontrollgruppe (Tabelle 14).

Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit des Chemerin-Levels von der Hypertonie untersucht. Es wurde in anderen Studien gezeigt, dass Chemerin bei Bluthochdruck hochreguliert ist [27]. Chemerin war bei den Tumorpatienten, die zugleich eine Hypertonie hatten, signifikant höher als in denen, die normalen Blutdruck hatten (Abb. 35 B). Zusätzlich wurde gezeigt, dass bei Hypercholesterinämie und Hyperurikämie im Serum der Krebspatienten mehr Chemerin zu messen war als bei jenen, die keine dieser beiden Erkrankungen hatten (Abb. 35 C, D).

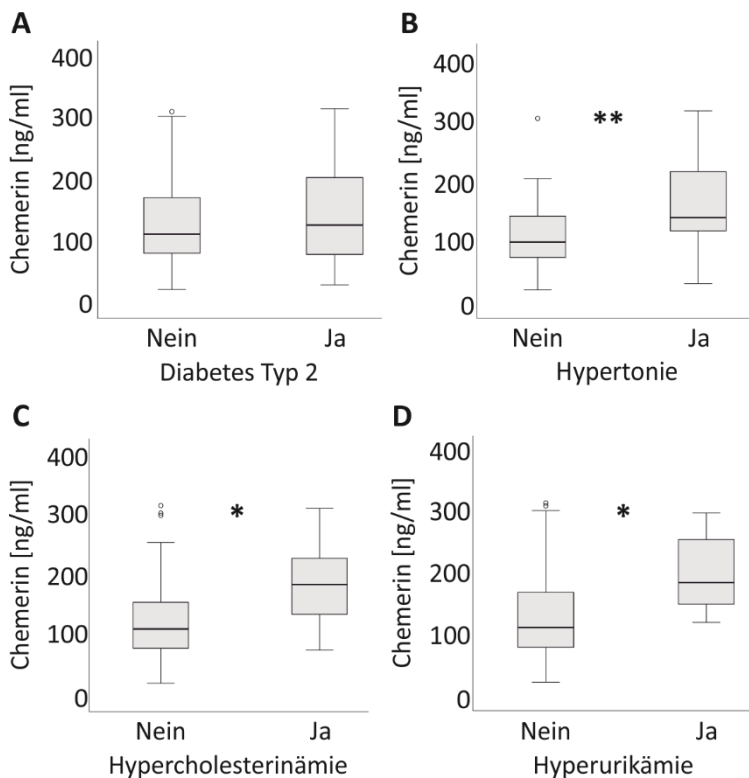


Abb. 35 Chemerin bei Patienten mit Komorbiditäten T2D, Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie. (A) Chemerin in Patienten mit (n = 21) und ohne T2D (n = 47). (B) Chemerin in Patienten mit (n = 34) und ohne Hypertonie (n = 34). (C) Chemerin in Patienten mit (n = 11) und ohne Hypercholesterinämie (n = 57). (D) Chemerin in Patienten mit (n = 7) und ohne Hyperurikämie (n = 61). Statistik: Mann-Whitney-U-Test. \* p < 0,05 \*\* p < 0.01.



Im Folgenden wurden Patienten ohne (Abb. 36 A, B) und mit Komorbiditäten (Abb. 36 C, D) separat betrachtet.

Bei Personen, die keine Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie hatten wurden die Chemerin-Konzentrationen verglichen. In dieser Untergruppe war Chemerin bei CRC-Patienten im Vergleich zu HCC-Patienten erhöht, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 36 A). Ebenso war CEA induziert (Abb. 36 B). AFP war dagegen bei HCC-Patienten erhöht (Abb. 36 B).

Dagegen wurde bei der Patientengruppe, die die zuvor genannten Erkrankungen aufwies, kein Unterschied in der Chemerin-Konzentration in den beiden Krebspatientengruppen und der Kontrollgruppe gefunden (Abb. 36 C). Der Tumormarker CA19-9 stieg in den CRC-Patienten an. AST, ALT und GGT waren dagegen in HCC-Patienten im Vergleich zu CRC-Patienten signifikant hochreguliert (Abb. 36 D).

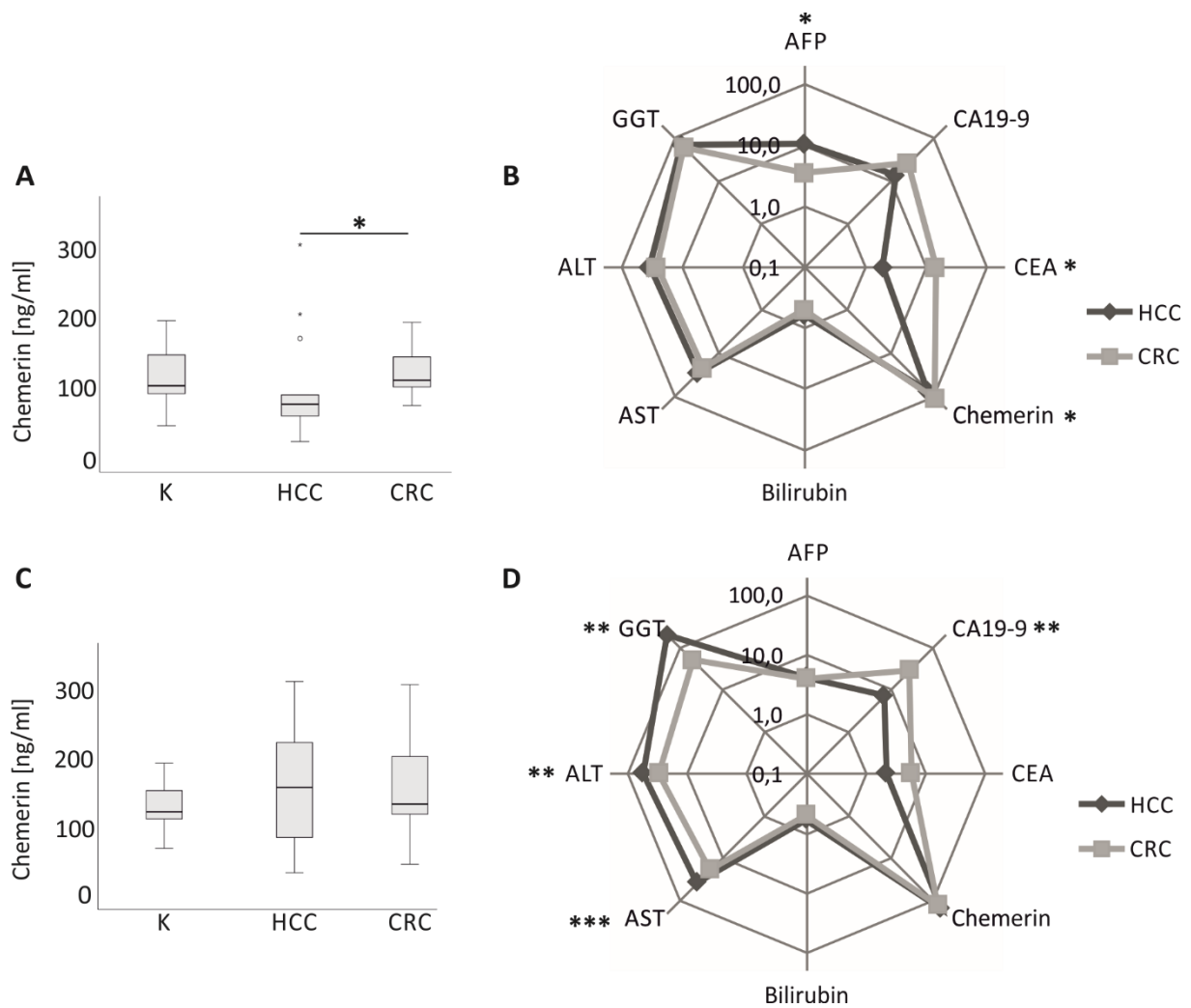


Abb. 36 Serum-Chemerin in Patienten ohne und mit Komorbiditäten. (A) Chemerin in Kontrollen (n = 27), HCC-Patienten (n = 14) und CRC-Patienten (n = 18), die nicht an Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie litten. (B) Chemerin, CEA, CA19-9, AFP, GGT, ALT, AST und Bilirubin in Krebspatienten, die die zuvor genannten Komorbiditäten nicht aufwiesen. (C) Chemerin in Kontrollen (n = 22), HCC-Patienten (n = 18) und CRC-Patienten (n = 18), die an den genannten Komorbiditäten litten. (D) Chemerin, CEA, CA19-9, AFP, GGT, ALT, AST und Bilirubin in Krebspatienten mit den zuvor genannten Komorbiditäten. Die Diagramme in B und D zeigen die Mediane in logarithmischer Darstellung. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test bzw. Mann-Whitney-U-Test. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

### 3.3.4 Korrelation von Chemerin mit der Leberfunktion von HCC- und CRC-Patienten

Bisher ist nicht geklärt, ob Serum-Chemerin als Biomarker für die Leberfunktion herangezogen werden kann. Die Chemerin-Konzentrationen der Kontrollgruppe korrelierten jedoch nicht mit ALT, AST oder Bilirubin (Tabelle 23). In der Gruppe bestehend aus HCC- und CRC-Patienten korrelierte Chemerin ebenfalls nicht mit der ALT oder AST, und auch nicht mit GGT oder Prothrombinzeit. Auch bei getrennter Betrachtung war dies nicht der Fall (Tabelle 23). Es wurde gemessen, dass bei den Krebspatienten Chemerin mit Bilirubin negativ korrelierte (Abb. 37 A und Tabelle 23). Dies beruhte auf einer Korrelation in der CRC-Patientengruppe, da diese Korrelationen in der HCC-Gruppe nicht vorhanden waren (Tabelle 23).

Tabelle 23 Korrelationen (Koeffizienten und p-Werte) von Chemerin mit Laborparametern von HCC-, CRC-Patienten und Kontrollen.

Korrelation von Chemerin mit:	HCC	CRC	alle Tumorpatienten	Kontrollen
Prothrombinzeit (%)	r = -0,103 p = 0,587	r = -0,262 p = 0,128	r = -0,172 p = 0,170	n. a.
Bilirubin (mg/dL)	r = -0,316 p = 0,083	<b>r = -0,477</b> <b>p = 0,004</b>	<b>r = -0,386</b> <b>p = 0,001</b>	r = -0,930 p = 0,540
ALT (U/L)	r = -0,103 p = 0,590	r = -0,186 p = 0,292	r = -0,174 p = 0,169	r = -0,182 p = 0,215
AST (U/L)	r = 0,100 p = 0,593	r = -0,267 p = 0,127	r = -0,070 p = 0,577	r = -0,196 p = 0,181
GGT (U/L)	r = 0,145 p = 0,469	r = -0,298 p = 0,092	r = -0,087 p = 0,511	n. a.

Signifikante Korrelationen sind in fett angegeben. Statistik: Spearman-Korrelation. n. a.: not available.

Die Chemerin-Level aller HCC-Patienten wurden in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum untersucht. Sie wurden in Patienten verglichen, die einen hohen Alkoholkonsum hatten (> 30 g/d), einen täglichen, aber geringeren Alkoholkonsum (< 15 g/d), einen seltenen oder gar keinen Alkoholkonsum (Abb. 37 B). Die Chemerin-Konzentrationen aller Gruppen innerhalb der

HCC-Patienten-Kohorte waren vergleichbar. Die Chemerin-Level hingen demnach nicht vom Alkoholkonsum bei einer HCC-Erkrankung ab.

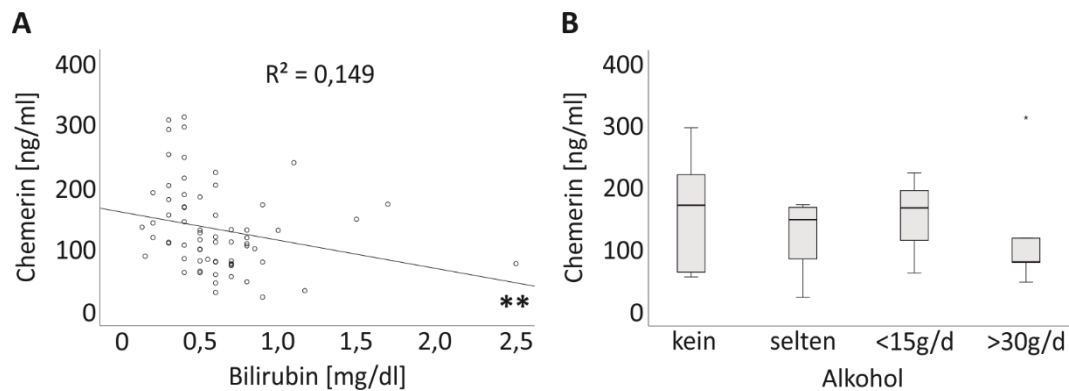


Abb. 37 Die Beziehung von Chemerin zu Bilirubin und Alkoholkonsum. (A) Die Korrelation von Chemerin mit Bilirubin in HCC-Patienten (n = 31) und CRC-Patienten (n = 35). (B) Chemerin in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum in 24 HCC-Patienten (kein: n = 11, selten: n = 5, < 15 g/d: n = 3, > 30 g/d: n = 5). Statistik: Spearman-Korrelation bzw. einfaktorielles ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. \*\* p < 0,01.

Die Stadien der Steatose, Entzündung und Fibrose werden in unterschiedliche Grade eingeteilt [94]. Die Chemerin-Konzentration im Serum der Krebspatienten wurde in Abhängigkeit dieser Parameter untersucht. Es wurde gezeigt, dass hier keinerlei Zusammenhänge bestanden (Abb. 38). Auch wenn die HCC- und CRC-Patienten einzeln betrachtet wurden, konnte keine Abhängigkeit von den Stadien der Leberschädigung nachgewiesen werden. Die Chemerin-Konzentration im Serum korrelierte demnach nicht mit den Stadien der Leberschädigung.

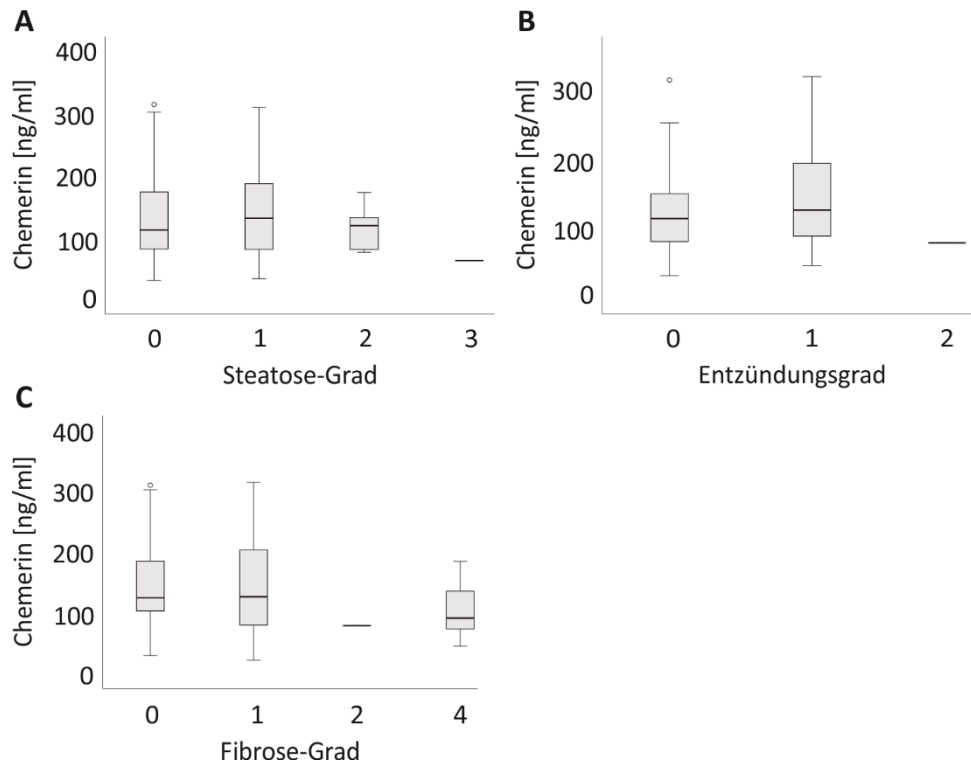


Abb. 38 Zusammenhang von Chemerin mit der Leberschädigung in Krebspatienten. (A) Chemerin in Abhängigkeit vom Steatose-Grad (Grad 0: n = 25, Grad 1: n = 27, Grad 2: n = 5, Grad 3: n = 1) (B) Chemerin in Abhängigkeit von der Leberentzündung (Grad 0: n = 28, Grad 1: n = 29, Grad 2: n = 1) (C) Chemerin in Abhängigkeit von der Leberfibrose (Grad 0: n = 28, Grad 1: n = 25, Grad 2: n = 1, Grad 4: n = 14). Statistik: Kruskal-Wallis-Test.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Chemerin-Isoformen in Leberzellen und im HCC untersucht. Dazu zählte neben den Analysen zur Zytotoxizität, Proliferation, Migration und zum Lipidstoffwechsel in Leberzellen auch der Einfluss von Chemerin auf Immunzellen. In der Leber befindet sich eine der größten Immunzellpopulationen des menschlichen Körpers. Hier sind alle Untergruppen der Leukozyten vertreten [55]. Aus diesem Grund wurden einerseits die Funktionen von Chemerin auf interne Zellprozesse von Hepatom-Zellen analysiert und andererseits dessen Wirkung auf Zytokine, die zur Kommunikation mit nicht-parenchymalen Leberzellen wie den Immunzellen dienen, untersucht. In diesem Zusammenhang wurden die Effekte der Exposition von Immunzellen mit Zellkulturüberständen von Hepatom-Zellen betrachtet.

### 4.1 Expression rekombinanter Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien

Chemerin wird als biologisch inaktives Prochemerin sezerniert und durch C-terminale Proteolyse aktiviert. Hierbei entstehen mehrere Isoformen. Die bisher am besten charakterisierte Variante ist das humane Chemerin-157 bzw. das murine Chemerin-156. Da man davon ausgeht, dass sich die Isoformen in ihrer Funktion unterscheiden, wurden diese und weitere Chemerin-Isoformen rekombinant hergestellt.

Die Expression von Chemerin wurde im Zelllysate und im Zellkulturüberstand von Hepatom-Zelllinien nach Transfektion mit Plasmiden zur Überexpression der Chemerin-Isoformen untersucht. Es sei angemerkt, dass hierbei nur die Detektion aller Chemerin-Isoformen möglich war und nicht zwischen den Isoformen unterschieden werden konnte.

Dabei zeigte sich, dass in der humanen Zelllinie HepG2 die Intensität der zellulären Expression von Chemerin bei allen Isoformen ähnlich war. Auch im Zellkulturüberstand war dies der Fall. Im Zelllysate von Huh7-Zellen war dagegen die Expressionen der unterschiedlichen Isoformen vergleichbar, im Zellkulturüberstand war Chemerin nach Expression von Chemerin-

157 jedoch leicht erhöht. Da alle Isoformen eine ähnlich hohe Expression im Zelllysats aufwiesen, könnte dies auf eine erhöhte Stabilität von löslichem Chemerin-157 hinweisen. Es muss sich hier auch nicht um Chemerin-157 handeln. Im Zellkulturüberstand aktive Proteasen könnten aus Chemerin-157 andere detektierbare Isoformen generiert haben. Der Abbau der Isoformen Chemerin-162, Chemerin-156 und Chemerin-155 zu nicht mehr detektierbaren Produkten könnte die Ursache der geringeren gemessenen Chemerin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von Huh7-Zellen sein. Allerdings müssen die oben getroffenen Hypothesen im Detail geprüft werden. Ein erster Schritt wäre die massenspektrometrische Analyse der Chemerin-Isoformen in den Zellkulturüberständen.

Auch in Hepa1-6-Zellen könnte ein ähnlicher Mechanismus stattgefunden haben. Chemerin war nach der Expression von Chemerin-162 im Zelllysats noch am schwächsten exprimiert, während im Zellkulturüberstand die Chemerin-Konzentration aller Isoformen ähnlich waren. Womöglich wurden die murinen Isoformen Chemerin-156, Chemerin-155 und Chemerin-154 zum Teil abgebaut, sodass die gemessene Chemerin-Konzentration geringer war.

Die Chemerin-mRNA war bei allen Isoformen in den Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 jeweils etwa gleich stark exprimiert. Die in der semi-quantitativen Real-Time-PCR verwendeten Primer messen alle Chemerin-Isoformen und zielen nicht auf bestimmte Isoformen ab. Man geht jedoch aufgrund der nach Transfektion deutlich stärker exprimierten mRNA im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen davon aus, dass die erhöhte gemessene mRNA der künstlich herbeigeführten Expression der Chemerin-Isoformen zuzuschreiben ist.

## 4.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf Zellprozesse von Hepatom-Zelllinien

### 4.2.1 Zytotoxische Aktivität von Chemerin-Isoformen

Chemerin wurde sowohl als tumorfördernd als auch -hemmend beschrieben [58]. Daher wurde das Potenzial von Chemerin, auf Tumorzellen zytotoxisch zu wirken, *in vitro* untersucht. Hierbei lag der Fokus auf den Unterschieden von rekombinanten aktiven und inaktiven Chemerin-Isoformen. Keine der Chemerin-Isoformen löste eine Zellschädigung in den Hepatom-Zelllinien aus. Anhand dieser Messung wird geschlossen, dass keine vermehrte Nekrose stattfindet und die Zellviabilität von Hepatom-Zelllinien durch überexprimiertes Chemerin nicht beeinflusst wird.

### 4.2.2 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf die Zellproliferation

Die Zellproliferation bzw. -viabilität wurde in den Hepatom-Zelllinien, die rekombinantes Chemerin exprimierten, untersucht. In der Literatur wurde beschrieben, dass Chemerin-157 keinen Effekt auf die Proliferation von humanen Adenokarzinomzellen des Magens (AGS) hatte [146]. In Hepa1-6-Zellen führte weder die Überexpression von Chemerin noch die exogene Stimulation mit rekombinantem Chemerin zu einer verstärkten Proliferation oder Apoptose dieser Zellen [110].

Die Ergebnisse aus der Literatur konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Chemerin-Isoformen hatten auf die Proliferation der Hepatom-Zelllinien keinen nennenswerten Einfluss. Zwar zeigten sich geringe Effekte in Huh7-Zellen, die mit Chemerin-163 transfiziert worden waren, allerdings ergaben die beiden hier verwendeten Assays zur Messung der Zellviabilität und -proliferation konträre Resultate. In HepG2-Zellen wurde die Proliferation durch die Expression von Chemerin-Isoformen leicht supprimiert.

Auch in Hepa1-6-Zellen stimmten die Messungen zur Zellviabilität im MTT-Assay mit der Erfassung der Proliferation mittels Zellzählung nach Expression des murinen Chemerin-155



nicht überein. Die in der Zellzählung ermittelte Hochregulation konnte im MTT-Assay nicht gezeigt werden. Wie bereits erwähnt, könnten diese unterschiedlichen Ergebnisse an den verschiedenen Zeitpunkten dieser beiden Messungen liegen. Womöglich verursachte Chemerin-155 eine erhöhte Proliferation ausschließlich in den ersten 24 - 48 Stunden nachdem die Zellen mit den Chemerin-Konstrukten transfiziert wurden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die extrazellulären Proteasen innerhalb dieser Zeit die Chemerin-Isoformen weiter prozessiert hatten und die Wirkung der ursprünglich durch Transfektion eingebrachten Chemerin-Isoformen daher nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Insofern könnte der Effekt von kürzeren Isoformen, die potenziell aktiver oder auch inaktiver waren, dokumentiert worden sein. Daher könnten sich die Effekte der rekombinanten Isoformen im Verlauf des Versuchs geändert oder sogar umgekehrt haben. Um dies zu testen, wären Versuche mit dem Zusatz von Proteaseinhibitoren erforderlich.

Ein weiterer Faktor könnte ein Nährstoffmangel im Zellkulturmedium sein, der einige Tage nach Beginn des Experiments eintreten kann. Dieser führte möglicherweise zu einer verringerten Proliferation der Zellen in der Zeit zwischen 48 - 72 h nach der Transfektion. Die Zellen sind somit Stress ausgesetzt und trotz potenziell proliferationsfördernder Eigenschaften von Chemerin wird die Zellteilung verlangsamt oder gestoppt. Allerdings sollte dieser Effekt eines Nährstoffmangels auch in den Kontroll-transfizierten Zellen nachzuweisen sein.

Zudem hat das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 eine zytotoxische Wirkung [176]. Diese Zytotoxizität war jedoch bei der Kontrolle als auch den Chemerin-Isoformen exprimierenden Zellen vergleichbar hoch.

Um die Messergebnisse der Proliferation zu optimieren, könnte entweder zu einem oder mehreren früheren Zeitpunkten (innerhalb der ersten 24 h nach der Transfektion) gemessen oder ein mehrfacher Austausch des Zellkulturmediums vorgenommen werden, um dem Nährstoffmangel entgegenzuwirken. Hier könnten sich dadurch vermehrt diejenigen Chemerin-Isoformen im Zellkulturmedium befinden, die ursprünglich exprimiert wurden. Dies könnte letztendlich die Messung ihrer spezifischen Wirkung auf die Proliferation ermöglichen. Weiterhin könnten langfristige Untersuchungen der Proliferation mittels stabiler Transfektion der Zellen weitere Erkenntnisse zur Wirkung von Chemerin-Isoformen ergeben.

### 4.2.3 Chemerin-Isoformen in der Migration

Die Metastasierung und Invasion von tumorösen Zellen ist eines der Kennzeichen von Krebs [65]. Die Förderung der Metastasierung von Tumorzellen ist für das Fortschreiten der Krebserkrankung von entscheidender Bedeutung. Daher wurde untersucht, ob und inwiefern Chemerin diese Eigenschaft von Hepatom-Zellen beeinflusst. Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass Chemerin-157 über den Ras homolog family member A (RhoA)/Rho-associated protein kinase-(ROCK)-Signalweg agiert und in murinen Prä-B-Lymphomzellen und AGS-Zellen zur verstärkten Migration führte [146]. Im HCC verhinderte Chemerin allerdings die Metastasierung [107].

In allen drei in dieser Arbeit untersuchten Hepatom-Zelllinien wurden ausschließlich unveränderte bzw. Migrations-hemmende Effekte beobachtet. Die in Rourke et al. erwähnten Proteine ROCK1 und ROCK2 sind Rho-Kinasen und sind an der Migration von Zellen beteiligt, indem sie die Organisation des Zytoskeletts steuern [162]. Huh7-Zellen weisen jedoch nicht-synonyme Mutationen im ROCK1-Gen auf [204]. Möglicherweise verhindern diese Mutationen die Funktion von ROCK1 und somit wird ein potenziell Migrations-fördernder Effekt in dieser Zelllinie nicht entsprechend vermittelt.

Wie in der Hepatom-Zelllinie 7404, PVTT-1 und Hep3B von Li et al. gezeigt wurde, hemmte die Überexpression von Chemerin über den CMKLR1/PTEN/AKT-Signalweg die Migration dieser Zellen [107]. Dabei muss erwähnt werden, dass in dieser Studie nicht geklärt wurde, welche Chemerin-Isoformen im Zellkulturmedium vorlagen und für diesen Effekt verantwortlich waren.

Eine verminderte Migration nach Expression von Chemerin-163 konnte auch in HepG2-Zellen und Huh7-Zellen beobachtet werden. In Hepa1-6-Zellen zeigte die Überexpression von Chemerin-162 keine Verminderung der Migration. Im Einklang mit diesem Ergebnis war auch die Beobachtung, dass sich die Aktivierung der AKT in Hepa1-6 nicht veränderte und Chemerin über diesen Signalweg offenbar keinen Einfluss auf die Zellmigration hatte. Allerdings wurde in HepG2-Zellen und Hepa1-6-Zellen eine deutliche Verminderung der Migration bei Überexpression von Chemerin-157 bzw. Chemerin-156 nachgewiesen. Auch hieran war der AKT-Signalweg nicht beteiligt.

Schlussendlich wird gefolgert, dass Chemerin-157 zu einer Verlangsamung der Migration von bestimmten Hepatom-Zelllinien führte, alle anderen Isoformen jedoch keinen oder einen geringen Effekt zeigten.

#### **4.2.4 Chemerin und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, Stat3, ERK 1/2, p38 MAPK und AKT**

Der Transkriptionsfaktor Stat3 ist für das Tumorwachstum verantwortlich und ist in aggressiven Lebertumoren phosphoryliert [69, 70]. Die Aktivierung von Stat3 nach Überexpression des als inaktiv geltenden Chemerin-155 in HepG2 deutet auf eine tumorfördernde Funktion dieser Isoform hin. Eventuell war auch das Ausschalten der Aktivität von Chemerin durch Prozessierung zu einer anderen Isoform der Grund für die erhöhte Stat3-Aktivierung. Bisher ist allerdings keine Prozessierung von Chemerin-155 zu einer anderen Isoform bekannt. Eventuell führt die Überexpression von inaktiven Isoformen und die anschließende Bindung an die Chemerin-Rezeptoren CMKLR1 bzw. GPR1 zu einer antagonistischen Wirkung gegenüber den aktiven Chemerin-Isoformen. Dadurch leiten die Rezeptoren keine Signale weiter, was wiederum zur Folge haben könnte, dass vermeintliche protektive Effekte von aktiven Chemerin-Isoformen nicht zum Tragen kommen.

Es wurde berichtet, dass Chemerin die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hemmen aber auch steigern kann [40, 110, 186]. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine nennenswerten Aktivierungen oder Deaktivierungen dieses Transkriptionsfaktors gefunden. Ausschließlich in HepG2-Zellen wurde durch Chemerin-155 dessen Phosphorylierung leicht erhöht.

Die Aktivierung der Kinase ERK 1/2 kann zu gesteigerter Zellproliferation und Migration führen [28, 161]. In einigen Arbeiten wurde diese Kinase durch die Exposition von Zellen mit Chemerin aktiviert [12, 59, 73, 180]. Dies war in den hier untersuchten Hepatom-Zelllinien nicht der Fall. Es wurden in anderen Studien auch die Aktivierungen von p38 MAPK und AKT beobachtet [90, 107], aber auch bei diesen Kinasen wurde in der vorliegenden Arbeit keine Aktivierung in den Leberzellen gemessen.

Ein möglicher Grund für das Ausbleiben der Aktivierung der untersuchten Faktoren NF- $\kappa$ B, ERK 1/2, p38 MAPK und AKT könnte der Zeitpunkt der Messung sein. Die Stimulation der Aktivierung durch Chemerin wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Möglicherweise tritt eine Aktivierung schon zu einem früheren Zeitpunkt ein. Dies wurde für phospho-AKT nachgewiesen. Diese wird durch eine kurzzeitige Inkubation mit Chemerin (2 - 15 min) aktiviert, während nach ca. 1 h eine verminderte Aktivität nachzuweisen war [107].

#### **4.2.5 Assoziation von Chemerin mit dem HCC-Tumormarker AFP**

AFP ist der bisher einzige Tumormarker für Patienten mit HCC. Das Protein schützt HepG2-Zellen vor Apoptose und fördert die Proliferation diese Zellen [56]. Die Expression von AFP wurde durch die rekombinanten Chemerin-Isoformen in Hepatom-Zelllinien nicht induziert. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Proliferation in dieser Arbeit. In HepG2-Zellen wurde die Proliferation lediglich leicht gehemmt, dagegen war die Expression dort von AFP ähnlich im Vergleich zur Kontrolle. Diese Suppression der Zellproliferation wurde also nicht von einer Hochregulation von AFP durch Chemerin verursacht. Die Expression von AFP in den untersuchten Hepatom-Zelllinien war ohnehin relativ hoch.

#### **4.2.6 Einfluss von Chemerin-Isoformen auf den Lipidmetabolismus**

In Lebertumoren ist der Fettstoffwechsel massiv verändert und fördert so das Wachstum. So steigt die Konzentration an Cholesterinestern an, während freies Cholesterin nicht verändert ist [97]. In den Hepatom-Zelllinien wurde das Verhältnis von Cholesterinestern zu freiem Cholesterin nach Expression von rekombinanten Chemerin-Isoformen untersucht. Während sich in Huh7-Zellen und Hepa1-6-Zellen keine durch die Isoform-Expression hervorgerufenen Veränderungen zeigten, wurde eine Verminderung des Verhältnisses dieser Lipide nach Expression von Chemerin-156 in HepG2-Zellen festgestellt. Demnach lag eine im Vergleich zu

Cholesterinestern erhöhte Menge von freiem Cholesterin vor. Ob dies aufgrund erhöhter Lipaseaktivität bzw. verminderter Bildung der Ester verursacht wurde, ist nicht geklärt.

Die Akkumulation von freiem Cholesterin in der Leber wird mit der Entstehung von Lebererkrankungen wie der NASH und der NAFLD assoziiert [8, 84]. Erhöhtes freies Cholesterin in der Leber führt zur Fehlfunktion der Mitochondrien, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und letztendlich zur Apoptose, was sich als Leberschädigung auswirkt [8]. Die zellschädigende Wirkung von freiem Cholesterin könnte jedoch für die Therapie eines HCCs genutzt werden. Allerdings konnte keine veränderte Zellviabilität bei Überexpression von Chemerin-156 in diesen Zellen festgestellt werden.

Da im Vergleich zum freiem Cholesterin der Anteil der Cholesterinester nach der Expression von Chemerin-156 vermindert war, könnte dies das Wachstum der Tumorzellen hemmen, da eine erhöhte Konzentration von Cholesterinestern für die Förderung dieses Wachstums steht [97].

Da Chemerin mit dem LDL-Cholesterin korreliert [145], könnte es weitere Proteine mit einer Rolle im Cholesterinstoffwechsel beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurde die Expression von PCSK9 nach Überexpression von rekombinanten Chemerin-Isoformen gemessen. PCSK9 fördert den Abbau der LDL-Rezeptoren, wodurch die Konzentration von LDL-Cholesterin im Serum ansteigt und die Aufnahme von Cholesterin in die Zellen abnimmt [14].

Während in HepG2-Zellen keine Regulation beobachtet wurde, verminderte die Expression von Chemerin-156 und Chemerin-155 die PCSK9-Expression in Huh7-Zellen. Dies könnte also zum Anstieg von Cholesterin in der Leber führen und zur Verminderung der LDL-Cholesterin-Konzentration im Blut und damit vor der Arteriosklerose schützen [14, 16]. Es soll hierbei erwähnt werden, dass in den murinen Hepatom-Zellen alle Chemerin-Isoformen zu einem leichten Anstieg von PCSK9 führten. Es scheint ein Spezies-abhängiger Unterschied in der Regulation von PCSK9 durch Chemerin zu bestehen. Da sich der Cholesterinstoffwechsel zwischen Menschen und Mäusen grundlegend unterscheidet, ist dies durchaus denkbar.

#### 4.2.7 Schlussfolgerung: Chemerin-Isoformen in Leberzellen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die einzelnen Chemerin-Isoformen keine konsistente Wirkung auf die analysierten Zellprozesse in Hepatom-Zellen haben. Zwar wurden signifikante Regulationen durch bestimmte Chemerin-Isoformen gefunden, im Gesamtbild betrachtet hingen die Ergebnisse stark von der Art des Versuchsaufbaus und der untersuchten Zelllinie ab. Möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe zeigten sich zwischen den beiden humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 und Huh7 divergente Effekte durch Chemerin. Beim Vergleich der humanen Zelllinien mit der murinen Hepa1-6-Zelllinie könnten auch generelle Unterschiede zwischen humanen und murinen Zellen eine Rolle spielen. Chemerin-163 hat möglicherweise in der Proliferation, Chemerin-157 in der Migration, Chemerin-156 im Lipidmetabolismus und Chemerin-155 in der Tumorprogression eine Wirkung.

Eine wesentliche Bedeutung der autokrinen oder parakrinen Effekte auf Hepatom-Zelllinien wird den Chemerin-Isoformen anhand der hier dokumentierten Daten jedoch nicht zugeschrieben.

### **4.3 Chemerin-Isoformen beeinflussen die Zytokin-Sekretion von Leberzellen und Immunzellen**

In den Studien anderer Forschungsgruppen wurde gezeigt, dass nach Chemerin-Stimulation die Zytokine TNF, IL-6, IL-8, und das Chemokin CCL2 in verschiedenen Zellen reguliert werden [12, 31, 90, 106]. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, inwiefern die verschiedenen Chemerin-Isoformen die Zytokinprofile von Hepatom-Zelllinien beeinflussen. Des Weiteren wurde die Wirkung der Zellkulturüberstände dieser Hepatom-Zellen auf das Zytokinprofil von Immunzellen untersucht. Hierbei sei erwähnt, dass es sich bei diesen Analysen um das Zytokinprofil von je einem biologischen Replikate handelte und aus diesem Grund keine statistisch gestützten Bewertungen der Ergebnisse möglich waren. Es wurden die aufgrund von der jeweiligen Expressionsstärke und Regulation und aufgrund von Literaturrecherchen als relevant erachteten Zytokine genauer untersucht. Dennoch könnten Forschungsarbeiten zu weiteren regulierten Zytokinen zu zusätzlichen Erkenntnissen führen.

Die Ergebnisse der Zytokin-Arrays mit einem biologischen Replikate unterschieden sich häufig von den Ergebnissen der ELISA mit mindestens drei biologischen Replikaten. Die Zytokin-Arrays dienen vordergründig dazu, einen Überblick über die durch die Zellen exprimierten Zytokine zu bekommen, die in weiteren Versuchen wie dem ELISA erfassbar sein könnten. Für die Analyse der Auswirkungen unterschiedlicher Behandlungen der Zellen wird diese Methode jedoch nicht empfohlen.

Alle in weiterführenden Versuchen untersuchten Zytokine und Chemokine (CCL2, CCL20, IL-6, IL-8 bzw. CXCL1/KC, Osteopontin, TNF) sind an Entzündungsprozessen beteiligt und wirken dabei mehrheitlich proinflammatorisch [15, 66, 71, 74, 81, 143].

Bei separater Betrachtung der einzelnen Chemerin-Isoformen deuten sich Tendenzen bezüglich ihrer Funktion im Entzündungsprozess an. Die inaktive Isoform Chemerin-155 bzw. Chemerin-154 wies sowohl in den Leberzellen als auch in den Immunzellen überwiegend anti-inflammatorische Effekte auf, da es mehrheitlich die Expression der untersuchten Zytokine herunterregulierte. Durch Chemerin-155-Expression waren IL-8 in HepG2-Zellen und Osteopontin in Huh7-Zellen dagegen verstärkt exprimiert. Die inaktive Form Chemerin-163 bzw. Chemerin-162 war in vielen Fällen mit der entsprechenden Kontrolle vergleichbar. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zu den kürzeren Isoformen geringere Expression von

Chemerin-162 in Hepa1-6-Zellen sein. Bezüglich der Wirkung der beiden aktiven Isoformen Chemerin-157 und Chemerin-156 ließen sich keine eindeutigen Tendenzen weder in den Leberzellen noch in den Immunzellen erkennen.

Innerhalb der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 zeigten die beiden aktiven murinen Formen Chemerin-156 und Chemerin-155 eine eher entzündungsfördernde Funktion. CCL2 und TNF wurden bei Expression dieser Isoformen verstärkt exprimiert. Die Folgen der Expressionen der inaktiven Formen unterschieden sich in diesen Zellen jedoch kaum von den Kontrollen.

In den humanen HepG2-Zellen waren die Regulationen der Isoformen stark konträr bezüglich ihrer Zytokinexpression. Während die Konzentrationen von CCL20 und Osteopontin gleichbleibend bis vermindert waren, wurde die IL-8-Expression durch alle Chemerin-Isoformen erhöht. In Huh7-Zellen agierten Chemerin-156 und Chemerin-155 eher anti-inflammatorisch, Chemerin-157 förderte dagegen die Expression von Osteopontin. Innerhalb der beiden humanen Zelllinien zeigten die beiden kürzesten Isoformen mehrheitlich entzündungshemmende Antworten. Insgesamt hatten die Chemerin-Isoformen in den humanen Hepatom-Zelllinien sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte, abhängig von der Zelllinie und dem betrachteten Zytokin. Daher ist eine verallgemeinernde Aussage zur Funktion von Chemerin hier nicht möglich. Auch in der bisherigen Literatur werden diesem Adipokin pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen nachgesagt [155]. Bisher ist jedoch vollkommen unklar, welche Mechanismen daran beteiligt sind. Hier könnten die Konzentration, der Beobachtungszeitraum und auch die Expression der Chemerin-Rezeptoren von Bedeutung sein.

Humane PBMC bestehen aus ca. 70 % T-Zellen, 15 % B-Zellen, 10 % natürlichen Killerzellen, 5 % Monozyten und 1 % dendritischen Zellen [152]. Diese Zellpopulation wird häufig für immunologische Fragestellungen und in der Krebsforschung verwendet [152]. Es ist bekannt, dass Chemerin natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Makrophagen chemotaktisch anlockt [109, 180]. Im HCC-Mausmodell mit Chemerin-Knockout wurde gezeigt, dass sich weniger T-Zellen im Tumorgewebe befanden als in den Wildtyp-HCC-Mäusen [110]. Chemerin korrelierte zudem mit der Anzahl der Leukozyten in der Adipositas bei Kindern [103].



Aufgrund dieser Beziehungen von Chemerin mit Immunzellen wurden die inflammatorischen Reaktionen von humanen PBMC und murinen Makrophagen auf die in Hepatozyten exprimierten Chemerin-Isoformen untersucht.

Bei der Betrachtung der Reaktionen der PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 zeigten sich mehrheitlich entzündungshemmende Effekte von Chemerin. In den PBMC wirkte insbesondere Chemerin-155 anti-inflammatorisch. In den murinen Makrophagen zeigte sich eine deutliche Suppression der untersuchten Zytokine IL-6, dem IL-8-Homolog CXCL1/KC und TNF nach Stimulation mit Chemerin. Auch hier supprimierte Chemerin-154 die meisten der gemessenen Zytokine. Diese Resultate stimmen mit den von Cash et al. beobachteten Auswirkungen des C-terminalen Chemerin-Peptids Chemerin-140-154 auf Makrophagen überein [31].

Demnach hatte Chemerin-154 (murin) auf Makrophagen in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Untersuchung der Zytokine eine anti-inflammatorische Wirkung.

In synovialen Fibroblasten wurde die Expression von CCL2 durch rekombinantes Chemerin-157 induziert [45]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft sowohl in den murinen Hepatom-Zellen als auch in murinen Makrophagen beobachtet, und zwar durch die beiden aktiven Isoformen Chemerin-156 und Chemerin-155. Es ist jedoch unklar, ob die erhöhte Konzentration im Zellkulturüberstand von den Makrophagen oder aus dem Zellkulturüberstand der Hepatom-Zellen stammte. Dahingegen wurde CCL2 in den humanen PBMC durch Chemerin-163 und Chemerin-155 stark supprimiert. CCL2 fördert die Migration von Makrophagen [38] und es muss im Tierversuch geklärt werden, ob Chemerin die CCL2-vermittelte Immigration von Immunzellen in die Leber beeinflusst.

CCL20 ist ein Chemoattraktant für Lymphozyten und dendritische Zellen [74, 150] und wurde in den beiden humanen Hepatom-Zelllinien durch Chemerin-156 und Chemerin-155 vermindert, im Zellkulturüberstand von humanen PBMC blieb die Konzentration von CCL20 nach allen Stimulationen gleich. In der Literatur wurde eine Beziehung des Chemerin-Rezeptors CMKLR1 mit CCL20 beschrieben. In CMKLR1-Knockout-Mäusen, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, waren die Chemokine CCL2, CCL20 und CXCL1 in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermindert [37]. In Wildtyp-Mäusen, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, waren diese Zytokine erhöht und die Anzahl der

Neutrophilen, Monozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen steigerte sich im Vergleich zu den Knockout-Mäusen [37]. Über die Aktivierung des Chemerin-Rezeptors scheint in diesem Fall eine Immunantwort ausgelöst zu werden. Bei HCC ist CCL20 im Tumorgewebe erhöht [148]. Diesem Zytokin wird eine Rolle in der Karzinogenese von HCC zugeschrieben [148]. Die Suppression von CCL20 in humanen Hepatom-Zelllinien deutet auf eine anti-inflammatorische Wirkung von Chemerin-156 und Chemerin-155 hin.

IL-6 wurde in den murinen Makrophagen durch die Stimulation mit den Zellkulturüberständen der Hepa1-6-Zellen mit allen Chemerin-Isoformen, insbesondere Chemerin-154, herunterreguliert. In humanen PBMC wurde IL-6 ebenfalls durch Chemerin-155 supprimiert. Lin et al. fanden heraus, dass eine Überexpression von Chemerin-163 im HCC-Mausmodell mit Chemerin-Knockout-Mäusen ebenfalls die Expression von IL-6 vermindert. Die Suppression von IL-6 wurde als anti-inflammatorisch betrachtet und wirkte daher protektiv bei HCC [110]. Daher könnte Chemerin, insbesondere Chemerin-155 bzw. weitere Prozessierungen dieser Isoform über Immunzellen einen protektiven Effekt bei HCC haben.

Die Regulationen von IL-8 (bzw. CXCL1/KC) in den untersuchten Zellen verhielten sich diametral. Während dieses proinflammatorische Zytokin in HepG2-Zellen verstärkt wurde, wurde es in Huh7-Zellen leicht supprimiert. In murinen Hepatom-Zellen wurde keine Veränderung der Expression von CXCL1/KC durch die Expression von Chemerin gemessen. In humanen PBMC und murinen Makrophagen wurde IL-8 bzw. CXCL1/KC nach Stimulation mit dem Zellkulturüberstand von Chemerin-exprimierenden Hepatom-Zellen supprimiert (mit Ausnahme von Chemerin-156 in PBMC, das vergleichbar zur Kontrolle war). Chemerin zeigte also mehrheitlich einen anti-inflammatorischen Effekt auf diese Immunzellen. Bisher gibt es noch keine beschriebenen Verbindungen von Chemerin und IL-8 bzw. CXCL1/KC im HCC.

Osteopontin erhöhte die Proliferation von injizierten Huh7-Zellen in der Nacktmaus und steigerte somit das Zellwachstum bei HCC [138]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Chemerin-157 in Huh7-Zellen die Expression von Osteopontin fördert. Womöglich könnte Chemerin-157 somit auch das Zellwachstum über Osteopontin steigern. Allerdings war die Proliferation von Huh7-Zellen gegenüber der Kontrolle nicht verstärkt.

TNF wurde in murinen Makrophagen durch das Peptid Chemerin-145-154 supprimiert [88]. In dieser Arbeit führte eine Stimulation von murinen Makrophagen mit dem Zellkulturüber-

stand von Hepa1-6-Zellen, die rekombinante Chemerin-Isoformen exprimieren, ebenfalls zur Suppression von TNF. Der stärkste Effekt wurde durch Chemerin-154 hervorgerufen.

Obwohl die Regulationen der Zytokine häufig in die Richtung deuteten, dass einzelne Chemerin-Isoformen entzündungshemmend wirken, wurde in den untersuchten Signalwegen, insbesondere NF- $\kappa$ B, innerhalb der Hepatom-Zelllinien keine entsprechende Deaktivierung gefunden. Während auch morphologisch bei den untersuchten Leberzellen keine eindeutigen Veränderungen bezüglich ihrer Proliferation und Migration erkennbar waren, deutete deren Zytokinexpression auf eine Signalvermittlung hin, die zur Regulation der Entzündungsreaktion in Immunzellen beitrug. Möglicherweise führt es zu eindeutigeren Ergebnissen, wenn einzelne Subpopulationen der PBMC separat untersucht würden.

Generell ist nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt Chemerin proteolytisch prozessiert wird, was die Deutung der Effekte der Chemerin-Isoformen auf die Zellprozesse erschwert. Sobald Chemerin die Zelle verlässt, kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass sich im Zellkulturüberstand ausschließlich die ursprünglich überexprimierte Isoform befindet und daher die erzielte Wirkung nicht zwangsläufig auf diese Isoformen zurückzuführen ist. Erste massenspektrometrische Untersuchungen deuteten an, dass sich nach der künstlich herbeigeführten Expression einer jeden Chemerin-Isoform mehrere unterschiedliche Isoformen im Zellkulturüberstand befinden könnten. Neben der ursprünglich exprimierten Variante wurden C-terminal verkürzte Formen gefunden (mit Ausnahme von Chemerin-155-exprimierenden Zellen).

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wirkten sich vom Mittelwert mäßig abweichende Werte stark auf das Gesamtergebnis aus. Bei einer Stichprobengröße von  $n = 3 - 5$  macht sich dies deutlich bemerkbar. Dies führt dazu, dass Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen mit statistischen Tests schwer nachzuweisen sind.

Chemerin, insbesondere die Isoform Chemerin-155 bzw. das murine Homolog Chemerin-154, hatte einen Einfluss auf Immunzellen und deren inflammatorische Antwort. Eine Suppression der inflammatorischen Antwort von Immunzellen führt möglicherweise zur geringe-

ren Infiltration dieser Zellen in das Tumorgewebe. Um dies zu klären, könnte das chemotaktische Potenzial der einzelnen Chemerin-Isoformen auf Immunzellen untersucht werden. Ob die Infiltration von Immunzellen tumorfördernde oder wachstumshemmende Auswirkungen hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Wie bereits von Lin et al. [109] *in vivo* beobachtet wurde, führte jedoch eine geringere Expression von Chemerin zur verminderten Infiltration und damit zu einer schlechteren Prognose.

In dieser Arbeit deutete eine erhöhte Expression bestimmter Isoformen auf die Suppression der Immunantwort hin. Aus diesem Grund könnte also die Immunsuppression durch Chemerin-155/154 im Kontext des HCC tumorfördernde Folgen haben und könnte daher möglicherweise als Ziel therapeutischer Maßnahmen bei HCC dienen.

## 4.4 Chemerin im HCC und in CRC-Lebermetastasen

Es war von Interesse, das Potenzial von Chemerin als Marker zur Unterscheidung von HCC und Lebermetastasen bei CRC zu analysieren, da Chemerin in den Seren von CRC-Patienten erhöht [5, 48] und in HCC-Patienten verringert war [109]. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im International Journal of Molecular Sciences unter dem Titel „Serum Chemerin Does Not Differentiate Colorectal Liver Metastases from Hepatocellular Carcinoma“ im Jahr 2019 veröffentlicht [53].

Es wurde gezeigt, dass sich die Chemerin-Level in Seren von HCC-Patienten nicht von CRC-Patienten mit Lebermetastasen unterschieden. Ebenso gab es zwischen der Kontrollgruppe und den CRC-Patienten keinen Unterschied bezüglich des Serum-Chemerins, woraus sich schließen lässt, dass nicht die Erkrankung an CRC allein das erhöhte Chemerin in diesen Patienten verursachte. Chemerin war in verschiedenen mit chronischer Entzündung verbundenen Krankheiten hochreguliert [144]. Daher könnten bestimmte Komorbiditäten das Serum-Chemerin entscheidend beeinflussen.

Chemerin war in den Krebspatienten erhöht, die zusätzlich an Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie erkrankt waren. In der Kontrollgruppe war Chemerin bei Hypertonie und Hypercholesterinämie jedoch nicht angestiegen. In anderen Studien wurde gezeigt, dass Chemerin bei Patienten mit Bluthochdruck ebenfalls zunahm [145]. Demnach wurde erwartet, dass sowohl bei den HCC- und CRC-Patienten als auch der Kontrollgruppe Chemerin bei diesen Komorbiditäten ansteigt. Aus den Beobachtungen in dieser Studie wird gefolgert, dass die Zunahme von Chemerin bei Krebspatienten mit zusätzlichen Erkrankungen wie Bluthochdruck stärker induziert wird. Beim Vergleich von HCC- und CRC-Patienten ohne Komorbiditäten war Chemerin in den HCC-Patienten tatsächlich vermindert.

Die Tumormarker CEA und CA19-9 waren in CRC-Patienten im Vergleich zu HCC-Patienten erhöht. Dies stimmte ebenfalls mit Ergebnissen aus der Literatur überein [1, 2]. Zwar gab es keine Assoziation dieser Tumormarker mit den genannten Komorbiditäten, jedoch war CEA nur im Serum der CRC-Patienten, die diese zusätzlichen Erkrankungen nicht hatten, höher konzentriert. Dagegen war CA19-9 in CRC-Patienten erhöht, die diese Komorbiditäten aufwiesen. In weiteren Studien sollte evaluiert werden, inwiefern dies bei der Diagnostik von CRC eine Rolle spielt.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob Chemerin als Marker von Leberschädigungen geeignet ist. Es ist bekannt, dass Chemerin mit dem Child-Pugh-Score (dient zur Bewertung der Leberzirrhose-Stadien), der ALT und Bilirubin negativ und mit der Prothrombinzeit positiv korreliert [82]. Bilirubin korrelierte auch in der hier untersuchten Kohorte in CRC-Patienten negativ mit Chemerin.

Obwohl Serum-Chemerin bei Patienten mit Leberzirrhose vermindert ist, ergab sich kein Zusammenhang mit dem Grad der Leberentzündung, der Steatose und der Fibrose in den hier untersuchten Kohorten. In manchen Gruppen befand sich allerdings nur ein Patient, daher sollte diese Studie mit einer größeren Patientengruppe wiederholt werden. Demnach scheint systemisches Chemerin nicht mit der Leberschädigung assoziiert zu sein. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass Chemerin in der NAFLD mit fortgeschrittenen Fibrose- und Steatosestadien und Entzündungsgraden unverändert war [98]. Daher ist lediglich eine sehr schwere Schädigung der Leberfunktion mit einer Verringerung des Serum-Chemerins assoziiert. Darüber hinaus war Chemerin weder mit AFP, Tumorgröße, Differenzierungsgrad, TNM-Stadium oder vaskulärer Invasion assoziiert.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass Chemerin nicht zur Unterscheidung von HCC und CRC-Lebermetastasen geeignet ist.

## 5 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Die Prognose ist meist schlecht, da es in vielen Fällen erst sehr spät diagnostiziert wird. In den meisten Fällen entwickelt sich ein HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose, bedingt durch eine Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Infektion, übermäßigen Alkoholkonsum oder eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.

Chemerin ist ein multifunktionales Adipokin, das vorrangig im Fettgewebe und in der Leber gebildet wird. Nach C-terminaler Prozessierung durch extrazelluläre Proteasen entstehen unterschiedliche Chemerin-Isoformen, die aufgrund ihrer Aktivität klassifiziert wurden. Bei Krebserkrankungen zeigte Chemerin sowohl Tumor-inhibierende als auch tumorfördernde Eigenschaften. Für das HCC wurde eine protektive Wirkung des hochaktiven murinen Chemerin-156 nachgewiesen.

Daher war es von Interesse herauszufinden, ob und inwiefern verschiedene Isoformen von Chemerin in der Leber und im hepatozellulären Karzinom wirken.

Es wurden zwei inaktive (Chemerin-163 und -155) und zwei aktive humane Chemerin-Isoformen (Chemerin-157 und -156) und ihre jeweiligen murinen Homologe untersucht. Nach Expression dieser rekombinanten Proteine durch die Hepatom-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hepa1-6 wurden die Zytotoxizität, die Proliferation und Zellviabilität, die Migration und der Lipidmetabolismus analysiert. Chemerin wirkte nicht zytotoxisch und beeinflusste die Proliferation von Hepatom-Zellen nur in geringem Maß. Die Migration von HepG2-Zellen und Hepa1-6-Zellen wurde durch das aktive Chemerin-157 bzw. das murine Homolog Chemerin-156 supprimiert. Das Verhältnis von Cholesterinestern zu freiem Cholesterin wurde durch Chemerin-156 vermindert. Die Sekretion des HCC-Tumormarkers  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) wurde durch Chemerin nicht beeinflusst.

Des Weiteren wurde das Zytokinprofil der Chemerin-exprimierenden Leberzellen untersucht und dabei festgestellt, dass in den humanen Zelllinien insbesondere die kürzeren Chemerin-Isoformen anti-inflammatorisch wirkten und die Sekretion der Zytokine IL-8, Osteopontin und CCL20 supprimiert wurde. In Hepa1-6-Zellen hatten die aktiven Chemerin-Isoformen eher proinflammatorische Effekte.

Da Chemerin als Chemokin fungiert und Makrophagen, natürliche Killerzellen und Neutrophile chemotaktisch anlockt, wurden die sezernierten Zytokine nach Stimulation von humanen PBMC und murinen Makrophagen mit Zellkulturüberständen von Chemerin-exprimierenden Hepatom-Zelllinien untersucht. In den humanen Immunzellen zeigte vor allem Chemerin-155 anti-inflammatorische Effekte. Die Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF wurde in murinen Makrophagen durch alle Chemerin-Isoformen, aber insbesondere durch Chemerin-154 supprimiert. Daraus wurde geschlossen, dass die als inaktiv geltende Isoform Chemerin-155/154 anti-inflammatorisch auf Immunzellen wirkt.

Chemerin ist im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) hochreguliert und in Patienten mit HCC vermindert. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich Chemerin als Marker zur Differentialdiagnose kolorektaler Lebermetastasen und primärer Lebertumore eignet. Das Serum-Chemerin wurde in 36 CRC-Patienten, 32 HCC-Patienten und 49 Patienten ohne Tumorerkrankungen gemessen. Die Chemerin-Konzentrationen waren in allen drei Gruppen vergleichbar. In der Krebspatienten-Kohorte wiesen Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie erhöhtes Serum-Chemerin auf. Chemerin korrelierte nicht mit den Tumormarkern carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9 oder AFP. Es war auch nicht mit den Stadien der Lebersteatose, -fibrose, der Entzündung oder der Tumor-Node-Metastasis-Klassifikation assoziiert. Daraus wurde geschlossen, dass sich Serum-Chemerin nicht als diagnostischer Marker zur Unterscheidung von primären Lebertumoren und CRC-Lebermetastasen eignet.



## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Prozessierung von Chemerin durch proteolytische Spaltung am C-Terminus .....	18
Abb. 2 Plasmidkarte von pcDNA3.1/V5-His-TOPO .....	59
Abb. 3 Aminosäure- und DNA-Sequenzen der humanen und murinen Chemerin-Isoformen.	60
Abb. 4 Test der Spezifität von drei verschiedenen humanen Chemerin-Antikörpern .....	62
Abb. 5 Chemerin-Expression im Zelllysat humaner und muriner Hepatom-Zelllinien .....	64
Abb. 6 Chemerin im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien .....	66
Abb. 7 mRNA-Expression von Chemerin .....	67
Abb. 8 O. D.-Werte der LDH-Messung in den Zellkulturüberständen der humanen Hepatom-Zelllinien .....	69
Abb. 9 Zellviabilität der humanen und murinen Hepatom-Zelllinien .....	71
Abb. 10 Proliferation der humanen Hepatom-Zelllinien .....	73
Abb. 11 Migration der humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 und Huh7 und der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 .....	76
Abb. 12 Migrations-Assay der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 .....	77
Abb. 13 Migrations-Assay der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7 .....	78
Abb. 14 Migrations-Assay der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 .....	79
Abb. 15 Expression und Aktivierung von (phospho-)NF- $\kappa$ B p65 .....	81
Abb. 16 Expression und Aktivierung von (phospho-)Stat3 .....	82
Abb. 17 Expression und Aktivierung von (phospho-)ERK 1/2 .....	84
Abb. 18 Expression und Aktivierung von (phospho-)p38 MAPK .....	86
Abb. 19 Expression und Aktivierung von (phospho-)AKT .....	87
Abb. 20 Der HCC-Tumormarker AFP im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien .....	88
Abb. 21 Verhältnis von Cholesterinestern und freiem Cholesterin in Hepatom-Zelllinien .....	90
Abb. 22 PCSK9 im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien .....	91
Abb. 23 CCL2 im Zellkulturüberstand der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 .....	104
Abb. 24 CCL20 im Zellkulturüberstand der humanen Hepatom-Zelllinien .....	105
Abb. 25 IL-8 bzw. CXCL1-KC im Zellkulturüberstand der Hepatom-Zelllinien .....	106
Abb. 26 Osteopontin im Zellkulturüberstand der humanen Hepatom-Zelllinien .....	107
Abb. 27 TNF im Zellkulturüberstand der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1-6 .....	108
Abb. 28 CCL2 im Zellkulturüberstand von humanen PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. ....	110
Abb. 29 CCL20 im Zellkulturüberstand humaner PBMC .....	111

Abb. 30 IL-6 im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7.....	112
Abb. 31 IL-8 bzw. CXCL1-KC im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. ....	113
Abb. 32 Osteopontin im Zellkulturüberstand humaner PBMC.....	114
Abb. 33 TNF im Zellkulturüberstand humaner PBMC und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7.....	115
Abb. 34 Chemerin und die Tumormarker CEA und CA19-9. ....	118
Abb. 35 Chemerin bei Patienten mit Komorbiditäten T2D, Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperurikämie. ....	119
Abb. 36 Serum-Chemerin in Patienten ohne und mit Komorbiditäten. ....	121
Abb. 37 Die Beziehung von Chemerin zu Bilirubin und Alkoholkonsum. ....	123
Abb. 38 Zusammenhang von Chemerin mit der Leberschädigung in Krebspatienten. ....	124

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Geräte und Hilfsmittel .....	25
Tabelle 2	Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	27
Tabelle 3	Kommerziell erworbene Chemikalien, Reagenzien, Medien und Puffer .....	28
Tabelle 4	Verwendete Assay-Kits .....	34
Tabelle 5	Verwendete enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Kits.....	35
Tabelle 6	Verwendete primäre Antikörper für Western Blot und Immunpräzipitationen.....	36
Tabelle 7	Für Western Blot verwendete sekundäre Antikörper .....	37
Tabelle 8	Primer für die Amplifikation der humanen Chemerin-Isoformen mittels PCR. ....	38
Tabelle 9	Primer für die Amplifikation der murinen Chemerin-Isoformen mittels PCR.....	38
Tabelle 10	Primer zur Sequenzierung von DNA-Inserts rekombinanter Vektoren.....	38
Tabelle 11	Primer für semi-quantitative Real-Time-PCR von Chemerin.....	39
Tabelle 12	Verwendete Restriktionsendonukleasen .....	39
Tabelle 13	Verwendete humane und murine Hepatom- und Makrophagen-Zelllinien .....	40
Tabelle 14	Parameter der HCC-, CRC-Patienten und der Kontrollen .....	42
Tabelle 15	Software und Online-Tools .....	43
Tabelle 16	Zellzahl pro 6-Well und pro 12-Well der verwendeten Zelllinien .....	46
Tabelle 17	Expression der rekombinanten Chemerin-Isoformen in HepG2-Zellen.....	62
Tabelle 18	Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der HepG2-Zelllinie .....	93
Tabelle 19	Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der Huh7-Zelllinie.....	94
Tabelle 20	Zytokin-Array von Zellkulturüberständen der Hepa1-6-Zelllinie.....	95
Tabelle 21	Zytokin-Array von Zellkulturüberständen von humanen PBMC .....	98
Tabelle 22	Zytokin-Array mit Zellkulturüberständen der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7.....	99
Tabelle 23	Korrelationen (Koeffizienten und p-Werte) von Chemerin mit Laborparametern von HCC-, CRC-Patienten und Kontrollen. ....	122

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>a. u.</b>	arbitrary unit
<b>AFP</b>	$\alpha$ -Fetoprotein
<b>AGS</b>	Adenokarzinomzellen des Magens
<b>AKT</b>	protein kinase B
<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>BCA</b>	bicinchoninic acid
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index
<b>bp</b>	basepair
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b>CA19-9</b>	carbohydrate antigen 19-9
<b>CCL2</b>	chemokine (C-C motif) ligand 2
<b>CCL20</b>	chemokine (C-C motif) ligand 20
<b>CCL5</b>	chemokine (C-C motif) ligand 5
<b>CCRL2</b>	C-C chemokine receptor-like 2
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CE</b>	Cholesterinester
<b>CEA</b>	carcinoembryonic antigen
<b>CMKLR1</b>	chemokine-like receptor 1
<b>CRC</b>	kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma)
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>CXCL1/KC</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 /KC
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ERK 1/2</b>	extracellular signal regulated kinase 1/2
<b>FBS</b>	fetal bovine serum

<b>FC</b>	freies Cholesterin
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GGT</b>	$\gamma$ -Glutamyltransferase
<b>GM-CSF</b>	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>GOI</b>	gene of interest
<b>GPR1</b>	G protein-coupled receptor 1
<b>HBV</b>	Hepatitis-B-Virus
<b>HC</b>	Hypercholesterinämie
<b>HCC</b>	hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
<b>HCV</b>	Hepatitis-C-Virus
<b>HDL</b>	high-density lipoprotein
<b>HIV</b>	humanes Immundefizienz-Virus
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
<b>HT</b>	Hypertonie
<b>HU</b>	Hyperurikämie
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>IL-8</b>	Interleukin 8
<b>kb</b>	kilo basepairs
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>n. a.</b>	not available
<b>NASH</b>	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells
<b>O. D.</b>	Optische Dichte
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cell
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<b>PCSK9</b>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<b>PI3K</b>	phosphoinositide 3-kinases
<b>PTEN</b>	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity

	protein phosphatase
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>Rho</b>	Ras homolog family member A
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>rpm</b>	revolutions per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>Stat3</b>	signal transducer and activator of transcription 3
<b>TBS</b>	tris-buffered saline
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TNM</b>	Tumor-Node-Metastasis
<b>Tris-Base</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>U</b>	Units
<b>üN</b>	über Nacht

## 9 Literaturverzeichnis

1. A. Attallah M., N. Al-Ghawalby A., A.A.F. Abdel Aziz, E. El-Sayed A., A. Tabll A., A. El-Waseef M. Clinical Value of Serum CEA, CA 19-9, CA 242 and AFP in Diagnosis of Gastrointestinal Tract Cancers. *International J. of Cancer Research* 2006; 2 (1): 50–6.
2. Abdel-Hamid NM, Abouzied MM, Nazmy MH, Fawzy MA, Gerges AS. A suggested guiding panel of seromarkers for efficient discrimination between primary and secondary human hepatocarcinoma. *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37 (2): 2539–46.
3. Akin S. Serum Chemerin Level in Breast Cancer. *UHOD* 2017; 27 (2): 127–32.
4. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele TA, Barac A, Bensenor I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chittheer A, Choi J-Y, Cowie B, Dandona L, Dandona R, Dey S, Dicker D, Phuc H, Ekwueme DU, Zaki MES, Fischer F, Fürst T, Hancock J, Hay SI, Hotez P, Jee SH, Kasaeian A, Khader Y, Khang Y-H, Kumar A, Kutz M, Larson H, Lopez A, Lunevicius R, Malekzadeh R, McAlinden C, Meier T, Mendoza W, Mokdad A, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nguyen Q, Nguyen G, Ogbo F, Patton G, Pereira DM, Pourmalek F, Qorbani M, Radfar A, Roshandel G, Salomon JA, Sanabria J, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou S, Shackelford K, Shore H, Sun J, Mengistu DT, Topór-Mądry R, Tran B, Ukwaja KN, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wakayo T, Weiderpass E, Werdecker A, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Zaidi Z, Zhu L, Murray CJL, Naghavi M, Fitzmaurice C. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA oncology* 2017; 3 (12): 1683–91.
5. Alkady MM, Abdel-Messeih PL, Nosseir NM. Assessment of Serum Levels of the Adipocytokine Chemerin in Colorectal Cancer Patients. *Journal of medical biochemistry* 2018; 37 (3): 313–9.
6. Allemann P, Demartines N, Bouzourene H, Tempia A, Halkic N. Long-term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma larger than 10 cm. *World journal of surgery* 2013; 37 (2): 452–8.
7. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24 (50): 7455–64.
8. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta* 2015; 1852 (9): 1765–78.
9. Baecker A, Liu X, La Vecchia C, Zhang Z-F. Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *European journal of cancer prevention the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 2018; 27 (3): 205–12.
10. Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of hepatocellular carcinoma* 2016; 3: 41–53.
11. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105 (1): 64–9.

12. Berg V, Sveinbjörnsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin (21-157). *Arthritis research & therapy* 2010; 12 (6): R228.
13. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 1993; 303 (2): 474–82.
14. Bhat M, Skill N, Marcus V, Deschenes M, Tan X, Bouteaud J, Negi S, Awan Z, Aikin R, Kwan J, Amre R, Tabaries S, Hassanain M, Seidah NG, Maluccio M, Siegel P, Metrakos P. Decreased PCSK9 expression in human hepatocellular carcinoma. *BMC gastroenterology* 2015; 15: 176.
15. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology* 1993; 64 (5 Suppl): 456–60.
16. Bittner VA, Giugliano RP, Brinton EA, Guyton JR. PCSK9 inhibitors for prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of clinical lipidology* 2018; 12 (4): 835–43.
17. Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World journal of gastroenterology* 2005; 11 (47): 7391–400.
18. Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine & growth factor reviews* 2011; 22 (5-6): 331–8.
19. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007; 148 (10): 4687–94.
20. Bozaoglu K, Curran JE, Stocker CJ, Zaibi MS, Segal D, Konstantopoulos N, Morrison S, Carless M, Dyer TD, Cole SA, Goring HHH, Moses EK, Walder K, Cawthorne MA, Blangero J, Jowett JBM. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010; 95 (5): 2476–85.
21. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, Mahaney MC, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, Collier G, Blangero J, Walder K, Jowett JBM. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009; 94 (8): 3085–8.
22. Breitbach CJ, Moon A, Burke J, Hwang T-H, Kirn DH. A Phase 2, Open-Label, Randomized Study of Pexa-Vec (JX-594) Administered by Intratumoral Injection in Patients with Unresectable Primary Hepatocellular Carcinoma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2015; 1317: 343–57.
23. Brierley JD, Gospodarowicz MK. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8. Aufl. Chichester: John Wiley & Sons Incorporated, 2016.
24. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2005; 42 (5): 1208–36.
25. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2011; 53 (3): 1020–2.
26. Buechler C. Chemerin in Liver Diseases. *Endocrinol Metab Syndr* 2014; 03 (04).



27. Buechler C, Feder S, Haberl EM, Aslanidis C. Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (5).
28. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014; 120 (22): 3446–56.
29. Calado RT, Brudno J, Mehta P, Kovacs JJ, Wu C, Zago MA, Chanock SJ, Boyer TD, Young NS. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2011; 53 (5): 1600–7.
30. Campos-da-Paz M, Dórea JG, Galdino AS, Lacava ZGM, Fatima Menezes Almeida Santos M de. Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer: Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches. *Recent patents on biotechnology* 2018; 12 (4): 269–79.
31. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MBL, Greaves DR. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205 (4): 767–75.
32. Chang S-S, Eisenberg D, Zhao L, Adams C, Leib R, Morser J, Leung L. Chemerin activation in human obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2016; 24 (7): 1522–9.
33. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang T-S, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology* 2009; 10 (1): 25–34.
34. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, N.Y.)* 2011; 332 (6037): 1519–23.
35. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420 (6917): 860–7.
36. Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1980; 64 (4): 809–19.
37. Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy M-O, Lannoy V, Lambrecht BN, Brusselle GG, Joos GF. The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2011; 186 (9): 5457–67.
38. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2009; 29 (6): 313–26.
39. Dhanasekaran R, Bando S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research* 2016; 5.
40. Dranse HJ, Muruganandan S, Fawcett JP, Sinal CJ. Adipocyte-secreted chemerin is processed to a variety of isoforms and influences MMP3 and chemokine secretion through an NFκB-dependent mechanism. *Molecular and cellular endocrinology* 2016; 436: 114–29.
41. Du X-Y, Leung LLK. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2009; 41 (12): 973–9.
42. Du X-Y, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL. Regulation of Chemerin Bioactivity by Plasma Carboxypeptidase N, Carboxypeptidase B (Activated Thrombin-

- activable Fibrinolysis Inhibitor), and Platelets\*. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284 (2): 751–8.
43. Duvic M, Nagpal S, Asano AT, Chandraratna RA. Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1997; 37 (2 Pt 3): S18-24.
  44. Eichelmann F, Schulze MB, Wittenbecher C, Menzel J, Weikert C, Di Giuseppe R, Biemann R, Isermann B, Fritsche A, Boeing H, Aleksandrova K. Association of Chemerin Plasma Concentration With Risk of Colorectal Cancer. *JAMA network open* 2019; 2 (3): e190896.
  45. Eisinger K, Bauer S, Schäffler A, Walter R, Neumann E, Buechler C, Müller-Ladner U, Frommer KW. Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Experimental and molecular pathology* 2012; 92 (1): 90–6.
  46. Eisinger K, Krautbauer S, Wiest R, Weiss TS, Buechler C. Reduced serum chemerin in patients with more severe liver cirrhosis. *Experimental and molecular pathology* 2015; 98 (2): 208–13.
  47. El-Sagheer G, Gayyed M, Ahmad A, Abd El-Fattah A, Mohamed M. Expression of chemerin correlates with a poor prognosis in female breast cancer patients. *Breast cancer (Dove Medical Press)* 2018; 10: 169–76.
  48. Erdogan S, Yilmaz FM, Yazici O, Yozgat A, Sezer S, Ozdemir N, Uysal S, Purnak T, Sendur MA, Ozaslan E. Inflammation and chemerin in colorectal cancer. *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37 (5): 6337–42.
  49. Ernst MC, Haidl ID, Zúñiga LA, Dranse HJ, Rourke JL, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology* 2012; 153 (2): 672–82.
  50. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010; 21 (11): 660–7.
  51. Ertle J, Dechêne A, Sowa J-P, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, Schlaak JF, Gerken G, Syn W-K, Canbay A. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *International journal of cancer* 2011; 128 (10): 2436–43.
  52. Farsam V, Basu A, Gatzka M, Treiber N, Schneider LA, Mulaw MA, Lucas T, Kochanek S, Dummer R, Levesque MP, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Senescent fibroblast-derived Chemerin promotes squamous cell carcinoma migration. *Oncotarget* 2016; 7 (50): 83554–69.
  53. Feder S, Kandulski A, Schacherer D, Weiss TS, Buechler C. Serum Chemerin Does Not Differentiate Colorectal Liver Metastases from Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (16).
  54. Ferland DJ, Watts SW. Chemerin: A Comprehensive Review Elucidating the Need for Cardiovascular Research. *Pharmacological research* 2015; 99: 351–61.
  55. Freitas-Lopes MA, Mafra K, David BA, Carvalho-Gontijo R, Menezes GB. Differential Location and Distribution of Hepatic Immune Cells. *Cells* 2017; 6 (4).
  56. Galle PR, Foerster F, Kudo M, Chan SL, Llovet JM, Qin S, Schelman WR, Chintharlapalli S, Abada PB, Sherman M, Zhu AX. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver international official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2019; 39 (12): 2214–29.

57. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis* 2017; 16.
58. Goralski KB, Jackson AE, McKeown BT, Sinal CJ. More Than an Adipokine: The Complex Roles of Chemerin Signaling in Cancer. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (19).
59. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (38): 28175–88.
60. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109 (3): 433–8.
61. Guillabert A, Wittamer V, Bondue B, Godot V, Imbault V, Parmentier M, Communi D. Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *Journal of leukocyte biology* 2008; 84 (6): 1530–8.
62. 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; 104: 42–5.
63. Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Feder S, Sinal CJ, Bruckmann A, Hoering M, Krautbauer S, Liebisch G, Buechler C. Overexpression of Hepatocyte Chemerin-156 Lowers Tumor Burden in a Murine Model of Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2019; 21 (1).
64. Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Feder S, Sinal CJ, Buechler C. Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis. *Anticancer research* 2018; 38 (5): 2649–57.
65. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100 (1): 57–70.
66. Hanson A, Piras IS, Wilhelmsen D, Still CD, Chu X, Petrick A, Gerhard GS, DiStefano JK. Chemokine ligand 20 (CCL20) expression increases with NAFLD stage and hepatic stellate cell activation and is regulated by miR-590-5p. *Cytokine* 2019; 123: 154789.
67. Hart R, Greaves DR. Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2010; 185 (6): 3728–39.
68. Hartmann D, Srivastava U, Thaler M, Kleinhans KN, N'kontchou G, Scheffold A, Bauer K, Kratzer RF, Kloos N, Katz S-F, Song Z, Begus-Nahrmann Y, Kleger A, Figura G von, Strnad P, Lechel A, Günes C, Potthoff A, Deterding K, Wedemeyer H, Ju Z, Song G, Xiao F, Gillen S, Schrezenmeier H, Mertens T, Ziol M, Friess H, Jarek M, Manns MP, Beaugrand M, Rudolph KL. Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2011; 53 (5): 1608–17.
69. He G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell research* 2011; 21 (1): 159–68.
70. He G, Yu G-Y, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Leffert HL, Karin M. Hepatocyte IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer cell* 2010; 17 (3): 286–97.

71. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115 (1): 1–20.
72. Helfer G, Wu Q-F. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *The Journal of endocrinology* 2018; 238 (2): R79-R94.
73. Henau O de, Degroot G-N, Imbault V, Robert V, Poorter C de, Mcheik S, Galés C, Parmentier M, Springael J-Y. Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLoS one* 2016; 11 (10): e0164179.
74. Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiyama H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272 (9): 5846–53.
75. Ho DW-H, Lo RC-L, Chan L-K, Ng IO-L. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Liver cancer* 2016; 5 (4): 290–302.
76. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 2013; 12: 86.
77. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of leukocyte biology* 2010; 87 (3): 501–8.
78. Horn P, Loeffelholz C von, Forkert F, Stengel S, Reuken P, Aschenbach R, Stallmach A, Bruns T. Low circulating chemerin levels correlate with hepatic dysfunction and increased mortality in decompensated liver cirrhosis. *Scientific reports* 2018; 8 (1): 9242.
79. Hukezalie KR, Wong JMY. Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *The FEBS journal* 2013; 280 (14): 3194–204.
80. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26 (15): 2166–76.
81. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry* 2018; 59: 17–24.
82. Imai K, Takai K, Hanai T, Shiraki M, Suzuki Y, Hayashi H, Naiki T, Nishigaki Y, Tomita E, Shimizu M, Moriwaki H. Impact of Serum Chemerin Levels on Liver Functional Reserves and Platelet Counts in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2014; 15 (7): 11294–306.
83. Invitrogen. pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit: Five-minute cloning and expression of Taq polymerase-amplified PCR products in mammalian cells. User Manual 2009 (K4800-40).
84. Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2016; 27 (2): 84–95.
85. Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97 (12): 3017–26.

86. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008; 14 (2): 419–27.
87. Jiang Z, Jhunjhunwala S, Liu J, Haverty PM, Kennemer MI, Guan Y, Lee W, Carnevali P, Stinson J, Johnson S, Diao J, Yeung S, Jubb A, Ye W, Wu TD, Kapadia SB, Sauvage FJ de, Gentleman RC, Stern HM, Seshagiri S, Pant KP, Modrusan Z, Ballinger DG, Zhang Z. The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome research* 2012; 22 (4): 593–601.
88. John H, Hierer J, Haas O, Forssmann W-G. Quantification of angiotensin-converting-enzyme-mediated degradation of human chemerin 145-154 in plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 2007; 362 (1): 117–25.
89. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2005; 175 (6): 3463–8.
90. Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Ebisawa M, Yokoyama W, Watanabe K, Imai T, Muramoto K, Terashima Y, Sugihara T, Matsushima K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2011; 13 (5): R158.
91. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (23).
92. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 391 (4): 1762–8.
93. Kennedy AJ, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CIII: Chemerin Receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacological reviews* 2018; 70 (1): 174–96.
94. Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2005; 41 (6): 1313–21.
95. Knowles BB, Aden DP. Human Hepatoma Derived Cell Line, Process for Preparation Thereof, and Uses Therefor. *United States Patent* 1983 (4,393,133).
96. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (New York, N.Y.)* 1980; 209 (4455): 497–9.
97. Krautbauer S, Meier EM, Rein-Fischboeck L, Pohl R, Weiss TS, Sigrüener A, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* 2016; 1861 (11): 1767–74.
98. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Waluga M, Warakomska I, Szczygiel B, Berdowska A, Mazur W, Wozniak-Grygiel E, Kryczka W. Chemerin, vaspin and insulin resistance in chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis* 2010; 17 (9): 661–7.

99. Kulig P, Kantyka T, Zabel BA, Banas M, Chyra A, Stefanska A, Tu H, Allen SJ, Handel TM, Kozik A, Potempa J, Butcher EC, Cichy J. Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2011; 187 (3): 1403–10.
100. Kulig P, Zabel BA, Dubin G, Allen SJ, Ohyama T, Potempa J, Handel TM, Butcher EC, Cichy J. Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2007; 178 (6): 3713–20.
101. Kumar JD, Holmberg C, Kandola S, Steele I, Hegyi P, Tiszlavicz L, Jenkins R, Beynon RJ, Peeney D, Giger OT, Alqahtani A, Wang TC, Charvat TT, Penfold M, Dockray GJ, Varro A. Increased expression of chemerin in squamous esophageal cancer myofibroblasts and role in recruitment of mesenchymal stromal cells. *PloS one* 2014; 9 (7): e104877.
102. Kunimoto H, Kazama K, Takai M, Oda M, Okada M, Yamawaki H. Chemerin promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle and increases mouse blood pressure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2015; 309 (5): H1017-28.
103. Landgraf K, Friebe D, Ullrich T, Kratzsch J, Dittrich K, Herberth G, Adams V, Kiess W, Erbs S, Körner A. Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012; 97 (4): E556-64.
104. Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma X-L, Ouchi N. Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circulation journal official journal of the Japanese Circulation Society* 2017; 81 (7): 920–8.
105. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2009; 1 (6): a001651.
106. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, Ziegler F von, Lebherz C, Tittus J, Reiser M, Becker C, Göke B, Leber AW, Parhofer KG, Broedl UC. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *European journal of endocrinology* 2009; 161 (2): 339–44.
107. Li J-J, Yin H-K, Guan D-X, Zhao J-S, Feng Y-X, Deng Y-Z, Wang X, Li N, Wang X-F, Cheng S-Q, Bao Y, Xie D. Chemerin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis. *British journal of cancer* 2018; 118 (10): 1337–48.
108. Likhitsup A, Razumilava N, Parikh ND. Treatment for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Current Standard and the Future. *Clinical liver disease* 2019; 13 (1): 13–9.
109. Lin W, Chen Y-L, Jiang L, Chen J-K. 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. *Clinical laboratory* 2011; 57 (11-12): 879–85.
110. Lin Y, Yang X, Liu W, Li B, Yin W, Shi Y, He R. 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): 3599–608.
111. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer research* 2006; 66 (24): 11851–8.

112. Liu-Chittenden Y, Jain M, Gaskins K, Wang S, Merino MJ, Kotian S, Kumar Gara S, Davis S, Zhang L, Kebebew E. RARRES2 functions as a tumor suppressor by promoting  $\beta$ -catenin phosphorylation/degradation and inhibiting p38 phosphorylation in adrenocortical carcinoma. *Oncogene* 2017; 36 (25): 3541–52.
113. Liu-Chittenden Y, Patel D, Gaskins K, Giordano TJ, Assie G, Bertherat J, Kebebew E. Serum RARRES2 Is a Prognostic Marker in Patients With Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016; 101 (9): 3345–52.
114. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2003; 37 (2): 429–42.
115. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England)* 2003; 362 (9399): 1907–17.
116. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, Oliveira AC de, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 2008; 359 (4): 378–90.
117. Lőrincz H, Katkó M, Harangi M, Somodi S, Gaál K, Fülöp P, Paragh G, Seres I. Strong correlations between circulating chemerin levels and lipoprotein subfractions in nondiabetic obese and nonobese subjects. *Clinical endocrinology* 2014; 81 (3): 370–7.
118. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, Henau O de, Rouger L, Brait M, Franssen J-D, Nadai P de, Huaux F, Parmentier M. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2009; 183 (10): 6489–99.
119. Machida K, McNamara G, Cheng KT-H, Huang J, Wang C-H, Comai L, Ou J-HJ, Lai MMC. Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2010; 185 (11): 6985–98.
120. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017; 169 (3): 381–405.
121. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB life* 2014; 66 (1): 19–26.
122. Meder W, Wendland M, Busmann A, Kutzleb C, Spodsberg N, John H, Richter R, Schleuder D, Meyer M, Forssmann WG. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Letters* 2003; 555 (3): 495–9.
123. Migeotte I, Franssen J-D, Goriely S, Willems F, Parmentier M. Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations. *European journal of immunology* 2002; 32 (2): 494–501.
124. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *Journal of clinical gastroenterology* 2013; 47 Suppl: S2-6.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983; 65 (1-2): 55–63.

126. Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *The Journal of investigative dermatology* 1997; 109 (1): 91–5.
127. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 1982; 42 (9): 3858–63.
128. Nakajima H, Nakajima K, Nagano Y, Yamamoto M, Tarutani M, Takahashi M, Takahashi Y, Sano S. Circulating level of chemerin is upregulated in psoriasis. *Journal of dermatological science* 2010; 60 (1): 45–7.
129. Nakamura N, Naruse K, Kobayashi Y, Miyabe M, Saiki T, Enomoto A, Takahashi M, Matsubara T. Chemerin promotes angiogenesis in vivo. *Physiological reports* 2018; 6 (24): e13962.
130. Onkologie H:L. S3-Leitlinie hepatozelluläres Karzinom.
131. Pachynski RK, Wang P, Salazar N, Zheng Y, Nease L, Rosalez J, Leong W-I, Viridi G, Rennie K, Shin WJ, Nguyen V, Butcher EC, Zabel BA. Chemerin Suppresses Breast Cancer Growth by Recruiting Immune Effector Cells Into the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* 2019; 10: 983.
132. Pachynski RK, Zabel B, Leong W-I, Crowder R, Peehl D, Butcher E. Expression of the leukocyte chemoattractant chemerin in human prostate tumors. *JCO* 2015; 33 (7\_suppl): 81.
133. Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, Tejeda NM, Monnier J, Swanson CD, Holzer AK, Gentles AJ, Sperinde GV, Edalati A, Hadeiba HA, Alizadeh AA, Butcher EC. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *The Journal of experimental medicine* 2012; 209 (8): 1427–35.
134. Parikh ND, Singal AG, Hutton DW. Cost effectiveness of regorafenib as second-line therapy for patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2017; 123 (19): 3725–31.
135. Parlee SD, Wang Y, Poirier P, Lapointe M, Martin J, Bastien M, Cianflone K, Goralski KB. Biliopancreatic diversion with duodenal switch modifies plasma chemerin in early and late post-operative periods. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2015; 23 (6): 1201–8.
136. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 2007; 109 (9): 3625–32.
137. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, Ferlay J, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *International journal of cancer* 2019.
138. Phillips RJ, Helbig KJ, van der Hoek KH, Seth D, Beard MR. Osteopontin increases hepatocellular carcinoma cell growth in a CD44 dependant manner. *World journal of gastroenterology* 2012; 18 (26): 3389–99.
139. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 1978; 15 (1): 261–7.
140. Ress C, Tschoner A, Engl J, Klaus A, Tilg H, Ebenbichler CF, Patsch JR, Kaser S. Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels. *European journal of clinical investigation* 2010; 40 (3): 277–80.



141. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nature immunology* 2018; 19 (3): 222–32.
142. Roh S-g, Song S-H, Choi K-C, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S-i. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; 362 (4): 1013–8.
143. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Molecular medicine today* 1996; 2 (5): 198–204.
144. Roman AA, Parlee SD, Sinal CJ. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine* 2012; 42 (2): 243–51.
145. Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity reviews an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2013; 14 (3): 245–62.
146. Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Molecular and cellular endocrinology* 2015; 417: 36–51.
147. Rourke JL, Muruganandan S, Dranse HJ, McMullen NM, Sinal CJ. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *The Journal of endocrinology* 2014; 222 (2): 201–15.
148. Rubie C, Frick VO, Wagner M, Rau B, Weber C, Kruse B, Kempf K, Tilton B, König J, Schilling M. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. *Scandinavian journal of immunology* 2006; 63 (6): 468–77.
149. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, Mollereau C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. 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. *European journal of immunology* 1998; 28 (5): 1689–700.
150. Schutyser E, Struyf S, van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews* 2003; 14 (5): 409–26.
151. Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, Bedossa P, Tordjman J, Eckel J, Clément K. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010; 95 (6): 2892–6.
152. Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in molecular biosciences* 2017; 4: 96.
153. Shimamura K, Matsuda M, Miyamoto Y, Yoshimoto R, Seo T, Tokita S. Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23. *Peptides* 2009; 30 (8): 1529–38.
154. Shin JK, Kim HC, Lee WY, Yun SH, Cho YB, Huh JW, Park YA, Chun H-K. High preoperative serum CA 19-9 levels can predict poor oncologic outcomes in colorectal cancer patients on propensity score analysis. *Annals of surgical treatment and research* 2019; 96 (3): 107–15.
155. Shin WJ, Zabel BA, Pachynski RK. Mechanisms and Functions of Chemerin in Cancer: Potential Roles in Therapeutic Intervention. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 2772.

156. Singal AG, Conjeevaram HS, Volk ML, Fu S, Fontana RJ, Askari F, Su GL, Lok AS, Marrero JA. Effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention a publication of the American Association for Cancer Research, co-sponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2012; 21 (5): 793–9.
157. Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* 2010; 16 (4): 418–24.
158. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2008; 152 (2): 217–21.
159. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of hepatology* 2012; 56 (3): 704–13.
160. Sun P, Wang S, Wang J, Sun J, Peng M, Shi P. The involvement of iron in chemerin induced cell cycle arrest in human hepatic carcinoma SMMC7721 cells. *Metallomics integrated biometal science* 2018; 10 (6): 838–45.
161. Sun Y, Liu W-Z, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou H-F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of receptor and signal transduction research* 2015; 35 (6): 600–4.
162. Suyama E, Kawasaki H, Kasaoka T, Taira K. Identification of genes responsible for cell migration by a library of randomized ribozymes. *Cancer research* 2003; 63 (1): 119–24.
163. Tenneti P, Borad MJ, Babiker HM. Exploring the role of oncolytic viruses in hepatobiliary cancers. *Immunotherapy* 2018; 10 (11): 971–86.
164. Treeck O, Buechler C, Ortmann O. Chemerin and Cancer. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (15).
165. Tucureanu MM, Rebleanu D, Constantinescu CA, Deleanu M, Voicu G, Butoi E, Calin M, Manduteanu I. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *International journal of nanomedicine* 2018; 13: 63–76.
166. Tümmler C, Snapkov I, Wickström M, Moens U, Ljungblad L, Maria Elfman LH, Winberg J-O, Kogner P, Johnsen JI, Sveinbjørnsson B. Inhibition of chemerin/CMKLR1 axis in neuroblastoma cells reduces clonogenicity and cell viability in vitro and impairs tumor growth in vivo. *Oncotarget* 2017; 8 (56): 95135–51.
167. Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino ÉC, da Silva RF, da Silva RdCMA, Goloni-Bertollo EM. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP* 2017; 18 (4): 863–72.
168. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European journal of clinical investigation* 2018; 48 (9): e12997.
169. van Herpen NA, Sell H, Eckel J, Schrauwen P, Mensink RP. Prolonged fasting and the effects on biomarkers of inflammation and on adipokines in healthy lean men. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 2013; 45 (5): 378–82.

170. van Meer S, Man RA de, Coenraad MJ, Sprengers D, van Nieuwkerk KMJ, Klümpen H-J, Jansen PLM, IJzermans JNM, van Oijen MGH, Siersema PD, van Erpecum KJ. Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: Results from a large cohort in the Netherlands. *Journal of hepatology* 2015; 63 (5): 1156–63.
171. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen J-D, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *The Journal of experimental medicine* 2005; 201 (4): 509–15.
172. Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 2002; 13 (2): 143–54.
173. Vogel A, Saborowski A. Current strategies for the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer treatment reviews* 2020; 82: 101946.
174. Wang C, Wu WKK, Liu X, To K-F, Chen GG, Yu J, Ng EKW. Increased serum chemerin level promotes cellular invasiveness in gastric cancer: a clinical and experimental study. *Peptides* 2014; 51: 131–8.
175. Wang N, Wang Q-J, Feng Y-Y, Shang W, Cai M. Overexpression of chemerin was associated with tumor angiogenesis and poor clinical outcome in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clinical oral investigations* 2014; 18 (3): 997–1004.
176. Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2018; 23 (10).
177. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schäfler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clinical endocrinology* 2010; 72 (3): 342–8.
178. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112 (12): 1796–808.
179. Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2005; 175 (1): 487–93.
180. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *The Journal of experimental medicine* 2003; 198 (7): 977–85.
181. Wittamer V, Grégoire F, Robberecht P, Vassart G, Communi D, Parmentier M. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 (11): 9956–62.
182. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Globocan. *Cancer Fact Sheet: Liver and intrahepatic bile ducts* 2018.
183. Wörns M-A, Galle PR, Zeuzem S, Schirmacher P, Manns M, Vogel A. Drug Treatment for Chronic Hepatitis C Infection and Cancer Risk. *Deutsches Arzteblatt international* 2017; 114 (35-36): 597–602.

184. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112 (12): 1821–30.
185. Yamaguchi Y, Du X-Y, Zhao L, Morser J, Leung LLK. Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 (45): 39510–9.
186. Yamawaki H, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 423 (1): 152–7.
187. Yang H, Li F, Kong X, Yuan X, Wang W, Huang R, Li T, Geng M, Wu G, Yin Y. Chemerin regulates proliferation and differentiation of myoblast cells via ERK1/2 and mTOR signaling pathways. *Cytokine* 2012; 60 (3): 646–52.
188. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemerin reveals its chimeric nature. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205 (10): 2187–90.
189. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (41): 34661–6.
190. Zabel BA, Nakae S, Zúñiga L, Kim J-Y, Ohshima T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205 (10): 2207–20.
191. Zabel BA, Nakae S, Zúñiga L, Kim J-Y, Ohshima T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205 (10): 2207–20.
192. Zabel BA, Ohshima T, Zuniga L, Kim J-Y, Johnston B, Allen SJ, Guido DG, Handel TM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Experimental hematology* 2006; 34 (8): 1106–14.
193. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2005; 174 (1): 244–51.
194. Zabel BA, Zuniga L, Ohshima T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. *Experimental hematology* 2006; 34 (8): 1021–32.
195. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* 2005; 15 (1): 11–8.
196. Zhang B-H, Yang B-H, Tang Z-Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2004; 130 (7): 417–22.
197. Zhang J, Jin H-C, Zhu A-K, Ying R-C, Wei W, Zhang F-J. Prognostic significance of plasma chemerin levels in patients with gastric cancer. *Peptides* 2014; 61: 7–11.

198. Zhang J, Zhou J, Tang X, Zhou L-Y, Zhai L-L, Vanessa ME-D, Yi J, Yi Y-Y, Lin J, Qian J, Deng Z-Q. Reduced expression of chemerin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2017; 8 (54): 92536–44.
199. Zhao H-Q, Li W-M, Lu Z-Q, Yao Y-M. Roles of Tregs in development of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology WJG* 2014; 20 (24): 7971–8.
200. Zhao L, Yamaguchi Y, Ge X, Robinson WH, Morser J, Leung LLK. Chemerin 156F, generated by chymase cleavage of prochemerin, is elevated in joint fluids of arthritis patients. *Arthritis research & therapy* 2018; 20 (1): 132.
201. Zhao L, Yamaguchi Y, Sharif S, Du X-Y, Song JJ, Lee DM, Recht LD, Robinson WH, Morser J, Leung LLK. Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 (45): 39520–7.
202. Zhao L, Yamaguchi Y, Shen W-J, Morser J, Leung LLK. Dynamic and tissue-specific proteolytic processing of chemerin in obese mice. *PloS one* 2018; 13 (8): e0202780.
203. Zhao S, Li C, Ye Y-b, Peng F, Chen Q. Expression of Chemerin Correlates With a Favorable Prognosis in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Lab Med* 2011; 42 (9): 553–7.
204. Zhao Y, Chen Y, Hu Y, Wang J, Xie X, He G, Chen H, Shao Q, Zeng H, Zhang H. Genomic alterations across six hepatocellular carcinoma cell lines by panel-based sequencing. *Transl. Cancer Res* 2018; 7 (2): 231–9.
205. Zheng Y, Luo S, Wang G, Peng Z, Zeng W, Tan S, Xi Y, Fan J. Downregulation of tazarotene induced gene-2 (TIG2) in skin squamous cell carcinoma. *European journal of dermatology EJD* 2008; 18 (6): 638–41.

# 10 Anhang

## 10.1 Publikationen

- Buechler C, **Feder S**, Haberl EM, Aslanidis C. Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (5).
- **Feder S**, Kandulski A, Schacherer D, Weiss TS, Buechler C. Serum Chemerin Does Not Differentiate Colorectal Liver Metastases from Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2019; 20 (16).
- **Feder S**, Kandulski A, Schacherer D, Weiss TS, Buechler C. Serum Adiponectin Levels Do Not Distinguish Primary from Metastatic Liver Tumors. *Anticancer research* 2020; 40 (1): 143–51.
- **Feder S**, Haberl EM, Spirk M, Weiss TS, Wiest R, Buechler C. Pentraxin-3 is not related to disease severity in cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *Clinical and experimental medicine* 2020 (im Druck).
- 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; 104: 42–5.
- Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, **Feder S**, Sinal CJ, Bruckmann A, Hoering M, Krautbauer S, Liebisch G, Buechler C. Overexpression of Hepatocyte Chemerin-156 Lowers Tumor Burden in a Murine Model of Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2019; 21 (1).
- Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, **Feder S**, Sinal CJ, Buechler C. Chemerin in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocarcinogenesis. *Anticancer research* 2018; 38 (5): 2649–57.
- Krautbauer S, Neumeier M, Haberl EM, Pohl R, **Feder S**, Eisinger K, Rein-Fischboeck L, Buechler C. The utrophin-beta 2 syntrophin complex regulates adipocyte lipid droplet size independent of adipogenesis. *Molecular and cellular biochemistry* 2019; 452 (1-2): 29–39.

- Rein-Fischboeck L, Bajraktari G, Pohl R, **Feder S**, Eisinger K, Mages W, Haberl EM, Buechler C. Alpha-syntrophin dependent expression of tubulin alpha 8 protein in hepatocytes. *Journal of physiology and biochemistry* 2018; 74 (4): 511–21.
- Rein-Fischboeck L, Haberl EM, Bajraktari G, **Feder S**, Pohl R, Eggenhofer E, Buechler C. Alpha-syntrophin deficiency protects against non-alcoholic steatohepatitis associated increase of macrophages, CD8+ T-cells and galectin-3 in the liver. *Experimental and molecular pathology* 2019; 113: 104363.
- Rein-Fischboeck L, Haberl EM, Pohl R, **Feder S**, Liebisch G, Krautbauer S, Buechler C. Variations in hepatic lipid species of age-matched male mice fed a methionine-choline-deficient diet and housed in different animal facilities. *Lipids in health and disease* 2019; 18 (1): 172.
- Rein-Fischboeck L, Haberl EM, Pohl R, Schmid V, **Feder S**, Krautbauer S, Liebisch G, Buechler C. Alpha-syntrophin null mice are protected from non-alcoholic steatohepatitis in the methionine-choline-deficient diet model but not the atherogenic diet model. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 2018; 1863 (5): 526–37.

## 10.2 Kongressbeiträge

- Summer School 2017 der Regensburg International Graduate School of Life Sciences (RIGeL) in Weltenburg (Posterpräsentation):  
 „The Role of Chemerin in Liver Cells and in Hepatocellular Carcinoma“  
 Susanne Feder, Rebekka Pohl, Elisabeth M. Haberl, Lisa Rein-Fischboeck and Christa Buechler
  
- Summer School 2018 der Regensburg International Graduate School of Life Sciences (RIGeL) in Niederalteich (Vortrag):  
 „The Role of Chemerin in Liver Cells and in Hepatocellular Carcinoma“  
 Susanne Feder, Elisabeth M. Haberl, Rebekka Pohl and Christa Buechler
  
- 12<sup>th</sup> Annual Conference of the International Liver Cancer Association (ILCA) 2018 in London, Vereinigtes Königreich (Posterpräsentation):  
 „Hepatic tumor burden is reduced by endogenous overexpression of Chemerin-156“  
 Susanne Feder, Elisabeth M. Haberl, Rebekka Pohl, Lisa Rein-Fischböck, Thomas S. Weiss, Christa Buechler
  
- 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) 2019 in Heidelberg (Posterpräsentation):  
 „Chemerin-156 reduces liver tumor growth in vivo but has no effect on liver cell proliferation and migration“  
 Susanne Feder, Marlen Spirk, Rebekka Pohl, Lisa Rein-Fischboeck, Astrid Bruckmann, Elisabeth M. Haberl, Christa Buechler

## 10.3 Stipendium

iPUR – Internationales Promotionsprogramm der Universität Regensburg

Förderung eines Konferenzbesuches: 12<sup>th</sup> Annual Conference of the International Liver Cancer Association (ILCA) 2018 in London, Vereinigtes Königreich



## Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Christa Bächler für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke ihr für all die Ideen und Hilfestellungen zu meinem Projekt. Die stets konstruktive Kritik und die wissenschaftlichen Diskussionen wusste ich sehr zu schätzen. Es war eine sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit. Außerdem möchte ich mich für die Erstellung des ersten Gutachtens und die Funktion als Prüferin im Prüfungsausschuss bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Richard Warth, meinem ersten Mentor, möchte ich für die Ausübung der Funktion des Zweitgutachters und des zweiten Prüfers im Prüfungsausschuss danken. Außerdem möchte ich mich für die aufschlussreichen und hilfreichen Diskussionen zu meiner Doktorarbeit bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Charalampos Aslanidis, meinem zweiten Mentor, für die Übernahme der Funktion des dritten Prüfers im Prüfungsausschuss bedanken. Ich bedanke mich außerdem für den Input und die Denkanstöße bezüglich meiner Doktorarbeit.


Bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Schweda bedanke ich mich herzlich für die Ausübung des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Gerhard Liebisch für die massenspektrometrische Lipidanalyse und die gemeinsame Besprechung der Ergebnisse.

Bei Elena Underberg möchte ich mich herzlich für die technische Unterstützung im Labor bedanken.

Ein großer Dank geht auch an meine ehemaligen Kolleginnen aus unserer Arbeitsgruppe Marlen Spirk, Ganimete Bajraktari, Kerstin Dürholz, Dr. Lisa Haberl, Dr. Lisa Rein-Fischböck und Dr. Rebekka Pohl für die tolle Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich all meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Biopark für die schöne Zeit und amüsanten Mittagspausen danken: Angelika, Bianca, Hubert, Kentaro, Luise, Madlen, Bettina, Ezgi, Natascha, Parastoo und Toni.

Und vor allem danke ich meinen .