

Pathomechanismen für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) im Kontext genetischer Variation

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (PhD)
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Franziska Beatrice Schmalz

aus Bad Wildungen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Lutz
2. Gutachter: Prof. Dr. Marc Hübner

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.09.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	14
1.1 Einführung in das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und die Bedeutung genetischer Prädisposition	14
1.1.1 Epidemiologie und Prävalenz	14
1.1.2 Risikofaktoren für die HCC-Entstehung	15
1.1.3 Rolle der genetischen Veranlagung in der Krankheitsentwicklung	16
1.2. Aufbau und Metabolismus in der Leber	17
1.2.1 Grundlegende Funktionen der Leber und Leberanatomie	17
1.2.2 Zelluläre Bestandteile	17
1.2.3 Grundlagen des Lipidstoffwechsels	19
1.2.4 Regulation des Lebermetabolismus	20
1.3 Die <i>PNPLA3</i> -I148M-Mutation und ihre Rolle bei Lebererkrankungen	21
1.3.1 Das <i>PNPLA3</i> -Gen	21
1.3.2 Physiologische Funktionen des <i>PNPLA3</i> -Proteins	22
1.3.3 Der rs738409 Polymorphismus im <i>PNPLA3</i> -Gen	22
1.3.4 Pathomechanismen der <i>PNPLA3</i> -I148M induzierten Leberschädigung	23
1.3.5 Die <i>PNPLA3</i> -I148M induzierte Inflammation und Karzinogenese	24
1.4 Genetische Variation im <i>LPL</i> -Gen und seine Rolle im Lipidstoffwechsel ..	26
1.4.1 Physiologische Rolle des <i>LPL</i> -Proteins	26
1.4.2 Das <i>LPL</i> -Gen	26
1.4.3 Genetische Regulation von <i>LPL</i>	27
1.4.4 Der rs13702 Polymorphismus im <i>LPL</i> -Gen	28

1.5 Bedeutung des <i>SAMM50</i> -Gens im Kontext hepato-biliärer Erkrankungen	29
1.6 Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Geräte	31
2.2 Reagenzien und Chemikalien	32
2.3 Verbrauchsmaterialien	33
2.4 Kits	34
2.5 Software	34
2.6 Zelllinien und Zellkulturmedien	35
2.7 Patientenmaterial	35
2.8 Zellkultivierung	36
2.9 Zellaussaat und Stimulation	38
2.10 Geneditierung mittels CRISPR/Cas9	38
2.10.1 Konzeption und Herstellung der benötigten Reagenzien	38
2.10.2 Transfektion mittels CRISPR/Cas9	41
2.11 DNA-Isolation und Genotypisierung	42
2.12 Sequenzierung	44
2.13 Untersuchung der Genexpression	45
2.13.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	45
2.13.2 qPCR	45
2.14 Western Blot	46
2.14.1 Gewinnung von Zelllysaten	46
2.14.2 Gelelektrophorese	47
2.14.3 Transfer der Proteine und Immunologische Detektion	47
2.15 Durchflusszytometrische Analyse	49
2.15.1 Antikörper-basierte Detektion intrazellulärer Proteine	49
2.15.2 Nachweis der Lipidakkumulation und der ROS-Bildung mit Fluoreszenzfarbstoffen	50
2.15.3 Auswertung mittels FlowJo™ Software	52

2.16 Fluoreszenzmikroskopie	53
2.17 Untersuchung der Interleukinproduktion mittels ELISA	53
2.18 Statistische Analyse	53
3. Ergebnisse	55
3.1 Untersuchungen zur HCC-Entwicklung im Kontext der <i>PNPLA3</i> -I148M-Mutation mithilfe CRISPR/Cas9 modifizierter Hepatoma Zelllinien.....	55
3.1.1 Generierung von Zelllinien für die Untersuchung der <i>PNPLA3</i> -I148M-Mutation mittels CRISPR/Cas9.....	55
3.1.2 Die <i>PNPLA3</i> -Expression ist in den mit CRISPR/Cas9 generierten Hepatoma Zelllinien bei Vorliegen der <i>PNPLA3</i> -148M-Variante erhöht	58
3.1.3 Der <i>PNPLA3</i> -148M-Genotyp führt zu einer verstärkten Einlagerung von Triglyceriden	60
3.1.4 Die CXCL-8 Sekretion ist unter dem Einfluss der <i>PNPLA3</i> -148M-Variante in den Hepatoma Zelllinien erhöht.....	61
3.1.5 Bei Vorliegen der <i>PNPLA3</i> -148M-Mutation kommt es zu einer gesteigerten oxidativen Belastung in den Hepatoma Zelllinien	62
3.1.6 NADPH Oxidasen erhöhen den oxidativen Stress in den Hepatoma Zelllinien mit der <i>PNPLA3</i> -148M-Mutation.....	65
3.2 Pathophysiologische Bedeutung des rs13702 Polymorphismus im <i>LPL</i> -Gen vor dem Hintergrund der alkoholischen Lebererkrankung	68
3.2.1 Der <i>LPL</i> rs13702 Polymorphismus ist protektiv hinsichtlich der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms bei Vorliegen einer Alkohol-assoziierten Zirrhose	68
3.2.2 Der protektive Effekt des <i>LPL</i> rs13702 CC-Genotyps zeigt Wechselwirkungen mit dem <i>PNPLA3</i> -148M-Genotyp	69
3.2.3 Der <i>LPL</i> rs13702 CC-Genotyp korreliert unabhängig mit HCC....	70
3.2.4 Das <i>LPL</i> rs13702 C-Allel korreliert mit Lebersteatose und dem Leberenzym Gamma-Glutamyl-Transferase in Patienten mit ALD	71

3.2.5 Die hepatische LPL-Expression ist in Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose höher als in den Kontrollen.....	73
3.2.6 Das LPL-Protein wird vor allem in humanen Sternzellen und Sinus-Endothelzellen der Leber exprimiert.....	75
3.2.7 Die <i>LPL</i> -mRNA-Expression kann durch PPAR-Agonisten in LX-2 Zellen gesteigert werden	76
3.3 Genetische Variation in <i>SAMM50</i> im Kontext des Alkohol-assoziierten HCC.....	77
3.3.1 Der rs376142 und der rs3827385 Polymorphismus im <i>SAMM50</i> -Gen sind mit einem erhöhten HCC-Risiko bei Vorliegen einer ALD assoziiert, was sich auf eine Kopplung mit der <i>PNPLA3</i> -148M-Variante zurückführen lässt	77
4. Diskussion	80
5. Zusammenfassung.....	96
6. Abbildungsverzeichnis	97
7. Tabellenverzeichnis	99
8. Literaturverzeichnis	101
9. Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALD	Alkohol-assoziierte Lebererkrankung
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANGPTL3	<i>Angiopoietin-like 3</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APOE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BER	Basenaustauschreparatur
BFAR	<i>Bifunctional apoptosis regulator</i>
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas9	<i>Caspase 9</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate response element-binding protein</i>
CGI-58	<i>Comparative Gene Identification-58</i>
CI	Konfidenzintervall
CITE-Seq	<i>Cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing</i>
CREB-H	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 3-Like Protein H</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CXCL	C-X-C Motiv Chemokin Ligand
DAA	<i>Direct acting antiviral agents</i>
DAG	Diacylglycerol

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCFDA	Dichlorofluorescein-Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i>
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
gRNA	<i>Guide RNA</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HFD	<i>High-fat diet</i>
HGS	<i>Hepatocyte growth supplement</i>
HNE	Hydroxynonenal
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

HSA	Humanes Serum Albumin
HSC	Humane Sternzellen
HSD17B13	Hydroxysteroid (17-beta) Dehydrogenase 13
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i>
IFN(L3)	Interferon (Lambda 3)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
Indel	Insertion und Deletion
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAAT	<i>Lysophosphatidic acid acyl transferase activity</i>
LPL	Lipoprotein Lipase
LSEC	Sinus-Endothelzellen der Leber
LXR	Leber X-Rezeptor
MAG	Monoacylglycerin
MASH	<i>Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis</i>
MASL(D)	<i>Metabolic dysfunction- associated steatotic liver (disease)</i>
MBOAT7	<i>Membrane-bound O-acyltransferase 7</i>
Met	Methionin
MetALD	MASLD kombiniert mit ALD
MFI	<i>Mean-fluorescence-intensity</i>
miRNA	<i>Micro RNA</i>
MICA	<i>Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A</i>
MICOS	<i>Mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>
MRESS	<i>MicroRNA responsive element seed sequence</i>
mRNA	Messenger RNA

NAC	N-Acetyl Cystein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaP	Natriumpyruvat
NEFA	Nicht-veresterte Fettsäuren
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Nox	NADPH-Oxidasen
OGG-1	8-Oxoguanin Glykosylase-1
OR	<i>Odds ratio</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>
PAF	Populations-attributabler Faktor
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PBS(-T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (mit Tween)
PE	Phycoerythrin
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
P/S	Penicillin/Streptomycin
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RFS	<i>Recurrence free survival</i>
RNA	Ribonukleinsäure
(si)RNA	<i>(Small interfering) RNA</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAM(M 50)	<i>Sorting and assembly machinery (component 50 homolog)</i>
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLD	<i>Steatotic liver disease</i>
SNP	<i>Single Nukleotide Polymorphismus</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>

ssODN	<i>Single strand oligodeoxynucleotide</i>
TAG	Triacylglycerid
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TGF	Transformierenden Wachstumsfaktor
TGRL	Triacylglyceridreiches Lipoprotein
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i>
X ²	Pearson's Chi-Quadrat-Test

1. Einleitung

1.1 Einführung in das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und die Bedeutung genetischer Prädisposition

1.1.1 Epidemiologie und Prävalenz

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit 841,080 neuen Fällen im Jahr 2018 die sechsthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste krebisbedingte Todesursache und damit ein globales Gesundheitsproblem dar. Die höchste Inzidenz wird in Ostasien und Afrika beobachtet, wobei die Häufigkeit und Mortalität in Europa und Asien stetig steigt. Es wird angenommen, dass im Jahr 2025 eine Million Menschen neu am HCC erkranken werden (Llovet et al. 2021).

Hinsichtlich der HCC-Inzidenz gibt es geschlechterspezifische Unterschiede, wobei der größte Anteil der HCC-Fälle in Männern zu verzeichnen ist (Myers et al. 2021). Ein Risikoanstieg wurde in den letzten Jahren insbesondere bei Frauen beobachtet, mit einer jährlichen Inzidenzsteigerung von 2,2 % im Gegensatz zu Männern mit 1,1 % in den Jahren 2008-2017 (SEER 2022). Das HCC ist mit 75 % die global am häufigsten vorkommende primäre Leberkrebsart neben weiteren weniger häufigen Typen wie dem Cholangiozellulären Karzinom, dem Angiosarkom oder dem Hepatoblastom (Lotfollahzadeh et al. 2024).

90 % aller HCC-Fälle treten im Kontext einer chronischen Lebererkrankung auf, wobei eine Zirrhose jeglicher Ätiologie den größten Risikofaktor darstellt. Weitere Risikofaktoren sind chronischer Alkoholabusus, metabolische Erkrankungen wie die *Metabolic dysfunction- associated steatotic liver disease* (MASLD), sowie Hepatitis-B-Virus (HBV) - und Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektionen, gefolgt von weniger starken Risikofaktoren wie Zirrhose bedingt durch eine primäre biliäre Cholangitis, eine Hämochromatose oder eine α 1-Antitrypsin-Defizienz (Llovet et al. 2021). Variationen in der HCC-Inzidenz und -Mortalitätsraten sind auf Umwelteinflüsse, die Prävalenz chronischer Hepatitis-Infektionen sowie Unterschiede in Vorsorge- und Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen (Yang et al. 2023).

1.1.2 Risikofaktoren für die HCC-Entstehung

MASLD, früher bekannt als NAFLD, ist eine Fettlebererkrankung (*steatotic liver disease*, SLD) in der Anwesenheit ein oder mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren in Abwesenheit signifikanten Alkoholkonsums. Die MASLD stellt eine Spektrumerkrankung dar, die eine isolierte Steatose (MASL), *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* (MASH), Fibrose, Zirrhose und das MASH bedingte HCC vereint. MASLD ist die am häufigsten vorkommende Lebererkrankung mit einer stetig steigenden Prävalenz (Tacke et al. 2024). Ursächlich dafür sind die Pandemien von Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2 neben weiteren Umweltfaktoren, die Patienten anfälliger für die Entwicklung von Lebererkrankungen machen (Younossi et al. 2022). Die MASLD ist unter anderem mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, chronische Nierenerkrankungen und leberspezifische Komplikationen assoziiert. Bei der MASH kommt es zusätzlich zu der hepatischen Steatose zu einer lobulären Inflammation und in deren Folge zunehmenden fibrotischen Leberschädigung. Diese Inflammation geht beispielsweise mit einer Infiltration von Lymphozyten und Neutrophilen in den Bereichen um die kleinen venösen Blutgefäße in der Leber (perivenuläre Areale) einher. Die SLD vereint neben der MASLD, der Wirkstoff-induzierten und der kryptogenen SLD auch die MASLD mit erhöhtem Alkoholkonsum (MetALD) sowie die Alkohol-assoziierte Lebererkrankung (ALD) (Tacke et al. 2024).

Exzessiver Alkoholkonsum kann zur Entwicklung einer ALD führen, die ein breites Spektrum hepatischer Erkrankungen umfasst und das HCC-Risiko bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren erhöht. Die ALD reicht von der asymptomatischen Steatose über die Alkoholische Steatohepatitis (ASH) und der Alkoholischen Leberfibrose bis hin zu der Entwicklung einer Zirrhose und des HCC. Die Entwicklung einer ALD wird neben Umwelteinflüssen, der genetischen Variation, dem Geschlecht und der Ethnizität durch die Ernährung sowie das Vorliegen weiterer zugrundeliegender Lebererkrankungen beeinflusst (Tacke et al. 2024; Liu et al. 2022).

HBV-Infektionen, ausgelöst durch das taxonomisch zu den *Hepadnaviridae* Familie gehörenden HBV, tragen zur Entwicklung einer fortschreitenden Dekompensation der Leber sowie zur Zirrhose- und HCC-Entwicklung bei. Durch die im Jahr 1992 implementierte HBV-Vakzinierung für Kinder konnte die Prävalenz der chronischen HBV-Infektion in den vakzinierten Kohorten um 90 % gesenkt werden (Rizzo et al. 2022).

Neben HBV-Infektionen stellen auch HCV-Infektionen eine Hauptursache für die Entstehung der fortgeschrittenen hepatischen Fibrose und Zirrhose, verbunden mit einem gesteigerten Risiko für das HCC, dar. HCV zählt zu den hepatotropischen Ribonukleinsäure (RNA)-Viren und kann heutzutage sehr effektiv mit *direct acting antiviral agents* (DAA) behandelt werden (Axley et al. 2018).

Auch weitere soziodemographische Charakteristika tragen zur Entstehung und Progression des HCC bei, wie beispielsweise das Alter, das männliche Geschlecht, die Therapiemöglichkeiten sowie die Ethnizität. Unterschiede je nach ethnischer Herkunft sind neben Umwelteinflüssen auch auf verschiedene Prävalenzen genetischer Risikofaktoren in den Populationen zurückzuführen (Beutler et al. 2020).

1.1.3 Rolle der genetischen Veranlagung in der Krankheitsentwicklung

Die individuelle genetische Prädisposition spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des HCC. So wird beispielsweise das Risiko durch Gendefekte beeinflusst, die zur Ausprägung der Stoffwechselerkrankungen α 1-Antitrypsin-Defizienz oder Wilson-Krankheit führen und die bei Vorliegen einer Zirrhose das HCC-Risiko erhöhen können (Guillaud et al. 2023). Darüber hinaus gibt es Gendefekte, welche die Resilienz gegenüber HBV- und HCV-Infektionen erhöhen (O'Brien et al. 2019) oder das Risiko für metabolische Erkrankungen beeinflussen, welche stark mit dem Risiko der MASLD assoziiert sind (Belkina und Denis 2010; Angelidi et al. 2022).

Weitere genetische Einflussfaktoren stellen die häufig im Genom vorkommenden *Single Nukleotide* Polymorphismen (SNP) dar, welche die individuelle Diversität beispielsweise in Hinblick auf die phänotypische Variation, die Reaktion auf bestimmte Arzneimittel oder die Entstehung von Krankheiten bestimmen. Die inter-individuellen Unterschiede kommen dabei beispielsweise durch Veränderungen in der Genexpression, der *messenger* RNA (mRNA)-Stabilität und der Lokalisation von mRNA oder Proteinen zustande (Shastri 2009). SNP sind unter anderem in die Modulation von oxidativem Stress, Entzündung und Immunantworten sowie in die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparatur und Zellzyklusmechanismen involviert, was zur Leberkarzinogenese und damit zum HCC-Risiko beitragen kann (Nahon und Zucman-Rossi 2012).

Genetische Studien, die sich entweder auf wenige Gene (Kandidatengen-Ansatz) oder auf das komplette Genom (Genomweite Assoziationsstudie, GWAS) fokussieren, haben

in den letzten Jahren potenzielle Varianten, die mit dem HCC-Risiko assoziiert sind, identifiziert. Polymorphismen im *epidermal growth factor (EGF)*, Interferon Lambda 3 (*IFNL3*) oder *Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A (MICA)* Gen können beispielsweise die Empfänglichkeit für HCC bei Patienten mit HCV erhöhen. Genetische Variationen in *Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3)*, *Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2)* und *Membrane-bound O-acyltransferase 7 (MBOAT7)* hingegen erhöhen das HCC-Risiko bei Vorliegen einer metabolischen Lebererkrankung (Fujiwara und Hoshida 2019).

1.2. Aufbau und Metabolismus in der Leber

1.2.1 Grundlegende Funktionen der Leber und Leberanatomie

Die Leber erfüllt ein großes Spektrum an Funktionen, einschließlich des Metabolismus, der Detoxifikation, der Proteinsynthese, der metabolischen Homöostase sowie der Sekretion verdauungsfördernder Komponenten. Die diversen Funktionen der Leber werden durch ihr anatomisch einzigartiges gewebespezifisches 3D-Netzwerk ermöglicht (Martínez-Torres et al. 2024). Makroskopisch besteht die Leber aus hexagonalen funktionellen Elementen, den Leberläppchen, die in einer gitterartigen Struktur angeordnet sind (Ricken et al. 2015). Jedes dieser Leberläppchen enthält die portale Triade, bestehend aus dem Zusammenschluss drei wichtiger Gefäße, der hepatischen Arterie, der Portalvene und dem Gallengang. Dabei bringt die Leberarterie sauerstoffreiches Blut zur Leber, die Portalvene führt nährstoffreiches, sauerstoffarmes Blut aus den peripheren Geweben zur Leber und der Gallengang führt Galle von der Leber ab (Martínez-Torres et al. 2024). Im Zentrum jedes Leberläppchens befindet sich die Zentralvene, die das Blut sammelt, welches von der portalen Triade kommt. Die Kapillaren, welche die Blutgefäße der portalen Triade mit der Zentralvene verbinden, werden Sinusoide genannt und sind von Hepatozyten flankiert. Diese übernehmen eine zentrale Rolle in der Leber, da sie den Blutfluss und Stoffaustausch in den Leberläppchen ermöglichen (Ricken et al. 2015).

1.2.2 Zelluläre Bestandteile

Die Leber besteht aus verschiedenen miteinander interagierenden Zelltypen (Martínez-Torres et al. 2024), wobei Hepatozyten mit 80 % aller in der Leber ansässigen Zellen den

Hauptzelltyp und den zentralen Bereich des Glucose- und Lipidmetabolismus darstellen (Ricken et al. 2015). Die verbleibenden 20 % der Zellen stellen nicht-parenchymale Zelltypen dar, die aus Cholangiozyten, Kupffer-Zellen, humanen Sternzellen (HSC) und Sinus-Endothelzellen der Leber (LSEC) bestehen. Hepatozyten sind epitheliale polarisierte Zellen mit einer basolateralen Membran, die in Kontakt mit den Sinusoiden steht und einer apikalen Seite, welche die Gallenkapillare formt. Diese münden in den Gallengang, der von Cholangiozyten gesäumt ist (Lemos et al. 2019).

Die Sinusoide, die zwischen den Hepatozyten-Strängen verlaufen, sind mit einem diskontinuierlichen Endothel ausgekleidet, welches aus LSEC besteht (Abb. 1). Diese besitzen Fenestrationen, welche als Ultrafiltrationssystem wirken und damit die hepatische Aufnahme verschiedener Substrate steuern (Fraser et al. 2012). Zusätzlich dazu können LSEC zur Regeneration der Leber nach einer Leberverletzung beitragen und der Entwicklung einer Fibrose entgegenwirken (Verhulst et al. 2021).

Im perisinusoidalen Raum (Disse-Raum) zwischen den Hepatozyten und LSEC befinden sich HSC, welche Vitamin A speichern und an der Produktion extrazellulärer Matrixproteine (ECM) beteiligt sind. Im Lumen der Sinusoide sind zudem Leber-spezifische Makrophagen (Kupffer-Zellen) lokalisiert, die für die Immunregulation der Leber von Bedeutung sind (Abb. 1) (Gibert-Ramos et al. 2021).

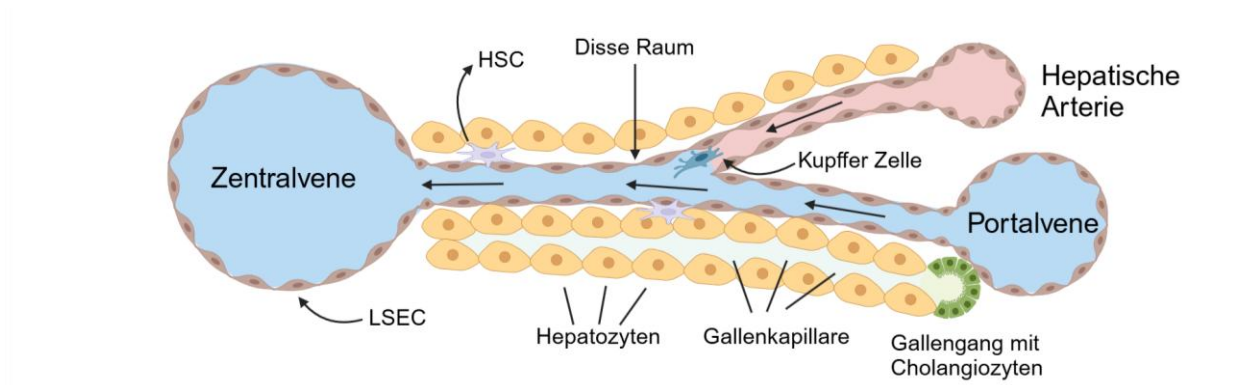


Abb. 1 Schematische Darstellung der Leberstruktur mit beteiligten Zelltypen. Erstellt mit Biorender.com und modifiziert nach Fanti und Ko-Autoren (Fanti et al. 2017).

Im Rahmen von Lebererkrankungen können zelluläre Faktoren in der Leber beeinflusst oder geschädigt werden, was weitreichende Auswirkungen haben kann. Beispielsweise kann es durch eine chronische Lebererkrankung zur Aktivierung der fibrogenetischen HSC kommen, die durch ihre Transdifferenzierung in einen aktivierten,

myofibroblastenähnlichen Zelltyp übergehen und damit einhergehend pro-fibrotische und pro-inflammatorische Eigenschaften erwerben (Garbuzenko 2022). Die Myofibroblasten sind neben ihren proliferativen, kontraktiven und inflammatorischen Eigenschaften auch durch eine verstärkte Produktion von Molekülen der ECM charakterisiert (Tsuchida und Friedman 2017).

Auch LSEC werden unter pathologischen Bedingungen beeinflusst, was zum Verlust der Fenestrationsen führen kann (Kapillarisation). Dadurch gehen die protektiven Eigenschaften der Zellen verloren, was zur Initiierung und Progression chronischer Lebererkrankungen beiträgt (Poisson et al. 2017).

1.2.3 Grundlagen des Lipidstoffwechsels

Metabolite wie Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren aus der Nahrung oder anderen extrahepatischen Geweben erreichen die Leber über das Portalvenensystem. Fettsäuren aus der Nahrung werden dabei zunächst in Triglyceride umgewandelt und dann mit Phospholipiden und Apolipoproteinen zu Chylomikronen verpackt. Diese werden anschließend zunächst über den Blutkreislauf zum Fettgewebe und zur Muskulatur transportiert, wo der Großteil der Triglyceride mithilfe des Lipoprotein Lipase Enzyms (LPL) hydrolysiert und zur Energiegewinnung oder Speicherung aufgenommen wird. Die triglyceridarmen Chylomikronen-Remnants gelangen dann über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Hepatozyten der Leber (Rui 2014).

Zusätzlich zur Aufnahme von Fettsäuren aus der Nahrung können Lipide aus anderen extrahepatischen Geweben aufgenommen werden. Im postprandialen Zustand oder bei einem Überschuss von Kohlenhydraten kann Glucose nicht nur in Glykogen umgewandelt, sondern auch in Fettsäuren konvertiert werden (de novo Lipogenese) (Liao et al. 2022). Freie Fettsäuren können dann mit Glycerol-3-Phosphat zu Triacylglyceriden (TAG) umgewandelt und als Lipidtropfen in Hepatozyten gespeichert werden oder mit Cholesterol esterifiziert werden. Die so erzeugten Cholesterol-Ester können dann später als Cholesterolquelle in peripheren Geweben genutzt werden.

Darüber hinaus können TAG in Form von triglyceridreichen *very-low-density lipoprotein* (VLDL)-Partikeln in die Zirkulation abgegeben werden. Dort können sie beispielsweise im nüchternen Zustand oder bei körperlicher Anstrengung vom extrahepatischen Gewebe zur Energiegewinnung genutzt werden. Dabei werden sie mithilfe der Lipoproteinlipase im

Fett- und Muskelgewebe zu Glycerol und nicht-veresterte Fettsäuren (NEFA) hydrolysiert (Lipolyse) und durchlaufen anschließend in den Mitochondrien die β -Oxidation und Ketonkörperbildung (Rui 2014).

Die VLDL-Partikel werden durch die Abgabe der Triglyceride in triglyceridärmere *intermediate-density lipoprotein* (IDL)-Partikel umgewandelt, die zu überwiegend Cholesterin transportierenden LDL-Partikeln weiter metabolisiert werden. Diese können von verschiedenen Geweben einschließlich der Leber über LDL-Rezeptoren aufgenommen werden. Der anschließende Transport von Cholesterol von den peripheren Geweben zurück zur Leber in Form von *high-density lipoprotein* (HDL) Partikeln ist wichtig für die Rückführung des Cholesterins, wo es verschiedene Funktionen erfüllt (Feingold 2000). In der Leber wird das Cholesterin beispielsweise zu Gallensäuren umgewandelt, die in den Gallengang sekretiert und unter anderem für die Fettverdauung– und Resorption benötigt werden (Liao et al. 2022).

1.2.4 Regulation des Lebermetabolismus

Die Leber ist ein essenziell an der Lipid- und Glucosehomöostase beteiligtes Organ, dessen Aktivität durch verschiedene Nährstoffe sowie hormonelle und neuronale Signale sowie deren zugehörige Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren reguliert wird. Es dient als Zentrum metabolischer Aktivität, welches mit anderen Organen wie dem Skelettmuskel und dem adipösen Gewebe in Verbindung steht (Rui 2014). Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Lipidmetabolismus beteiligt sind, umfassen beispielsweise *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) und *Sterol regulatory element binding protein* (SREBP)-1 neben nukleären Rezeptoren wie Leber-X-Rezeptoren (LXR) oder Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) (Ramatchandirin et al. 2023).

PPAR werden als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren durch endogene Liganden wie beispielsweise Fettsäuren und ähnliche Komponenten in der Leber oder anderen Organen aktiviert. Dabei wird zwischen drei verschiedenen Isoformen unterschieden, PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Diese weisen Unterschiede hinsichtlich der Affinität und Spezifität ihrer Agonisten, ihrer Verteilung im Körper und ihrer Fähigkeit, den Lipidmetabolismus und die Energiehomöostase in Säugetieren zu modulieren (Monroy-Ramirez et al. 2021), auf. Beispielsweise spielt PPAR γ unter anderem eine Rolle in der

Adipogenese und der Lipidaufnahme, der Speicherung von TAG und der Bildung von Lipidtropfen in Adipozyten (Sun et al. 2021; Lefterova et al. 2014). Zusammen regulieren die Transkriptionsfaktoren glykolytische Gene und Gene, die an der Regulation der Lipogenese, der Lipidaufnahme, des Lipidtransportes- oder der Speicherung involviert sind (Rui 2014).

Die hormonelle Regulation des hepatischen Metabolismus erfolgt durch Glucagon und Insulin, welche den Blutglucosespiegel regulieren und eng an der Koordination des Glucose- und Lipidmetabolismus beteiligt sind (Sharabi et al. 2019).

1.3 Die *PNPLA3*-I148M-Mutation und ihre Rolle bei Lebererkrankungen

1.3.1 Das *PNPLA3*-Gen

Das *PNPLA3*-Gen befindet sich auf Chromosom 22 und besteht insgesamt aus neun Exons mit einer Länge von 2805 Basenpaaren, die für insgesamt 481 Aminosäuren kodieren. *PNPLA3* gehört zu der diversen *PNPLA*-Proteinfamilie, die aus insgesamt neun Subtypen besteht und in verschiedenen Organismen vorkommt. Die *PNPLA*-Domäne enthält eine aus α - und β -Faltblättern bestehende „Sandwich“ Struktur und ein konserviertes katalytisches Serin-Aspartat Lipase Motiv (Sherman et al. 2024). Das humane *PNPLA3*-Gen ist überwiegend in der Leber- und dem Fettgewebe exprimiert und befindet sich beispielsweise in den in der Leber ansässigen Hepatozyten, HSC und LSEC (Pingitore und Romeo 2019).

PNPLA3 wird transkriptionell und auf Proteinebene über die Nährstoffverfügbarkeit reguliert (Huang et al. 2011), wobei die Auswirkungen auf Gen- und Proteinebene zellpopulationsspezifische Unterschiede aufweisen können. So führt eine erhöhte Glucosezufuhr in Hepatozyten zu einer Steigerung der *PNPLA3*-Expression, wohingegen sie in HSC die Expression senkt (Bruschi et al. 2020b). In Mausstudien konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von *PNPLA3* im nüchternen Zustand niedrig ist und unter dem Einfluss von Kohlenhydraten um das 90-fache ansteigt. In Mäusen, die eine *high-fat diet* (HFD) erhalten, kommt es ebenfalls zu einer Steigerung der *PNPLA3*-Level, was auf eine Regulation des Proteins auch im Hinblick auf den Lipidstatus hindeutet (Hoekstra et al. 2010).

1.3.2 Physiologische Funktionen des PNPLA3-Proteins

Zelluläre Studien, in denen PNPLA3 überexprimiert wurde, haben ergeben, dass die Proteine auf den Lipidtropfen, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytosol lokalisiert sind (Sherman et al. 2024). Weitere Studien haben in diesem Kontext gezeigt, dass das PNPLA3-Protein vor allem mit der Membran und Lipidtropfen assoziiert und fest in der Membran verankert ist (He et al. 2010; Xiang et al. 2021).

Die enzymatischen Aktivitäten des PNPLA3-Proteins sind divers und umfassen sowohl Lipaseaktivitäten hinsichtlich TAG- und Retinyl-Estern als auch in geringerem Maße Acyltransferaseaktivitäten, wie beispielsweise *Lysophosphatidic acid acyl transferase activity* (LPAAT) auf Phospholipiden. Im Hinblick auf die Lipaseaktivität ist PNPLA3 für die Hydrolyse drei großer Glycerolipide (TAG; Diacylglycerin, DAG; Monoacylglycerin, MAG) verantwortlich, wobei eine Präferenz für einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) besteht. Durch die LPAAT-Aktivität kommt es zur Acylierung der Lysophosphatidsäure (LPA) zur Phosphatidsäure, welche als Vorläufer für Triglyceride dient (Pingitore und Romeo 2019).

Die höchste Expression des PNPLA3-Proteins findet sich in Hepatozyten und HSC, wo es als Lipidtropfenregulator agiert. Speziell in HSC ist PNPLA3 an der Physiologie und Fibrosedynamik der Zellen beteiligt. Hier besitzt das PNPLA3-Protein Hydrolase-Aktivität hinsichtlich von Retinyl-Estern, was zur Freisetzung von Retinol aus den Zellen führt. Dabei kommt es zu einer Hochregulation des Proteins, wenn die Zellen Retinol depletiert sind. Die Hochregulation kann auch durch den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β induziert werden, welcher in die Fibrogenese involviert ist. Das lässt auf eine direkte Rolle von PNPLA3 bei der Leberfibrose und inflammatorischen Vorgängen schließen. In Hepatozyten ist PNPLA3 in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit in die Umstrukturierung von Triglyceriden und Phospholipiden involviert (Mitsche et al. 2018), was zur Remodellierung von Lipidtropfen führt. Dies deutet auf eine Rolle des Proteins in der Regulation der Lipidhomöostase hin.

1.3.3 Der rs738409 Polymorphismus im *PNPLA3*-Gen

Der *PNPLA3* rs738409 (C>G) Polymorphismus (*PNPLA3*-I148M) ist ein SNP, der zu einer Substitution von Isoleucin (Ile) zu Methionin (Met) an Position 148 im Protein führt (Pingitore und Romeo 2019). Die Prävalenz der Mutation unterscheidet sich in

Abhängigkeit der Ethnizität und ist in asiatischen und in lateinamerikanischen Individuen im Vergleich zu kaukasischen Individuen deutlich erhöht (Petta et al. 2024).

Die *PNPLA3*-I148M-Mutation ist der häufigste und stärkste genetische Risikofaktor, der für die Entwicklung einer Alkohol-assoziierten Leberschädigung, einer MASH, einer Zirrhose und eines HCC bekannt ist. Übergewicht, Ernährung sowie weitere Risikofaktoren können die Effekte der Mutation auf die SLD amplifizieren und den Einfluss der Mutation so weiter steigern. In umfassenden Studien wurde nachgewiesen, dass die *PNPLA3*-I148M-Mutation mit dem kompletten Spektrum der SLD assoziiert ist. Durch die hohe Frequenz und Effektgröße hat die Mutation den höchsten populations-attributablen Faktor (PAF) für chronische Lebererkrankungen und Zirrhose in europäischen Populationen im Unterschied zu anderen, in GWAS identifizierten Varianten (Kozlitina und Sookoian 2024). Eine Assoziation der *PNPLA3*-I148M-Mutation explizit mit ALD und ihren Folgen Fibrose, Zirrhose und HCC konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Trépo et al. 2022).

1.3.4 Pathomechanismen der *PNPLA3*-I148M induzierten Leberschädigung

Die molekularen Mechanismen, die unter dem Einfluss der *PNPLA3*-I148M-Mutation zu einem erhöhten Risiko für Lebererkrankungen beitragen, sind bisher unzureichend verstanden.

Wie die *PNPLA3*-I148M-Mutation zu einer Steigerung der Leberverfettung führt, konnte in Teilen aufgeklärt werden. Zum einen haben Studien gezeigt, dass es bei Anwesenheit der Mutation zu einer reduzierten TAG- und DAG-Hydrolase-Aktivität und somit zu einer Akkumulation von TAG in der Leber kommt (Xiang et al. 2021; Huang et al. 2011). Auch in anderen Studien konnte eine erhöhte Einspeicherung von Triglyceriden in der Leber nachgewiesen werden (Petit et al. 2010; Sookoian und Pirola 2011). Diese war dabei unabhängig vom Body-Mass-Index (BMI) und dem Vorliegen einer Insulinsensitivität und es bestand keine Korrelation zum totalen und viszeralen Fett (Goran et al. 2010). Zellbasierte Studien von Nischalke und Ko-Autoren (Nischalke et al., unpubliziert) konnten zudem eine erhöhte Einspeicherung von Triglyceriden in Hepatoma Zelllinien nachweisen, in denen die *PNPLA3*-148M-Mutation mithilfe eines lentiviralen Plasmids stabil überexprimiert wurde. Neben der verminderten Hydrolase-Aktivität kann die

Mutation auch die Aktivität der LPAAT steigern, was zu einer gesteigerten TAG-Synthese führt (Kumari et al. 2012).

Darüber hinaus kommt es im Rahmen der *PNPLA3*-I148M-Mutation zu Veränderungen in Bezug auf die Lokalisation und die Menge des Proteins. So findet sich das *PNPLA3*-I148M-Protein im Vergleich zur Wildtypvariante hauptsächlich in den Lipidtropfen, was in einer veränderten Verteilung des Proteins zwischen den Lipidtropfen und dem ER beziehungsweise Zytosol resultiert (Ruhanen et al. 2014). Zudem konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass es in Anwesenheit der Mutation zu einer Inhibierung der Ubiquitinierung und des proteasomalen Abbaus kommt (BasuRay et al. 2017). Das sorgt dafür, dass sich das Protein auf der Oberfläche der Lipidtropfen anreichert, was mit der TAG-Hydrolyse interferiert und im weiteren Verlauf eine Lebersteatose fördern kann (BasuRay et al. 2019; Wang et al. 2019). Weitere Studien haben in diesem Kontext belegt, dass das *PNPLA3*-Protein durch die membran-gebundene E3 Ubiquitin-Ligase *bifunctional apoptosis regulator* (BFAR) reguliert wird. Basierend auf den Ergebnissen wird angenommen, dass durch die *PNPLA3*-148M-Mutation das Motiv zerstört wird, welches durch BFAR erkannt wird. Dies führt im weiteren Verlauf dazu, dass nur ein geringer Anteil des *PNPLA3*-Proteins auf den Lipidtropfen ubiquitiniert und abgebaut wird (Das et al. 2024).

Unklar sind vor allem die Schritte, die von der übermäßigen Verfettung der Leberzelle zur Zirrhose und zum Karzinom führen.

1.3.5 Die *PNPLA3*-I148M induzierte Inflammation und Karzinogenese

Inflammatorische Prozesse im Körper spielen eine zentrale Rolle in der HCC-Entwicklung (Yang et al. 2020). In diesem Kontext haben epidemiologische Studien Evidenz für einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Entzündung und der HCC-Entstehung erbracht (Dalglish und O'Byrne 2006). Hepatische Entzündungsreaktionen wurden auch in Patienten mit der *PNPLA3*-148M-Mutation in Form von leukozytärer Infiltration und erhöhten Transaminasen nachgewiesen (Sookoian und Pirola 2011). Darüber hinaus konnten in einer lentiviral mit der *PNPLA3*-148M-Mutation transduzierten Hepatoma Zelllinie erhöhte C-X-C Motiv-Chemokin-Ligand (CXCL)-8 und CXCL-1 Spiegel gemessen werden, was für die CXCL-8 Konzentration auch *in vivo* verifiziert werden konnte (Nischalke et al. 2019).

Chemokine besitzen tumorförderndes Potenzial und können über ihre pro-fibrotischen Eigenschaften die Progression der Fettleber zur Zirrhose vorantreiben. Wie genau die *PNPLA3-I148M*-Mutation zu erhöhten CXCL-8 Spiegeln beiträgt, ist bisher unzureichend verstanden. Eine Hypothese könnte sein, dass es unter der *PNPLA3-I148M*-Mutation zu pro-inflammatorischen und tumorfördernden Mechanismen durch erhöhten oxidativen Stress kommen könnte.

Oxidative Prozesse, die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie eine verminderte anti-oxidative Kapazität sind nachweislich in die Entwicklung von Tumoren und die Karzinogenese involviert (Nourazarian et al. 2014). Studien deuten in diesen Zusammenhang auf eine Rolle von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen (Nox) bei der Entstehung von Leberfibrose, Zirrhose und HCC hin. Nox sind in oxidative Prozesse involviert und die Hauptproduzenten von ROS, die Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden verursachen können (Sedeek et al. 2013). Hinweise auf eine Rolle von Nox ergeben sich aus zellbasierten Studien von Nischalke und Ko-Autoren (Nischalke et al., unpubliziert) in denen durch den Einsatz von Nox-Inhibitoren eine verminderte pro-inflammatorische Reaktion erzielt werden konnte. Passend dazu wurde in weiteren Forschungsarbeiten herausgefunden, dass es im Kontext der Hepatokarzinogenese zu einer vermehrten Expression des DNA-Reparaturenzyms 8-Oxoguanin Glykosylase (OGG-1) kommt (Zhang et al. 2022), was für eine Beteiligung von ROS spricht. Kommt es durch die ROS zu einer verlängerten enzymatischen Aktivität von OGG-1, kann dies im weiteren Verlauf auch die Bindung von Transaktivatoren, wie beispielsweise *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) an die DNA erleichtern. Dies kann zu einer erhöhten Expression von Zytokinen und zur Rekrutierung von Immunzellen beitragen (Vlahopoulos et al. 2023). Eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges kann auch direkt durch ROS erfolgen, welche die Genexpression auf verschiedene Art und Weise beeinflussen können (Kietzmann et al. 2017).

Ein weiterer Biomarker für oxidativen Stress stellt das Lipidaldehyd 4-Hydroxynonenal (4-HNE) dar, welches durch die Oxidation von PUFA entsteht (Zhong und Yin 2015).

1.4 Genetische Variation im *LPL*-Gen und seine Rolle im Lipidstoffwechsel

1.4.1 Physiologische Rolle des LPL-Proteins

LPL, das zur Triglyceridlipasefamilie gehört, ist ein Schlüsselenzym im Lipidstoffwechsel, welches zentral am Transport und Metabolismus von Lipiden beteiligt ist (Li et al. 2014). Das Protein wird vor allem im Fettgewebe, der Skelett- und Herzmuskulatur, sowie in Makrophagen exprimiert. Die enzymatische Funktion von LPL umfasst die Bindung und den Katabolismus von triacylglyceridreichen Lipoproteinen (TGRL), zu denen beispielsweise Chylomikronen und VLDL-Partikel gehören (Lent-Schochet und Jialal 2024). Die triglyceridarmen Lipoproteinpartikel werden in Assoziation mit LPL anschließend von der Leber abgebaut (Moon et al. 2022).

LPL wird vor allem in der fötalen Entwicklung exprimiert. Mit steigendem Alter nimmt die Konzentration des Proteins in der Leber ab, bis in der gesunden adulten Leber keine Expression mehr nachweisbar ist (Peinado-Onsurbe et al. 1992). Jüngere Studien konnten jedoch zeigen, dass es zu einem Anstieg der LPL-Expression in Patienten mit MASLD kommt (Westerbacka et al. 2007). Dabei war die LPL-Expression in der Leber vor allem in HSC, nicht jedoch in Hepatozyten nachweisbar (Teratani et al. 2019).

1.4.2 Das *LPL*-Gen

Das *LPL*-Gen konnte 1987 auf Chromosom 8 (8p22) lokalisiert werden und kodiert für ein Protein, welches insgesamt aus 475 Aminosäuren besteht (Sparkes et al. 1987). Das Gen ist ungefähr 30 Kilobasen lang und aufgeteilt in 10 Exons (Abb. 2). Exon 10 enthält die 3' nichtkodierende Sequenz, welche 1948 Basenpaare umfasst, wohingegen Exon 1-9 lediglich 105-276 Basenpaare beinhalten. Exon 1 enthält die 5'untranslatierte Region, die Domäne für das Signalpeptid und die ersten zwei Aminosäuren des ausgereiften Proteins. Exon 2-9 kodieren für die restlichen 446 Aminosäuren, die unter anderem für die Bindung des Lipoproteinsubstrates sowie für die Kopplung des Enzyms an das kapillare Endothel verantwortlich sind (Deeb und Peng 1989). Nach Abspaltung des Signalpeptides entsteht dann das ausgereifte Protein (Wion et al. 1987).

Das LPL-Protein ist als Dimer mit einer hydrophoben Pore, die Acylketten von Triglyceriden aufnehmen kann, aktiv. Mutationen im Gen, die mit Hypertriglyceridämie assoziiert sind, befinden sich am Ende dieser Pore und können die Hydrolyse beeinflussen (Gunn und Neher 2023).

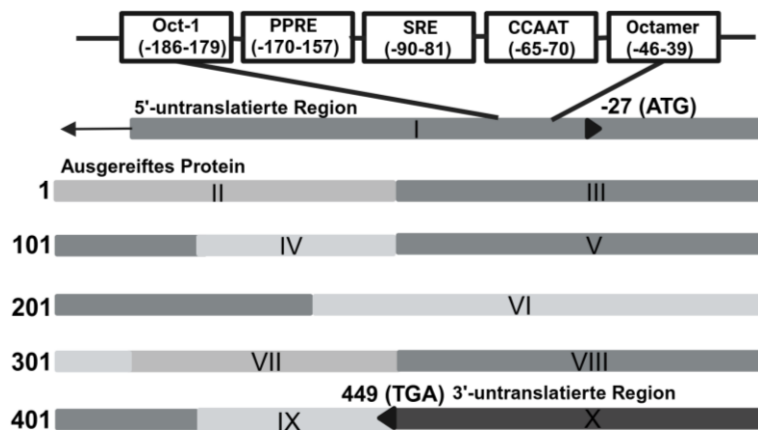


Abb. 2 Graphische Darstellung des *LPL*-Gens mit proximalen Promoterelementen. Das *LPL*-Gen besteht aus 10 Exons (I-X), mit dem Startkodon (ATG) im ersten und dem Stoppkodon (TGA) im 10. Exon. Die 5'-untranslatierte Region enthält die meisten transkriptionellen Regulationselemente, die 3'-untranslatierte Region enthält Bereiche, die für die translationale Regulation verantwortlich sind. **Oct-1**, *Organo-Kation-Transporter*; **PPRE**, *peroxisome proliferator responsive element*; **SRE**, *sterol responsive element*. Erstellt mit Biorender.com und angelehnt an Wang und Eckel (BasuRay et al. 2019; Wang und Eckel 2009).

1.4.3 Genetische Regulation von LPL

Die Regulation von LPL ist ein hochkomplexer Prozess, der sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell modifiziert wird (Li et al. 2014). Interaktive Proteine wie Apolipoproteine kontrollieren die Aktivität von LPL durch ihre aktivierende, stabilisierende oder inhibierende Wirkung (Kumari et al. 2021). Neben direkt auf die Aktivität von LPL wirkenden Proteinen sind auch indirekt wirkende Komponenten beteiligt, wie der Transkriptionsfaktor *CAMP Responsive Element Binding Protein 3-Like Protein H* (CREB-H), der die LPL regulierenden Apolipoproteine beeinflusst (Lee et al. 2011). Hormonell wird *LPL* durch Insulin, aber auch Wachstums- und Steroidhormone wie Testosteron und Estrogen reguliert (Björntorp 1997).

Die transkriptionelle Regulation von *LPL* erfolgt über regulatorische Elemente im Gen, wie beispielsweise über das PPARE in der Promoterregion des Gens. In diesem Kontext konnte unter Verwendung von PPAR-Agonisten gezeigt werden, dass es gewebespezifisch zu einer erhöhten Expression von *LPL* in Adipozyten (Schoonjans et al. 1996), sowie in der Leber und dem Dünndarm (Niho et al. 2003) kommt. Posttranskriptionell wird *LPL* durch Calcium (Zhang et al. 2005) oder Ephinephrine reguliert (Ranganathan et al. 2002). Ein

weitere posttranskriptioneller Regulationsmechanismus erfolgt über mikro (mi) RNA (Richardson et al. 2013).

1.4.4 Der rs13702 Polymorphismus im *LPL*-Gen

In einer genomweiten bioinformatischen Analyse von Richardson wurden 87 SNP untersucht, die mRNA-micro RNA (miRNA) Interaktionen verändern (Richardson et al. 2011). Unter den identifizierten SNP war auch die rs13702 Variante in der 3'UTR des *LPL*-Gens, dessen C-Allel (rs13702T>C) mit geringerem TAG-Leveln und höheren HDL-Blut-Konzentrationen in der Allgemeinbevölkerung assoziiert ist (Tang et al. 2010).

Richardson und Ko-Autoren (Richardson et al. 2013) konnten den Zusammenhang zwischen Serum Lipid-Leveln und der rs13702 Variante in einer Meta-Analyse verifizieren. Zudem konnten sie zeigen, dass die Assoziation zwischen Lipid-Leveln und der Minorvariante durch die Aufnahme von PUFA weiter gesteigert werden kann. Dies wird durch das PPRE in der Promoterregion des *LPL*-Gens ermöglicht, welches eine Regulation durch extrinsische Faktoren wie die Ernährung oder pharmakologische Agenzien ermöglicht (Xi, 2020). Funktionelle Analysen haben ergeben, dass die Anwesenheit des C-Allels zu der Zerstörung der *microRNA responsive element seed sequence* (MRESS) in der 3'UTR des LPL-Proteins führt. Dies sorgt dafür, dass die entsprechende miRNA (miR410) nicht mehr an die mRNA binden und so die Translation des LPL-Proteins inhibieren kann (Abb. 3). Als Folge kommt es dann zu einer relativen Steigerung der LPL-Level (*gain of function* Mutation). Im Falle der rs13702 T-Variante kommt es zur regulatorischen Inhibition durch die miR410, was den Effekt der PUFA auf die LPL-Expression aufhebt (Richardson et al. 2013). Die Veränderungen hinsichtlich der LPL-Spiegel können im weiteren Verlauf zu einer Beeinflussung des Lipidmetabolismus beitragen.

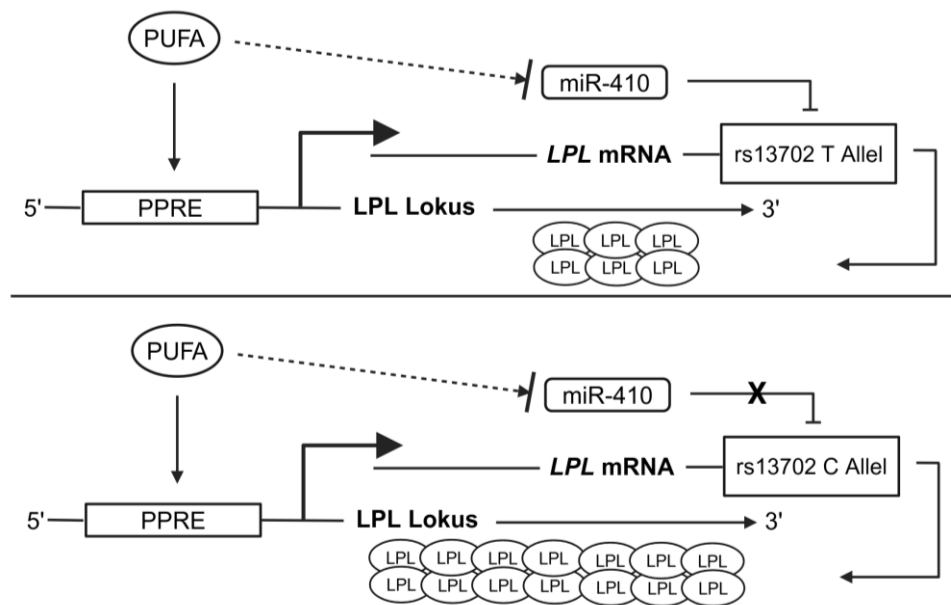


Abb. 3 Interaktion des rs13702 T-Allels und des rs13702 C-Allels im 3'UTR des *LPL*-Lokus mit der miR410. Die durchgezogenen Pfeile stellen die mithilfe von *in vitro* Assays verifizierten Interaktionen dar. Die gestrichelten Pfeile deuten die vermutete Rolle der PUFA in der Genregulation an. Erstellt mit Biorender.com und modifiziert nach Richardson und Ko-Autoren (Richardson et al. 2013).

In einer genomweiten Assoziationsstudie (Ghodsian et al. 2021) konnte das C-Allel im rs13702 Locus des *LPL*-Gens als protektiver Faktor in der MASLD Entwicklung identifiziert werden.

1.5 Bedeutung des *SAMM50*-Gens im Kontext hepato-biliärer Erkrankungen

Sorting and assembly machinery component 50 homolog (*SAMM50*) ist ein mitochondriales Protein, welches für die Assemblierung der Atmungskettenkomplexe benötigt wird (Ott et al. 2012) und in die Thermogenese von Adipozyten involviert ist (Park et al. 2022). Im Detail bildet *SAMM50*, zusammen mit den zwei peripheren Membranproteinen Metaxin 1 und 2, die *sorting and assembly machinery* (*SAM*) in der äußeren Membran der Mitochondrien. Dort ist der Komplex an der Biogenese und der Inkorporation der β -Barrel Proteine in die äußere Mitochondrienmembran sowie in die Stabilisierung des *mitochondrial contact site and cristae organizing system* (*MICOS*)-Komplex beteiligt, der für die mitochondriale Membranorganisation und den Aufbau der Atmungskomplexe benötigt wird (Abudu et al. 2021). Da Mitochondrien eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Fettlebererkrankung übernehmen, könnte auch die

genetische Variation im *SAMM50*-Gen mit der Entstehung und Pathogenese von Fettlebererkrankungen assoziiert sein (Karkucinska-Wieckowska et al. 2022).

In diesem Zusammenhang wurden das G-Allel des rs3761472 und das C-Allel des rs3827385 Polymorphismus im *SAMM50*-Gen in zwei großen Patientenkohorten als Risikofaktoren für HCC identifiziert und mit verschiedenen Datensets validiert (Wang et al. 2021b). Beide Polymorphismen beeinflussen die Bindung von Transkriptionsfaktoren, was in Anwesenheit des G- (rs3761442) beziehungsweise C-Allels (rs3827385) zu einer Steigerung der *SAMM50*-Expression in Adipozyten führt. In einer multiethnischen Kohorte konnte genetische Variation in *SAMM50* bei asiatischen, nicht jedoch in kaukasischen Patienten mit dem Auftreten einer MASLD assoziiert werden, was auf einen deutlichen Einfluss des ethnischen Hintergrunds hindeutet (Wang et al. 2021a).

1.6 Zielsetzung

Die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms wird neben externen Faktoren durch die individuelle genetische Prädisposition beeinflusst. In dieser Arbeit wurden genetische Polymorphismen und die durch sie induzierten Mechanismen untersucht, die mit dem Lipidmetabolismus und der Entstehung des HCC assoziiert sind.

Im Hauptprojekt lag der Fokus auf der Untersuchung der rs738409 Variante im *PNPLA3*-Gen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten Aufschluss über die molekularen Mechanismen geben, die bei Vorliegen der Mutation zu einem erhöhten HCC-Risiko führen. Dazu wurden Hepatomazelllinien mit der Wildtyp- (*PNPLA3*^{WT}) und 148M-Mutationsvariante (*PNPLA3*^{MUT}) des *PNPLA3*-Gens unter Verwendung der *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase 9* (CRISPR/Cas9) Methode generiert. Anschließend wurden Untersuchungen auf molekularbiologischer- und proteinchemischer Ebene durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der rs13702 Polymorphismus im *LPL*-Gen im Hinblick auf die Entwicklung einer Zirrhose oder eines HCC bei Patienten mit ALD untersucht. Dazu wurde zunächst die Häufigkeit des rs13702 C-Allels bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden der ALD ermittelt. Danach erfolgten weitere Untersuchungen zur LPL-Expression in humanen Zellen und im Gewebe. Im dritten Teilprojekt wurde der Einfluss von zwei möglichen Risikovarianten des *SAMM50*-Gens (rs3827385 und rs3761472) auf das HCC-Risiko bei vorliegender ALD untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 1 Auflistung der verwendeten Geräte, inklusive Bezugsquelle

Gerät	Bezugsquelle
Axiocam ICc 1 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss, Jena
Axiovert 200M (Lichtmikroskop)	Zeiss, Jena
BD FACS Canto II (Durchflusszytometer)	Boston Industries, Massachusetts, USA
Eppendorf Thermomixer 5436	Sigma-Aldrich, Darmstadt
EVE™ Automatic Cell Counter	NanoEntek, Seoul, Korea
GFL 3016 (Schwenker)	Profcontrol GmbH, Schönwalde-Glien
Heraeus Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Heraeus Varifuge 3.0 (Zentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen
Large Blue LED Transilluminator	IO Rodeo, Pasadena, Kalifornien
LightCycler® 96 System	Roche Diagnostics, Mannheim
ULWCD CK2 (Fluoreszenzmikroskop)	Olympus, Japan
POWER PAC 300 (Stromversorgung)	BioRad Laboratories, Feldkirchen
Power Supply Model 200/2.0 (Stromversorgung)	BioRad Laboratories, Feldkirchen
Sprout Plus Mini	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Sterilwerkbank	UnityLab Services, Dreieich
Sunrise™ Absorptionsreader	Tecan, Crailsheim
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad Laboratories, Feldkirchen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Labomedic, Bonn

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Tab. 2 Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien, inklusive Bezugsquelle und Katalognummer (K.-Nr.)

Bezeichnung	K.-Nr.	Bezugsquelle
Amoniumpersufat (APS)	248614	Sigma Aldrich®, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	A9418	Sigma Aldrich®, Darmstadt
Collagen R solution 0,4 %	47256	SERVA, Heidelberg
Fixierungs/Permeabilisierungslösung (Cytfix/Cytoperm)	554714	BD Biosciences, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	10708984001	Sigma Aldrich®, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A3672	AppliChem, Darmstadt
<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i> (DPBS)	14190144	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Ethanol	A1613	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	F7524	Sigma Aldrich, Darmstadt
Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail 100×	78438	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Hepatocyte growth supplement</i> (HGS)	5252	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA
Isopropanol	I9030	AppliChem GmbH, Darmstadt
4x Laemmli Probenpuffer	1610747B02	BioRad, Feldkirchen
LightSNiP Sonden	-	TIB Molbiol, Berlin
<i>Mounting</i> Medium	50001	Ibidi GmbH, Gräfeling
Natriumpyruvat (NaP) 100 mM	11360070	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Penicillin/Streptomycin (P/S)	P06-07050	PanBiotec™, Aidenbach
Waschpuffer (PermWash)	554723	BD Biosciences, Heidelberg
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	18912014	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Pierce™ ECL Western Blotting Substrat	32106	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Pioglitazon	71745	Cayman Chemical, Michigan, USA

Poly-L-Lysin Hydrobromid	P2636	SIGMA, Missouri, USA
Primer, <i>single strand oligodeoxynucleotide</i> (ssODN)	-	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
Puromycin	ant-pr-1	InvivoGen, Kalifornien, USA
Ripa Puffer	39244	SERVA, Heidelberg
ROTI®Load 1 4 × Konzentrat	K929.2	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	9005-64-5	Carl Roth, Karlsruhe
Vektoren	-	Vektorbuilder, Neu-Isenburg
Wasser (PCR-Grad)	755135	Kisker Biotech, Steinfurt
Wasserstoffperoxid, 30 %	8070.2	Carl Roth, Karlsruhe
Whatman™ Protran Nitrozellulose Membran	WHA10401116	Whatman GmbH, Dassel

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, inklusive Bezugsquelle

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
96-well PCR Platten	STARLAB International, Höltigbaum
CELLSTAR® TUBES (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS) Röhrchen	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Kryogefäße Cryopure	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Mikroskopiekammer, µ-Slide 8 well	Ibidi GmbH, Gräfelfing
Pasteurpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (1000, 200, 100, 10 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	SARSTEDT AG & Co.KG, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 150cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6,12,24,48,96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.4 Kits

Tab. 4 Auflistung der verwendeten Kits, inklusive Bezugsquelle

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amersham™ ECL Prime Western-Blot Detektions Reagenz	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Blue Probe qPCR Kit	Biozym, Hessisch Oldendorf
Blue S'Green qPCR Kit	Biozym, Hessisch Oldendorf
DCA-Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
ELISA MAX™ Standard Set Human CXCL-8	BioLegend, San Diego, USA
FastPure® Gel DNA Extraktionskit	Vazyme, Düsseldorf, Deutschland
GeneJET RNA Purification Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
LightSNiP (SimpleProbe) Assay	TIB-MolBiol, Berlin, Deutschland
Lipofectamin® 3000 Transfektions Kit	Invitrogen, Darmstadt
QIAamp Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit	BioRad Laboratories, Feldkirchen

2.5 Software

Tab. 5 Auflistung der verwendeten Software, inklusive Entwickler

Software	Entwickler
Benchling: Life Sciences R&D Cloud	San Francisco, USA
BioRender Premium	Toronto, Kanada
FlowJo™ Software Version 10.7.1	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism Version 9.0.0	GraphPad Software, Boston, USA
ImageLab Software, Version 6.1	BioRad, Feldkirchen
LightCycler®96 Software	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
IBM SPSS Statistics Software 24	IBM, New York, USA
Zeiss Efficient Navigation (ZEN)	Carl Zeiss AG, Oberkochen

2.6 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tab. 6 Auflistung der verwendeten Zellen und Zellkulturmedien, inklusive Bezugsquelle und K.-Nr.

Zelllinie/Medium	K.-Nr.	Bezugsquelle
HepG2	300198	Cytion, Berlin
Huh-7	300156	Cytion, Berlin
PLC/PRF/5	ATCC-CRL-8024	LGC Standards GmbH, Wesel
Primäre Hepatozyten	#5200	ScienCell Reseach Laboratories, Carlsbad, USA
LSEC	#5000	ScienCell Reseach Laboratories, Carlsbad, USA
LX-2	305039	Cytion, Berlin
Primäre HSC	#5300	ScienCell Reseach Laboratories, Carlsbad, USA
DMEM 0/5/25 mM Glucose	11966025/31600083/ 11965092	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Hepatozyten-Medium	#5201	ScienCell Reseach Laboratories, Carlsbad, USA
HSC-Spezialmedium	MCST250	Lonza, Köln
OptiMEM	10149832	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2.7 Patientenmaterial

Zur Untersuchung der *LPL*- und der *SAMM50*-Polymorphismen wurden verschiedene Patientenkohorten mit Alkohol-assoziiierter Leberzirrhose, darunter auch Patienten mit HCC, gesunde Individuen, alkoholabhängige Menschen ohne Lebererkrankung und Patienten mit chronischer Virushepatitis C mit und ohne HCC verwendet. Die klinischen Daten und Blutproben wurden am Universitätsklinikum Bonn und der Abteilung für Hepatologie und Gastroenterologie Berlin, sowie in der Abteilung für Hepatologie des Universitätsklinikums Leipzig gesammelt und analysiert.

Patienten wurden als alkoholabhängig ohne Leberschädigung klassifiziert, wenn mindestens 60 g Alkohol pro Tag (Frauen) beziehungsweise 80 g Alkohol pro Tag (Männer) über einen Zeitraum von mindestens 10 Jahren konsumiert wurden, ohne dass Leberschädigungen aufgetreten sind. Als gesunde Kontrollen dienten Individuen ohne klinische oder laborchemische Anzeichen einer Lebererkrankung, deren Material aus

Blutspenden oder Krebsvorsorgeuntersuchungen erhalten wurde. Die Diagnose der Zirrhose erfolgte durch eine Leberbiopsie oder durch das klinische Erscheinungsbild, unterstützt durch Labor- und Bildgebungsbefunde. Demographische, sowie Labor- und klinische Daten wie Geschlecht, Alter und Ätiologie der Zirrhose wurden ebenfalls dokumentiert. Patienten wurden der Gruppe der Alkohol-assoziierten Zirrhose zugeordnet, wenn die Menge an konsumierten Alkohol 300 g pro Woche überschritt und andere Gründe für eine Zirrhose wie eine HBV-, HCV-Infektion oder Hämochromatose ausgeschlossen werden konnten. Die Diagnose des HCC erfolgte nach internationalen Leitlinien (EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma 2012).

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurden Gewebeproben von Patienten mit einer ALD-Zirrhose und von Patienten mit viraler Infektion mit und ohne HCC verwendet. Zusätzlich dazu wurde tumorfreies Lebergewebe analysiert, welches durch operative Resektion von Lebermetastasen oder Lebertransplantationen erhalten wurde. Alle Patienten der Studie waren kaukasischer Ethnizität.

Das Studienprotokoll entsprach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki und wurde von den örtlichen Ethikkommissionen genehmigt (Bonn: Nummer 536/20; Leipzig: Nummer 357/19-ek). Vor der Teilnahme an dieser Studie wurde die schriftliche Einwilligung der Teilnehmer eingeholt.

2.8 Zellkultivierung

Für die Untersuchung des *PNPLA3*-Polymorphismus wurden zwei immortalisierte, kommerziell erhältliche, hepatozelluläre Zelllinien (HepG2, PLC/PRF/5) verwendet. Die Zellen wurden ursprünglich jeweils aus der Leber eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom isoliert und anschließend als *in vitro* Modell für die Leberkrebsforschung etabliert (Puttahanumantharayappa et al. 2021). Für die Untersuchung des *LPL*-Polymorphismus kamen neben der PLC/PRF/5 Zelllinie primäre Hepatozyten, primäre HSC und die aus primären HSC immortalisierte Zelllinie LX-2, sowie primäre LSEC zum Einsatz (Tab. 6).

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert, indem sie zunächst abgelöst und anschließend ein Teil davon in eine neue Zellkulturflasche (75 cm²) überführt wurde. Für die Umsetzung der hepatozellulären Zelllinien sowie der LX-2 Zelllinie wurden die Zellen

einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die adhärennten Zellen von dem Boden der Flasche zu lösen. Nach Ablösung der Zellen wurden das Trypsin durch Hinzugabe von 6 ml Zellkulturmedium neutralisiert und die Zellen für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 3 ml frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl mithilfe des Zellzählgerätes ermittelt. Die entsprechende Zellzahl wurde im Anschluss in 10 ml des jeweiligen Zellkulturmediums, inklusive aller Zusätze, aufgenommen (Tab. 7) und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die primären Hepatozyten wurden analog zu den hepatozellulären Zelllinien in ihrem entsprechenden Zellkulturmedium (Tab. 7) kultiviert, wobei die Zellen für eine verbesserte Adhärenz in zuvor mit 0,02 % Kollagen beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät wurden. Für die Kultivierung der primären HSC wurden die Flaschen ebenfalls beschichtet, wobei 10 µg/ml Poly-D-Lysin verwendet wurde. Die Zellen wurden außerdem anstatt mit PBS einmal mit 1x*Dulbecco's Balanced Salt Solution* (DPBS) gewaschen, bevor sie mit 1:10 in 1xDPBS verdünntem Trypsin abgelöst wurden. Im Anschluss an die Trypsinierung wurde die Reaktion mit 5 ml fötalem Kälberserum (FCS) und 10 ml Zellkulturmedium abgestoppt und nach erfolgter Zentrifugation die entsprechende Zellzahl (Tab. 7) in die mit Poly-D-Lysin beschichteten Flaschen ausgesät.

Tab. 7 Auflistung der für die Kultivierung verwendeten Zelllinien, der benötigten Zellzahl für eine 75cm² Zellkulturflasche sowie der benötigten Medien, inklusive Zusätze

Zelllinie	Zellzahl (für 75cm² Zellkulturflasche)	Medium	Zusätze
PLC/PRF/5	0,7x10 ⁶	DMEM 5mM	10 % FCS, 1 % P/S
HepG2	1,5x10 ⁶	DMEM 5mM	10 % FCS, 1 % P/S
LX-2	1,3x10 ⁶	DMEM 5mM	2 % FCS, 1 % P/S
Primäre Hepatozyten	1x10 ⁶	Hepatozyten-Medium	5 % FCS, 1 % HGS, 1 % P/S
Primäre HSC	0,375x10 ⁶	HSC-Spezialmedium	-

2.9 Zellaussaat und Stimulation

Die Aussaat der Zellen in Zellkulturplatten für die nachfolgenden Experimente erfolgte analog zur Kultivierung, wobei zunächst die Zellzahl ermittelt und das Pellet mit der gewünschten Anzahl an Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Zellen in die Kavitäten der Zellkulturplatten überführt. Während der anschließenden 24-stündigen Inkubationsphase wurden die Zellen erneut adhärent und konnten im Anschluss für nachfolgende Versuche eingesetzt werden. Die benötigte Zellzahl und die entsprechende Zellkulturplatte war dabei abhängig von der Zelllinie, sowie dem durchgeführten Versuch (Abschnitt 2.10, 2.13, 2.15, 2.16, 2.17).

Für die Untersuchung des *PNPLA3*-Polymorphismus erfolgte im Anschluss an die Zellaussaat zunächst eine 24-stündige Hungerphase, in welcher die Hepatoma Zelllinien PLC/PRF/5 und HepG2 ohne Glucose (0 mM) und mit wenig FCS (1 %) kultiviert wurden. Danach wurden die Zellen entsprechend dem jeweiligen Versuch für einen spezifischen Zeitraum stimuliert (Abschnitt 2.13, 2.15, 2.17). Die Stimuli wurden dafür in Zellkulturmedium mit erhöhtem Glucose-Gehalt (25 mM) verdünnt und anschließend zu den Zellen gegeben. Die LX-2 Zelllinie für die Untersuchung der *LPL* rs13702 Variante wurde am Folgetag der Zellaussaat direkt stimuliert. Die Stimulation erfolgte hierbei in Zellkulturmedium mit 5 mM Glucose-Gehalt. Im Anschluss an die jeweiligen Inkubationszeiten konnten die Versuche durchgeführt werden.

2.10 Geneditierung mittels CRISPR/Cas9

2.10.1 Konzeption und Herstellung der benötigten Reagenzien

Für die Geneditierung der Hepatoma Zelllinien wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet, welches speziell für das Einbringen der *PNPLA3*-148I-Variante in HepG2 und der *PNPLA3*-148M-Variante in die PLC/PRF/5 Zellen angepasst wurde. Das für die Arbeit verwendete System bestand aus einem CRISPR/Cas9-Plasmid, welches neben der Cas9, die spezifisch einen Doppelstrangbruch induziert, eine 20 Basenpaar lange spezifische *guide RNA* (gRNA) enthielt, die für die Erkennung und Bindung der Ziel-DNA essenziell ist.

Für die Arbeit wurden insgesamt zwei Plasmide eingesetzt, die sich anhand der gRNA unterscheiden. Ein Vektor enthielt eine gRNA, die auf die Sequenz der PLC/PRF/5 Zellen

abgestimmt ist (*PNPLA3-I148M* gRNA, Tab. 8), während der andere Vektor eine gRNA für die HepG2 Zellen enthalten hat (*PNPLA3-M148I* gRNA, Tab. 8). Darüber hinaus war das Plasmid mit weiteren Elementen ausgestattet, die für die Stabilisierung und die Expression in der Zelle verantwortlich sind. Dazu zählten beispielsweise ein U6 Promoter für die gRNA-Expression und ein Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI), um die Replikation zu ermöglichen. Des Weiteren befand sich ein Fluoreszenzmarker (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP) zur Visualisierung sowie ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektionierung auf dem Plasmid.

Tab. 8 Für das CRISPR/Cas9-System benötigte Sequenzen des ssODN und der gRNA

Bezeichnung	Sequenz (3'-5')
<i>PNPLA3-I148M</i> , gRNA	GAAGATGTCACCGGAATAGG
<i>PNPLA3-M148I</i> , gRNA	ACTGTAGAAGGGCATGAAGC
<i>PNPLA3-I148M</i> , ssODN	AAGGATCAGGAAAATTTAAAGGGTGCTCTCGCCTATAACTTCTCTCTCCTTTG CTTTCACAGGCCTTGGTATGTTCTGCTTCATGCCCTTCTACAGTGGCCTTAT CCCTCCTTCCTTCAGAGGCGT
<i>PNPLA3-M148I</i> , ssODN	AAAGCTTATGAAGGATCAGGAAAATTTAAAGGGTGCTCTCGCCTATAACTTCT CTCTCCTTTGCTTTCACAGGCCTTGGTATGTTCTGCTTCATCCCCTTCTACA GTGGCCTTATCCCTCCTTCCT

Neben den Plasmiden wurden 127 Basenpaare lange Oligonukleotide (*single strand Oligodeoxynucleotide*, ssODN) konzipiert, die aus einem zentralen Teil mit der gewünschten *PNPLA3* Variante (*PNPLA3-I148M* für PLC/PRF/5 beziehungsweise *PNPLA3-M148I* für HepG2), sowie flankierenden Sequenzen für die homologe Rekombination bestehen. Die jeweiligen Sequenzen sind Tab. 8 zu entnehmen.

Die 148I/148M Variante liegt auf Exon 3 im *PNPLA3*-Gen, welches insgesamt aus neun Exons besteht (Abb. 4 A). Im Verlauf der Geneditierung mittels CRISPR/Cas9 kommt es zunächst durch die Transfektion (Abschnitt 2.10.2) zu der Aufnahme des Plasmids und des ssODN, gefolgt von der Expression und der Bildung eines gRNA-Cas9 Komplexes. Im Falle der PLC/PRF/5 Zellen führt anschließend die komplementäre Basenpaarung der *PNPLA3-I148M* gRNA (Abb. 4 B, grün markiert) an ihre Zielsequenz auf dem 3'5' Strang

und die Anwesenheit der *protospacer adjacent motif* (PAM) Sequenz auf dem 5'3' Strang (blau markiert) drei Basenpaare von der PAM-Sequenz entfernt zur Induktion eines spezifischen Doppelstrangbruches durch die Cas9. Dies ermöglicht die Bindung des spezifischen *PNPLA3*-I148M ssODN (in rot dargestellt) mit der enthaltenen Punktmutation (G anstatt C), die dann zum Aminosäureaustausch von Ile zu Met an Position 148 führt (Abb. 4 B, C). Durch die Nukleotidsubstitution kommt es auch zu einer Zerstörung der PAM-Sequenz, was einen erneuten Doppelstrangbruch durch die Cas9 verhindert.

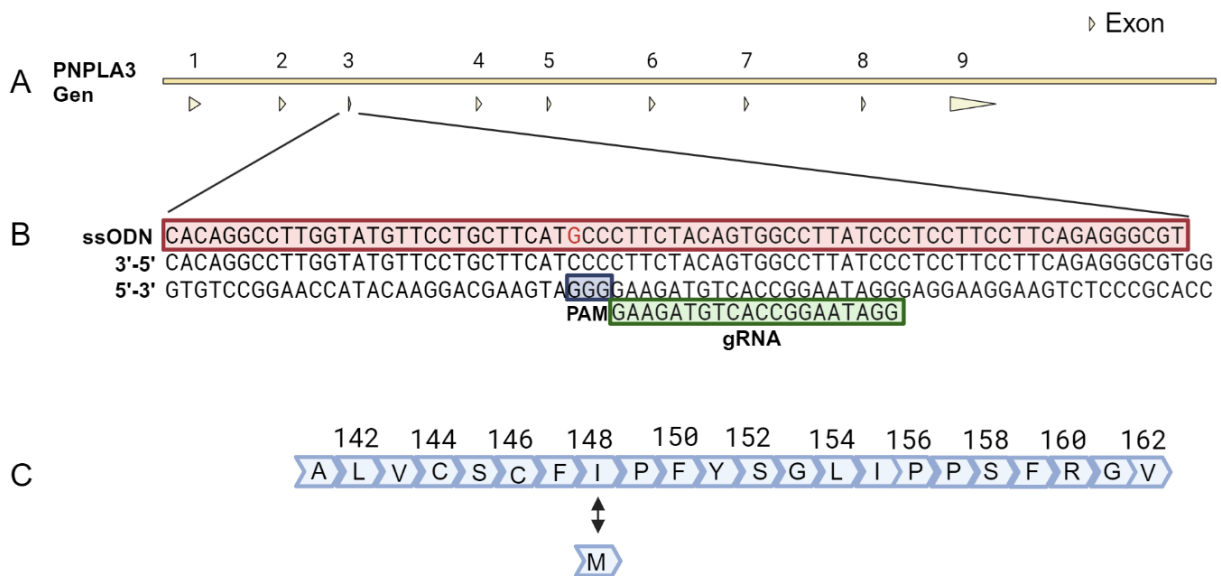


Abb. 4 Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Designs, inklusive gRNA, ssODN und PAM-Sequenz am Beispiel der PLC/PRF/5 Zellen (*PNPLA3*-I148M). (A) *PNPLA3*-Gen, bestehend aus neun Exons. (B) Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des *PNPLA3*-Doppelstranges in Exon 3, einschließlich dazugehöriger PAM-Sequenz (blau) auf dem 5'-3' Strang. Darstellung des eingesetzten ssODN (rot) inklusive der Punktmutation, sowie der zum 3'-5' Strang komplementären gRNA (grün). (C) Aminosäuresequenz des *PNPLA3*-Proteins mit Darstellung der Substitution an Position 148 (Ile zu Met).

In HepG2 Zellen kommt es analog dazu mithilfe der spezifischen gRNA (*PNPLA3*-M148I) zur Induktion eines Doppelstrangbruches durch Cas9, gefolgt von der Bindung des Oligonukleotides (*PNPLA3*-M148I). Dies resultiert dann in einem Aminosäureaustausch von Met zu Ile an Position 148 (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu den PLC/PRF/5 Zellen führt die Nukleotidsubstitution in diesem Fall nicht automatisch zu der Zerstörung einer PAM-Sequenz, da eine abweichende Nukleotidfolge vorliegt. Aus diesem Grund enthält das für die HepG2 verwendete

Oligonukleotid eine zusätzliche Punktmutation, welche die am nächsten gelegene PAM-Sequenz auflöst. Dies resultiert in einer stummen Mutation, die auch den Sequenzierungsdaten der HepG2 Zellen zu entnehmen ist (Ergebnisteil, Abschnitt 3.1.1.). Die Auswahl geeigneter Vektoren und die Erstellung spezifischer gRNA und Oligonukleotide erfolgte am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Uniklinikum Bonn in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Vitamin K-Zyklus“ unter Leitung von Dr. rer. nat. Katrin Czogalla-Nitsche. Im Anschluss an die Konzeption der CRISPR-Plasmide mithilfe des Programmes *Benchling: Life Sciences R&D Cloud* wurden die Vektoren von der Firma *Vektorbuilder* und die Oligonukleotide von der Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT) bestellt.

Das erhaltene CRISPR-Plasmid wurde in Vorbereitung auf die Transfektion mithilfe des QIAGEN® Plasmid Midi Kits nach Versuchsprotokoll vervielfältigt und hatte im Anschluss daran eine Konzentration von 500 ng/µl.

2.10.2 Transfektion mittels CRISPR/Cas9

Die Transfektion erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 3000 in 24-well Platten. Dafür wurden 100,000 Zellen (HepG2) beziehungsweise 40,000 Zellen (PLC/PRF/5) einen Tag vor Versuchsbeginn in antibiotikafreiem Zellkulturmedium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die Vorbereitung der Transfektionsreagenzien, gefolgt von einer 12-minütigen Inkubationszeit zur Bildung der Transfektionskomplexe. Anschließend erfolgte die Hinzugabe der aus dem Transfektionsreagenz und der zu transportierenden DNA (Plasmid/ssODN) bestehenden Komplexe für die anschließende Transfektion der Zellen (Tab. 9).

Tab. 9 Reaktionsprotokoll für die Transfektion mit Lipofectamin 3000 (Angabe pro well)

Versuchsablauf	Benötigte Reagenzien und Schritte	
Vorbereitung der Transfektionsreagenzien	Eppendorf Gefäß 1: 25 µl OptiMEM 1 µl I148M/M148I ssODN (100 nM) 0,75 µl Lipofectamin 3000 Inkubation 5 Minuten RT	Eppendorf Gefäß 2: 25 µl OptiMEM 1 µl I148M/M148I Plasmid (500 ng) 1 µl Lipofectamin 3000 Reagenz Inkubation 5 Minuten RT
Bildung der Transfektionskomplexe	Eppendorf Gefäß 1 und 2 mischen Inkubation 12 Minuten RT	
Hinzugabe der DNA/Lipidkomplexe zu den Zellen	53,75 µl/well tröpfchenweise hinzugeben	

Im Anschluss an die 24-stündige Transfektion wurde zunächst die Zell-Viabilität und Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach Abnahme des Transfektionsmediums wurden die Zellen mithilfe 5 µg/ml Puromycin für 48 Stunden hinsichtlich des Puromycinresistenz-vermittelnden CRISPR-Plasmides selektiert. Danach erfolgte eine dreitägige Ruhephase, in der die Zellen im normalen Zellkulturmedium kultiviert wurden. Anschließend erfolgte die Aussaat von Einzelzellen mittels *limiting dilution* in 96-well Platten. Die Einzelzellen wurden für zwei bis drei Wochen in den 96-well Platten kultiviert, wobei ein- bis zweimal die Woche ein Mediumswechsel erfolgte. Nach Erreichen einer 80-90 %-igen Konfluenz wurden die Zellklone abgelöst und zunächst in eine 24-well Platte, später in eine 6-well Platte übertragen. Während der Umsetzung wurden Zellen für eine DNA-Isolation entnommen, um den Genotyp zu ermitteln.

2.11 DNA-Isolation und Genotypisierung

Die Isolation von DNA erfolgte zum einen mit Zellen aus der laufenden Kultivierung (PLC/PRF/5, HepG2) und zum anderen mit kryokonservierten Zellen (Huh-7). Der Versuch wurde zunächst mithilfe des QIAamp Blood Mini Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Anschluss wurde der Genotyp mittels Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung eines LightSNiP (SimpleProbe) Assays bestimmt. Dabei wurde 1 µl der zu untersuchenden DNA mit den jeweiligen für die PCR benötigten Reagenzien (Tab. 10) gemischt und anschließend die Schmelzkurvenanalyse mittels Echtzeit-PCR auf dem LightCycler-System nach entsprechendem Versuchsprotokoll durchgeführt.

Tab. 10 Für die Genotypisierung eingesetzte Reagenzien, inklusive Volumenangabe. Die Volumina für den Reaktionsmix beziehen sich auf eine zu untersuchende Probe.

Reagenz	Volumen in µl
BlueProbe Mastermix	2,5
Wasser (PCR-Grad)	1,3
LightSNiP Sonde	0,2
DNA-Probe	1

Die Bestimmung des Genotyps wird durch die fluoreszenzmarkierte Sonde ermöglicht, deren Fluoreszenz durch Bindung an ihre jeweilige Zielsequenz gesteigert wird. Punktmutationen in der Zielsequenz können die Bindung der Sonde schwächen, was zu einer geringeren Schmelztemperatur führt. Die durch den Schmelzvorgang veränderte Fluoreszenzintensität kann mittels LightCycler System detektiert werden, was über die jeweilige Schmelztemperatur Aufschluss über den Genotyp gibt. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Sonden eingesetzt, die jeweils spezifische Schmelztemperaturen für die Allele des untersuchten Gens aufweisen (Tab. 11) und somit eine Unterscheidung der Genotypen ermöglichen.

Tab. 11 Verwendete Light SNiP Sonden mit spezifischen Schmelztemperaturen für die jeweiligen Allele

Bezeichnung	Schmelztemperatur 1 mit zugehörigem Allel	Schmelztemperatur 2 mit zugehörigem Allel
<i>PNPLA3</i> rs738409 (I148M)	46 °C (C-Allel)	57 °C (G-Allel)
<i>SAMM50</i> rs3827385	58 °C (T-Allel)	64 °C (C-Allel)
<i>SAMM50</i> rs3761472	60 °C (A-Allel)	67 °C (G-Allel)
<i>LPL</i> rs13702	53 °C (T-Allel)	60 °C (C-Allel)

2.12 Sequenzierung

Für die Sequenzierung im Anschluss an die Genotypisierung wurde 1 µl der Proben-DNA mit den für die Sequenzierung benötigten Primern (Tab. 12) und Reagenzien für die quantitative PCR (Tab. 13) inkubiert und in eine 96-well PCR-Platte aufgetragen, um das gewünschte Genprodukt zu amplifizieren.

Tab. 12 Für die Sequenzierungs-PCR verwendete Primer, inklusive dazugehöriger Sequenzen und Länge des amplifizierten Fragments.

Primerbezeichnung	Sequenz	Länge in bp
<i>PNPLA3</i> , vorwärts	5'-AGTTCCCCGTTCTTTTGACCCA-3'	236
<i>PNPLA3</i> , rückwärts	5'CTGCAGGCAGGAGATGTCTGAG-3'	236

Tab. 13 Für die quantitative PCR eingesetzte Reagenzien, mit Volumenangabe. Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf eine zu untersuchende Probe.

Reagenz	Volumen in µl
Wasser (PCR-Grad)	3
Primer vorwärts/rückwärts 5 µM	jeweils 0,5
Blue S'Green Mastermix	5
DNA-Probe	1

Im Anschluss an die PCR wurde das Produkt in die Taschen eines zuvor angefertigtem 1,6 %-igen Agarose-Gels (Tab. 14) aufgetragen und nach einer Laufzeit von 40 Minuten bei 100 V die entstandene Bande mithilfe eines Blaulicht-Transilluminators lokalisiert. Diese wurde mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und die DNA mithilfe des FastPure® Gel DNA Extraktionskits aufgereinigt. 72 ng DNA wurden anschließend mit 4 µM des *PNPLA3* rückwärts Primers inkubiert und zur Sequenzierung an die Firma *Microsynth AG* übergeben. Die Auswertung im Anschluss erfolgte mithilfe des Programmes *A Plasmid Editor* (ApE).

Tab. 14 Bestandteile des 1,6 %-igen Agarose-Gels, inklusive eingesetzter Menge und Bezugsquelle

Bestandteil	Menge	Bezugsquelle
UltraPure™ Agarose	0,8 g	Invitrogen, Darmstadt
1x TAE-Puffer (aus 50x TAE-Puffer)	50 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt AppliChem, Darmstadt
50x TAE-Puffer, bestehend aus	121 g	
Tris-Base	28,55 ml	
Eisessig	50 ml	
0,5 M EDTA pH 8,0	a.u. 500 ml	
H ₂ O		
SYBR™ Safe DNA Farbstoff	0,5 µl	Invitrogen, Darmstadt

2.13 Untersuchung der Genexpression

Für die Untersuchung der Genexpression in Hepatoma Zelllinien wurden 15,000 (PLC/PRF/5) beziehungsweise 32,000 (HepG2) Zellen in eine 48-well Platte ausgesät. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Hungerphase, gefolgt von einer ebenso langen Stimulation (Abschnitt 2.9) mit 10 % FCS in 25 mM Zellkulturmedium. Im Anschluss daran erfolgten eine RNA-Isolation und komplementäre DNA (cDNA)-Synthese. Im Falle der LX-2 Zellen wurden 76,000 Zellen in eine 24-well Platte ausgesät, am Folgetag mit 10 µM Pioglitazon in 5 mM Zellkulturmedium stimuliert und nach 24 Stunden hinsichtlich ihrer mRNA-Expression untersucht.

2.13.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Für die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte am Versuchstag zunächst die Lyse der Zellen, gefolgt von der RNA-Isolation und der cDNA-Synthese. Die Versuche erfolgten mithilfe des *GeneJET RNA Purification Kits* und des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* laut Herstellerangaben.

2.13.2 qPCR

Für die anschließende qPCR wurde jeweils 1 µl der Probe abhängig vom nachzuweisenden Gen mit den jeweiligen Primern (Tab. 15), sowie weiteren für die qPCR benötigten Reagenzien inkubiert (Tab. 13). Anschließend erfolgte die Amplifizierung der gewünschten Genprodukte mit dem LightCycler System nach Reaktionsprotokoll.

Tab. 15 Auflistung der verwendeten Primer für die qPCR, inklusive Sequenzangabe und Länge

Primer	Sequenz	Länge in bp
<i>LPL</i> , vorwärts	5'-CTG CTG GCA TTG CAG GAA GTC T-3'	114
<i>LPL</i> , rückwärts	5'-CAT CAG GAG AAA GAC GAC TCG G-3'	114
<i>Nox1</i> , vorwärts	5'-GGT TTT ACC GCT CCC AGC AGA A-3'	102
<i>Nox1</i> , rückwärts	5'-CTT CCA TGC TGA AGC CAC GCT T-3'	102
<i>Nox2</i> , vorwärts	5'-CTC TGA ACT TGG AGA CAG GCA AA-3'	132
<i>Nox2</i> , rückwärts	5'-CAC AGC GTG ATG ACA ACT CCA G-3'	132
<i>Nox3</i> , vorwärts	5'-ACA CCC CTA ACG AGA GCT ACC-3'	87
<i>Nox3</i> , rückwärts	5'-TGA CGC CTG CTA TTG TCC TTA-3'	87
<i>RPL19</i> , vorwärts	5'-TGG GCA TAG GTA AGC GGA-3'	223
<i>RPL19</i> , rückwärts	5'-GCC TTG TCT GCC TTC AGC-5'	223

2.14 Western Blot

2.14.1 Gewinnung von Zelllysaten

Für die Western Blot Analyse wurden sowohl Zelllinien (PLC/PRF/5 Zellen, Primäre Hepatozyten, HSC, LX-2, LSEC) als auch Lebergewebeproben verwendet. Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden circa 1×10^6 Zellen mit Trypsin gelöst, herunterzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen, gefolgt von einer 5-minütigen Zentrifugation bei 10,000 rpm. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 50 μ l RIPA Lysepuffer, versetzt mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail, aufgenommen und für die restliche Versuchsdauer auf Eis gelagert. Die auf Eis gekühlten Proben wurden zunächst für 20 Minuten unter Schütteln (circa 400 rpm) inkubiert und anschließend für 10 Sekunden mit 20-50 kHz Ultraschall behandelt, um die Zellen vollständig zu lysieren. Nach der Homogenisation erfolgte zunächst ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4 °C und 13,000 rpm. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, wobei ein Teil für die Proteinbestimmung verwendet und die restliche Probe für die Gelelektrophorese vorbereitet wurde. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit Wasser verdünnt (1:8; 1:16; 1:32) und der Versuch mit dem DC-Protein Assay Kit laut Herstellerangaben durchgeführt.

Die Probenvorbereitung erfolgte anschließend durch die Zugabe eines 4x Laemmli-Probenpuffers, welcher dafür sorgt, dass das Protein in seine Primärstruktur überführt wird. Die Proben wurden dafür auf eine Konzentration von 6 µg/µl eingestellt und dann 3:1 mit dem Gemisch versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss für 5 Minuten bei 11,000 rpm zentrifugiert. Die vorbereiteten Proben konnten dann direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder für spätere Versuche bei -20 °C gelagert werden.

2.14.2 Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Proteinbestimmung wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Dafür wurden die Gele zunächst mithilfe des *TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kits* laut Herstellerangaben hergestellt. Ammoniumpersulfat (APS) wurde für die Herstellung des Trenn- und Sammelgels für jeden Versuch frisch angesetzt. Für die anschließende Gelelektrophorese wurden 30 µg (pro Zelllinie) beziehungsweise 20 µg (Lebergewebe) Protein pro Probe in die Taschen der Gelelektrophoresekammer aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief zunächst bei einer Spannung von 150 V, bis die Proben vom Sammelgel ins Trenngel übergelaufen waren. Im Anschluss wurde die Elektrophorese bei 200 V fortgesetzt, bis die Bromphenolblaubande in den Proben das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.14.3 Transfer der Proteine und Immunologische Detektion

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die im Trenngel befindlichen Proteine mittels *Semidry* Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dafür wurde eine Abfolge aus einer Lage mit Transferpuffer getränktem Filterpapier, einer ebenfalls mit Transferpuffer äquilibrierten Nitrocellulose-Membran, des Trenngels und einer weiteren mit Puffer getränkten Lage Filterpapier zwischen zwei Plattenelektroden platziert. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 25 V wurden die Proteine dann innerhalb einer Stunde auf die Membran übertragen. Danach wurden die Membranen entnommen und für 30 Minuten in 3 % Bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS mit 0,1 % Tween 20 (PBS-T) unter ständigem Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Im Anschluss an das Blocken wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten in 10 ml PBS-T gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenker mit den entsprechenden Antikörpern (1:500 in 3 %-iger BSA-Lösung) inkubiert (Tab. 16).

Tab. 16 Auflistung der verwendeten Primärantikörper für den Western Blot, inklusive Antigenität, K.-Nr. und Bezugsquelle

Antikörper	Antigenität	K.-Nr.	Bezugsquelle
LPL-Antikörper, Klon ID: OTI2C12	Monoklonal	TA503783S	OriGene Technologies, Rockville, USA
Humaner LPL-Antikörper	Polyklonal	AF7197-SP	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper	Monoklonal	Sc-47724	Santa Cruz, Heidelberg

Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal in PBS-T gewaschen, um noch ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit den in 3 % BSA gelösten *horseradish peroxidase* (HRP) konjugierten Sekundärantikörpern (Anti-Maus Immunglobulin G (IgG) 1:10,000; Anti-Ziege IgG 1:5,000) auf dem Schwenker bei Raumtemperatur (Tab. 17).

Tab. 17 Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper für den Western Blot, inklusive zugehörigen Primärantikörpern, K.-Nr. und Bezugsquelle

Sekundärantikörper	Dazugehöriger Primärantikörper	K.-Nr.	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG, polyklonal	GADPH und monoklonaler LPL- Antikörper	A9044	Merck, Darmstadt
Anti-Ziege IgG, polyklonal	Polyklonaler LPL- Antikörper	Sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran mit dem Luminol-basierten HRP Substrat ECL benetzt und auf dem Imaging System platziert. Nach etwa einer Minute konnten die Proteine durch die nachfolgende Chemilumineszenzreaktion visualisiert werden.

2.15 Durchflusszytometrische Analyse

2.15.1 Antikörper-basierte Detektion intrazellulärer Proteine

Für die intrazelluläre Färbung verschiedener Proteine mit Antikörpern wurden 15,000 Zellen (PLC/PRF/5) beziehungsweise 32,000 Zellen (HepG2) zunächst in 48-well Platten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte die 24-stündige Inkubation mit dem Hungermedium, gefolgt von der Stimulation der Zellen mit 10 % FCS in 25 mM Zellkulturmedium für weitere 24 Stunden. Am Versuchstag wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten in Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt, bei 1000 rpm für 5 Minuten herunterzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit 150 µl Fixierungs/Permeabilisierungslösung für 20 Minuten im Kühlschrank, gefolgt von einem einmaligen Waschriff mit 1x Waschpuffer. Unspezifische Bindungsstellen wurden danach mit 450 µl Blockierungslösung (0,5 % BSA in 1x Waschpuffer) für 45 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach erfolgte nach einem einmaligen Waschriff die Hinzugabe des jeweiligen Primär- beziehungsweise gekoppelten Antikörpers (Tab. 18). Diese wurden 1:200 (Nox 1-3, PNPLA3, 4-HNE und Isotypkontrolle) beziehungsweise 1:100 (OGG-1) in Blockierungslösung verdünnt und 50 µl der Antikörperlösung in die Röhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit zwischen 45-60 Minuten konnten die Proben bei Verwendung der gekoppelten Antikörper (4-HNE und Isotypkontrolle, Nox-2, OGG-1) nach einem zweimaligen Waschriff im Durchflusszytometer gemessen werden.

Für die ungekoppelten Primärantikörper (Nox-1, Nox-3, PNPLA3) erfolgte nach einem einmaligen Waschriff die Inkubation mit dem 1:500 in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörper (Tab. 19). Nach einer anschließenden Inkubationsdauer von 45 Minuten und einem zweimaligen Waschriff wurde dann die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

Tab. 18 Eingesetzte Primär- und gekoppelte Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich der Antigenität, K.-Nr. und Bezugsquelle

Bezeichnung	Antigenität	K.-Nr.	Bezugsquelle
4-Hydroxynonenal Antikörper, Alexa Fluor® 647 gekoppelt	Polyklonal	bs-6313R	Bioss Antibodies, Heidelberg
IgG Isotypkontrolle, Alexa Fluor® 647 gekoppelt	Polyklonal	400418	Bioss Antibodies, Heidelberg
CYBB/Nox-2, Alexa Fluor® 647 gekoppelt	Monoklonal	NBP1-41012	Novus Biologicals, Colorado, USA
OGG-1 Antikörper, Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelt	Polyklonal	abx146022	Abnova Ltd, Babenhausen
Nox-1	Polyklonal	NBP1-31546	Novus Biologicals, Colorado, USA
Nox-3	Polyklonal	LS-C384945	LifeSpan BioSciences, Washington, USA
PNPLA3-Antikörper	Polyklonal	ab81874	Abcam, München

Tab. 19 Eingesetzter Sekundärantikörper für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich K.-Nr. und Bezugsquelle

Bezeichnung	K.-Nr.	Bezugsquelle
Donkey pAb to Rb IgG, Alexa Fluor® 647	ab181347	Abcam, Amsterdam, Niederlande

2.15.2 Nachweis der Lipidakkumulation und der ROS-Bildung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die durchflusszytometrische Messung der Triglyceridakkumulation und der ROS-Sekretion mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe *NileRed* und Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA) wurden 15,000 PLC/PRF/5 und 32,000 HepG2 Zellen (*NileRed*-Assay) beziehungsweise 20,000 PLC/PRF/5 und 41,000 HepG2 Zellen (DCFDA-Assay) in 48-well Platten ausgesät.

Anschließend erfolgte, analog wie zuvor, die 24-stündige Hungerphase. Für den *NileRed*-Assay wurden die Zellen anschließend für weitere 24 Stunden mit verschiedenen Reagenzien stimuliert (Tab. 20).

Tab. 20 Eingesetzte Stimuli für den *NileRed*- und DCFDA-Assay, inklusive eingesetzter Endkonzentration, K.-Nr. und Bezugsquelle

Assay	Stimulus	Konzentration	K.-Nr.	Bezugsquelle
<i>NileRed</i>	FCS	10 %	F7524	Sigma Aldrich, Darmstadt
	Humanes Serum Albumin (HSA)	4 %	-	Prothya, Amsterdam, Niederlande
DCFDA	tert-Butylhydroperoxid (tBHP)	250 µM	ab113851	Abcam, München
	Arachidonsäure (AA)	200 µM	10006607	Cayman Chemical, Michigan, USA
	N-Acetyl Cystein (NAC)	5 mM	160280250	ThermoFisher, Dreieich

Am Versuchstag wurden die Zellen aus der Zellkulturplatte abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit dem Lebend-Tot-Farbstoff Hoechst 33342 (Tab. 21) und *NileRed* für 15 Minuten im Dunkeln angefärbt. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte ein zweimaliger Waschschrift und die Messung im Phycoerythrin (PE)-Kanal (565/574 nm).

Tab. 21 Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich eingesetzter Endkonzentration, K.-Nr. und Bezugsquelle

Bezeichnung	Konzentration	K.-Nr.	Bezugsquelle
<i>NileRed</i>	0,625 µg/ml	22190	AAT Bioquest, USA, Kalifornien
DCFDA Assay Reagent	10 µM	HB7190	Hello Bio, Dunshaughlin, Irland
Hoechst 33342	1 µM	62249	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Für den DCFDA-Assay wurden die Hepatoma Zelllinien im Anschluss an die Hungerphase zunächst bei 37 °C für 40 Minuten mit 10 µM des Farbstoffs angefärbt (Tab. 21). Anschließend erfolgte die Hinzugabe des Stimulus (Tab. 20). Nach einer vierstündigen Inkubationszeit erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung im Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- Kanal (495/519nm).

2.15.3 Auswertung mittels FlowJo™ Software

Um die Ergebnisse der intrazellulären Färbung mit Antikörpern (Abschnitt 2.15.1) zu analysieren, wurden unter Verwendung der FlowJo Software zunächst die Dubletten mithilfe der Vorwärtsstreulicht-Fläche (FSC-A) und der Vorwärtsstreulicht-Breite (FSC-W) aus der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die Einzelzellen im Histogramm relativ zu ihrer Fluoreszenzemission dargestellt (Abb. 5 A). Für die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Abschnitt 2.15.2) wurden ebenfalls zunächst die Dubletten ausgeschlossen. Anschließend wurden die toten von den lebenden Zellen mithilfe des Lebend-Tot Farbstoffes Hoechst im Pacific Blue-Kanal abgegrenzt. Die lebenden Zellen wurden anschließend im Histogramm dargestellt (Abb. 5 B). In beiden Fällen wurde das geometrische Mittel für die anschließende statistische Auswertung verwendet.

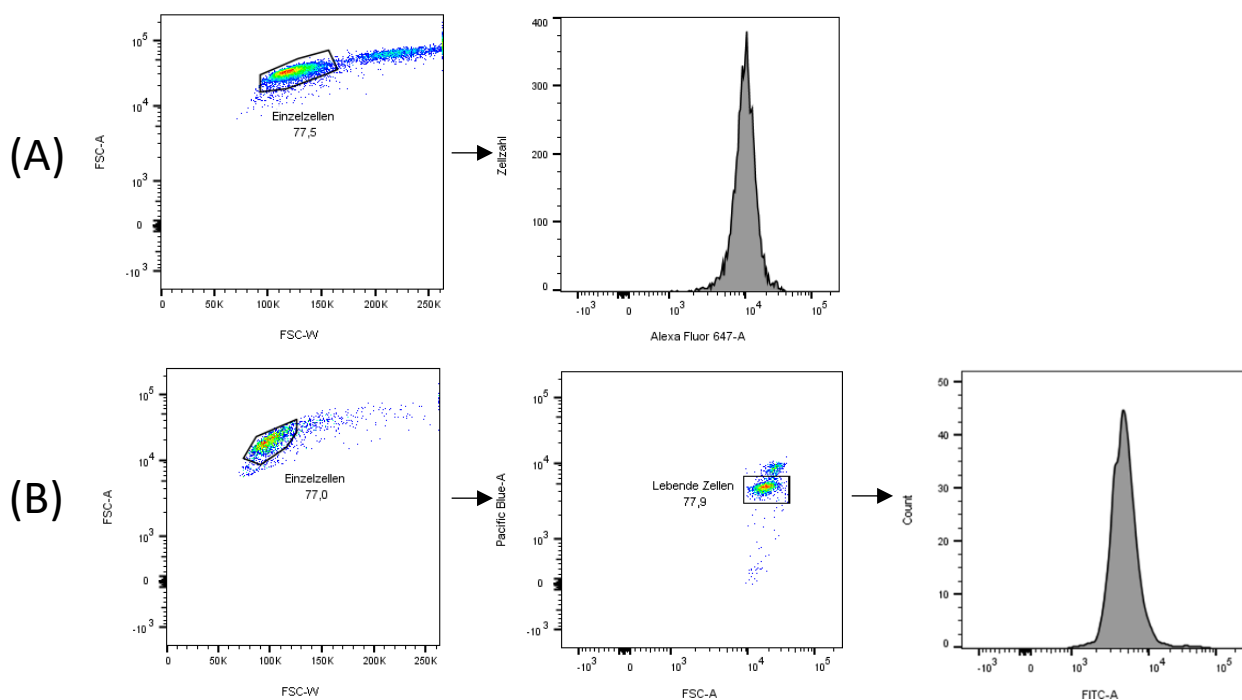


Abb. 5 Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie für die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (A) und mit Fluoreszenzfarbstoffen (B).

2.16 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 20,000 PLC/PRF/5 Zellen oder 30,000 HSC einen Tag vor Versuchsbeginn in 8-well Mikroskop-Kammern eingesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 0,1 % BSA in PBS einmal gewaschen. Anschließend wurde der Humane LPL-Antikörper (Tab. 16) 1:20 in PBS mit 1 % BSA verdünnt und 100 µl davon zu den Zellen gegeben. Nach etwa einer Stunde wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend mit dem 1:200 in 1 % BSA in PBS verdünnten Anti-Ziege-IgG-Sekundärantikörper (Tab. 17) für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss an die Färbung wurde die Abdeckung der Mikroskop-Kammern entfernt und *Mounting Medium* mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) tröpfchenweise hinzugegeben, um die Zellen zu fixieren und die Zellkerne anzufärben. Danach wurde das Deckgläschen auf der DAPI-Lösung platziert und die Mikroskop-Kammern über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am nächsten Tag, gefolgt von der Auswertung mithilfe der Software *Zeiss Efficient Navigation* (ZEN).

2.17 Untersuchung der Interleukinproduktion mittels ELISA

Für die Untersuchung der CXCL-8 Sekretion wurden 15,000 PLC/PRF/5 oder 32,000 HepG2 Zellen in 48-well Zellkulturplatten eingesät. Anschließend folgte die 24-stündige Hungerphase und ebenso lange Stimulation der Zellen mit 10 % FCS, sowie 10 % FCS und 4 % Humanes Serum Albumin (HSA). Am Versuchstag wurden die Überstände in den Zellkulturplatten abgenommen und die Quantifizierung der Interleukin-Menge mithilfe des ELISA MAX™ Standard Set Human CXCL-8 nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.18 Statistische Analyse

Die quantitative Analyse erfolgte mithilfe des Programmes GraphPad Prism Version 9.0.0. Bei Vorliegen von zwei Datensätzen wurde nach Überprüfung der Normalverteilung entweder der Student's t-Test (normalverteilte Proben) oder der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (nicht normalverteilten Proben) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und einem 95 % Konfidenzintervall (CI) durchgeführt. Um auf die Stärke und Richtung eines Zusammenhanges zu prüfen, wurde der *Spearman*-Rangkorrelationskoeffizient

verwendet. Bei mehr als zwei vorliegenden Datensätzen wurde nach Überprüfung der Normalverteilung der *analysis of variance* (ANOVA)-Test durchgeführt.

Die Signifikanz wurde definiert als $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) und $p > 0,05$ (nicht signifikant, ns). Alle Graphen zeigen entweder die Standardabweichung (SD) oder den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), was der jeweiligen Abbildungsunterschrift zu entnehmen ist. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden unter Verwendung des geometrischen Mittels mit der *mean-fluorescence-intensity* (MFI) kalkuliert. Die Daten der klinischen Kohorten wurden mit der IBM SPSS Statistics Software 24 analysiert. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium wurden mithilfe eines exakten Tests ausgeschlossen (<https://www.snpstats.net/start.htm>, Stand November 2024). Der Vergleich der Genotypen sowie die univariate Regressionsanalyse erfolgte mithilfe des *Pearson-Chi-Quadrat-Tests* (X^2 -Test). Die univariate und die multivariate logistische Regression wurde durchgeführt, um die Unabhängigkeit der HCC-Risikofaktoren mit $p < 0,05$ für die Aufnahme und $p > 0,1$ für den Ausschluss von Parametern zu bestätigen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur HCC-Entwicklung im Kontext der *PNPLA3*-I148M-Mutation mithilfe CRISPR/Cas9 modifizierter Hepatoma Zelllinien

3.1.1 Generierung von Zelllinien für die Untersuchung der *PNPLA3*-I148M-Mutation mittels CRISPR/Cas9

Die CRISPR/Cas9 vermittelte Geneditierung wurde an den hepatozellulären Zelllinien PLC/PRF/5 und HepG2 durchgeführt, welche ursprünglich die 148I (PLC/PRF/5) beziehungsweise 148M Variante (HepG2) des *PNPLA3*-Gens tragen. Im Falle der PLC/PRF/5 Zelllinie wurden die Zellen mit dem *PNPLA3*-I148M-Plasmid transfiziert, um die *PNPLA3*-I148M-Mutation einzuführen. Die HepG2 Zellen wurden mit dem *PNPLA3*-M148I-Plasmid transfiziert, um die Wildtypvariante des Gens einzubringen. Die Untersuchung im Hinblick auf den Genotyp erfolgte im Anschluss an die Selektionierung und die Generierung von Einzellzellklonen mithilfe der *PNPLA3* LightSNiP Sonde (Abschnitt 2.11.).

Im Falle der PLC/PRF/5 Zellen wurden drei Zellklone generiert, welche den *PNPLA3*-148M-Genotyp tragen (*PNPLA3*^{MUT}). Darüber hinaus wurden mehrere Klone mit der ursprünglichen Wildtypvariante des Gens (*PNPLA3*^{WT}) erhalten. Bezüglich der HepG2 Zellen wurde neben einigen Zellklonen mit der ursprünglichen *PNPLA3*^{MUT} Variante ein *PNPLA3*^{WT} Klon erhalten.

In Abbildung 6 sind exemplarisch die Genotypisierungsergebnisse eines PLC/PRF/5 Zellklons mit *PNPLA3*^{MUT} (A) und beispielhaft eines homozygoten *PNPLA3*^{WT} (B) Klons gezeigt. Im Falle der HepG2 Zellen wird der Zellklon mit *PNPLA3*^{WT} (C) und ein exemplarischer von mehreren mit der ursprünglichen *PNPLA3*^{MUT} Variante dargestellt (D). Als Kontrollen dienten die untransfizierten PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen. Des Weiteren wurden auch untransfizierte Huh-7 Zellen eingesetzt, die analog zu den HepG2 Zellen die *PNPLA3*-148M-Mutation tragen.

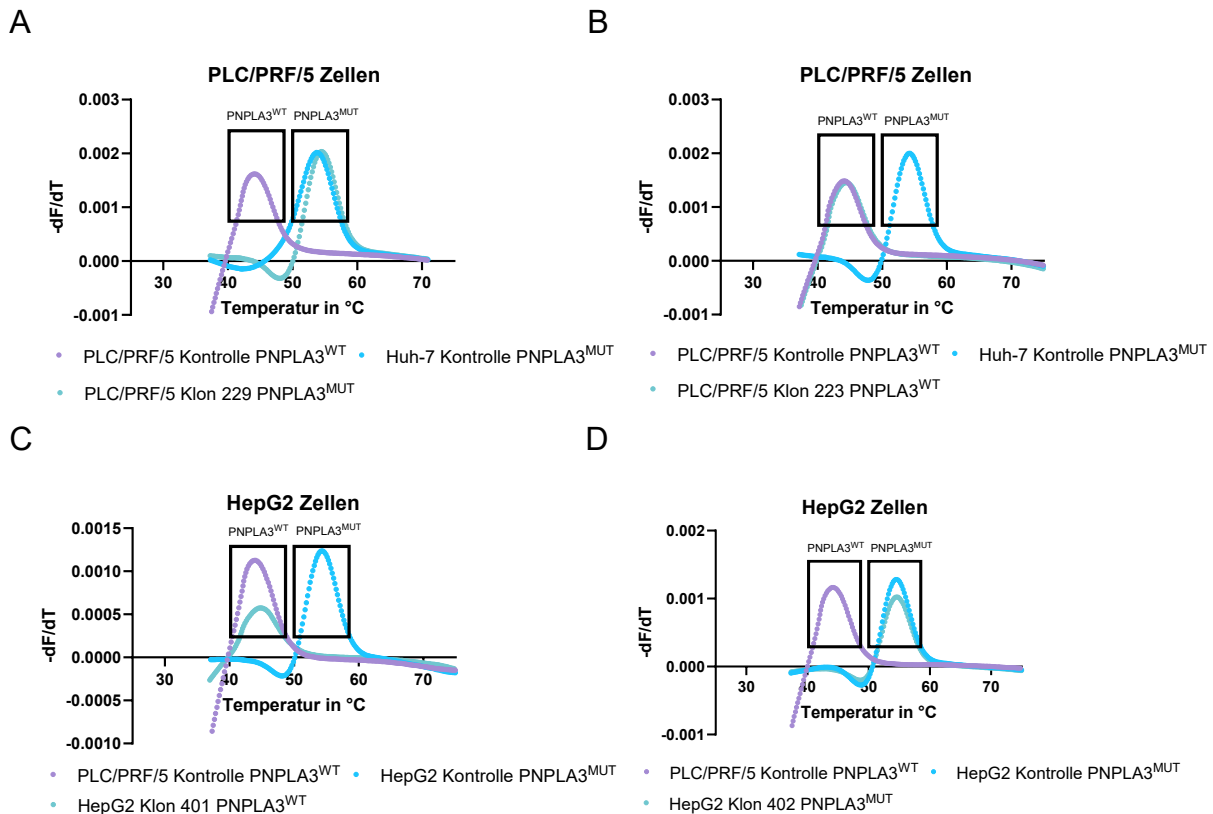


Abb. 6 Genotypisierungsergebnisse der PLC/PRF/5 und HepG2 Zellklone.

(A, B) Schmelzkurven der PLC/PRF/5 Zellen inklusive eines transfizierten $PNPLA3^{MUT}$ Zellklons (A) und eines $PNPLA3^{WT}$ Zellklons (B) im Vergleich zu der untransfizierten PLC/PRF/5 Kontrolle ($PNPLA3^{WT}$), sowie einer ursprünglich die $PNPLA3$ -1148M-Mutation tragende Huh-7 Zelllinie. (C, D) Schmelzkurven der HepG2 Zellen mit dem $PNPLA3^{WT}$ Zellklon (C) und einem $PNPLA3^{MUT}$ Zellklon (D) im Vergleich zu der untransfizierten HepG2 Kontrolle, sowie der PLC/PRF/5 Zelllinie mit der $PNPLA3$ -148I-Variante.

Um die Genotypisierungsergebnisse auf Sequenzebene zu validieren und Insertionen sowie Deletionen (Indels) auszuschließen, wurden die Proben anschließend sequenziert (Abschnitt 2.12.).

Für die PLC/PRF/5 Zellen konnten, einhergehend mit den Ergebnissen der Genotypisierung, drei Zellklone erhalten werden, welche die $PNPLA3$ -148M-Mutation tragen (Klon 229, Klon 424, Klon 120, Abb. 7). In diesen kam es wie gewünscht zu einer Substitution von Guanin (untransfizierte Kontrolle, A) zu Cytosin ($PNPLA3^{MUT}$ Zellklone, B), dargestellt durch den roten Balken. Dies führt dann zum Aminosäureaustausch von Ile zu Met an Position 148. In den amplifizierten Bereichen waren bei keiner der Zellklone Indels oder stumme Mutationen sichtbar. Die Sequenzen der transfizierten Klone mit der

PNPLA3-Wildtypvariante stimmten mit der ursprünglichen Sequenz der untransfizierten Kontrolle überein und sind aus Übersichtsgründen nicht gezeigt.

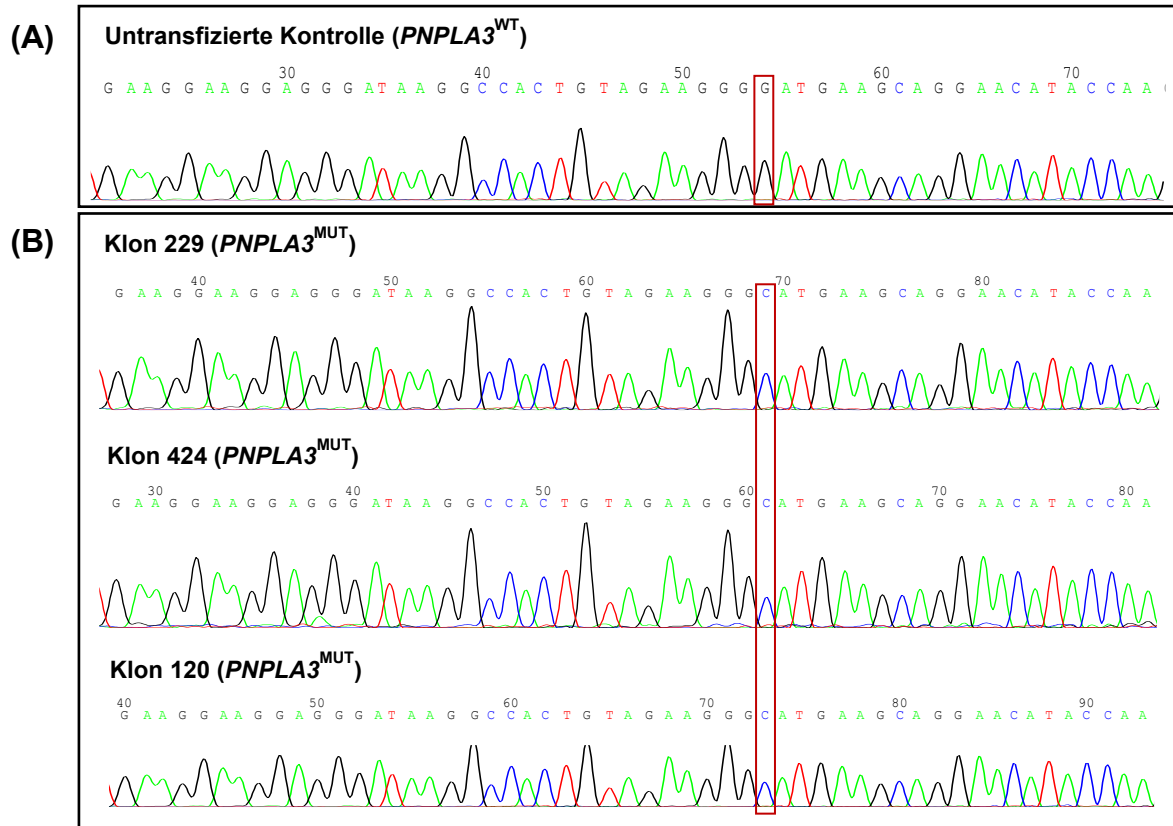


Abb. 7 Sequenzierungsergebnisse der mit CRISPR/Cas9 modifizierten PLC/PRF/5 Zellen. (A) Untransfizierte PLC/PRF/5 Kontrolle. (B) PLC/PRF/5 Zellklone mit der eingebrachten *PNPLA3*-148M-Mutation (*PNPLA3*^{MUT}). Die Nukleotidsubstitution (G zu C) ist jeweils durch einen roten Balken gekennzeichnet.

Die Sequenzierungsdaten der HepG2 Zellen haben bestätigt, dass es bei dem in der Genotypisierung als *PNPLA3*^{WT} identifizierten Zellklon (Klon 401) zu einem Nukleotidaustausch von Cytosin zu Guanin (Abb. 8, roter Balken) kommt. Neun Basenpaare hinter der Substitution zeigen die Daten zudem einen Nachweis von zwei verschiedenen Nukleotiden, Guanin und Thymin, dargestellt durch den Buchstaben "K" (Abb. 8, blauer Balken).

Die Anwesenheit von Thymin zusätzlich zur ursprünglichen Base Guanin kommt durch die homologe Rekombination zustande, in welcher die PAM-Sequenz durch das modifizierte ssODN zerstört wird (Abschnitt 2.10.). Dabei kommt es zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz, sodass die Funktionalität des Proteins nicht beeinflusst wird (stumme Mutation). Darüber hinaus weisen die Sequenzierungsdaten drei Basenpaare

vor der Substitution eine Abweichung von der PLC/PRF/5 Sequenz aus, die in allen HepG2 Zellen identisch ist und ebenfalls in einer stummen Mutation resultiert (Abb. 8, grüner Balken).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die nach der Transfektion erhaltenen Zellklone mit der ursprünglichen *PNPLA3*-148M-Variante nicht dargestellt.

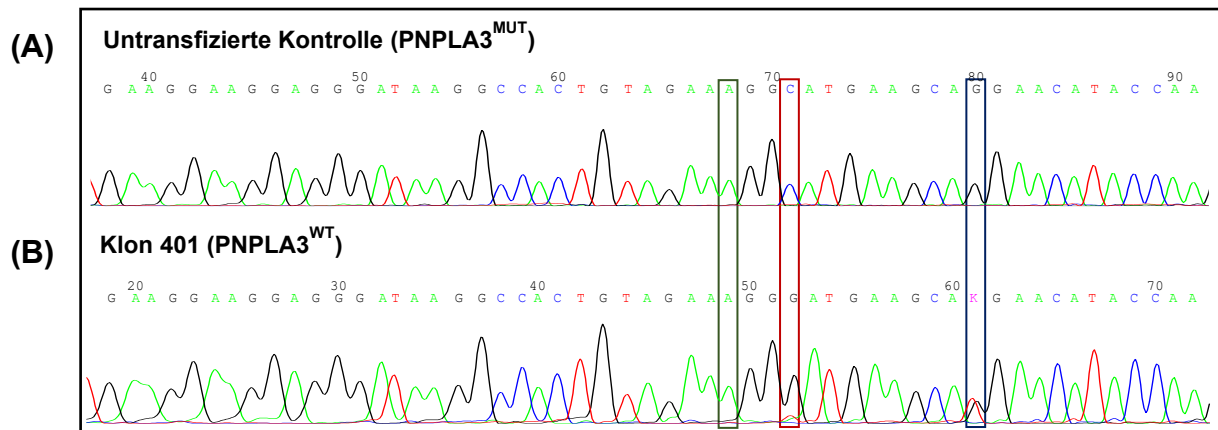


Abb. 8 Sequenzierungsergebnisse der mit CRISPR/Cas9 modifizierten HepG2 Zellen, einschließlich der untransfizierten Kontrolle (A) und des HepG2 Zellklons mit der neu eingebrachten *PNPLA3*^{WT} Variante (Klon 401, B). Die Nukleotidsubstitution (C zu G) und die stummen Mutationen sind jeweils durch einen roten beziehungsweise blauen und grünen Balken gekennzeichnet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur *PNPLA3*-I148M-Mutation erfolgten mit den neu generierten PLC/PRF/5 *PNPLA3*^{MUT} Zellklonen und dem HepG2 *PNPLA3*^{WT} Zellklon, die in der nachfolgenden Arbeit auch als Zelllinien bezeichnet werden. Dies gilt auch für die Zellklone mit der ursprünglichen Variante des Gens (*PNPLA3*^{WT} für PLC/PRF/5 und *PNPLA3*^{MUT} für HepG2), die als Kontrollen in den jeweiligen Experimenten eingesetzt wurden.

3.1.2 Die *PNPLA3*-Expression ist in den mit CRISPR/Cas9 generierten Hepatoma Zelllinien bei Vorliegen der *PNPLA3*-148M-Variante erhöht

Die *PNPLA3*-Expression kann in Hepatoma Zelllinien durch die Nährstoffzufuhr reguliert werden, beispielsweise in Form einer erhöhten Glucosezufuhr, welche die hepatische Expression steigert (Bruschi et al. 2020a). Daher erfolgte die Stimulation der Zellen sowie die Zellaussaat in Zellkulturmedium mit erhöhtem Glucosegehalt (25 mM). Zudem wurde zwischen der Zellaussaat und der Stimulation wurde eine 24-stündige Depletionsphase

(Abschnitt 2.9.) ohne Glucose und einem erniedrigten FCS-Gehalt (1 %) eingelegt, in welcher es durch die Nährstoffmangelbedingungen zu einer verringerten Expression von PNPLA3 kommt. Im Falle der I148M-Mutation ist der Abbau des PNPLA3-Proteins gestört (BasuRay et al. 2019), sodass insgesamt eine höhere Menge des mutierten PNPLA3-Proteins im Vergleich zum Wildtyp anfällt. Durch den geschilderten Versuchsaufbau sollten die PNPLA3-Expressionslevel verstärkt werden, um die Unterschiede durch die *PNPLA3*-I148M-Mutation auf molekularbiologischer- und proteinchemischer Ebene hervorzuheben.

Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse. Dabei konnte sowohl in den PLC/PRF/5 als auch in den HepG2 Zellen unter dem Einfluss der Mutation einer gesteigerten Menge des PNPLA3-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 9 A, B, C).

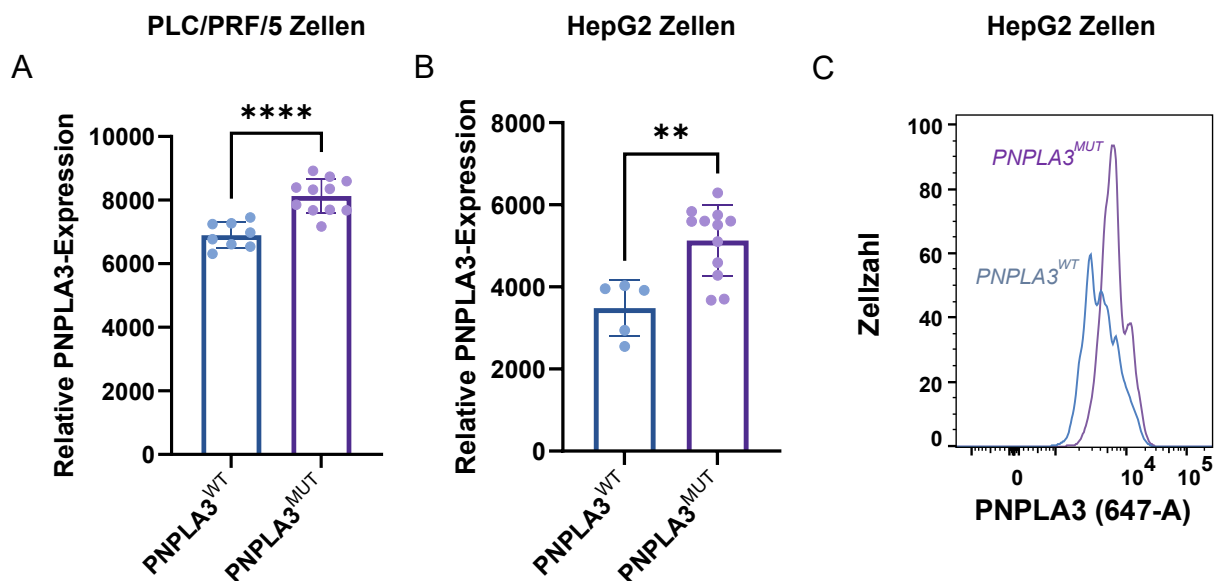


Abb. 9 PNPLA3-Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen. Insgesamt vier PLC/PRF/5 Zellklone (A, 2x *PNPLA3*^{WT}, 2x *PNPLA3*^{MUT}) und vier HepG2 Zellklone (B, 1x *PNPLA3*^{WT} und 3x *PNPLA3*^{MUT}) wurden mithilfe durchflusszytometrischer Analyse untersucht. (C) Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzverschiebung unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Mutation am Beispiel der HepG2 Zellen. Die Ergebnisse stammen aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test (A) beziehungsweise Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (B). Angabe der Mittelwerte $\pm$ SD.

3.1.3 Der *PNPLA3*-148M-Genotyp führt zu einer verstärkten Einlagerung von Triglyceriden

In Anwesenheit der *PNPLA3*-I148M-Mutation kommt es zu einer verstärkten Leberverfettung (Petit et al. 2010). In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Einlagerung von Triglyceriden in lentiviral mit der *PNPLA3*-148M-Variante transduzierten PLC/PRF/5 Zellen unter Einfluss des Lipidträgers FCS nachgewiesen werden (Nischalke et al., unpubliziert). Um zu überprüfen, ob es auch in den mit CRISPR/Cas9 generierten Zelllinien unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Mutation zu diesem Phänotyp kommt, wurden die Zellen mit den Lipidträgern FCS und HSA stimuliert und mittels durchflusszytometrischer Analyse hinsichtlich der Akkumulation von Lipidtropfen untersucht. Für den Versuch wurde der hydrophobe Farbstoff *NileRed* eingesetzt, welcher in einer lipid-reichen Umgebung seine Fluoreszenzeigenschaften ändert (Abschnitt 2.15.2).

Im Ergebnis ist es unter dem Einfluss von HSA in den HepG2 und PLC/PRF/5 Zellen mit der *PNPLA3*-148M-Variante zu einer vermehrten Verfettung im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit FCS gekommen. Diese war darüber hinaus deutlich höher im Vergleich zu den Hepatoma Zelllinien mit der Wildtypvariante (Abb. 10 A, B, C).

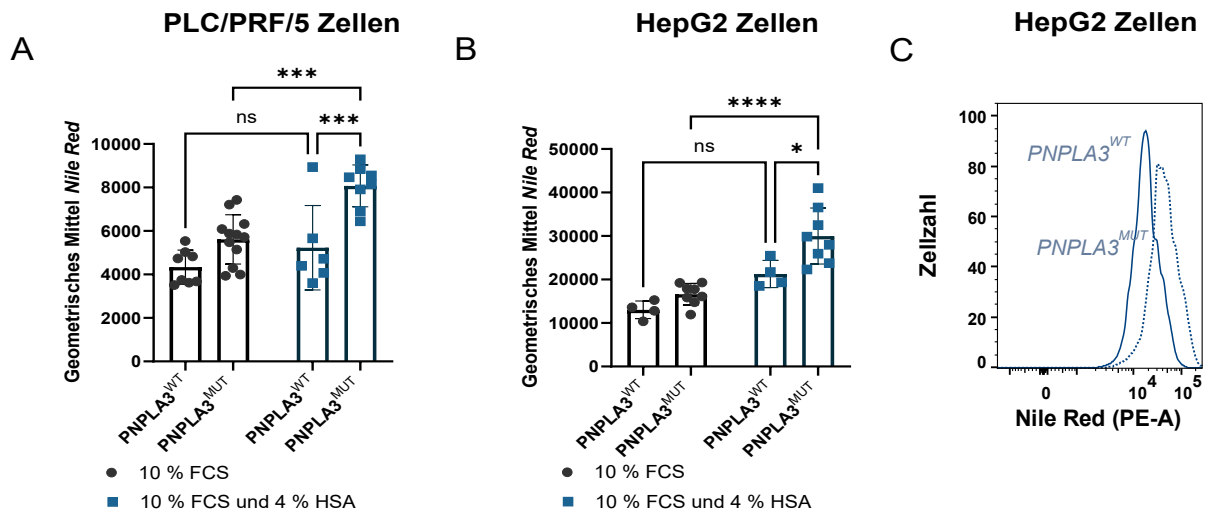


Abb. 10 Akkumulation von Lipidtropfen in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Variante. Dargestellt sind im Falle der PLC/PRF/5 Zellen fünf verschiedene Zellklone (A, 2x *PNPLA3*^{WT}, 3x *PNPLA3*^{MUT}) und im Falle der HepG2 Zellen vier verschiedene Zellklone (B, 1x *PNPLA3*^{WT} und 3x *PNPLA3*^{MUT}). (C) Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzänderung in HepG2 Zellen in Anwesenheit der *PNPLA3*-148M-Mutation bei Stimulation mit dem Lipidträger HSA. Die Ergebnisse basieren auf ≥ 4 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung mit ANOVA. Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

3.1.4 Die CXCL-8 Sekretion ist unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Variante in den Hepatoma Zelllinien erhöht

Verschiedene Studien konnten eine erhöhte Sekretion von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Mediatoren in HSC (Bruschi et al. 2017) und Chemokinen in Hepatoma Zellen (Nischalke et al. 2019) unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Mutation nachweisen. Dabei wurde in beiden Fällen ein Zellmodell gewählt, in welchem die *PNPLA3*^{WT} und die *PNPLA3*^{MUT} Variante mithilfe von Vektoren mit viralen Promoterelementen überexprimiert wurden. Um zu untersuchen, ob es in den endogen mit der CRISPR/Cas9-Variante modifizierten Hepatoma Zellen ebenfalls zu einer pro-inflammatorischen Reaktion kommt, wurde die CXCL-8 Sekretion in den Zelllinien gemessen.

Da sich im Hinblick auf die PLC/PRF/5 *PNPLA3*^{MUT} Zellklone lediglich bei einem der drei untersuchten Klone ein einheitlicher Trend über mehrere Versuche zeigte (siehe auch Diskussion, S. 80), wurde nur dieser in der Auswertung berücksichtigt. Hierbei ergab sich in Anwesenheit der Mutation unter dem Einfluss des Lipidträgers HSA im Vergleich zur

alleinigen Stimulation mit FCS eine erhöhte Sekretion (Abb. 11 A). Beide Hepatoma *PNPLA3*^{MUT} Zelllinien zeigten zudem bei Stimulation mit HSA eine erhöhte Zytokinproduktion im Vergleich zur Wildtypvariante von *PNPLA3* (Abb. 11 A, B).

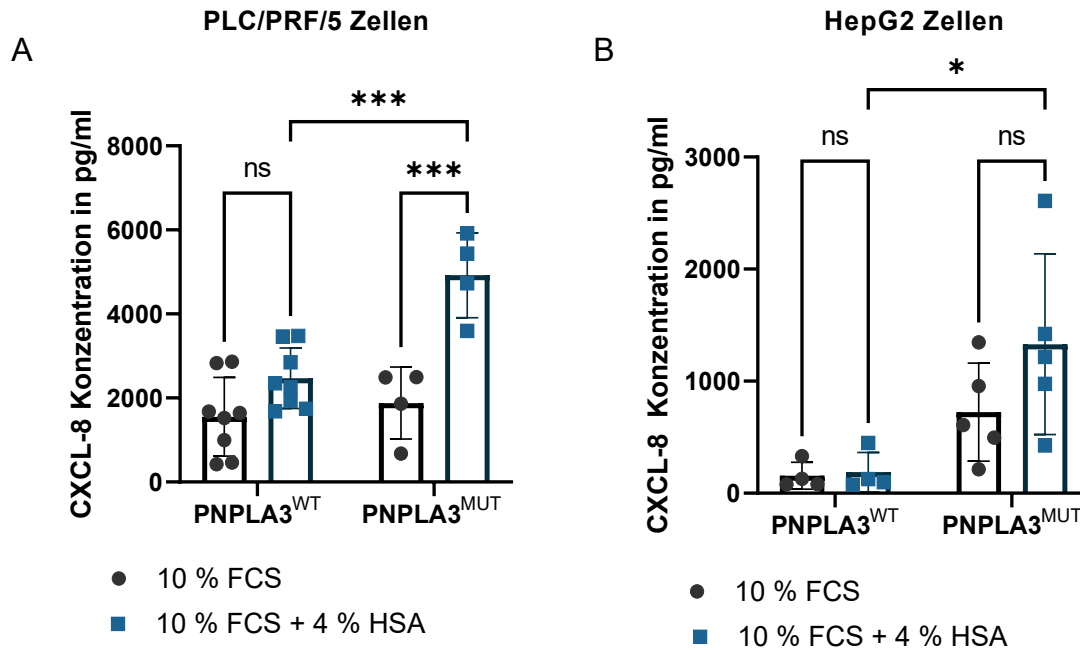


Abb. 11 CXCL-8 Sekretion in den PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen nach Stimulation mit den Lipidträgern FCS und HSA. (A) Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, mit *PNPLA3*^{WT} (n=2), und *PNPLA3*^{MUT} (n=1). (B) Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen, mit *PNPLA3*^{WT} (n=1) und *PNPLA3*^{MUT} (n≥1). Statistische Auswertung mittels ANOVA. Mittelwerte mit SD dargestellt.

3.1.5 Bei Vorliegen der *PNPLA3*-148M-Mutation kommt es zu einer gesteigerten oxidativen Belastung in den Hepatoma Zelllinien

Als mögliches Bindeglied zwischen der *PNPLA3*-I148M-Mutation und einer erhöhten Chemokinsekretion kommt oxidativer Stress infrage, der zudem die Hepatokarzinogenese fördern kann (Nourazarian et al. 2014). Im nächsten Schritt sollte daher der Nachweis von ROS erfolgen.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde der Farbstoff DCFDA eingesetzt, welcher zunächst in die Zelle diffundiert, wo er durch eine intrazelluläre Esterase deacetyliert wird. Das entstehende nicht-fluoreszierende H₂DCF kann dann durch verschiedene ROS wie Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit oder Hydroxylradikale zum fluoreszierenden DCF

oxidiert werden, was einen Nachweis der ROS-Level im Zytosol ermöglicht (Armstrong et al. 2010). Für den Versuch wurden die Zellen mit Arachidonsäure und tert-Butylhydroperoxid (tBHP) stimuliert, um die Produktion der ROS in den Zellen zu induzieren. tBHP in Verbindung mit dem Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Im Hinblick auf die PLC/PRF/5 Zellen konnte für beide Stimuli in Abwesenheit von NAC eine ROS-Induktion nachgewiesen werden, wobei die relative DCFDA-Fluoreszenz unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Variante im Vergleich zu der Wildtypvariante von *PNPLA3* signifikant erhöht war (Abb. 12 A, C). Für die HepG2 Zellen konnte ein ähnlicher Trend gezeigt werden, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde (Abb. 12 B).

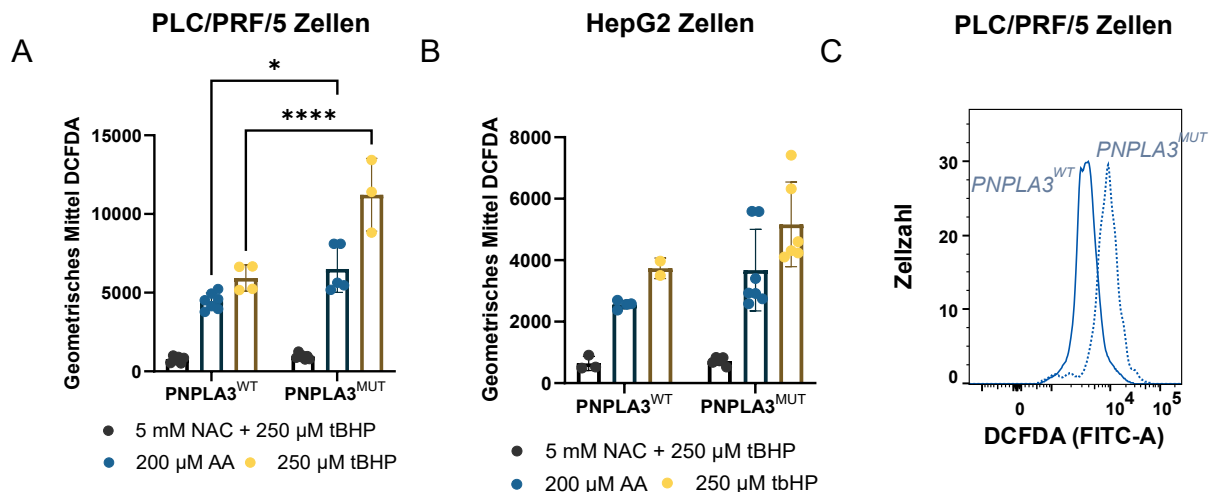


Abb. 12 ROS-Sekretion in den (A) PLC/PRF/5 und (B) HepG2 Zellen nach vierstündiger Stimulation mit 250 μM Arachidonsäure, 250 μM tBHP und 5 mM NAC. Der Versuch erfolgte insgesamt mit drei *PNPLA3*^{WT} (n=2 für PLC/PRF/5, n=1 für HepG2) beziehungsweise fünf *PNPLA3*^{MUT} (n=2 für PLC/PRF/5, n=3 für HepG2) Zellklonen und wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. (C) Fluoreszenzverschiebung unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Mutation nach Stimulation mit AA am Beispiel der PLC/PRF/5 Zellen. Statistische Auswertung (A) mittels ANOVA. Angabe der Mittelwerte ± SD.

Die Oxidation von Biomolekülen durch ROS führt zu vielfältigen DNA-Schäden, beispielsweise zur Bildung des mutagenen 8-Oxoguanins aus der Base Guanin. OGG-1 ist an der Reparatur von DNA-Schäden durch oxidativen Stress in Form der Basenaustauschreparatur (BER) beteiligt (Hahm et al. 2022). Eine erhöhte Expression

des Enzyms ist daher ein Biomarker für oxidativen Stress und typisch für karzinogene Prozesse (Shinmura und Yokota 2001).

Die HepG2 und PLC/PRF/5 Zelllinien wurden hinsichtlich der OGG-1 Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Dabei kam es unter dem Einfluss der Mutation zu einer signifikant gesteigerten Expression des Reparaturenzyms (Abb. 13 A, B, C).

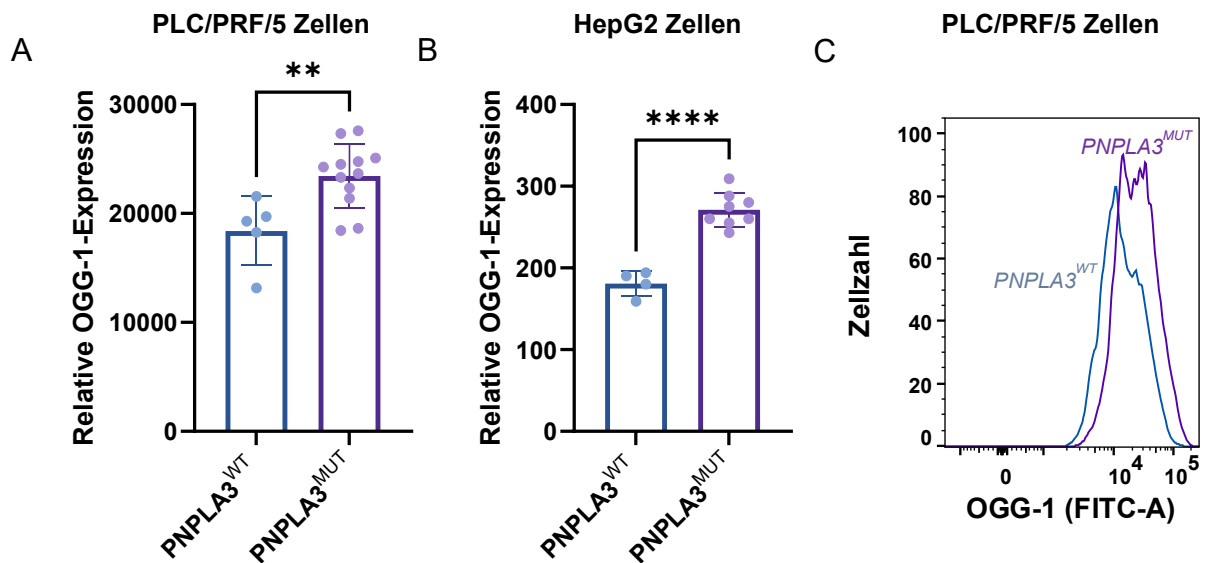


Abb. 13 Durchflusszytometrische Analyse der OGG-1 Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen. In die Untersuchungen wurden (A) vier Zellklone ($2 \times PNPLA3^{WT}$, $2 \times PNPLA3^{MUT}$) für die PLC/PRF/5 beziehungsweise (B) drei Zellklone ($1 \times PNPLA3^{WT}$ und $2 \times PNPLA3^{MUT}$) für die HepG2 Zellen mit einbezogen. (C) Darstellung der Fluoreszenzverschiebung als Histogramm am Beispiel der PLC/PRF/5 Zellen in Abhängigkeit des *PNPLA3*-Genotyps. Die Ergebnisse stammen aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung (A, B) erfolgte mittels Student's t-Test. Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

Ein weiterer Biomarker für oxidativen Stress ist das bioaktive Molekül 4-HNE, welches mit Proteinen, Nukleinsäuren und Membranlipiden reagiert und so im weiteren Verlauf Signalprozesse beeinflussen kann (Zhong und Yin 2015).

Die hier generierten Daten belegen, dass es zu einer signifikant erhöhten 4-HNE Menge in den PLC/PRF/5 und HepG2 Zelllinien in Anwesenheit der *PNPLA3*-148M-Mutation kommt (Abb. 14 A, B, C).

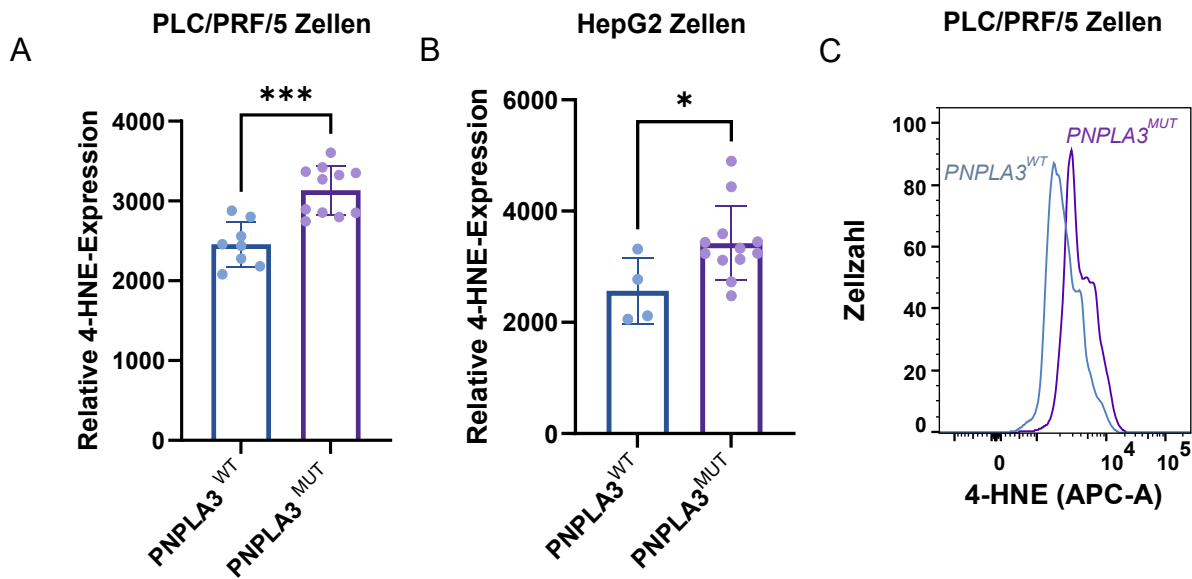


Abb. 14 4-HNE Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen. Für den Versuch wurden insgesamt (A) sechs Zellklone (2xPNPLA3^{WT}, 1xPNPLA3^{HET}, 3xPNPLA3^{MUT}) für die PLC/PRF/5 beziehungsweise (B) vier Zellklone (1xPNPLA3^{WT}, 3xPNPLA3^{MUT}) für die HepG2 Zellen verwendet. (C) Fluoreszenzverschiebung in Abhängigkeit des PNPLA3-Genotyps am Beispiel der PLC/PRF/5 Zellen. Die Analyse wurde mithilfe von ≥ 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test (A, B). Mittelwerte unter Berücksichtigung des SD.

3.1.6 NADPH Oxidasen erhöhen den oxidativen Stress in den Hepatoma Zelllinien mit der PNPLA3-148M-Mutation

Hauptproduzenten der ROS stellen Nox dar, die mithilfe ihres Ko-Faktors NADPH die Reduktion von O₂ zu Superoxidanionen (O₂⁻) initiieren. Die Superoxidanionen können auch in andere reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikale oder Singulett Sauerstoff oder durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt werden (Panday et al. 2015).

Um zu untersuchen, ob Nox für den erhöhten oxidativen Stress in Hepatoma Zelllinien mit der PNPLA3-148M-Mutation verantwortlich sind, erfolgte eine Analyse der Gen- und Proteinexpression von Nox 1, 2 und 3. Hinsichtlich der PLC/PRF/5 Zellen zeigte sich auf Genebene für Nox-1 (Abb. 15 A) und Nox-2 (Abb. 15 B) eine erhöhte Expression in Anwesenheit der PNPLA3-148M-Mutation. Die Nox-3 Menge befand sich in den Zellen unter der Nachweisgrenze (> Zyklus 35). In den HepG2 Zelllinien konnte eine erhöhte Nox-3 Expression in Anwesenheit der Mutation gezeigt werden, jedoch war ein Nachweis

von *Nox-1* und *Nox-2* aufgrund der geringen Expression in den Zellen nicht möglich (Abb. 15 C).

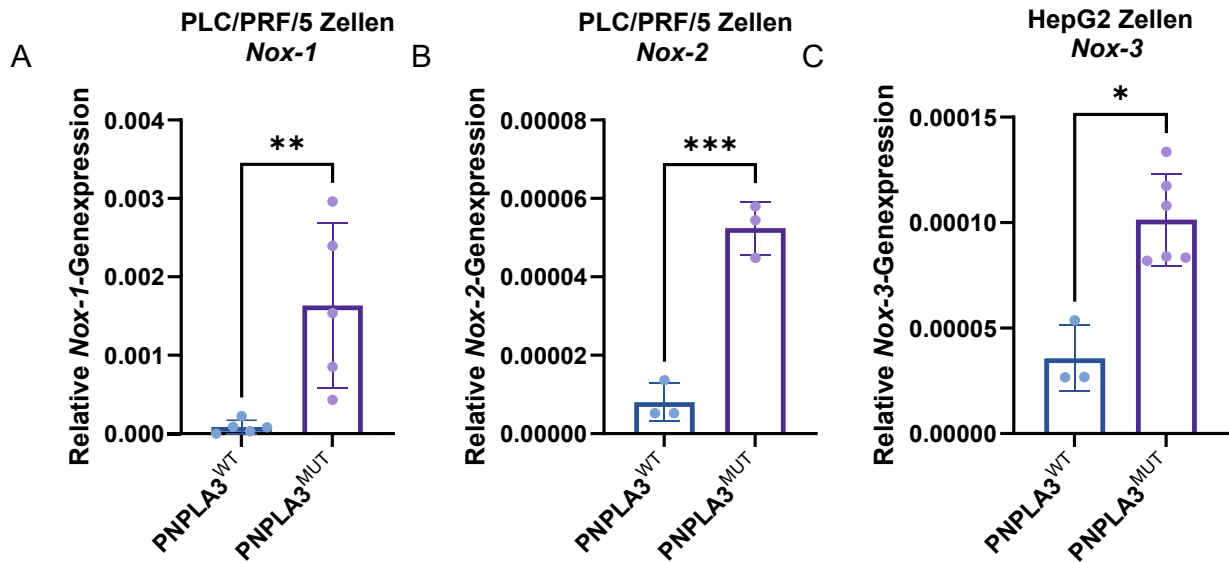


Abb. 15 *Nox*-Genexpression in den PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen. Die Untersuchung der Genexpression inkludierte im Falle der PLC/PRF/5 Zellen (A, B) insgesamt vier Klone (2x *PNPLA3*^{WT}, 2x *PNPLA3*^{MUT}). Für die Auswertung der HepG2 Zellen (C) wurden ein *PNPLA3*^{WT} und zwei *PNPLA3*^{MUT} Zellklone verwendet. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (A, C) beziehungsweise Student's t-Test (B). In die Auswertung wurden mindestens drei biologische Replikate mit einbezogen. Mittelwerte $\pm$ SD.

Auf Proteinebene zeigte sich für die PLC/PRF/5 Zelllinien bei Vorliegen der *PNPLA3*-148M-Variante eine signifikant erhöhte Expression von *Nox-1*, *Nox-2* und *Nox-3* im Vergleich zu *PNPLA3*^{WT} (Abb. 16 A, B, C, H). Die Ergebnisse hinsichtlich *Nox-1* und *Nox-3* konnten in den HepG2 Zelllinien bestätigt werden, in denen eine signifikant erhöhte Expression in Anwesenheit der Mutation nachgewiesen wurde (Abb. 16 D, F, G, I). Im Falle der *Nox-2* Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16 E). Insgesamt war die relative *Nox-1* Expression sowohl in den PLC/PRF/5 als auch in den HepG2 Zellen am höchsten, gefolgt von *Nox-3* und *Nox-2*.

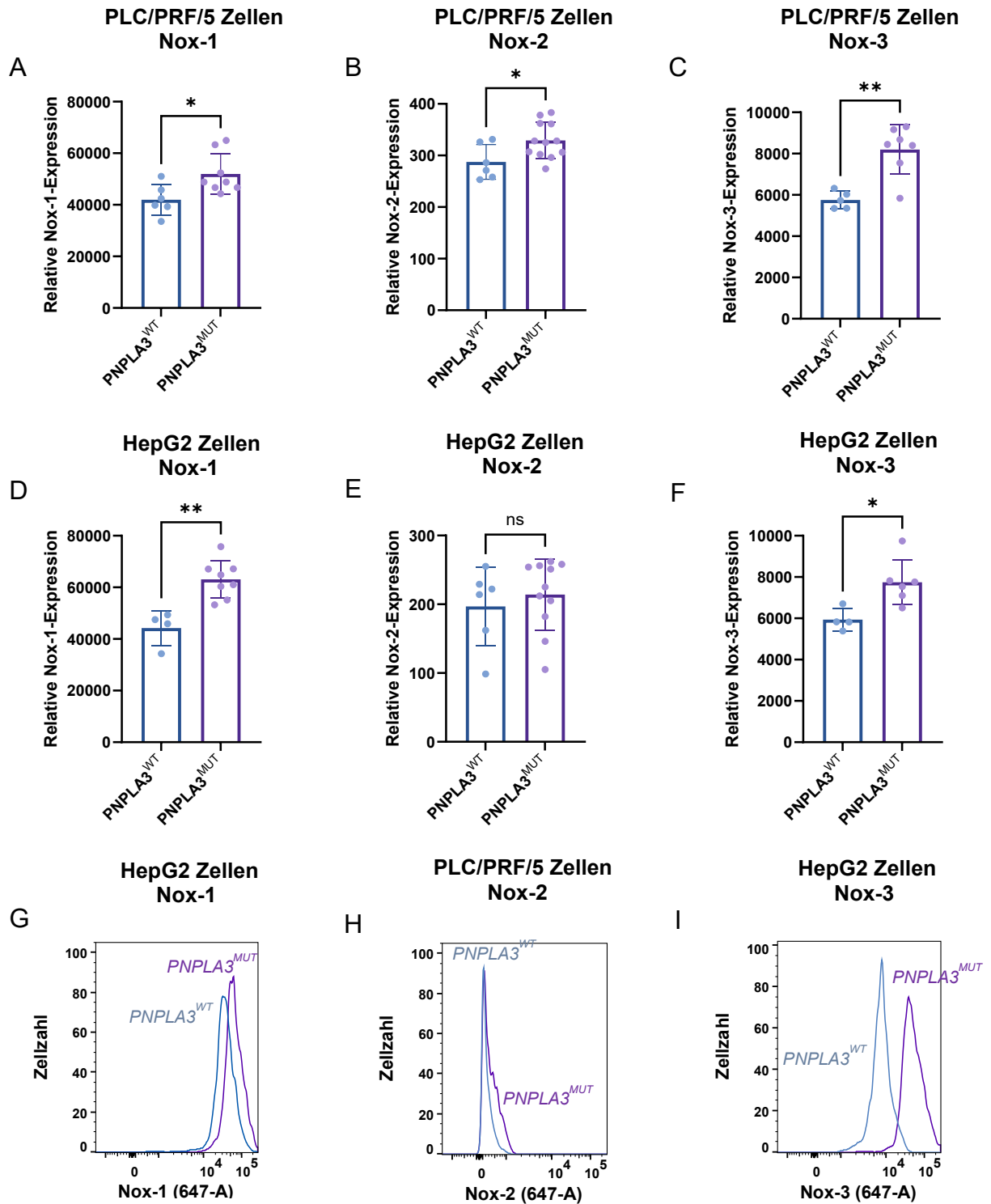


Abb. 16 Proteinexpression von Nox 1, 2 und 3 in den PLC/PRF/5 (A-C) und den HepG2 (D-F) Zellen. In die Analyse wurden (A, B, C) zwei *PNPLA3*^{WT} und drei *PNPLA3*^{MUT} Klone (PLC/PRF/5) beziehungsweise (D, E, F) ein *PNPLA3*^{WT} und drei *PNPLA3*^{MUT} Klone (HepG2) mit einbezogen.

(G, H, I) Darstellung der Fluoreszenzverschiebung am Beispiel der HepG2 Zellen (Nox-1 und Nox-3) beziehungsweise der PLC/PRF/5 Zellen (Nox-2) unter dem Einfluss der *PNPLA3*-148M-Mutation. Die Ergebnisse stammen aus ≥ 4 unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test. Mittelwerte $\pm$ SD.

Zusammenfassend ist es in den hier durchgeführten Studien gelungen, zwei verschiedene Hepatoma Zelllinien (PLC/PRF/5 und HepG2) mittels CRISPR/Cas9 zu modifizieren und so jeweils Klone mit der *PNPLA3*^{WT} (HepG2) und mit der *PNPLA3*^{MUT} (PLC/PRF/5) Variante zu generieren. Diese Klone haben sich phänotypisch hinsichtlich der Verfettung und der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in Übereinstimmung vorausgegangenen Studien mit *PNPLA3*-148M überexprimierenden Hepatoma Zelllinien verhalten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es bei Vorliegen der *PNPLA3*-148M-Variante zu einer vermehrten Expression von ROS, Reparaturenzymen und Nox kommt. Somit konnte eine mechanistische Verbindung zur vermehrten Hepatokarzinogenese bei Trägern der *PNPLA3*-148M-Variante hergestellt werden.

3.2 Pathophysiologische Bedeutung des rs13702 Polymorphismus im *LPL*-Gen vor dem Hintergrund der alkoholischen Lebererkrankung

3.2.1 Der *LPL* rs13702 Polymorphismus ist protektiv hinsichtlich der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms bei Vorliegen einer Alkohol-assoziierten Zirrhose

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der rs13702 Minorvariante und der Entstehung einer Zirrhose oder eines HCC im Kontext einer ALD besteht, wurden Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose mit und ohne HCC, Patienten mit HCV und HCC, sowie alkoholische und gesunde Kontrollen hinsichtlich dieser Variante im *LPL*-Gen genotypisiert.

Dabei zeigte sich eine signifikant verringerte Frequenz des CC-Genotyps in zwei Kohorten von Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose (Initial- und Validierungskohorte), die ein HCC entwickelt haben, im Vergleich zu Patienten ohne HCC (Abb. 17). Des Weiteren war die Frequenz in den Alkohol-assoziierten Kohorten mit HCC im Vergleich zu den Patienten mit einem HCC vor dem Hintergrund einer HCV-induzierten Zirrhose signifikant verringert.

Auf Populationsebene konnte in Kooperation mit Hamish Innes (*School of Health and Life Sciences, Glasgow Caledonian University*) und Stephan Buch (*Medical Department 1, University Hospital Dresden*) mittels Daten aus der UK Biobank ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen der rs13702 Variante und HCC-Entwicklung bestätigt werden ($p = 0,016$) (Schmalz et al. 2023).

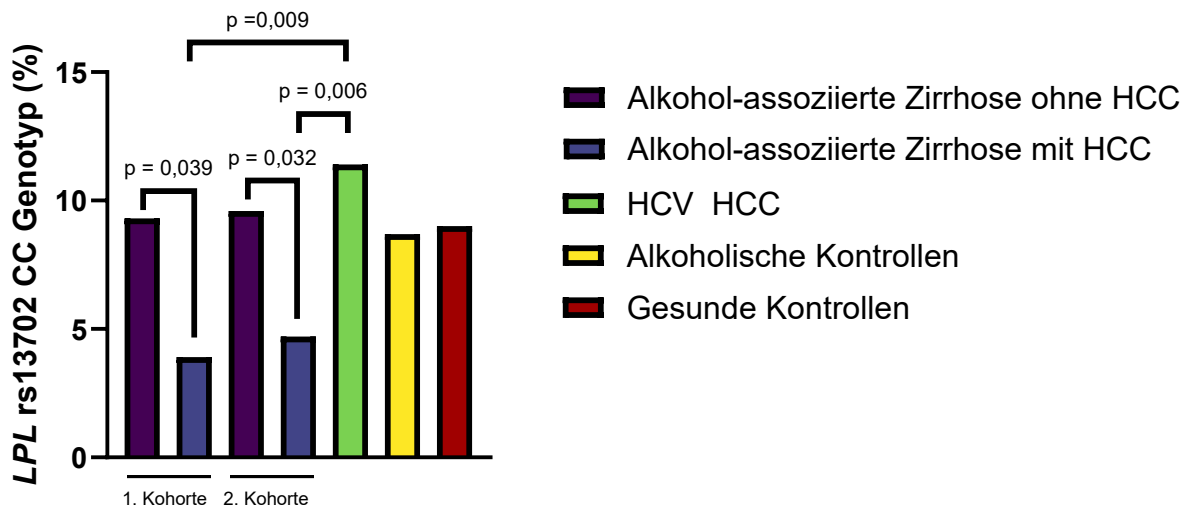


Abb. 17 Häufigkeit der homozygoten *LPL* CC-Variante in verschiedenen Studienkohorten. Statistische Auswertung mittels χ^2 -Test.

3.2.2 Der protektive Effekt des *LPL* rs13702 CC-Genotyps zeigt Wechselwirkungen mit dem *PNPLA3*-148M-Genotyp

Als nächstes wurde geprüft, ob der protektive Effekt des rs13702 CC-Genotyps im *LPL*-Gen hinsichtlich der HCC-Entstehung auch in Anwesenheit der *PNPLA3*-148M-Variante zum Tragen kommt. Dafür wurde die Initial- und Validierungskohorte von Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose mit und ohne HCC hinsichtlich des *PNPLA3* Genotyps untersucht und im Kontext der *LPL* rs13702 CC-Variante analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt der *LPL*-Minorvariante unabhängig von der Anwesenheit der *PNPLA3* 148 I/I und 148 I/M Genotypen besteht. In Individuen mit der *PNPLA3* 148 M/M Variante war der schützende Effekt des *LPL* rs13702 C-Allels jedoch nicht mehr vorhanden (Abb. 18).

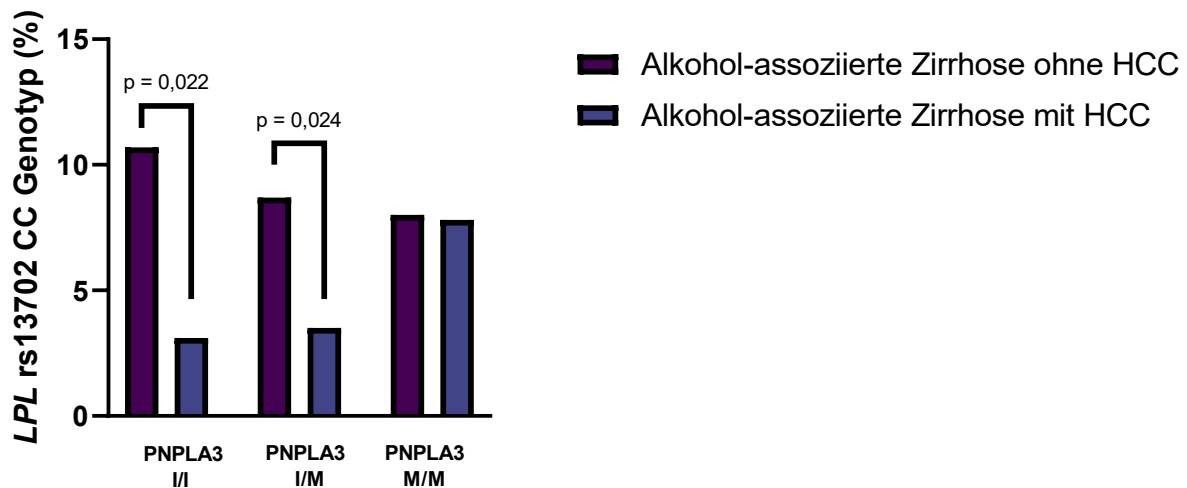


Abb. 18 Untersuchung des *LPL*-Genotyps in Assoziation mit der *PNPLA3*-148M-Mutation. Statistische Auswertung mittels χ^2 -Test.

3.2.3 Der *LPL* rs13702 CC-Genotyp korreliert unabhängig mit HCC

Um zu untersuchen, ob die Minorvariante einen unabhängigen protektiven Faktor für die HCC-Entwicklung darstellt, wurde eine uni- und multivariate Analyse mit bekannten Risikofaktoren durchgeführt. Die Ergebnisse der univariaten Analyse haben gezeigt, dass in beiden Kohorten von Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose neben dem *LPL* rs13702 CC-Genotyp höheres Alter, männliches Geschlecht, Diabetes und die Anwesenheit der *PNPLA3*-148M-Variante mit dem Auftreten von HCC assoziiert sind (Tab. 22). Darüber hinaus hat die multivariate Analyse bestätigt, dass alle Risikofaktoren unabhängig das HCC-Risiko erhöhen, wohingegen die *LPL* rs13702 Variante das Risiko senkt (OR = 0,5; $p = 0,03$).

Tab. 22 Regressionsanalyse potenzieller HCC-Risikofaktoren. *Die multivariate Analyse inkludierte alle signifikanten Parameter von der univariaten Analyse. OR, *odds ratio*.

Univariate Analyse				
95 % CI				
Parameter	P	OR	Unteres	Oberes
Alter	0,000	1,084	1,067	1,101
Geschlecht (männlich)	0,000	3,047	2,111	4,399
Diabetes	0,000	2,709	2,034	3,608
<i>PNPLA3</i> -148M	0,000	2,077	1,573	2,742
<i>LPL</i> rs13702 CC	0,003	0,442	0,254	0,769
Multivariate Analyse*				
95 % CI				
Parameter	P	OR	Unteres	Oberes
Alter	0,000	1,075	1,056	1,095
Geschlecht (männlich)	0,000	3,040	2,000	4,620
Diabetes	0,000	1,832	1,325	2,532
<i>PNPLA3</i> -148M	0,000	2,002	1,433	2,796
<i>LPL</i> rs13702 CC	0,033	0,493	0,258	0,943

3.2.4 Das *LPL* rs13702 C-Allel korreliert mit Lebersteatose und dem Leberenzym Gamma-Glutamyl-Transferase in Patienten mit ALD

Um die Auswirkungen der *LPL*-Minorvariante auf den Lipidstoffwechsel in Anwesenheit einer ALD zu untersuchen, wurden Patienten mit Alkohol-assoziierten Zirrhose hinsichtlich verschiedener metabolischer Parameter analysiert.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es in Patienten mit ALD in Anwesenheit der Minorvariante zu einer verringerten Leberverfettung kommt (Abb. 19 A). Weiterhin kommt es zu statistisch verringerten Blut-Spiegeln des Leberenzym Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) im Vergleich zur homozygoten Wildtypvariante (Abb. 19 B). Hinsichtlich des Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde hingegen keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 19 C). Auch in Bezug auf den Triglycerid- und

Cholesterin-Gehalt im Blut konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19 D, E).

Auf Populationsebene zeigte sich ebenfalls eine Assoziation der rs13702 CC-Variante mit Leberenzymen und darüber hinaus auch mit Cholesterinspiegeln. Zusätzlich dazu kam es im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen zu einer starken Korrelation der Variante ($p < 1.0 \times 10^{-310}$) mit Triglyceriden (Schmalz et al. 2023).

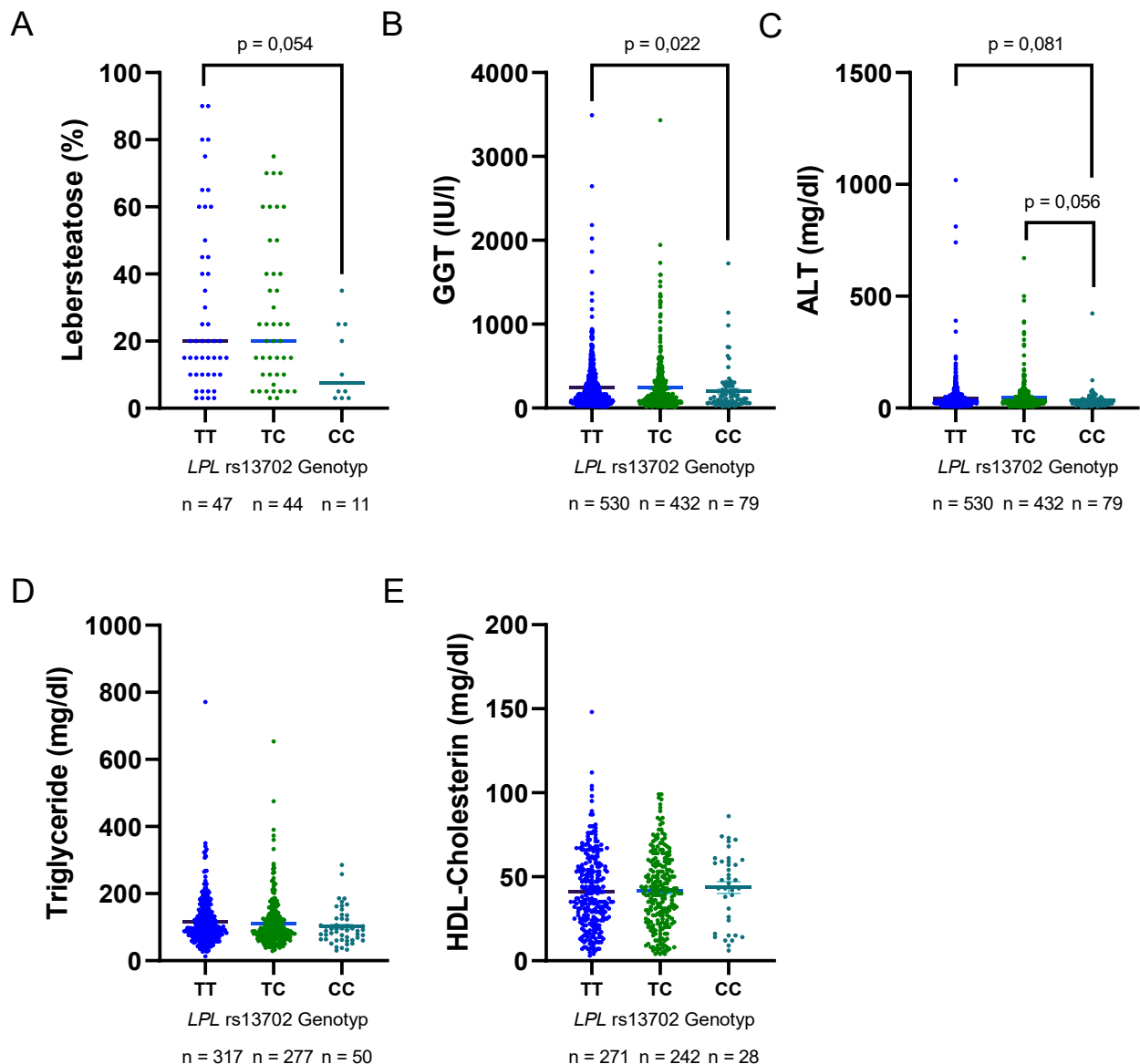


Abb. 19 Graphische Darstellung der Leberverfettung, sowie verschiedener Lipidparameter und Leberenzymen in Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose unter Berücksichtigung des *LPL* rs13702 Genotyps. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-Wilcoxon-Test. Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.2.5 Die hepatische LPL-Expression ist in Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose höher als in den Kontrollen

Grundsätzlich wurde bisher angenommen, dass LPL in der adulten Leber nicht exprimiert wird. In Studien konnte jedoch eine erhöhte *LPL*-Expression im Zuge einer MASLD nachgewiesen werden (Ghodsian et al. 2021).

Um herauszufinden, ob LPL bei ALD hepatisch exprimiert wird, wurden Leberproben von Patienten mit ALD mit und ohne HCC, mit einem HCC bedingt durch eine virale Infektion und Leberproben ohne Zirrhose, die bei der operativen Resektion von Lebermetastasen erhalten wurden, hinsichtlich der *LPL*-mRNA-Expression untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression bei Patienten mit ALD ohne HCC im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 20 A). In der Gruppe von Patienten mit ALD konnte weiterhin eine in Abhängigkeit der Anzahl an C-Allelen im *LPL* rs13702 Locus gesteigerte mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 20 B).

Neben der mRNA-Expression wurde auch die LPL-Proteinexpression in Patienten mit einer ALD analysiert, wobei auf statistische Auswertung aufgrund der geringen Probenanzahl verzichtet wurde. Jedoch zeigte sich bei den vier untersuchten Leberresektaten eine augenscheinlich erhöhte Proteinexpression im Gewebe von Patienten mit Zirrhose ohne HCC im Vergleich zu Patienten mit Zirrhose und einem HCC im Kontext einer ALD (Abb. 20 C).

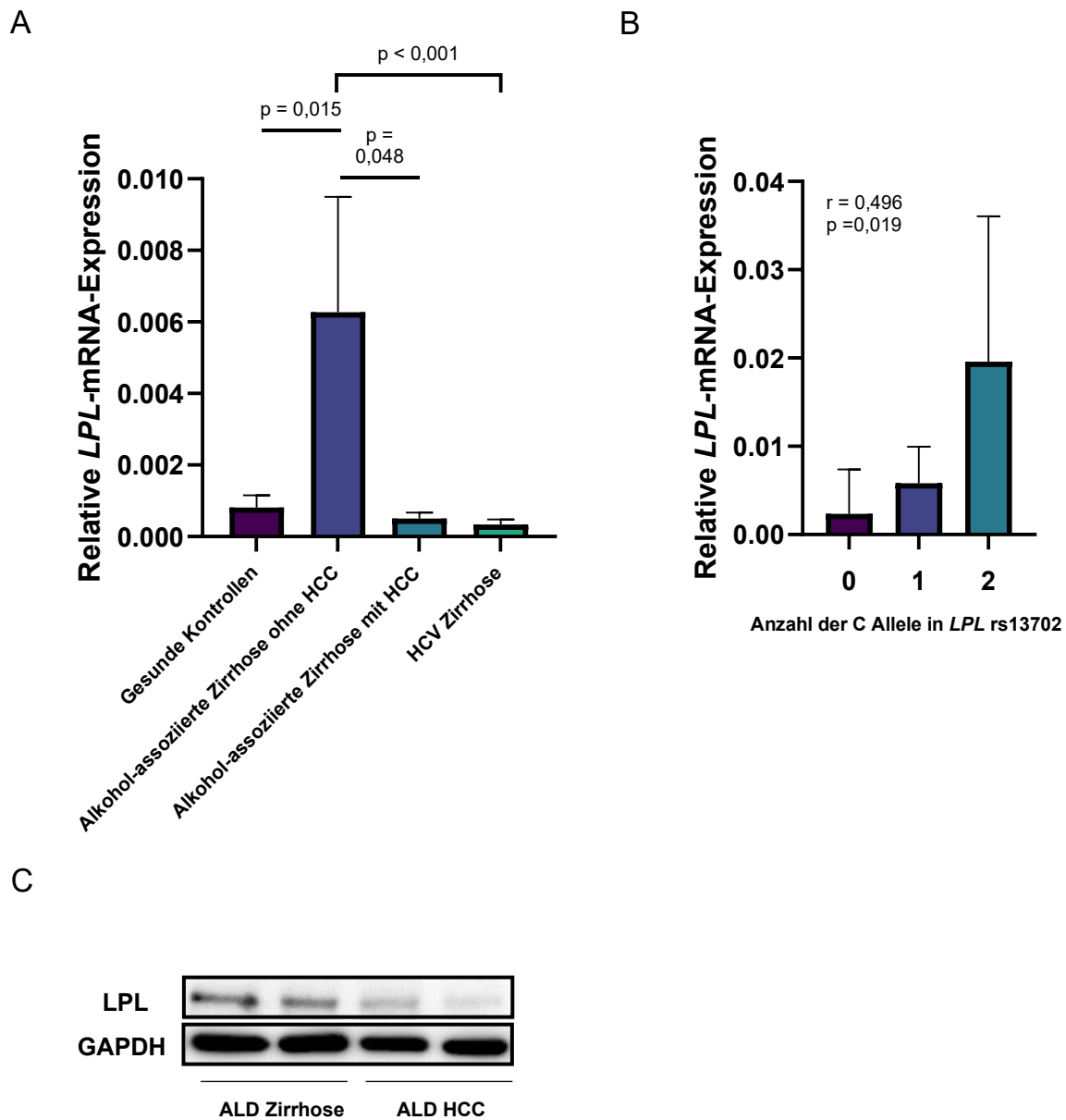


Abb. 20 LPL-mRNA- (A, B) und LPL-Protein-Expression (C) im humanen Lebergewebe. Die statistische Auswertung (A) erfolgte mithilfe des Student's t-Test beziehungsweise dem *Spearman*-Rangkorrelationskoeffizienten (B). (C) Exemplarische Darstellung eines Western Blots zur Untersuchung der LPL-Proteinexpression im Gewebe von Patienten mit ALD. Mittelwerte mit SD dargestellt.

3.2.6 Das LPL-Protein wird vor allem in humanen Sternzellen und Sinus-Endothelzellen der Leber exprimiert

Teratani und Ko-Autoren (Teratani et al. 2019) konnten eine erhöhte Expression des LPL-Proteins in HSC im Kontext einer MASLD nachweisen. Aus diesem Grund wurde die LPL-Expression in verschiedenen Zelltypen der Leber analysiert.

Neben primären HSC und der humanen Sternzelllinie LX-2 erfolgte eine Untersuchung der Expression in primären Hepatozyten und der Hepatoma-Zelllinie PLC/PRF/5, sowie in LSEC. In Übereinstimmung mit der genannten Studie konnte die höchste Expression in primären HSC nachgewiesen werden, gefolgt von LSEC und LX-2 Zellen. Die geringste Expression war in primären Hepatozyten sowie in PLC/PRF/5 Zellen zu finden (Abb. 21 A, B, C).

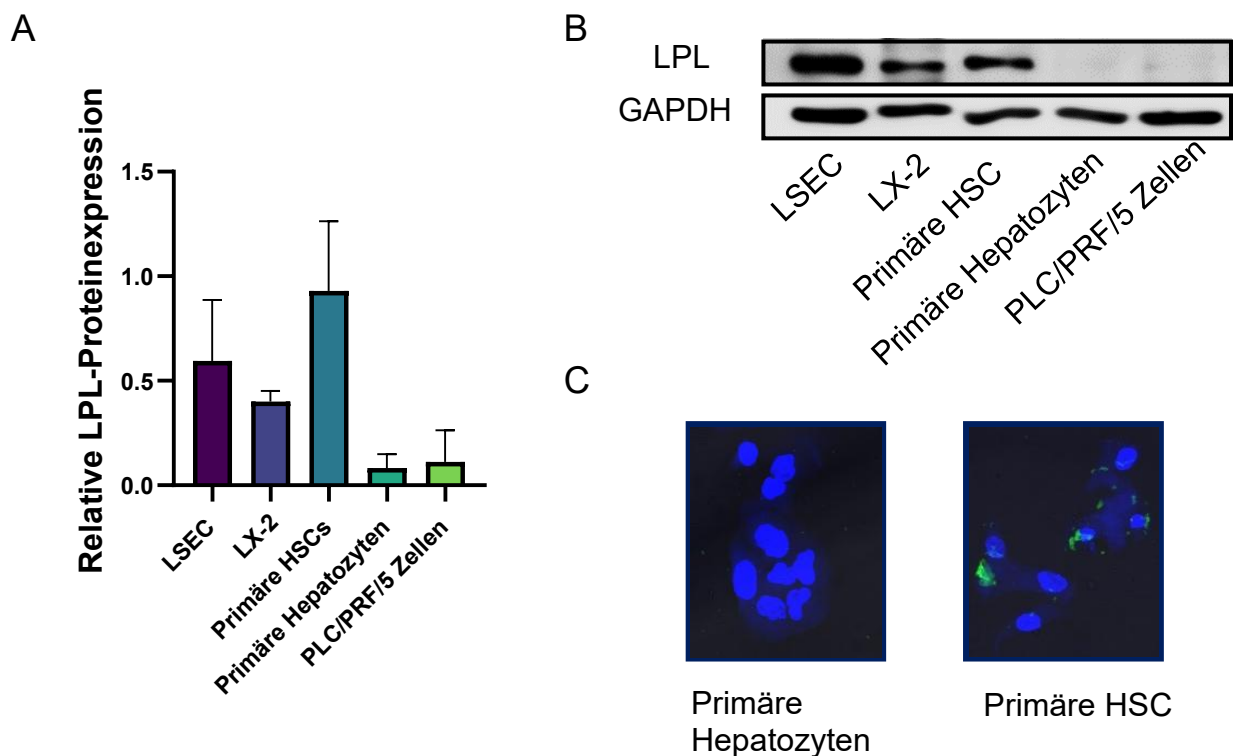


Abb. 21 LPL-Proteinexpression in verschiedenen Zelltypen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (A), wobei der Blot (B) exemplarisch für ein unabhängiges Experiment steht. Die Immunfluoreszenzfärbung (C) wurde an zwei (Primäre Hepatozyten) beziehungsweise drei (Primäre HSC) biologischen Replikaten durchgeführt, wobei jeweils eine Färbung exemplarisch gezeigt ist.

3.2.7 Die *LPL*-mRNA-Expression kann durch PPAR-Agonisten in LX-2 Zellen gesteigert werden

Unter Hinzugabe von PPAR-Agonisten kann es zu einer Induktion der *LPL*-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben kommen (Schoonjans et al. 1996; Niho et al. 2003). Um zu überprüfen, ob die *LPL*-Expression auch in Leber-residenten Zellen durch die Verwendung von PPAR-Agonisten induziert werden kann, wurden LX-2 und PLC/PRF/5 Zellen mit dem PPAR γ -Agonisten Pioglitazon behandelt.

Dabei ergab sich eine deutlich erhöhte basale mRNA-Expression in den LX-2 Zellen im Gegensatz zu der PLC/PRF/5 Zelllinie, was die Ergebnisse auf Proteinebene stützt (Abschnitt 3.2.6). Darüber hinaus kam es in den LX-2 Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Expression unter dem Einfluss von Pioglitazon (Abb. 22).

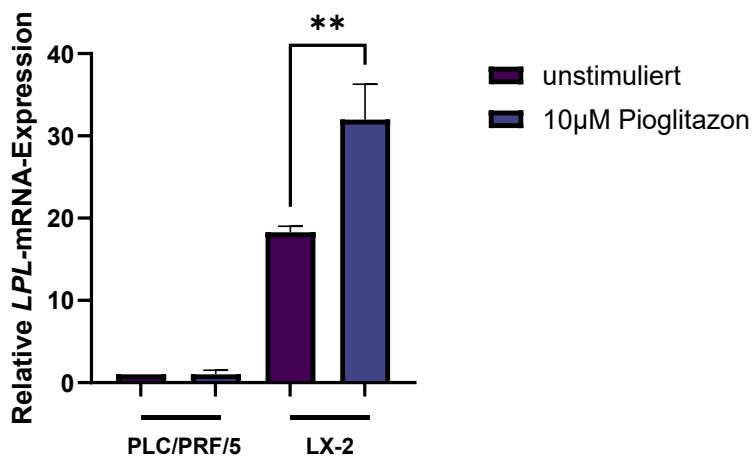


Abb. 22 *LPL*-mRNA-Expression in PLC/PRF/5 und LX-2 Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit 10 µM Pioglitazon. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test. Fehlerbalken zeigen die SD.

Im Ergebnis konnte in den hier durchgeführten Versuchen die CC-Variante im rs13702 Locus des *LPL*-Gens als unabhängiger protektiver Faktor in der HCC-Entwicklung bei ALD-Patienten identifiziert werden, der mit Veränderungen des Lipidprofils einhergeht. Ursächlich für den protektiven Effekt wurden Unterschiede in der *LPL*-Expression in Abhängigkeit des Genotyps im pathologischen Kontext vermutet. Im Einklang mit dieser These konnte eine Hochregulation der Expression unter dem Einfluss des C-Allels in Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung nachgewiesen werden. Die Expression von

LPL, die sich auf mRNA-Ebene mithilfe des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon hochregulieren ließ, war von allen leber-residenten Zellen am höchsten in HSC.

3.3 Genetische Variation in *SAMM50* im Kontext des Alkohol-assoziierten HCC

3.3.1 Der rs376142 und der rs3827385 Polymorphismus im *SAMM50*-Gen sind mit einem erhöhten HCC-Risiko bei Vorliegen einer ALD assoziiert, was sich auf eine Kopplung mit der *PNPLA3*-148M-Variante zurückführen lässt

Genetische Variation im *SAMM50* rs3761472 und rs3927385 Locus wurde mit dem HCC-Risiko (Wang et al. 2021b), sowie dem Auftreten einer MASLD in Verbindung gebracht (Wang et al. 2021a). Um zu untersuchen, ob es im Kontext einer ALD zu einem erhöhten HCC-Risiko kommt, wurden Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose mit und ohne HCC, Patienten mit HCC vor dem Hintergrund einer HCV-Infektion, sowie alkoholische und gesunde Kontrollen hinsichtlich der *SAMM50*-Varianten analysiert.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Träger der Minorvarianten (rs3827385 C-Allel, Abb. 23 A beziehungsweise rs3761472 G-Allel, Abb. 23 B) am häufigsten in der Gruppe von Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose mit HCC vertreten waren. Der prozentuale Anteil in dieser Gruppe war dabei signifikant höher im Vergleich zu den Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose ohne HCC, Patienten mit einem viralen HCC sowie alkoholische und gesunde Kontrollen. Darüber hinaus war die Frequenz in Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose im Vergleich zu den gesunden und alkoholischen Kontrollen signifikant erhöht. Bei Vorhandensein der rs3761472 Minorvariante kam es zusätzlich auch zu einer signifikanten Erhöhung in diesen Patienten im Vergleich zu den Individuen mit HCV induziertem HCC.

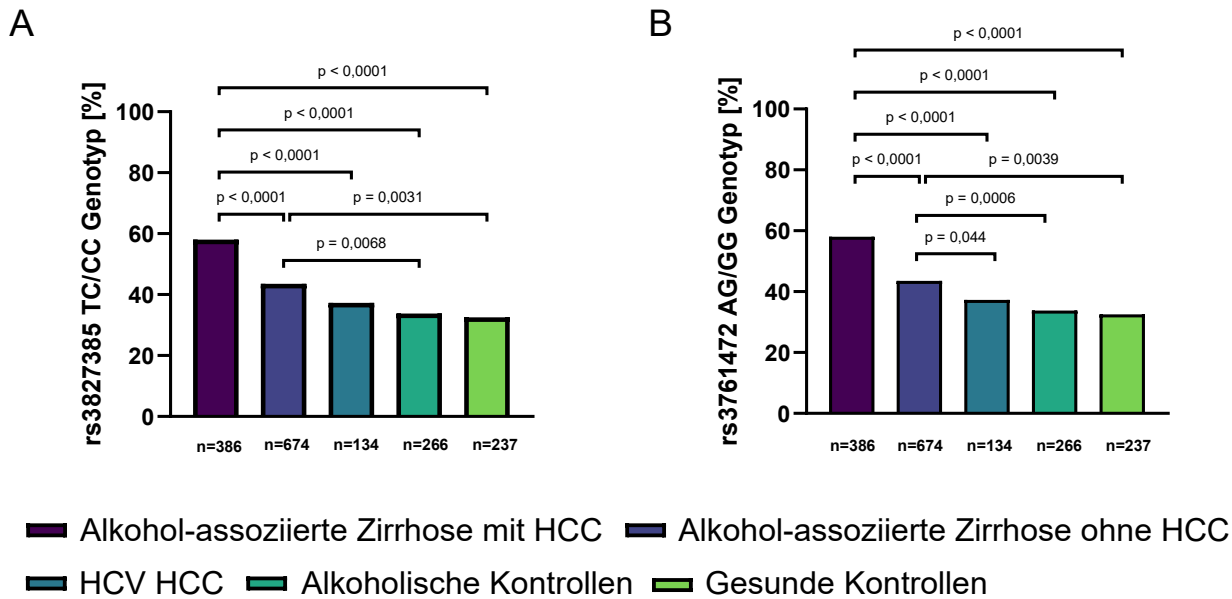


Abb. 23 Prozentualer Anteil der *SAMM50* rs3827385 TC/CC (A) und rs3761472 AG/GG (B) Genotypen in den Studienkohorten. Statistische Auswertung mittels χ^2 -Test.

Mit Hilfe einer Regressionsanalyse wurde überprüft, ob es sich bei den untersuchten Polymorphismen um unabhängige Risikofaktoren handelt. In der univariaten Analyse konnte das C-Allel in rs3827385 und das G-Allel in rs3761472, die *PNPLA3*-I148M-Mutation, sowie erhöhtes Alter, männliches Geschlecht und das Vorliegen von Diabetes mit dem HCC-Risiko assoziiert werden. Jedoch zeigte sich in der multivariaten Analyse ein Verlust der Signifikanz, wenn die *PNPLA3*-I148M-Risikovariante mit einbezogen wurde. Anschließend wurde daher untersucht, ob sich die beiden Polymorphismen in einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) mit der *PNPLA3*-148M-Variante befinden. Für beide Polymorphismen ergaben sich hier hohe Werte, was eine genetische Kopplung unterstreicht (Nischalke et al. 2022).

Im nächsten Schritt wurden die Träger der *SAMM50*-Minorvarianten beider Polymorphismen in den Studienkohorten hinsichtlich des Vorliegens der *PNPLA3*-148M-Variante untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Falle des *SAMM50* rs3827285 Polymorphismus in 90 % und im Falle des rs3761472 Polymorphismus in über 90 % der Fälle die Träger der *SAMM50*-Minorvarianten ebenfalls das *PNPLA3*-148M-Risikoallel besitzen (Abb. 24 A, B). Dies zeigt, dass die Anwesenheit eines *SAMM50*-Risikoallels eng mit der Anwesenheit der *PNPLA3*-I148M-Mutation verknüpft ist. Darüber

hinaus war die *PNPLA3*-148M-Variante in Anwesenheit des *SAMM50*-Wildtypallels doppelt so häufig bei Patienten mit alkoholischem HCC im Vergleich zu den Kontrollen ohne Lebererkrankung vorhanden. Somit wird das Risiko für die Entwicklung eines alkoholischen HCC auch bei Trägern des *SAMM50*-Wildtypallels erhöht.

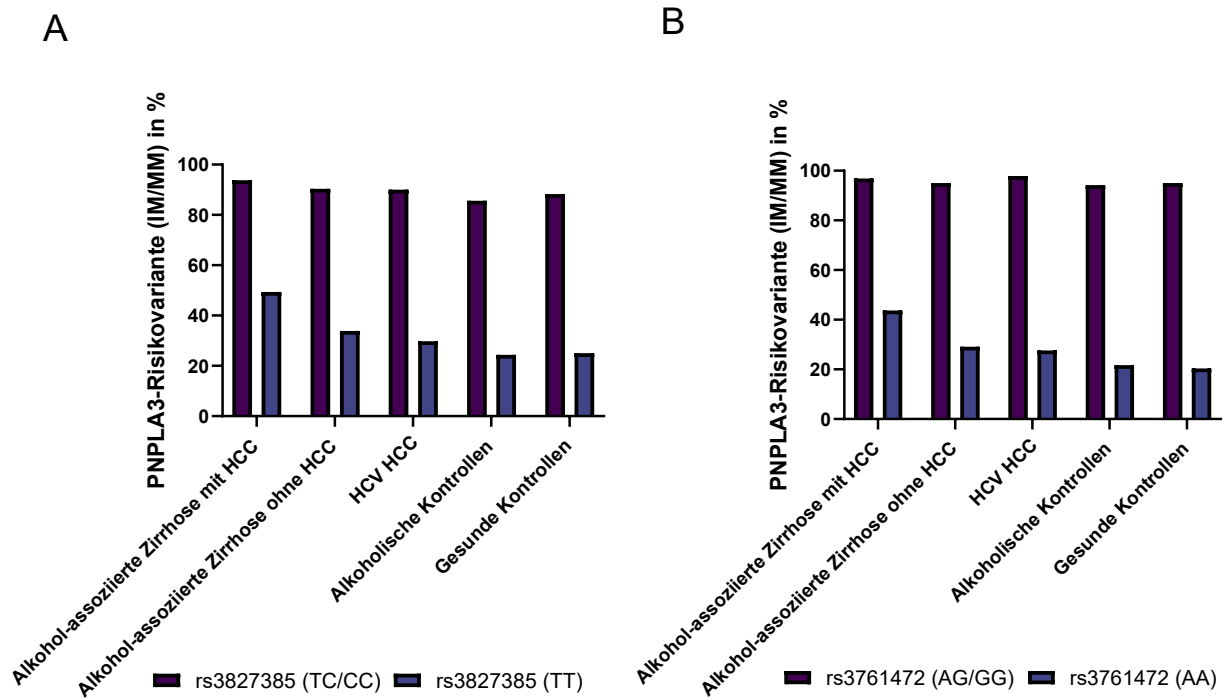


Abb. 24 Anteil an Trägern der *SAMM50* rs3827385 Risikovariante (A) und der rs3761472 Risikovariante (B), die auch ein *PNPLA3*-148M-Risikoallel tragen. Statistische Auswertung mittels χ^2 -Test.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es in Anwesenheit genetischer Variation im rs3827385 und rs3761472 Locus des *SAMM50*-Gens in der hier untersuchten Kohorte kaukasischer Individuen zu keiner zusätzlichen Erhöhung des HCC-Risikos kommt. Dies ist auf die Kopplung mit der *PNPLA3*-148M-Mutation zurückzuführen.

4. Diskussion

In den letzten Jahren wurden verschiedene genetische Risikofaktoren identifiziert, die zur Entwicklung des HCC im Kontext einer ALD beitragen (Trépo et al. 2022), wie beispielsweise die *PNPLA3*-I148M-Mutation und der rs58542926 Polymorphismus im *TM6SF2*-Gen. Viele Studien haben sich mit der Untersuchung des Pathomechanismus der *PNPLA3*-I148M-Mutation beschäftigt. Diese gilt als eine der stärksten Risikofaktoren für Lebererkrankungen, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht geklärt werden konnte. Neben Polymorphismen, die die Entwicklung eines HCC begünstigen gibt es genetische Varianten, die mit einem protektiven Effekt hinsichtlich der Krankheitsentwicklung einhergehen, wie beispielsweise Polymorphismen im Apolipoprotein E (*APOE*), Hydroxysteroid (17-beta) Dehydrogenase 13 (*HSD17B13*) und im Telomerase-Reverse-Transkriptase (*TERT*) Gen (Innes et al. 2022; Stickel et al. 2020; Buch et al. 2023).

In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus zwischen der *PNPLA3*-I148M-Mutation und einem gesteigerten HCC-Risiko mithilfe CRISPR/Cas9 generierter Hepatoma Zelllinien weiter aufgeschlüsselt. Zudem wurde der rs13702 CC-Genotyp im *LPL*-Gen als protektiver Faktor und zwei Polymorphismen im *SAMM50*-Gen als nicht unabhängige Risikofaktoren in der HCC-Entwicklung im Kontext der ALD identifiziert.

Im Hinblick auf die MASLD und ALD standen in den letzten Jahren vor allem genetische Risikofaktoren im Fokus, die zu metabolischen Störungen führen (Levene und Goldin 2012). Als spezifische genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer ALD sind Variationen in Genen identifiziert worden, die eine Rolle in der Neurotransmission oder dem Metabolismus von Alkohol übernehmen, wie beispielsweise den Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA), die zytosolische Alkohol-Dehydrogenase (ADH) oder die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) betreffend. Ebenso wurden Gene untersucht, welche die Präferenz gegenüber dem Alkoholkonsum modulieren, die in oxidativen Stress involviert sind und Variation in Genen, die für die hepatische Lipidspeicherung wichtig sind (Stickel und Hampe 2012). Die Risikofaktoren für ALD können zusammen mit denen für MASLD synergistisch wirken (Hagström et al. 2024). Auch können Gen-Variationen, die in Übergewicht und das metabolische Syndrom involviert sind, die HCC-Inzidenz und die Mortalität bei Vorliegen einer ALD steigern

(Idalsoaga et al. 2020). Andere Studien konnten in diesem Zusammenhang eine signifikant additive Interaktion zwischen MASLD und dem Alkoholkonsum auf das HCC-Risiko nachweisen. Dabei kam es zu einem schrittweise gesteigerten HCC-Risiko ausgehend von der MASLD, über MetALD bis hin zur ALD im Vergleich zur Nicht-MASLD (Yun et al. 2024). Generell muss bedacht werden, dass die Entwicklung der MASLD und ALD über einen längeren Zeitraum durch Umweltfaktoren, wie den Alkoholkonsum und die Ernährung, beeinflusst wird (Rinella und Sookoian 2024; Day 2006). Da diese in der medizinischen Praxis nicht immer eindeutig rückwirkend über Jahre nachzuvollziehen sind, lassen sich die MASLD und ALD nicht immer klar voneinander abgrenzen.

Hinsichtlich ihrer Pathophysiologie weisen ALD und MASLD viele Gemeinsamkeiten auf, wie beispielsweise das Vorliegen einer bestehenden Lebersteatose. Auch wenn sich Studien mit der Unterscheidung beider Erkrankungen, beispielsweise anhand phänotypischer Fibrose *Scores*, beschäftigen (Fukushima et al. 2024), tragen beide Erkrankungen durch die Gemeinsamkeiten in ihrer Pathophysiologie über ähnliche Mechanismen zum HCC-Risiko bei (Hagström et al. 2024). Dies hat dazu geführt, dass sich immer mehr Studien der Untersuchung bereits mit MASLD assoziierter Polymorphismen im Kontext einer ALD gewidmet haben. Beispielsweise konnte bereits für *PNPLA3* und *TM6SF2* gezeigt werden, dass diese Gene sowohl das Risiko für MASLD als auch für die Alkohol-assoziierte Zirrhose und das alkoholische HCC erhöhen; auch der genetische Faktor *HSD17B13* moduliert das Risiko, wobei er eine protektive Wirkung aufweist (Carlsson et al. 2020). Die *PNPLA3*-I148M-Mutation hat unter anderem durch ihre Auswirkungen auf die Leberverfettung (Johnson et al. 2024), die bei beiden Krankheiten eine Rolle spielt, und ihre Häufigkeit einen besonders starken Einfluss auf die Krankheitsentstehung.

Durch GWAS wurden in den letzten Jahren viele Risikofaktoren identifiziert, die nicht direkt mit den bekannten pathophysiologischen Wegen, die zur Entstehung der beiden Krankheiten führen, assoziiert sind. Diese können mit der ALD und MASLD über bisher unbekannte Pathomechanismen assoziiert sein, was sie gleichermaßen relevant für beide Erkrankungen macht (Stickel und Hampe 2012).

Im Rahmen einer GWAS wurde genetische Variation im *SAMM50*-Gen mit dem Risiko für MASLD (Kitamoto et al. 2013; Li et al. 2021) und HCC (Wang et al. 2021b) in Verbindung gebracht, was einen Einfluss der Varianten auf das HCC-Risiko auch bei Patienten mit

ALD nahelegt. Obwohl die Träger beider *SAMM50*-Minorallele in den hier durchgeführten Untersuchungen ein gesteigertes Risiko für HCC gezeigt haben, kam es zu einem Verlust der Assoziation mit dem HCC-Risiko in der multivariaten Analyse (Abschnitt 3.3.1). Dies kann anhand der Ergebnisse darauf zurückgeführt werden, dass das Vorhandensein des *PNPLA3*-148M-Risikoallels mit dem Tragen der jeweiligen *SAMM50*-Minorallele korreliert. Genetische Variation im *SAMM50*-Gen wurde bereits als unabhängiger Risikofaktor für MASLD beschrieben. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass diese Studien Patientenkohorten mit japanischen Individuen (Kitamoto et al. 2013) sowie Han-Chinesen (Li et al. 2021) eingeschlossen haben. In der hier durchgeführten Studie waren hingegen ausschließlich Patienten kaukasischer Ethnizität inkludiert. In einer anderen multiethnischen Kohorte war die genetische Variation nur bei japanisch-stämmigen Amerikanern und lateinamerikanischen Individuen mit dem HCC-Risiko assoziiert, nicht jedoch bei Amerikanern kaukasischer Ethnizität oder Amerikanern afrikanischer Abstammung (Wang et al. 2021b). Es ist bekannt, dass genetische Risikofaktoren von der Ethnizität abhängig sind. Beispielsweise ist die *PNPLA3*-I148M-Mutation am häufigsten bei lateinamerikanischen Individuen, gefolgt von Amerikanern europäischer und Amerikanern afrikanischer Abstammung, zu finden (Romeo et al. 2008). Ebenso kann es auch zu ethnischen Unterschieden in Hinblick auf das LD verschiedener Polymorphismen kommen (Ng et al. 2004).

Basierend auf den Ergebnissen kann daher vermutet werden, dass es sich bei *SAMM50* um keinen universellen, sondern um einen vom ethnischen Hintergrund abhängigen Risikofaktor, handelt. In der hier untersuchten Patientenkohorte mit kaukasischen Individuen liegen beide Polymorphismen gekoppelt mit der *PNPLA3*-148M-Variante vor, weshalb sich diese nicht als Biomarker für das Alkohol-assoziierte HCC eignen. Mechanistisch befinden sich die hier untersuchten *SAMM50*-Polymorphismen in Bereichen, die für Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen kodieren. Daher kann ein Einfluss auf die Genexpression vermutet werden. Es ist denkbar, dass es im pathologischen Kontext zu einer Hochregulation von Genen kommt, die durch die Anwesenheit der jeweiligen Minor-Allele verhindert wird. Dies wird beispielsweise durch Studien unterstützt, die für beide Polymorphismen gezeigt haben, dass sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und mit den *SAMM50*-Expressionsleveln in adipösem Gewebe assoziiert sind (Wang et al. 2021b). Für den *LPL* rs13702

Polymorphismus konnte eine Hochregulation im pathologischen Kontext in Patienten mit MASLD gezeigt werden (Ghodsian et al. 2021). In Übereinstimmung damit konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Steigerung der LPL-Menge bei Vorliegen einer Alkohol-assoziierten Zirrhose nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.5). Diese Steigerung ist abhängig vom vorliegenden Genotyp: in Abhängigkeit der Anzahl der C-Allele kommt es zu einer schrittweisen Steigerung der Expression. Unter dem Gesichtspunkt des protektiven Effekts der rs13702 CC-Variante hinsichtlich des HCC-Risikos bei der MASLD (Ghodsian et al. 2021) und der ALD (Abschnitt 3.2.1) führt dies zu der Annahme, dass eine gesteigerte LPL-Expression vor der HCC-Entwicklung schützen kann. Zudem hebt dies die Bedeutung des Polymorphismus in der Entwicklung metabolischer Lebererkrankungen hervor.

Als Hauptquelle der LPL-Expression konnten, in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Studien (Teratani et al. 2019), HSC identifiziert werden. Auf Basis der fibrogenetischen Rolle der HSC kann vermutet werden, dass den Lipidstoffwechsel beeinflussende Polymorphismen pro-fibrotische Mechanismen in HSC modulieren könnten. Dies könnte sich damit auch auf die Tumorigenese auswirken. Studien zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung von HSC metabolisch reguliert ist (Trivedi et al. 2021) und dass auch die *PNPLA3*-I148M-Mutation einen Einfluss auf die pro-fibrotische Aktivität in HSC hat (Bruschi et al. 2017). Das *PNPLA3*-Protein übt in HSC und Hepatozyten verschiedene Funktionen aus und ist unterschiedlich metabolisch reguliert. Speziell in Hepatozyten ist die *PNPLA3*-I148M-Mutation hauptsächlich in den Triglyceridstoffwechsel involviert. Dies konnte auch in den hier durchgeführten Studien an den neu generierten Hepatoma Zelllinien mit der *PNPLA3*-148M-Mutation hinsichtlich einer gesteigerten Einlagerung von Triglyceriden verifiziert werden (Abschnitt 3.1.3).

Neben HSC sind LSEC eine weitere Quelle von LPL (Abschnitt 3.2.6). Bei Anwesenheit freier Fettsäuren kommt es in LSEC zu einer Beeinflussung von Genen, die in den Lipidmetabolismus und inflammatorische Prozesse involviert sind. Dies führt zu einer Inhibition der Chemokin-Sekretion und zu einer verminderten inflammatorischen Zellrekrutierung durch LSEC. Daraus lässt sich ein kompensatorischer Mechanismus ableiten, welcher der Leberschädigung entgegenwirkt (McMahan et al. 2016). Bei Vorliegen einer Lebererkrankung kann es zu Beeinträchtigungen der physiologischen

Funktion der LSEC inklusive transkriptionellen Veränderungen kommen, die im Falle des *LPL*-Gens der weiteren Krankheitsentwicklung entgegenwirken können.

Die *LPL*-Expression konnte durch Einsatz des PPAR γ Agonisten Pioglitazon in HSC weiter gesteigert werden (Abschnitt 3.2.7), was vorher bereits in Nagetieren für Adipozyten (Schoonjans et al. 1996), Leber und Dünndarm (Niho et al. 2003) gezeigt werden konnte. LPL könnte daher ein Bindeglied zwischen der Einnahme von PPAR γ -Agonisten und dem reduzierten Auftreten von HCC in Mäusen (Shen et al. 2012) und Menschen (Plaz Torres et al. 2022) sein. Da PPAR γ neben seinem Einfluss auf die LPL-Expression über andere Mechanismen Auswirkungen auf die HCC-Entstehung hat, wie beispielsweise durch die Beeinflussung der Lipidsynthese oder der Zytokin-Sekretion (Zhao et al. 2024), wurden Untersuchungen mit dem speziellen LPL-Induktor NO-1886 durchgeführt. Dieser stimuliert die Synthese von LPL, ohne dabei die PPAR-Aktivität zu beeinflussen (Niho et al. 2005). Im Mausmodell konnte der Agonist ähnliche Effekte wie Pioglitazon erzielen, was ebenfalls Evidenz für eine spezifische Rolle der LPL-Expression in der Hepatokarzinogenese liefert (Takasu et al. 2012).

Aktuelle therapeutische Ansätze im Hinblick auf die LPL-Expression zielen auch auf Proteine ab, die an der intrinsischen Regulation von LPL beteiligt sind und somit zu einer Veränderung der Sekretion und Aufnahme verschiedener Lipoproteine führen können. Hierzu gehören beispielsweise *Angiopoietin-like* (ANGPTL) Proteine und Apolipoproteine wie APOC3 (Tomlinson et al. 2024).

Die Rolle von LPL in der fortgeschrittenen Lebererkrankung und der Mechanismus, durch welchen es über die Hochregulation zu einer verringerten hepatischen Tumorigenese beiträgt, ist bisher unbekannt. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Folgen der LPL-Expression im Menschen und in Tieren unterscheiden, wie dies auch für PNPLA3 der Fall ist. Für PNPLA3 kann dies vor allem auf Unterschiede in der Sequenzhomologie (Smagris et al. 2015), der Expression (Lake et al. 2005) und Regulation (Dubuquoy et al. 2011) zurückgeführt werden.

In den hier durchgeführten Studien konnte ein vorteilhafter Effekt der *LPL high producer* Variante hinsichtlich der HCC-Entwicklung im Kontext einer ALD gezeigt werden. Im Gegensatz dazu kam es in einem murinen MASH Modell zu einer Reduktion der hepatischen Fibrose bei einem *knockout* von LPL (Teratani et al. 2019). Hierbei müssen jedoch die Unterschiede in der verwendeten Spezies (Maus vs. Mensch) sowie im

experimentellen Design in Bezug auf das Krankheitsmodell (MASH vs. ALD) und das Stadium der Krankheit (Fibrose vs. HCC) beachtet werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass ein *knockout* des Gens, welcher in einer vollständigen Abwesenheit des Proteins resultiert, andere Auswirkungen zur Folge hat als eine Herunterregulation in der Expression. Da mit einem LPL *knockout* geborene Mäuse nach der Geburt nur wenige Stunden überleben (Weinstock et al. 1995), eignet sich das Modell nicht für weitere Untersuchungen. In einem anderen Mausmodell, in welchem LPL spezifisch in Hepatozyten ausgeschaltet wurde, kam es zu keiner Veränderung des Leberfettgehaltes (Liu et al. 2016), was darauf hindeuten würde, dass die LPL-Expression in Hepatozyten eher nicht mit Lebererkrankungen assoziiert ist. Es ist aber wahrscheinlich, dass es mit einem *knockout* lediglich in Hepatozyten nicht möglich ist, die Komplexität der LPL-Defizienz Gewebe-übergreifend darzustellen.

Insgesamt ist es vorstellbar, dass es im Kontext einer MASLD und ALD zu einer LPL-Hochregulation als Kompensationsmechanismus pathologischer Veränderungen im Lipidmetabolismus kommt, was dann zu einer Reduktion des hepatischen Fettgehalts, der Lipotoxizität, sowie der HCC-Entwicklung führt. Dies würde erklären, weshalb Menschen mit genetisch bedingter hoher LPL-Produktion in gewissen Umfang vor einem gesteigerten hepatischen Fettgehalt und damit einhergehend vor der Entwicklung einer MASLD oder der Entstehung eines HCC geschützt sind. Schneider und Ko-Autoren (Schneider et al. 1985) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass es zu einer Steigerung der LPL-Expression bei chronischem Alkoholkonsum kommt. Veränderungen der LPL-Level im pathologischen Kontext werden auch durch Ergebnisse von Pardina und Ko-Autoren (Pardina et al. 2009) unterstützt, die eine stark gesteigerte LPL-Aktivität und mRNA-Expression in adipösen Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen nachweisen konnten. Im Anschluss an eine bariatrische Operation kam es bei den Patienten anschließend zu einer Reduktion der LPL-Enzymaktivität und der Genexpression. Im Zellmodell zeigte eine Steigerung der LPL-Expression Auswirkungen auf den Lebermetabolismus im Kontext einer MASLD und MASH (Teratani et al. 2019). Andere Studien haben hingegen ergeben, dass eine Hochregulation von LPL im Kontext einer chronischen Alkoholfuhr nicht in der Lage ist, die gesteigerten Mengen an Chylomikronen und VLDL-Partikel unter diesen Bedingungen zu metabolisieren (Schneider et al. 1985).

LPL befindet sich hauptsächlich auf Endothelzellen und ist dort unter anderem an der Hydrolyse von Triglyceriden beteiligt (Li et al. 2014). In Anwesenheit der rs13702 Minorvariante kommt es zu einer Akkumulation des Proteins und einer gesteigerten Enzymaktivität. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass das C-Allel im rs13702 Locus in der generellen Bevölkerung einen Einfluss auf TAG- und HDL-Cholesterin-Level hat. Dabei kann die Assoziation zwischen der *LPL* rs13702 CC-Variante und TAG-Leveln durch die Aufnahme mehrfach (Richardson et al. 2011) und einfach ungesättigter Fettsäuren (Corella et al. 2014) weiter gesteigert werden.

Es ist vorstellbar, dass die Minorvariante das HCC-Risiko mechanistisch nicht direkt über Vorgänge in der Leber reduziert, sondern indirekt über die Beeinflussung des Lipidmetabolismus. Dabei kommt es zu einem veränderten Fettgehalt von Lipoproteinen, die in die Leber aufgenommen werden. Auf Populationsebene konnte eine signifikante Assoziation zwischen der rs13702 CC-Variante und dem TAG- und Cholesterin-Spiegel aufgezeigt werden (Schmalz et al. 2023). Ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Leberverfettung wurde jedoch verfehlt, was auf weitere Umwelteinflüsse wie die Art der Ernährung zurückzuführen sein könnte. In der hier in dieser Arbeit untersuchten Kohorte war der Einfluss der rs13702 CC-Variante auf die Serumlipidlevel niedrig (Abschnitt 3.2.4), was auf die kleinere Gruppengröße zurückzuführen sein könnte. Jedoch zeigte sich hinsichtlich GGT eine Reduktion und die Leberverfettung war vermindert, sodass ein Einfluss direkt auf den hepatischen Lipidmetabolismus vermutet werden kann. Zusätzlich dazu konnte eine gesteigerte hepatische Expression in Abhängigkeit des *LPL* rs13702 Genotyps und bei Vorliegen einer ALD gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass zumindest ein Teil der pathophysiologischen Vorgänge in der Leber stattfindet.

Neben der *LPL* rs13702 CC-Variante sind weitere Polymorphismen mit dem Lipidmetabolismus assoziiert wie die *PNPLA3*-I148M-Mutation sowie genetische Varianten im *TM6SF2* und *APOE* Gen (Yuan et al. 2008).

Die *PNPLA3*-I148M-Mutation wurde bereits in verschiedenen Studien mit einer gesteigerten Leberverfettung im Menschen assoziiert (Romeo et al. 2010; Valenti et al. 2010). In Folge der Mutation kommt es zu einer reduzierten Hydrolase Aktivität (Huang et al. 2011) und zu einer gesteigerten LPAAT-Aktivität (Kumari et al. 2012), was die TAG Synthese fördert. Auf Zellebene konnte eine erhöhte Akkumulation von Triglyceriden in PLC/PRF/5 Zellen nachgewiesen werden, die jeweils mit einem für die *PNPLA3*-M148I-

Variante und für die *PNPLA3*-I148M-Mutation kodierenden lentiviralen Plasmid transduziert wurden (Nischalke et al., unpubliziert).

Mithilfe des lentiviralen Plasmids wird die jeweilige *PNPLA3*-Variante nach Aufnahme und Integration des Plasmids in das Wirtsgenom zusätzlich zur endogenen *PNPLA3*-Expression exprimiert. Die residuale endogene Expression kann jedoch zur Artefaktbildung führen und pro-onkogene Einflüsse des lentiviralen Vektors auf das Wirtsgenom (Schlimgen et al. 2016) können die Zellen in ihrer Funktion beeinflussen. Ebenso kommt es durch die fehlende Regulation unter dem viralen Promoter zu einer konstitutiven, oft auch unphysiologisch hohen Expression des *PNPLA3*-Gens (Delzor et al. 2013; Harvey et al. 2009). Um die genetische Integration in den Zellen dauerhaft sicher zu stellen, müssen sie zudem mit Selektionsantibiotika kultiviert werden, was Einfluss auf die Viabilität und den Metabolismus nehmen kann (Skubis et al. 2017; Ferreira et al. 2010). Aus diesem Grund haben Modelle, in welcher die *PNPLA3*-Expression endogen beeinflusst wird, immer mehr an Bedeutung gewonnen. Beispielsweise haben bereits Luukkonen und Ko-Autoren (Luukkonen et al. 2019) mit CRISPR/Cas9 transfizierten epidermoiden Karzinoma A431 Zellen an der Untersuchung des *PNPLA3*-Polymorphismus gearbeitet. Die Expression von *PNPLA3* ist jedoch abhängig vom jeweiligen Zelltyp (Hoekstra et al. 2010) und zeigt eine besondere Relevanz in Hepatozyten, beispielsweise im Hinblick auf die Verfettung. In diesem Zusammenhang konnte in Experimenten von Kabbani und Ko-Autoren (Kabbani et al. 2022) nachgewiesen werden, dass es nur bei der Expression der *PNPLA3*-I148M-Mutation in Hepatozyten, nicht jedoch in Adipozyten, zu einer hepatischen Steatose kommt. Aus diesem Grund wurden in jüngster Zeit auch die Hepatoma Zelllinien HepG2 (Chen et al. 2023) und Hep3B (Sherman et al. 2024) mit der Wildtyp- beziehungsweise Mutationsvariante des *PNPLA3*-Gens transfiziert.

In dieser Arbeit wurde erstmals die *PNPLA3*-148M-Mutation in die PLC/PRF/5 Zelllinie eingebracht, zusammen mit der *PNPLA3*-148I-Variante in HepG2 Zellen, die zur Verifizierung der Ergebnisse dienten (Abschnitt 3.1.1). Da in dem verwendeten Modell das *PNPLA3*-Gen in Hepatoma Zellen spezifisch auf Genebene adressiert wurde, konnte die erhöhte Akkumulation von Triglyceriden nun auch auf Basis der endogenen Expression verifiziert werden.

Auch weitere Polymorphismen sind sowohl mit dem Lebermetabolismus als auch mit der Entstehung hepato-biliärer Erkrankungen assoziiert. Neben der *PNPLA3*-I148M-Variante ist beispielsweise das rs58542926 T-Allel im *TM6SF2* Gen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MASLD, einer fortschreitenden Leberverfettung und dem Stadium der Fibrose assoziiert (Li et al. 2022). Auch das rs187429064 G Allel im *TM6SF2* Gen ist bei Patienten mit HCC im Vergleich zu Patienten ohne HCC häufiger und korreliert mit einem erhöhten Leberfettgehalt. Das rs429358 C-Allel im *APOE* Gen hingegen geht mit einem verminderten Leberfettgehalt einher und senkt das Risiko für HCC in Patienten mit Zirrhose (Innes et al. 2022).

Die Assoziation der protektiven *LPL* rs13702 CC-Variante und weiterer Risikofaktoren für HCC speziell mit der Leberverfettung hebt letztere als wichtigen Faktor im Hinblick auf das Krankheitsrisiko hervor. Da alle oben genannten Polymorphismen einen Einfluss auf die Leberverfettung als gemeinsames Merkmal aufweisen, deutet dies auf einen gemeinsamen Weg hin, über den das HCC-Risiko durch die Leberverfettung beeinflusst wird. Es ist vorstellbar, dass die positive Auswirkung des *LPL* rs13702 Polymorphismus auf die Leberverfettung durch das homozygote Vorliegen der *PNPLA3*-I148M-Mutation deshalb aufgehoben wird (Abschnitt 3.2.2), da beide Gene über die gleichen Signalwege auf die Verfettung und die Krankheitsentstehung wirken. Dabei zeigt die *PNPLA3*-I148M-Mutation stärkere Auswirkungen, was in der Aufhebung des protektiven Effekts durch die *LPL*-Variante resultiert.

Mechanistisch kommt es im Falle der *PNPLA3*-I148M-Mutation zu einer Resistenz gegenüber der Ubiquitinylierung als Zwischenschritt vor dem Abbau des Proteins (BasuRay et al. 2019). Auch wurde gezeigt, dass das mutierte *PNPLA3*-Protein eine größere Proteinstabilität aufweist und eine höhere Tendenz hat, auf Lipidtropfen zu akkumulieren (Johnson et al. 2024). Als Folgereaktion der Akkumulation konkurriert das Protein mit der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) um die Bindung des Co-Faktors *Comparative Gene Identification-58* (CGI-58), was zu einer verminderten ATGL gesteuerten Lipolyse führt (BasuRay et al. 2019; Wang et al. 2019). Andere Studien haben am Hefe-Modell *Pichia pastoris* gezeigt, dass es unter dem Einfluss der Mutation zu einem Verlust der Lipase- und der LPAAT-Aktivität kommt und darauf basierend eine *loss of function* Mutation vermutet (Pingitore et al. 2014). Ein Verlust der enzymatischen Lipase

Aktivität wurde in strukturellen Modellen belegt (He et al. 2010) und im Zellmodell gezeigt (He et al. 2010; Luukkonen et al. 2019).

In dieser Arbeit konnte einhergehend mit den Studien von BasuRay und Ko-Autoren (BasuRay et al. 2019) eine gesteigerte Akkumulation von PNPLA3 unter Einfluss der 148M-Mutation gezeigt werden (Abschnitt 3.1.2). Es ist wahrscheinlich, dass die Unterschiede in der Proteinexpression pathophysiologische Auswirkungen haben können, wie beispielsweise auf die für die Lipolyse von TAG wichtige ATGL (BasuRay et al. 2019; Wang et al. 2019). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass es im Rahmen der *PNPLA3-I148M*-Mutation auch zu einem enzymatischen Funktionsverlust kommt. Die oben genannten Studien vermuten eine *loss of function* Mutation einerseits basierend auf den phänotypischen Gemeinsamkeiten wie beispielsweise der Lipidakkumulation, die sowohl bei der *PNPLA3-148M*-Variante und als auch bei einem *knockout* von PNPLA3 beobachtet wird. Auf der anderen Seite zeigten Luukkonen und Ko-Autoren auch, dass die *PNPLA3-148M*-Variante die Lebertriglyceride in Richtung einer polyungesättigten Zusammensetzung hin umgestaltet, indem sie die Hydrolyse oder Transacylierung von PUFA aus DAG hemmt (Luukkonen et al. 2019). Wie die durch die *PNPLA3-I148M*-Mutation hervorgerufene Leberverfettung dann zum erhöhten HCC-Risiko beiträgt, ist bisher nur unzureichend verstanden.

Zu den Faktoren, die die HCC-Entwicklung begünstigen und potenziell auf genetische Variation zurückzuführen sind, zählen beispielsweise oxidativer Stress durch einen erhöhten Fettsäuregehalt sowie das Vorliegen einer chronischen Inflammation (Llovet et al. 2021). Im Falle der *PNPLA3-I148M*-Mutation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von Lipidträgern zu einer erhöhten Akkumulation von Triglyceriden in Hepatozyten kommt, zusammen mit einer erhöhten CXCL-8 Sekretion (Abschnitt 3.1.4). und vermehrtem oxidativem Stress (Abschnitt 3.1.5).

Die Zunahme des oxidativen Stresses in den Zellen mit der *PNPLA3-148M*-Mutation war zum einen auf eine gesteigerte allgemeine ROS-Bildung in den Zellen mit der Mutation zurückzuführen. Zum anderen war das DNA-Reparaturenzym OGG-1 hochreguliert, welches in HCC-Patienten deutlich höher exprimiert ist als in gesunden Individuen (Zhang et al. 2022). Dies stützt die These, dass erhöhter oxidativer Stress ein mögliches Bindeglied zwischen der *PNPLA3-I148M*-Mutation und einem erhöhten HCC-Risiko darstellen kann. Neben der übermäßigen Produktion von ROS können die anti-oxidativen

Kapazitäten der Zellen eine Rolle hinsichtlich der durch die ROS-Bildung induzierten Schäden und dem HCC-Risiko spielen (Chen et al. 2020). Caon und Ko-Autoren (Caon et al. 2024) haben bei Anwesenheit der *PNPLA3*-148M-Mutation in HSC neben einer gesteigerten ROS-Sekretion eine reduzierte anti-oxidative Kapazität nachweisen können. In derselben Studie war 4-HNE in HSC mit der *PNPLA3*-148M-Mutation erhöht, was in der vorliegenden Arbeit auch in Hepatozyten gezeigt werden konnte. Somit könnten auch veränderte anti-oxidative Kapazitäten in Hepatozyten in Abhängigkeit der *PNPLA3*-148M-Mutation das HCC-Risiko beeinflussen.

Hinsichtlich des *LPL* rs13702 Polymorphismus konnte in murinen Studien gezeigt werden, dass es zu einer Erhöhung der LPL-Konzentration in Makrophagen bei Anwesenheit von ROS kommt (Renier et al. 1996). Es ist daher auch gut möglich, dass der erhöhte oxidative Stress bei ALD auch an der Hochregulation von LPL beteiligt ist.

Langanhaltender oxidativer Stress kann dazu führen, dass die enzymatische Funktion von OGG-1 eingeschränkt ist und das Enzym blockiert wird, wodurch über die Bindung des Transaktivators NF- κ B pro-inflammatorische Signalwege aktiviert werden können (Vlahopoulos et al. 2023). Auch weitere an der DNA-Reparatur beteiligte Enzyme, *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) und *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) sind in der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Chen et al., 2015; Tang et al., 2018) involviert. Basierend auf dem bekannten Zusammenhang zwischen *PNPLA3* und einer erhöhten CXCL-8 Sekretion wurde eine Beteiligung dieser Enzyme vermutet, was von Nischalke und Ko-Autoren in Inhibitionsexperimenten bestätigt werden konnte (Nischalke et al., unpubliziert). Dies führt zu der Annahme, dass auch OGG-1 als eine Komponente des DNA-Reparaturapparates zu der erhöhten CXCL-8 Sekretion beitragen könnte.

Eine Erhöhung der CXCL-8 Sekretion konnte bereits *in vivo* in Patientenseren und *in vitro* mit lentiviral transduzierten Hepatoma Zelllinien in Anwesenheit der Mutation gezeigt werden und nun auch im hier verwendeten Zellmodell auf endogener Ebene verifiziert werden.

Es ist vorstellbar, dass ebenso die veränderte Expression des LPL-Proteins im Kontext der rs13702 Variante zu Veränderungen inflammatorischer Prozesse führt, die sich auf das HCC-Risiko auswirken. Obwohl LPL auch in Leukozyten exprimiert wird, sind dessen pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften noch nicht vollständig entschlüsselt (Chang 2019) und vermutlich abhängig vom Zelltyp und der Lipidumgebung.

Als potenzielles Verbindungselement zwischen der Triglyceridakkumulation und der Erhöhung des oxidativen Stresses in den Zellen wurden Nox vermutet, die durch ihre ROS-Sekretion zu einer pro-oxidativen Umgebung beitragen können. Es ist vorstellbar, dass es durch die verminderte Aktivierung der ATGL in Anwesenheit der *PNPLA3-I148M*-Mutation zu einer verminderten Produktion freier Fettsäuren kommt. Diese fungieren als Liganden für PPAR, deren Expression in verschiedenen Studien mit der Aktivierung der Nox in Verbindung gebracht wurde (Inoue et al. 2001; Kang et al. 2019; Teissier et al. 2004), einhergehend mit einer veränderten ROS-Sekretion (Teissier et al. 2004). Interessanterweise konnte 4-HNE, welches als natürlicher Aktivator verschiedener PPAR-Isotypen wirkt, die Expression von Nox im Zellmodell erhöhen (Manea et al. 2015). Es ist denkbar, dass es durch die Hochregulation der Nox zur Bildung von 4-HNE kommt, welches dann über einen Rückkopplungsmechanismus die Nox-Expression erneut steigern kann.

In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nox-1 und Nox-3 in Hepatoma Zelllinien bei Vorliegen der *PNPLA3-148M*-Variante erhöht ist, was auf eine mögliche Rolle bei der Entstehung des HCC hinweist (Abschnitt 3.1.6). Nox-1 und Nox-3 sind beide zwar grundsätzlich nur in geringem Maße in der Leber exprimiert (Cheng et al. 2001), konnten jedoch im Falle von Nox-1 in HSC (Piccoli et al. 2007), LSEC und Hepatozyten (Matsumoto et al. 2018) und im Falle von Nox-3 in der Hepatoma Zelllinie HepG2 nachgewiesen werden (Kikuchi et al. 2000).

Eine Steigerung der *Nox-1* Expression auf Genebene im Rahmen der HCC-Entwicklung konnte von Eun und Ko-Autoren beobachtet werden (Eun et al. 2017). Darüber hinaus wurde in Patienten mit HCC die erhöhte *Nox-1* Expression negativ mit dem *recurrence free survival* (RFS) (Eun et al. 2017) assoziiert und als unabhängiger Faktor für ein verkürztes generelles Überleben identifiziert (Ha et al. 2016). Dies hebt die Bedeutung der *Nox-1* Expression in der HCC-Entwicklung hervor, was auch durch die hier generierten Ergebnisse gestützt wird.

Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur keine Hinweise auf Veränderungen von *Nox-3* auf Genebene im Kontext des HCC (Eun et al. 2017), was auf eine fehlende spezifische Rolle hindeuten würde. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass in den Studien lediglich die mRNA-Expression untersucht wurde. Im Hinblick auf die PLC/PRF/5 Zellen konnte in den hier durchgeführten Studien eine erhöhte *Nox-3* Expression auf

Proteinebene nachgewiesen werden, obwohl die mRNA-Expression sich nahe der Nachweisgrenze bewegte. Die Ergebnisse deuten damit auf eine potenzielle Rolle der Nox-3 Expression in der HCC-Entwicklung im Kontext der *PNPLA3*-I148M-Mutation hin. Die in dieser Arbeit nachgewiesene höhere Expression von Nox-1 im Vergleich zu Nox-3 sowie die Daten aus der Literatur lassen jedoch insgesamt die stärkste Beteiligung am HCC-Risiko durch diese Isoform vermuten.

Im Hinblick auf Nox-2 ergab sich für die PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen kein einheitliches Bild, wobei die geringe Expression von Nox-2 in die Interpretation mit einbezogen werden muss. Nox-2 wurde bereits mit dem HCC-Risiko in Verbindung gebracht, wird jedoch vor allem in Phagozyten exprimiert (Bode et al. 2023). Somit lassen die Ergebnisse nicht auf einen spezifischen Einfluss von Nox-2 für die Entwicklung des HCC unter Einfluss der 148M-Mutation schließen.

Insgesamt konnten mit dem hier verwendeten CRISPR/Cas9 generierten *in vitro* Modell wichtige am Pathomechanismus der 148M-Mutation beteiligte Komponenten untersucht werden. Durch Verwendung von zwei verschiedenen Hepatoma Zelllinien (PLC/PRF/5 und HepG2) konnten Zelllinien-spezifische Auswirkungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Jedoch muss beachtet werden, dass im Falle der HepG2 Zellen nur ein Zellklon mit der Wildtypvariante von *PNPLA3* erhalten wurde, sodass klonale Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Da sich der Zellklon jedoch phänotypisch wie erwartet verhalten hat und Indels im Bereich der homologen Rekombination mithilfe von Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten, ist die Wahrscheinlichkeit klonaler Effekte insgesamt als gering einzuschätzen. Die Etablierung geeigneter *in vitro* Modelle ist im Hinblick auf die *PNPLA3*-I148M-Mutation sehr wichtig, da sich, ebenso wie bei LPL, die Auswirkungen im Menschen und Tier unterscheiden.

Generell ist die Geneditierung in primären Hepatozyten und Hepatoma Zelllinien schwierig, da die Zellen aneuploid sind (Duncan et al. 2012). Beispielsweise ist die hier in dieser Arbeit verwendete PLC/PRF/5 Zelllinie triploid für Chromosom 22, was die Einbringung der *PNPLA3*-148M-Mutation auf allen drei vorhandenen Chromosomen aufwändig macht (Simon et al. 1982). Weiterhin sind bei Krebszelllinien oft Genominstabilitäten, wie sie häufig beim HCC vorkommen (Hung et al. 2024), zu beobachten, die auch während der Kultivierung auftreten und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gefährden können. Dem kann man entgegenwirken, indem die Zellen nur über

einen zuvor festgelegten Zeitraum kultiviert werden. Nichtsdestotrotz sind Veränderungen im Genom wahrscheinlich, speziell auch durch die Generierung der Einzelzellklone im Anschluss an die limitierende Verdünnung, in welcher die Zellen viele Teilungsschritte durchlaufen. Die Unterschiede der PLC/PRF/5 *PNPLA3*^{MUT} Zellklone im Gegensatz zu den Wildtyp-Klonen waren in Abhängigkeit des betrachteten Zellklones verschieden stark ausgeprägt, was auf eine interzelluläre Variabilität hindeutet. Trotz unterschiedlicher Ausprägungen kam es jedoch bei allen untersuchten *PNPLA3*^{MUT} Zellklonen in beiden Zelllinien zu einem ähnlichen Verhalten, welches daher spezifisch auf die 148M-Mutation zurückgeführt werden kann. Eine Ausnahme stellte die CXCL-8 Sekretion dar, bei der es im Hinblick auf die PLC/PRF/5 Zelllinien nur einen *PNPLA3*^{MUT} Zellklon gab, dessen Ergebnisse reproduzierbar waren. Bei den anderen untersuchten *PNPLA3*^{MUT} Zellklonen ergab sich kein einheitlicher Trend, wobei die Ursache der Schwankungen nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Es kann vermutet werden, dass die erhöhte CXCL-8 Sekretion unter dem Einfluss der Mutation in den Klonen zeitlich beschränkt oder durch bisher unbekannte Faktoren beeinflusst ist. Ebenso könnte die unterschiedliche Anzahl an Teilungsschritten, welche die Zellklone durchlaufen haben, eine Rolle spielen. Auch in lentiviral mit der *PNPLA3*-148M-Mutation transduzierten Hepatoma Zelllinien ging die Induzierbarkeit von CXCL-8 insbesondere in hohen Passagen teilweise verloren (Nischalke et al., unpublizierte Daten). Dies ist möglicherweise auf eine Erschöpfung (*exhaustion*) der Zellen zurückzuführen, die sich im Laufe der Zeit entwickelt. Die nachgewiesenen *in vivo* erhöhten CXCL-8 Serumspiegel in Trägern der *PNPLA3*-148M-Variante sprechen jedoch insgesamt gegen eine artifizielle Hochregulation in den generierten Klonen.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Veränderungen hinsichtlich der in dieser Arbeit untersuchten Komponenten in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps von *PNPLA3* nicht zwangsläufig auf einen kausalen Zusammenhang mit der erhöhten CXCL-8 Sekretion hindeuten. Um mit Sicherheit eine Beteiligung feststellen zu können, ist daher der Einsatz von Inhibitoren oder *small interfering RNA* (siRNA) gegen die Komponenten des propagierten Pathomechanismus nötig. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt, wobei die durchgeführten Experimente bezüglich der CXCL-8 Sekretion zu keinen konsistenten und im Hinblick auf den Genotyp einheitlichen, positiven oder negativen Ergebnissen, geführt haben. In Zukunft könnte daher als Ergebnis die Messung

einer stabileren Komponente des PNPLA3 Signalweges herangezogen werden, beispielsweise 4-HNE. Insgesamt wurden in dieser Arbeit jedoch bisher unbekannte Bestandteile des PNPLA3-Pathomechanismus identifiziert, die wahrscheinlich zu einem erhöhten HCC- Risiko beitragen.

Für die Untersuchung der hepatischen *LPL*-mRNA-Expression standen Gewebeproben zur Verfügung, wobei die Korrelation zur den rs13702 Genotypen aufgrund der limitierten Probenanzahl je nach Genotyp lediglich auf einer kleinen Stichprobe basierte. Auch im Hinblick auf die Proteinexpression im Gewebe stand nur eine begrenzte Probenanzahl zur Verfügung, weshalb hier auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde. Allerdings wurde eine höhere *LPL*-Expression bereits bei Trägern eines C-Allels in Nicht-Lebergewebe beschrieben (Ghodsian et al. 2021). Aufgrund der Tatsache, dass nur etwa 10 % aller Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose zwei C-Allele tragen, stellt die Analyse von einer höheren Zahl an humanen Leberproben eine Herausforderung dar.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die genetische Variation bei *LPL* rs13702 nicht kausal mit dem HCC zusammenhängen könnte, sondern nur in Verbindung mit dem tatsächlich assoziierten Faktor steht. Mechanistische Studien sind aufgrund der verschiedenen *LPL*-Phänotypen in Maus und Mensch schwierig. Da *LPL* jedoch im Lebergewebe von Patienten mit ALD hochreguliert war und die Expressionswerte mit der Anzahl der rs13702 C-Allele korrelierten, ist es sehr wahrscheinlich, dass *LPL* bei fortgeschrittener ALD pathophysiologisch entscheidend beteiligt ist.

In Hinblick auf das HCC-Risiko konnte in dieser Studie kein additiver Effekt bezogen auf die Anzahl der *LPL* rs13702 C-Allele nachgewiesen werden. Studien, die einen additiven Effekt auf die Blutfettwerte zeigen, umfassten mehr als 27,000 (Richardson et al. 2013) beziehungsweise 7,100 (Corella et al. 2014) Personen. Daher ist es naheliegend, dass die Stichprobenanzahl zu gering war, um einen additiven Effekt nachzuweisen.

Die Ergebnisse des *LPL*- und *SAMM50*-Polymorphismus basieren auf einer Fall-Kontroll-Studie. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Individuen in Zukunft ein HCC entwickeln werden oder ein HCC entwickelt hätten, wenn sie nicht aus anderen Gründen vorher gestorben wären. Dies könnte nur durch eine prospektive Studie erreicht werden, in welcher Patienten zu Beginn ihrer Leberzirrhose-Diagnose inkludiert werden. Auf Grund der langen Dauer einer solchen Studie und der relativ geringen Zahl

an Patienten, die letztlich ein HCC entwickeln, ist eine solche prospektive Studie praktisch sehr schwer durchzuführen.

Weiterführend sollte der Einsatz von Agonisten und Antagonisten gegen die hier untersuchten Elemente im PNPLA3-Signalweg weiterverfolgt werden, um auf eine sichere Beteiligung am Pathomechanismus der 148M-Mutation schließen zu können. Dies würde langfristig neue Therapiemöglichkeiten für Patienten mit der *PNPLA3*-148M-Mutation eröffnen, beispielsweise durch den Einsatz spezieller Nox-Inhibitoren. Analog zum *LPL*-Polymorphismus sollten Gewebeproben von Patienten mit und ohne Lebererkrankung im Kontext der Mutation untersucht und auf Einzellzebene analysiert werden, um die Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren. Da es sich bei Lebergewebe um eine heterogene Mischung verschiedener Zelltypen handelt, könnte die Methode der Einzelzell-RNA-Sequenzierung mit der Quantifizierung der Proteinexpression kombiniert werden (*cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing*, CITE-Seq).

Weitere Untersuchungen im Hinblick auf den *LPL* rs13702 Polymorphismus könnten eine Messung der intrahepatischen *LPL*-Aktivität berücksichtigen, um die funktionellen Auswirkungen der jeweiligen Genotypen stärker mit der Entwicklung des HCC in Verbindung zu bringen. Da die *LPL*-Expression auf Zellebene nachweisbar war und moduliert werden konnte, bietet sich zur Untersuchung auch der Einsatz eines *in vitro* Modells an. Hierbei könnten beispielsweise LX-2 Zellen mittels CRISPR/Cas9 hinsichtlich der *LPL* rs13702 Variante geneditiert werden.

Bezüglich der untersuchten *SAMM50*-Polymorphismen lassen Studien einen Einfluss der genetischen Variation auf Individuen nicht-kaukasischer Ethnizität vermuten. Daher sollten weitere Untersuchungen zur Entwicklung des HCC im Zusammenhang mit der ALD an Nicht-Kaukasiern durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Für die Untersuchung der *PNPLA3*-I148M-Mutation wurden im Hauptprojekt der Arbeit PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen mit der Mutationsvariante beziehungsweise Wildtypvariante des *PNPLA3*-Gens transfiziert. Als Ergebnis wurden im Hinblick auf die PLC/PRF/5 Zellen drei *PNPLA3*^{MUT} Klone und für die HepG2 Zellen ein *PNPLA3*^{WT} Klon erhalten. Zunächst konnte mit dem Modell das bekannte phänotypische Erscheinungsbild der Mutation, eine erhöhte Triglycerid Akkumulation und CXCL-8 Sekretion, auf Basis der endogenen *PNPLA3*-Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten mit dem Modell weitere, an der Pathophysiologie des Polymorphismus beteiligte Elemente identifiziert werden. Auf Basis der erhöhten *PNPLA3*-Expression unter dem Einfluss der Mutation wurde vermutet, dass es durch die dadurch bedingte Akkumulation von Triglyceriden zu einer Hochregulation der Nox kommt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nox-1 und Nox-3 auf Proteinebene unter dem Einfluss der Mutation vermehrt exprimiert werden. Im Einklang damit kam es zur erhöhten Entstehung von ROS, zu einer gesteigerten Anwesenheit des DNA-Reparaturenzyms OGG-1, sowie der Entstehung oxidativer Addukte wie 4-HNE. Es ist vorstellbar, dass die erhöhte CXCL-8 Sekretion in den Zellen mit der 148M-Mutation auf die pro-oxidative Umgebung und die damit verbundenen DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen ist. Insgesamt lassen die Ergebnisse auf einen Einfluss von Nox und oxidativen Mechanismen auf das erhöhte HCC-Risiko im Kontext der *PNPLA3*-I148M-Mutation schließen.

Die rs13702 Minorvariante im *LPL*-Gen konnte als protektiver Faktor im Hinblick auf die HCC-Entwicklung bei Vorliegen einer ALD identifiziert werden. Es liegt nahe, dass der protektive Effekt durch Veränderungen in der Expression auf Protein- und mRNA-Ebene zustande kommt, welche durch pathologische Veränderungen induziert wird. Entgegen den Erwartungen wurden nicht Hepatozyten, sondern HSC und LSEC als Hauptquelle für die *LPL*-Expression identifiziert. Die Expression von *LPL* konnte auch durch den PPAR γ Agonisten Pioglitazon moduliert werden, sodass *LPL* ein potenzielles Ziel für therapeutische Interventionen darstellt.

In der hier untersuchten Kohorte kaukasischer Individuen erwiesen sich die SNP rs3761472 und rs3827385 im *SAMM50*-Gen als nicht unabhängige Faktoren für das HCC-Risiko im Kontext einer ALD. Grund dafür ist die Kopplung mit der *PNPLA3*-148M-Mutation, die einen unabhängigen Einfluss der Polymorphismen ausschließt.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Leberstruktur mit beteiligten Zelltypen	18
Abb. 2 Graphische Darstellung des <i>LPL</i> -Gens mit proximalen Promoterelementen.....	27
Abb. 3 Interaktion des rs13702 T-Allels und des rs13702 C-Allels im 3'UTR des <i>LPL</i> -Lokus mit der miR410.....	29
Abb. 4 Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Designs, inklusive gRNA, ssODN und PAM-Sequenz am Beispiel der PLC/PRF/5 Zellen (<i>PNPLA3</i> -I148M)..	40
Abb. 5 Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie für die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (A) und mit Fluoreszenzfarbstoffen (B).	52
Abb. 6 Genotypisierungsergebnisse der PLC/PRF/5 und HepG2 Zellklone.....	43
Abb. 7 Sequenzierungsergebnisse der mit CRISPR/Cas9 modifizierten PLC/PRF/5 Zellen.....	57
Abb. 8 Sequenzierungsergebnisse der mit CRISPR/Cas9 modifizierten HepG2 Zellen, einschließlich der untransfizierten Kontrolle (A) und des HepG2 Zellklons mit der neu eingebrachten <i>PNPLA3</i> ^{WT} Variante (Klon 401, B).....	58
Abb. 9 <i>PNPLA3</i> -Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen.....	59
Abb. 10 Akkumulation von Lipidtropfen in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen unter dem Einfluss der <i>PNPLA3</i> -148M-Variante.....	61
Abb. 11 CXCL-8 Sekretion in den PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen nach Stimulation mit den Lipidträgern FCS und HSA.....	62
Abb. 12 ROS-Sekretion in den (A) PLC/PRF/5 und (B) HepG2 Zellen nach vierstündiger Stimulation mit 250 µM Arachidonsäure, 250 µM tBHP und 5 mM NAC.....	63
Abb. 13 Durchflusszytometrische Analyse der OGG-1 Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen.....	64
Abb. 14 4-HNE Expression in PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen.....	65
Abb. 15 <i>Nox</i> -Genexpression in den PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen.....	66
Abb. 16 Proteinexpression von <i>Nox</i> 1, 2 und 3 in den PLC/PRF/5 (A-C) und den HepG2 (D-F) Zellen.....	67
Abb. 17 Häufigkeit der homozygoten <i>LPL</i> CC-Variante in verschiedenen Studienkohorten	69
Abb. 18 Untersuchung des <i>LPL</i> -Genotyps in Assoziation mit der <i>PNPLA3</i> -148M-Mutation.....	70

Abb. 19 Graphische Darstellung der Leberverfettung, sowie verschiedener Lipidparameter und Leberenzyme in Patienten mit Alkohol-assoziiierter Zirrhose unter Berücksichtigung des <i>LPL</i> rs13702 Genotyps	72
Abb. 20 <i>LPL</i> -mRNA- (A, B) und <i>LPL</i> -Protein-Expression (C) im humanen Lebergewebe.	74
Abb. 21 <i>LPL</i> -Proteinexpression in verschiedenen Zelltypen.	75
Abb. 22 <i>LPL</i> -mRNA-Expression in PLC/PRF/5 und LX-2 Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit 10 μ M Pioglitazon.	76
Abb. 23 Prozentualer Anteil der <i>SAMM50</i> rs3827385 TC/CC (A) und rs3761472 AG/GG (B) Genotypen in den Studienkohorten.	78
Abb. 24 Anteil an Trägern der <i>SAMM50</i> rs3827385 Risikovariante (A) und der rs3761472 Risikovariante (B), die auch ein <i>PNPLA3</i> -148M-Risikoallel tragen	79

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Auflistung der verwendeten Geräte, inklusive Bezugsquelle	31
Tab. 2 Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien, inklusive Bezugsquelle und Katalognummer (K.-Nr.)	32
Tab. 3 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, inklusive Bezugsquelle.....	33
Tab. 4 Auflistung der verwendeten Kits, inklusive Bezugsquelle	34
Tab. 5 Auflistung der verwendeten Software, inklusive Entwickler	34
Tab. 6 Auflistung der verwendeten Zellen und Zellkulturmedien, inklusive Bezugsquelle und K.- Nr.....	35
Tab. 7 Auflistung der für die Kultivierung verwendeten Zelllinien, der benötigten Zellzahl für eine 75cm ² Zellkulturflasche sowie der benötigten Medien, inklusive Zusätze	37
Tab. 8 Für das CRISPR/Cas9-System benötigte Sequenzen des ssODN und der gRNA	39
Tab. 9 Reaktionsprotokoll für die Transfektion mit Lipofectamin 3000 (Angabe pro well).....	42
Tab. 10 Für die Genotypisierung eingesetzte Reagenzien, inklusive Volumenangabe..	43
Tab. 11 Verwendete Light SNiP Sonden mit spezifischen Schmelztemperaturen für die jeweiligen Allele.....	43
Tab. 12 Für die Sequenzierungs-PCR verwendete Primer, inklusive dazugehöriger Sequenzen und Länge des amplifizierten Fragments.	44
Tab. 13 Für die quantitative PCR eingesetzte Reagenzien, mit Volumenangabe.....	44
Tab. 14 Bestandteile des 1,6 %-igen Agarose-Gels, inklusive eingesetzter Menge und Bezugsquelle.....	45
Tab. 15 Auflistung der verwendeten Primer für die qPCR, inklusive Sequenzangabe und Länge	46
Tab. 16 Auflistung der verwendeten Primärantikörper für den Western Blot, inklusive Antigenität, K.-Nr. und Bezugsquelle	48
Tab. 17 Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper für den Western Blot, inklusive zugehörigen Primärantikörpern, K.-Nr. und Bezugsquelle	48
Tab. 18 Eingesetzte Primär- und gekoppelte Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich der Antigenität, K.-Nr. und Bezugsquelle	50

Tab. 19 Eingesetzter Sekundärantikörper für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich K.-Nr. und Bezugsquelle	50
Tab. 20 Eingesetzte Stimuli für den <i>NileRed</i> - und DCFDA-Assay, inklusive eingesetzter Endkonzentration, K.-Nr. und Bezugsquelle	51
Tab. 21 Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe für die durchflusszytometrische Analyse, einschließlich eingesetzter Endkonzentration, K.-Nr. und Bezugsquelle.....	51
Tab. 22 Regressionsanalyse potenzieller HCC-Risikofaktoren.....	71

8. Literaturverzeichnis

(1) [Der Titel "Human Protein Atlas, 2024" kann nicht dargestellt werden. Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Internetdokument - Feld "Autor" ist leer | Feld "Herausgeber" ist leer | Feld "Institution" ist leer" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]

(2) Abudu, Yakubu Princely; Shrestha, Birendra Kumar; Zhang, Wenxin; Palara, Anthimi; Brenne, Hanne Britt; Larsen, Kenneth Bowitz et al. (2021): SAMM50 acts with p62 in piecemeal basal- and OXPHOS-induced mitophagy of SAM and MICOS components. In: *The Journal of cell biology* 220 (8). DOI: 10.1083/jcb.202009092.

(3) Angelidi, Angeliki M.; Belanger, Matthew J.; Kokkinos, Alexander; Koliaki, Chrysi C.; Mantzoros, Christos S. (2022): Novel Noninvasive Approaches to the Treatment of Obesity: From Pharmacotherapy to Gene Therapy. In: *Endocrine reviews* 43 (3), S. 507–557. DOI: 10.1210/endrev/bnab034.

(4) Armstrong, Jeffrey S.; Khmour, Omar; Hecht, Sidney M. (2010): Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (7), S. 2152–2163. DOI: 10.1096/fj.09-143222.

(5) Axley, Page; Ahmed, Zunirah; Ravi, Sujana; Singal, Ashwani K. (2018): Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. In: *Journal of clinical and translational hepatology* 6 (1), S. 79–84. DOI: 10.14218/JCTH.2017.00067.

(6) BasuRay, Soumik; Smagris, Eriks; Cohen, Jonathan C.; Hobbs, Helen H. (2017): The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (4), S. 1111–1124. DOI: 10.1002/hep.29273.

(7) BasuRay, Soumik; Wang, Yang; Smagris, Eriks; Cohen, Jonathan C.; Hobbs, Helen H. (2019): Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (19), S. 9521–9526. DOI: 10.1073/pnas.1901974116.

(8) Belkina, Anna C.; Denis, Gerald V. (2010): Obesity genes and insulin resistance. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17 (5), S. 472–477. DOI: 10.1097/MED.0b013e32833c5c48.

- (9) Beutler, Bryce D.; Ulanja, Mark B.; Krishan, Rohee; Aluru, Vijay; Ndukwu, Munachismo L.; Hagen, Molly M. et al. (2020): Sociodemographic Characteristics as Predictors of Outcomes in Hepatocellular Carcinoma: A Retrospective Cohort Study. In: *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 27 (1), 1073274820956615. DOI: 10.1177/1073274820956615.
- (10) Björntorp, P. (1997): Hormonal control of regional fat distribution. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 12 Suppl 1, S. 21–25. DOI: 10.1093/humrep/12.suppl_1.21.
- (11) Bode, Kevin; Hauri-Hohl, Mathias; Jaquet, Vincent; Weyd, Heiko (2023): Unlocking the power of NOX2: A comprehensive review on its role in immune regulation. In: *Redox biology* 64, S. 102795. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102795.
- (12) Bruschi, Francesca V.; Tardelli, Matteo; Herac, Merima; Claudel, Thierry; Trauner, Michael (2020a): Metabolic regulation of hepatic PNPLA3 expression and severity of liver fibrosis in patients with NASH. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 40 (5), S. 1098–1110. DOI: 10.1111/liv.14402.
- (13) Bruschi, Francesca Virginia; Tardelli, Matteo; Claudel, Thierry; Trauner, Michael (2017): PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. In: *Hepatic medicine : evidence and research* 9, S. 55–66. DOI: 10.2147/HMER.S125718.
- (14) Bruschi, Francesca Virginia; Tardelli, Matteo; Einwallner, Elisa; Claudel, Thierry; Trauner, Michael (2020b): PNPLA3 I148M Up-Regulates Hedgehog and Yap Signaling in Human Hepatic Stellate Cells. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228711.
- (15) Buch, Stephan; Innes, Hamish; Lutz, Philipp Ludwig; Nischalke, Hans Dieter; Marquardt, Jens U.; Fischer, Janett et al. (2023): Genetic variation in TERT modifies the risk of hepatocellular carcinoma in alcohol-related cirrhosis: results from a genome-wide case-control study. In: *Gut* 72 (2), S. 381–391. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327196.
- (16) Caon, Elisabetta; Martins, Maria; Hodgetts, Harry; Blanken, Lieke; Vilia, Maria Giovanna; Levi, Ana et al. (2024): Exploring the impact of the PNPLA3 I148M variant on

primary human hepatic stellate cells using 3D extracellular matrix models. In: *Journal of hepatology* 80 (6), S. 941–956. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.01.032.

(17) Carlsson, Björn; Lindén, Daniel; Brolén, Gabriella; Liljeblad, Mathias; Bjursell, Mikael; Romeo, Stefano; Loomba, Rohit (2020): Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 51 (12), S. 1305–1320. DOI: 10.1111/apt.15738.

(18) Chang, Chuchun L. (2019): Lipoprotein lipase: new roles for an 'old' enzyme. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 22 (2), S. 111–115. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000536.

(19) Chen, Yidan; Mo, Liqin; Wang, Xuan; Chen, Bi; Hua, Yunfen; Gong, Linyan et al. (2020): TPGS-1000 exhibits potent anticancer activity for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. In: *Aging* 12 (2), S. 1624–1642. DOI: 10.18632/aging.102704.

(20) Chen, Yunzhi; Yan, Xuemei; Wang, Tian; Deng, Hongrong; Deng, Xiaojie; Xu, Fen; Liang, Hua (2023): PNPLA3 148M/M Is More Susceptible to Palmitic Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Apoptosis in HepG2 Cells. In: *International journal of endocrinology* 2023, S. 2872408. DOI: 10.1155/2023/2872408.

(21) Cheng, G.; Cao, Z.; Xu, X.; van Meir, E. G.; Lambeth, J. D. (2001): Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. In: *Gene* 269 (1-2), S. 131–140. DOI: 10.1016/s0378-1119(01)00449-8.

(22) Corella, Dolores; Sorlí, Jose V.; Estruch, Ramon; Coltell, Oscar; Ortega-Azorín, Carolina; Portolés, Olga et al. (2014): MicroRNA-410 regulated lipoprotein lipase variant rs13702 is associated with stroke incidence and modulated by diet in the randomized controlled PREDIMED trial. In: *The American journal of clinical nutrition* 100 (2), S. 719–731. DOI: 10.3945/ajcn.113.076992.

(23) Dalglish, Angus G.; O'Byrne, Ken (2006): Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. In: *Cancer treatment and research* 130, S. 1–38.

(24) Das, Avash; Cheng, Haili; Wang, Yang; Kinch, Lisa N.; Liang, Guosheng; Hong, Sen et al. (2024): The ubiquitin E3 ligase BFAR promotes degradation of PNPLA3. In:

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 121 (6), e2312291121. DOI: 10.1073/pnas.2312291121.

(25) Day, C. P. (2006): Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26 (9), S. 1021–1028. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01323.x.

(26) Deeb, S. S.; Peng, R. L. (1989): Structure of the human lipoprotein lipase gene. In: *Biochemistry* 28 (10), S. 4131–4135. DOI: 10.1021/bi00436a001.

(27) Delzor, Aurélie; Escartin, Carole; Déglon, Nicole (2013): Lentiviral vectors: a powerful tool to target astrocytes in vivo. In: *Current drug targets* 14 (11), S. 1336–1346. DOI: 10.2174/13894501113146660213.

(28) Dubuquoy, Céline; Robichon, Céline; Lasnier, Françoise; Langlois, Clotilde; Dugail, Isabelle; Foulle, Fabienne et al. (2011): Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. In: *Journal of hepatology* 55 (1), S. 145–153. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.024.

(29) Duncan, Andrew W.; Hanlon Newell, Amy E.; Smith, Leslie; Wilson, Elizabeth M.; Olson, Susan B.; Thayer, Matthew J. et al. (2012): Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. In: *Gastroenterology* 142 (1), S. 25–28. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.029.

(30) EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma (2012). In: *Journal of hepatology* 56 (4), S. 908–943.

(31) Eun, Hyuk Soo; Cho, Sang Yeon; Joo, Jong Seok; Kang, Sun Hyung; Moon, Hee Seok; Lee, Eaum Seok et al. (2017): Gene expression of NOX family members and their clinical significance in hepatocellular carcinoma. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11060. DOI: 10.1038/s41598-017-11280-3.

(32) Fanti, Maura; Gramignoli, Roberto; Serra, Monica; Cadoni, Erika; Strom, Stephen C.; Marongiu, Fabio (2017): Differentiation of amniotic epithelial cells into various liver cell types and potential therapeutic applications. In: *Placenta* 59, S. 139–145. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.03.020.

- (33) Feingold, Kenneth R. (2000): Endotext. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Hg. v. Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Marc R. Blackman, Alison Boyce, George Chrousos, Emiliano Corpas, et al. South Dartmouth (MA).
- (34) Ferreira, Marina Beloti; Myiagi, Suely; Nogales, Carlos Goes; Campos, Marcia Sampaio; Lage-Marques, José Luiz (2010): Time- and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. In: *Journal of applied oral science : revista FOB* 18 (3), S. 259–263. DOI: 10.1590/s1678-77572010000300011.
- (35) Fraser, Robin; Cogger, Victoria C.; Dobbs, Bruce; Jamieson, Hamish; Warren, Alessandra; Hilmer, Sarah N.; Le Couteur, David G. (2012): The liver sieve and atherosclerosis. In: *Pathology* 44 (3), S. 181–186. DOI: 10.1097/PAT.0b013e328351bcc8.
- (36) Fujiwara, Naoto; Hoshida, Yujin (2019): Hepatocellular Carcinoma Risk Stratification by Genetic Profiling in Patients with Cirrhosis. In: *Seminars in liver disease* 39 (2), S. 153–162. DOI: 10.1055/s-0039-1681031.
- (37) Fukushima, Masanori; Miyaaki, Hisamitsu; Nakao, Yasuhiko; Sasaki, Ryu; Haraguchi, Masafumi; Takahashi, Kosuke et al. (2024): Characterizing alcohol-related and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease cirrhosis via fibrotic pattern analysis. In: *Scientific reports* 14 (1), S. 23679. DOI: 10.1038/s41598-024-73739-4.
- (38) Garbuzenko, Dmitry Victorovich (2022): Pathophysiological mechanisms of hepatic stellate cells activation in liver fibrosis. In: *World journal of clinical cases* 10 (12), S. 3662–3676. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i12.3662.
- (39) Ghodsian, Nooshin; Abner, Erik; Emdin, Connor A.; Gobeil, Émilie; Taba, Nele; Haas, Mary E. et al. (2021): Electronic health record-based genome-wide meta-analysis provides insights on the genetic architecture of non-alcoholic fatty liver disease. In: *Cell reports. Medicine* 2 (11), S. 100437. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100437.
- (40) Gibert-Ramos, Albert; Sanfeliu-Redondo, David; Aristu-Zabalza, Peio; Martínez-Alcocer, Ana; Gracia-Sancho, Jordi; Guixé-Muntet, Sergi; Fernández-Iglesias, Anabel (2021): The Hepatic Sinusoid in Chronic Liver Disease: The Optimal Milieu for Cancer. In: *Cancers* 13 (22). DOI: 10.3390/cancers13225719.

- (41) Goran, Michael I.; Walker, Ryan; Le, Kim-Anne; Mahurkar, Swapna; Vikman, Susanna; Davis, Jaimie N. et al. (2010): Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents. In: *Diabetes* 59 (12), S. 3127–3130. DOI: 10.2337/db10-0554.
- (42) Guillaud, Olivier; Dumortier, Jérôme; Couchonnal-Bedoya, Eduardo; Ruiz, Mathias (2023): Wilson Disease and Alpha1-Antitrypsin Deficiency: A Review of Non-Invasive Diagnostic Tests. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 13 (2). DOI: 10.3390/diagnostics13020256.
- (43) Gunn, Kathryn H.; Neher, Saskia B. (2023): Structure of dimeric lipoprotein lipase reveals a pore adjacent to the active site. In: *Nature communications* 14 (1), S. 2569. DOI: 10.1038/s41467-023-38243-9.
- (44) Ha, Sang Yun; Paik, Yong-Han; Yang, Jung Wook; Lee, Min Ju; Bae, Hyunsik; Park, Cheol-Keun (2016): NADPH Oxidase 1 and NADPH Oxidase 4 Have Opposite Prognostic Effects for Patients with Hepatocellular Carcinoma after Hepatectomy. In: *Gut and liver* 10 (5), S. 826–835. DOI: 10.5009/gnl15543.
- (45) Hagström, Hannes; Hegmar, Hannes; Moreno, Christophe (2024): Interactions between the metabolic syndrome and alcohol consumption increases the risk of liver disease. In: *United European gastroenterology journal* 12 (2), S. 168–176. DOI: 10.1002/ueg2.12524.
- (46) Hahm, Ja Young; Park, Jongyeun; Jang, Eun-Sook; Chi, Sung Wook (2022): 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. In: *Experimental & molecular medicine* 54 (10), S. 1626–1642. DOI: 10.1038/s12276-022-00822-z.
- (47) Harvey, Alan R.; Hellström, Mats; Rodger, Jenny (2009): Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway. In: *Progress in brain research* 175, S. 151–161. DOI: 10.1016/S0079-6123(09)17510-6.
- (48) He, Shaoqing; McPhaul, Christopher; Li, John Zhong; Garuti, Rita; Kinch, Lisa; Grishin, Nick V. et al. (2010): A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (9), S. 6706–6715. DOI: 10.1074/jbc.M109.064501.

- (49) Hoekstra, Menno; Li, Zhaosha; Kruijt, J. Kar; van Eck, Miranda; van Berkel, Theo J. C.; Kuiper, Johan (2010): The expression level of non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly influenced by hepatic lipid status. In: *Journal of hepatology* 52 (2), S. 244–251. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.11.004.
- (50) Huang, Yongcheng; Cohen, Jonathan C.; Hobbs, Helen H. (2011): Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (43), S. 37085–37093. DOI: 10.1074/jbc.M111.290114.
- (51) Hung, Jui-Hsiang; Teng, Chiao-Feng; Hung, Hsu-Chin; Chen, Yi-Lin; Chen, Pin-Jun; Ho, Chung-Liang et al. (2024): Genomic instabilities in hepatocellular carcinoma: biomarkers and application in immunotherapies. In: *Annals of hepatology* 29 (6), S. 101546. DOI: 10.1016/j.aohep.2024.101546.
- (52) Idalsoaga, Francisco; Kulkarni, Anand V.; Mousa, Omar Y.; Arrese, Marco; Arab, Juan Pablo (2020): Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities. In: *Frontiers in medicine* 7, S. 448. DOI: 10.3389/fmed.2020.00448.
- (53) Innes, Hamish; Nischalke, Hans Dieter; Guha, Indra Neil; Weiss, Karl Heinz; Irving, Will; Gotthardt, Daniel et al. (2022): The rs429358 Locus in Apolipoprotein E Is Associated With Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. In: *Hepatology communications* 6 (5), S. 1213–1226. DOI: 10.1002/hep4.1886.
- (54) Inoue, N.; Takeshita, S.; Gao, D.; Ishida, T.; Kawashima, S.; Akita, H. et al. (2001): Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. In: *Atherosclerosis* 155 (1), S. 45–52. DOI: 10.1016/s0021-9150(00)00530-x.
- (55) Johnson, Scott M.; Bao, Hanmei; McMahon, Cailin E.; Chen, Yongbin; Burr, Stephanie D.; Anderson, Aaron M. et al. (2024): PNPLA3 is a triglyceride lipase that mobilizes polyunsaturated fatty acids to facilitate hepatic secretion of large-sized very low-density lipoprotein. In: *Nature communications* 15 (1), S. 4847. DOI: 10.1038/s41467-024-49224-x.

- (56) Kabbani, Mohammad; Michailidis, Eleftherios; Steensels, Sandra; Fulmer, Clifton G.; Luna, Joseph M.; Le Pen, Jérémie et al. (2022): Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid non-alcoholic fatty liver disease development in chimeric mice. In: *Cell reports* 40 (11), S. 111321. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111321.
- (57) Kang, Eun Sil; Hwang, Jung Seok; Lee, Won Jin; Lee, Gyeong Hee; Choi, Mi-Jung; Paek, Kyung Shin et al. (2019): Ligand-activated PPAR δ inhibits angiotensin II-stimulated hypertrophy of vascular smooth muscle cells by targeting ROS. In: *PloS one* 14 (1), e0210482. DOI: 10.1371/journal.pone.0210482.
- (58) Karkucinska-Wieckowska, Agnieszka; Simoes, Ines C. M.; Kalinowski, Piotr; Lebedzinska-Arciszewska, Magdalena; Zieniewicz, Krzysztof; Milkiewicz, Piotr et al. (2022): Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: A complex relationship. In: *European journal of clinical investigation* 52 (3), e13622. DOI: 10.1111/eci.13622.
- (59) Kietzmann, Thomas; Petry, Andreas; Shvetsova, Antonina; Gerhold, Joachim M.; Görlach, Agnes (2017): The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. In: *British journal of pharmacology* 174 (12), S. 1533–1554. DOI: 10.1111/bph.13792.
- (60) Kikuchi, H.; Hikage, M.; Miyashita, H.; Fukumoto, M. (2000): NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. In: *Gene* 254 (1-2), S. 237–243. DOI: 10.1016/s0378-1119(00)00258-4.
- (61) Kitamoto, Takuya; Kitamoto, Aya; Yoneda, Masato; Hyogo, Hideyuki; Ochi, Hidenori; Nakamura, Takahiro et al. (2013): Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. In: *Human genetics* 132 (7), S. 783–792. DOI: 10.1007/s00439-013-1294-3.
- (62) Kozlitina, Julia; Sookoian, Silvia (2024): Global Epidemiological Impact of PNPLA3 I148M on Liver Disease. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. DOI: 10.1111/liv.16123.

- (63) Kumari, Anni; Kristensen, Kristian K.; Ploug, Michael; Winther, Anne-Marie Lund (2021): The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis. In: *Biomedicines* 9 (7). DOI: 10.3390/biomedicines9070782.
- (64) Kumari, Manju; Schoiswohl, Gabriele; Chitraju, Chandramohan; Paar, Margret; Cornaciu, Irina; Rangrez, Ashraf Y. et al. (2012): Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. In: *Cell metabolism* 15 (5), S. 691–702. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.008.
- (65) Lake, Andrew C.; Sun, Ying; Li, Jian-Liang; Kim, Jae Eun; Johnson, Jeremy W.; Li, Dongmei et al. (2005): Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. In: *Journal of lipid research* 46 (11), S. 2477–2487. DOI: 10.1194/jlr.M500290-JLR200.
- (66) Lee, Jung Hoon; Giannikopoulos, Petros; Duncan, Stephen A.; Wang, Jian; Johansen, Christopher T.; Brown, Jonathan D. et al. (2011): The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. In: *Nature medicine* 17 (7), S. 812–815. DOI: 10.1038/nm.2347.
- (67) Lefterova, Martina I.; Haakonsson, Anders K.; Lazar, Mitchell A.; Mandrup, Susanne (2014): PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25 (6), S. 293–302. DOI: 10.1016/j.tem.2014.04.001.
- (68) Lemos, Fernanda de Oliveira; Florentino, Rodrigo M.; Lima Filho, Antônio Carlos Melo; Dos Santos, Marcone Loiola; Leite, M. Fatima (2019): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the liver: Expression and function. In: *World journal of gastroenterology* 25 (44), S. 6483–6494. DOI: 10.3748/wjg.v25.i44.6483.
- (69) Lent-Schochet, Daniella; Jialal, Ishwarlal (2024): StatPearls. Biochemistry, Lipoprotein Metabolism. Treasure Island (FL).
- (70) Levene, Adam P.; Goldin, Robert D. (2012): The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. In: *Histopathology* 61 (2), S. 141–152. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x.
- (71) Li, Xue-Ying; Liu, Zheng; Li, Li; Wang, Hai-Jun; Wang, Hui (2022): TM6SF2 rs58542926 is related to hepatic steatosis, fibrosis and serum lipids both in adults and

children: A meta-analysis. In: *Frontiers in endocrinology* 13, S. 1026901. DOI: 10.3389/fendo.2022.1026901.

(72) Li, Yuan; He, Ping-Ping; Zhang, Da-Wei; Zheng, Xi-Long; Cayabyab, Fracisco S.; Yin, Wei-Dong; Tang, Chao-Ke (2014): Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 237 (2), S. 597–608. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.016.

(73) Li, Zuyin; Shen, Weixing; Wu, Gang; Qin, Changjiang; Zhang, Yijie; Wang, Yupeng et al. (2021): The role of SAMM50 in non-alcoholic fatty liver disease: from genetics to mechanisms. In: *FEBS open bio* 11 (7), S. 1893–1906. DOI: 10.1002/2211-5463.13146.

(74) Liao, Chuyao; Di Wang; Qin, Siyuan; Zhang, Ying; Chen, Jie; Xu, Ruijie et al. (2022): Inflammatory-Dependent Bidirectional Effect of Bile Acids on NLRP3 Inflammasome and Its Role in Ameliorating CPT-11-Induced Colitis. In: *Frontiers in pharmacology* 13, S. 677738. DOI: 10.3389/fphar.2022.677738.

(75) Liu, Gan; Xu, Jun-Nan; Liu, Dong; Ding, Qingli; Liu, Meng-Na; Chen, Rong et al. (2016): Regulation of plasma lipid homeostasis by hepatic lipoprotein lipase in adult mice. In: *Journal of lipid research* 57 (7), S. 1155–1161. DOI: 10.1194/jlr.M065011.

(76) Liu, Yali; Liu, Tao; Zhao, Xu; Gao, Yanhang (2022): New insights into the bile acid-based regulatory mechanisms and therapeutic perspectives in alcohol-related liver disease. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 79 (9), S. 486. DOI: 10.1007/s00018-022-04509-6.

(77) Llovet, Josep M.; Kelley, Robin Kate; Villanueva, Augusto; Singal, Amit G.; Pikarsky, Eli; Roayaie, Sasan et al. (2021): Hepatocellular carcinoma. In: *Nature reviews. Disease primers* 7 (1), S. 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.

(78) Lotfollahzadeh, Saran; Recio-Boiles, Alejandro; Babiker, Hani M. (2024): StatPearls. Liver Cancer(Archived). Treasure Island (FL).

(79) Luukkonen, Panu K.; Nick, Auli; Hölttä-Vuori, Maarit; Thiele, Christoph; Isokuortti, Elina; Lallukka-Brück, Susanna et al. (2019): Human PNPLA3-I148M variant increases hepatic retention of polyunsaturated fatty acids. In: *JCI insight* 4 (16). DOI: 10.1172/jci.insight.127902.

- (80) Manea, Adrian; Manea, Simona-Adriana; Todirita, Andra; Albulescu, Irina Cristina; Raicu, Monica; Sasson, Shlomo; Simionescu, Maya (2015): High-glucose-increased expression and activation of NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells is mediated by 4-hydroxynonenal-activated PPAR α and PPAR β/δ . In: *Cell and tissue research* 361 (2), S. 593–604. DOI: 10.1007/s00441-015-2120-0.
- (81) Martínez-Torres, Dilan; Maldonado, Valentina; Pérez-Gallardo, Cristian; Yañez, Rodrigo; Candia, Valeria; Kalaidzidis, Yannis et al. (2024): Phenotypic characterization of liver tissue heterogeneity through a next-generation 3D single-cell atlas. In: *Scientific reports* 14 (1), S. 2823. DOI: 10.1038/s41598-024-53309-4.
- (82) Matsumoto, Misaki; Zhang, Jia; Zhang, Xueqing; Liu, Junjie; Jiang, Joy X.; Yamaguchi, Kanji et al. (2018): The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Free radical biology & medicine* 115, S. 412–420. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.019.
- (83) McMahan, Rachel H.; Porsche, Cara E.; Edwards, Michael G.; Rosen, Hugo R. (2016): Correction: Free Fatty Acids Differentially Downregulate Chemokines in Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Insights into Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *PloS one* 11 (12), e0168301. DOI: 10.1371/journal.pone.0168301.
- (84) Mitsche, Matthew A.; Hobbs, Helen H.; Cohen, Jonathan C. (2018): Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 promotes transfer of essential fatty acids from triglycerides to phospholipids in hepatic lipid droplets. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (18), S. 6958–6968. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002333.
- (85) Monroy-Ramirez, Hugo Christian; Galicia-Moreno, Marina; Sandoval-Rodriguez, Ana; Meza-Rios, Alejandra; Santos, Arturo; Armendariz-Borunda, Juan (2021): PPARs as Metabolic Sensors and Therapeutic Targets in Liver Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 22 (15). DOI: 10.3390/ijms22158298.
- (86) Moon, Joon Ho; Kim, Kyuho; Choi, Sung Hee (2022): Lipoprotein Lipase: Is It a Magic Target for the Treatment of Hypertriglyceridemia. In: *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)* 37 (4), S. 575–586. DOI: 10.3803/EnM.2022.402.
- (87) Myers, Shuna; Neyroud-Caspar, Isabelle; Spahr, Laurent; Gkouvatsos, Konstantinos; Fournier, Evelyne; Giostra, Emiliano et al. (2021): NAFLD and MAFLD as

emerging causes of HCC: A populational study. In: *JHEP reports : innovation in hepatology* 3 (2), S. 100231. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100231.

(88) Nahon, Pierre; Zucman-Rossi, Jessica (2012): Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. In: *Journal of hepatology* 57 (3), S. 663–674. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.035.

(89) Ng, Maggie C. Y.; Wang, Ying; So, Wing-Yee; Cheng, Suzanne; Visvikis, Sophie; Zee, Robert Y. L. et al. (2004): Ethnic differences in the linkage disequilibrium and distribution of single-nucleotide polymorphisms in 35 candidate genes for cardiovascular diseases. In: *Genomics* 83 (4), S. 559–565. DOI: 10.1016/j.ygeno.2003.09.008.

(90) Niho, Naoko; Mutoh, Michihiro; Takahashi, Mami; Tsutsumi, Kazuhiko; Sugimura, Takashi; Wakabayashi, Keiji (2005): Concurrent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by NO-1886, increasing lipoprotein lipase activity in Min mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8), S. 2970–2974. DOI: 10.1073/pnas.0500153102.

(91) Niho, Naoko; Takahashi, Mami; Shoji, Yutaka; Takeuchi, Yoshito; Matsubara, Satoshi; Sugimura, Takashi; Wakabayashi, Keiji (2003): Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR gamma ligand. In: *Cancer science* 94 (11), S. 960–964. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01385.x.

(92) Nischalke, Hans Dieter; Lutz, Philipp; Bartok, Eva; Krämer, Benjamin; Langhans, Bettina; Frizler, Regina et al. (2019): The PNPLA3 I148M variant promotes lipid-induced hepatocyte secretion of CXC chemokines establishing a tumorigenic milieu. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 97 (11), S. 1589–1600. DOI: 10.1007/s00109-019-01836-3.

(93) Nischalke, Hans Dieter; Schmalz, Franziska; Buch, Stephan; Fischer, Janett; Möller, Christine; Matz-Soja, Madlen et al. (2022): Genetic Variation of SAMM50 Is Not an Independent Risk Factor for Alcoholic Hepatocellular Carcinoma in Caucasian Patients. In: *International journal of molecular sciences* 23 (23). DOI: 10.3390/ijms232315353.

- (94) Nourazarian, Ali Reza; Kangari, Parisa; Salmaninejad, Arash (2014): Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15 (12), S. 4745–4751. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.12.4745.
- (95) O'Brien, Thomas R.; Yang, Hwai-I; Groover, Sarah; Jeng, Wen-Juei (2019): Genetic Factors That Affect Spontaneous Clearance of Hepatitis C or B Virus, Response to Treatment, and Disease Progression. In: *Gastroenterology* 156 (2), S. 400–417. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.09.052.
- (96) Ott, Christine; Ross, Katharina; Straub, Sebastian; Thiede, Bernd; Götz, Monika; Goosmann, Christian et al. (2012): Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. In: *Molecular and cellular biology* 32 (6), S. 1173–1188. DOI: 10.1128/MCB.06388-11.
- (97) Panday, Arvind; Sahoo, Malaya K.; Osorio, Diana; Batra, Sanjay (2015): NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. In: *Cellular & molecular immunology* 12 (1), S. 5–23. DOI: 10.1038/cmi.2014.89.
- (98) Pardina, Eva; Baena-Fustegueras, Juan A.; Llamas, Rafael; Catalán, Roberto; Galard, Rosa; Lecube, Albert et al. (2009): Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis. In: *Obesity surgery* 19 (5), S. 608–616. DOI: 10.1007/s11695-009-9827-5.
- (99) Park, Se-Jun; Shon, Dong-Hyun; Kim, Jae-Hyun; Ryu, Yang-Hwan; Ko, Yong (2022): SAMM50 Regulates Thermogenesis of Beige Adipocytes Differentiated from Human Adipose-Derived Stem Cells by Balancing Mitochondrial Dynamics. In: *International journal of molecular sciences* 23 (12). DOI: 10.3390/ijms23126764.
- (100) Peinado-Onsurbe, J.; Soler, C.; Soley, M.; Llobera, M.; Ramírez, I. (1992): Lipoprotein lipase and hepatic lipase activities are differentially regulated in isolated hepatocytes from neonatal rats. In: *Biochimica et biophysica acta* 1125 (1), S. 82–89. DOI: 10.1016/0005-2760(92)90159-S.
- (101) Petit, Jean-Michel; Guiu, Boris; Masson, David; Duvillard, Laurence; Jooste, Valerie; Buffier, Perrine et al. (2010): Specifically PNPLA3-mediated accumulation of

liver fat in obese patients with type 2 diabetes. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (12), E430-6. DOI: 10.1210/jc.2010-0814.

(102) Petta, Salvatore; Armandi, Angelo; Bugianesi, Elisabetta (2024): Impact of PNPLA3 I148M on Clinical Outcomes in Patients With MASLD. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. DOI: 10.1111/liv.16133.

(103) Piccoli, Claudia; D'Aprile, Annamaria; Ripoli, Maria; Scrima, Rosella; Lecce, Lucia; Boffoli, Domenico et al. (2007): Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. In: *Biochemical and biophysical research communications* 353 (4), S. 965–972. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.148.

(104) Pingitore, Piero; Pirazzi, Carlo; Mancina, Rosellina M.; Motta, Benedetta M.; Indiveri, Cesare; Pujia, Arturo et al. (2014): Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1841 (4), S. 574–580. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.12.006.

(105) Pingitore, Piero; Romeo, Stefano (2019): The role of PNPLA3 in health and disease. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1864 (6), S. 900–906. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.06.018.

(106) Plaz Torres, Maria Corina; Jaffe, Ariel; Perry, Rachel; Marabotto, Elisa; Strazzabosco, Mario; Giannini, Edoardo G. (2022): Diabetes medications and risk of HCC. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 76 (6), S. 1880–1897. DOI: 10.1002/hep.32439.

(107) Poisson, Johanne; Lemoine, Sara; Boulanger, Chantal; Durand, François; Moreau, Richard; Valla, Dominique; Rautou, Pierre-Emmanuel (2017): Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. In: *Journal of hepatology* 66 (1), S. 212–227. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.009.

(108) Puttahanumantharayappa, Lakshana D.; Sannappa Gowda, Nirmala G.; Shiragannavar, Varsha D.; Santhekadur, Prasanna K. (2021): Origin and properties of hepatocellular carcinoma cell lines. In: *Japanese J Gastroenterol Res* 1 (8). DOI: 10.52768/jjgastro/1040.

- (109) Ramatchandirin, Balamurugan; Pearah, Alexia; He, Ling (2023): Regulation of Liver Glucose and Lipid Metabolism by Transcriptional Factors and Coactivators. In: *Life (Basel, Switzerland)* 13 (2). DOI: 10.3390/life13020515.
- (110) Ranganathan, Gouri; Song, Wei; Dean, Nicholas; Monia, Brett; Barger, Steven W.; Kern, Philip A. (2002): Regulation of lipoprotein lipase by protein kinase C alpha in 3T3-F442A adipocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (41), S. 38669–38675. DOI: 10.1074/jbc.M206917200.
- (111) Renier, G.; Desfaits, A. C.; Lambert, A.; Mikhail, R. (1996): Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. In: *Journal of lipid research* 37 (4), S. 799–809.
- (112) Richardson, Kris; Lai, Chao-Qiang; Parnell, Laurence D.; Lee, Yu-Chi; Ordovas, Jose M. (2011): A genome-wide survey for SNPs altering microRNA seed sites identifies functional candidates in GWAS. In: *BMC genomics* 12, S. 504. DOI: 10.1186/1471-2164-12-504.
- (113) Richardson, Kris; Nettleton, Jennifer A.; Rotllan, Noemi; Tanaka, Toshiko; Smith, Caren E.; Lai, Chao-Qiang et al. (2013): Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. In: *American journal of human genetics* 92 (1), S. 5–14. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.10.020.
- (114) Ricken, T.; Werner, D.; Holzhütter, H. G.; König, M.; Dahmen, U.; Dirsch, O. (2015): Modeling function-perfusion behavior in liver lobules including tissue, blood, glucose, lactate and glycogen by use of a coupled two-scale PDE-ODE approach. In: *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 14 (3), S. 515–536. DOI: 10.1007/s10237-014-0619-z.
- (115) Rinella, Mary E.; Sookoian, Silvia (2024): From NAFLD to MASLD: updated naming and diagnosis criteria for fatty liver disease. In: *Journal of lipid research* 65 (1), S. 100485. DOI: 10.1016/j.jlr.2023.100485.
- (116) Rizzo, Giacomo Emanuele Maria; Cabibbo, Giuseppe; Craxì, Antonio (2022): Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. In: *Viruses* 14 (5). DOI: 10.3390/v14050986.

- (117) Romeo, Stefano; Kozlitina, Julia; Xing, Chao; Pertsemlidis, Alexander; Cox, David; Pennacchio, Len A. et al. (2008): Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. In: *Nature genetics* 40 (12), S. 1461–1465. DOI: 10.1038/ng.257.
- (118) Romeo, Stefano; Sentinelli, Federica; Cambuli, Valentina M.; Incani, Michela; Congiu, Tiziana; Matta, Vanessa et al. (2010): The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. In: *Journal of hepatology* 53 (2), S. 335–338. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.02.034.
- (119) Ruhanen, Hanna; Perttilä, Julia; Hölttä-Vuori, Maarit; Zhou, You; Yki-Järvinen, Hannele; Ikonen, Elina et al. (2014): PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. In: *Journal of lipid research* 55 (4), S. 739–746. DOI: 10.1194/jlr.M046607.
- (120) Rui, Liangyou (2014): Energy metabolism in the liver. In: *Comprehensive Physiology* 4 (1), S. 177–197. DOI: 10.1002/cphy.c130024.
- (121) Schlimgen, Ryan; Howard, John; Wooley, Dawn; Thompson, Maureen; Baden, Lindsey R.; Yang, Otto O. et al. (2016): Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies. In: *Journal of occupational and environmental medicine* 58 (12), S. 1159–1166. DOI: 10.1097/JOM.0000000000000879.
- (122) Schmalz, Franziska; Fischer, Janett; Innes, Hamish; Buch, Stephan; Möller, Christine; Matz-Soja, Madlen et al. (2023): High producer variant of lipoprotein lipase may protect from hepatocellular carcinoma in alcohol-associated cirrhosis. In: *JHEP reports : innovation in hepatology* 5 (4), S. 100684. DOI: 10.1016/j.jhepr.2023.100684.
- (123) Schneider, J.; Liesenfeld, A.; Mordasini, R.; Schubotz, R.; Zöfel, P.; Kubel, F. et al. (1985): Lipoprotein fractions, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in healthy subjects. In: *Atherosclerosis* 57 (2-3), S. 281–291. DOI: 10.1016/0021-9150(85)90040-1.
- (124) Schoonjans, K.; Peinado-Onsurbe, J.; Lefebvre, A. M.; Heyman, R. A.; Briggs, M.; Deeb, S. et al. (1996): PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. In: *The EMBO Journal* 15 (19), S. 5336–5348.

- (125) Sedeek, Mona; Nasrallah, Rania; Touyz, Rhian M.; Hébert, Richard L. (2013): NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24 (10), S. 1512–1518. DOI: 10.1681/ASN.2012111112.
- (126) SEER (2022): Cancer Statistics Review, 1975-2014 - SEER Statistics. Online verfügbar unter https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/index.html, zuletzt aktualisiert am 11.10.2022, zuletzt geprüft am 21.02.2025.
- (127) Sharabi, Kfir; Tavares, Clint D. J.; Puigserver, Pere (2019): Regulation of Hepatic Metabolism, Recent Advances, and Future Perspectives. In: *Current diabetes reports* 19 (10), S. 98. DOI: 10.1007/s11892-019-1224-4.
- (128) Shastry, Barkur S. (2009): SNPs: impact on gene function and phenotype. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 578, S. 3–22. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1_1.
- (129) Shen, B.; Chu, E. S. H.; Zhao, G.; Man, K.; Wu, C-W; Cheng, J. T. Y. et al. (2012): PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. In: *British journal of cancer* 106 (9), S. 1486–1494. DOI: 10.1038/bjc.2012.130.
- (130) Sherman, David J.; Liu, Lei; Mamrosh, Jennifer L.; Xie, Jiansong; Ferbas, John; Lomenick, Brett et al. (2024): The fatty liver disease-causing protein PNPLA3-I148M alters lipid droplet-Golgi dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 121 (18), e2318619121. DOI: 10.1073/pnas.2318619121.
- (131) Shinmura, K.; Yokota, J. (2001): The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. In: *Antioxidants & redox signaling* 3 (4), S. 597–609. DOI: 10.1089/15230860152542952.
- (132) Simon, D.; Aden, D. P.; Knowles, B. B. (1982): Chromosomes of human hepatoma cell lines. In: *International journal of cancer* 30 (1), S. 27–33. DOI: 10.1002/ijc.2910300106.
- (133) Skubis, Aleksandra; Gola, Joanna; Sikora, Bartosz; Hybiak, Jolanta; Paul-Samojedny, Monika; Mazurek, Urszula; Łos, Marek J. (2017): Impact of Antibiotics on the Proliferation and Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem

Cells. In: *International journal of molecular sciences* 18 (12). DOI: 10.3390/ijms18122522.

(134) Smagris, Eriks; BasuRay, Soumik; Li, John; Huang, Yongcheng; Lai, Ka-man V.; Gromada, Jesper et al. (2015): Pnpla3^{I148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61 (1), S. 108–118. DOI: 10.1002/hep.27242.

(135) Sookoian, Silvia; Pirola, Carlos J. (2011): Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (6), S. 1883–1894. DOI: 10.1002/hep.24283.

(136) Sparkes, R. S.; Zollman, S.; Klisak, I.; Kirchgessner, T. G.; Komaromy, M. C.; Mohandas, T. et al. (1987): Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. In: *Genomics* 1 (2), S. 138–144. DOI: 10.1016/0888-7543(87)90005-x.

(137) Stickel, Felix; Hampe, Jochen (2012): Genetic determinants of alcoholic liver disease. In: *Gut* 61 (1), S. 150–159. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301239.

(138) Stickel, Felix; Lutz, Philipp; Buch, Stephan; Nischalke, Hans Dieter; Silva, Ines; Rausch, Vanessa et al. (2020): Genetic Variation in HSD17B13 Reduces the Risk of Developing Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Alcohol Misusers. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 72 (1), S. 88–102. DOI: 10.1002/hep.30996.

(139) Sun, Chen; Mao, Shuyu; Chen, Siyu; Zhang, Wenxiang; Liu, Chang (2021): PPARs-Orchestrated Metabolic Homeostasis in the Adipose Tissue. In: *International journal of molecular sciences* 22 (16). DOI: 10.3390/ijms22168974.

(140) Tacke, Frank; Horn, Paul; Wai-Sun Wong, Vincent; Ratzl, Vlad; Bugianesi, Elisabetta; Francque, Sven et al. (2024): EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). In: *Journal of hepatology* 81 (3), S. 492–542. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.04.031.

- (141) Takasu, Shinji; Mutoh, Michihiro; Takahashi, Mami; Nakagama, Hitoshi (2012): Lipoprotein lipase as a candidate target for cancer prevention/therapy. In: *Biochemistry research international* 2012, S. 398697. DOI: 10.1155/2012/398697.
- (142) Tang, Weihong; Apostol, George; Schreiner, Pamela J.; Jacobs, David R.; Boerwinkle, Eric; Fornage, Myriam (2010): Associations of lipoprotein lipase gene polymorphisms with longitudinal plasma lipid trends in young adults: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. In: *Circulation Cardiovascular genetics* 3 (2), S. 179–186. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.913426.
- (143) Teissier, Elisabeth; Nohara, Atsushi; Chinetti, Giulia; Paumelle, Réjane; Cariou, Bertrand; Fruchart, Jean-Charles et al. (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. In: *Circulation research* 95 (12), S. 1174–1182. DOI: 10.1161/01.RES.0000150594.95988.45.
- (144) Teratani, Toshiaki; Tomita, Kengo; Furuhashi, Hirotaka; Sugihara, Nao; Higashiyama, Masaaki; Nishikawa, Makoto et al. (2019): Lipoprotein Lipase Up-regulation in Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. In: *Hepatology communications* 3 (8), S. 1098–1112. DOI: 10.1002/hep4.1383.
- (145) Tomlinson, Brian; Wu, Qian-Yan; Zhong, Yi-Ming; Li, Yan-Hong (2024): Advances in Dyslipidaemia Treatments: Focusing on ApoC3 and ANGPTL3 Inhibitors. In: *Journal of lipid and atherosclerosis* 13 (1), S. 2–20. DOI: 10.12997/jla.2024.13.1.2.
- (146) Trépo, Eric; Caruso, Stefano; Yang, Jie; Imbeaud, Sandrine; Couchy, Gabrielle; Bayard, Quentin et al. (2022): Common genetic variation in alcohol-related hepatocellular carcinoma: a case-control genome-wide association study. In: *The Lancet. Oncology* 23 (1), S. 161–171. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00603-3.
- (147) Trivedi, Parth; Wang, Shuang; Friedman, Scott L. (2021): The Power of Plasticity-Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. In: *Cell metabolism* 33 (2), S. 242–257. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.026.

- (148) Tsuchida, Takuma; Friedman, Scott L. (2017): Mechanisms of hepatic stellate cell activation. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 14 (7), S. 397–411. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38.
- (149) Valenti, Luca; Al-Serri, Ahmad; Daly, Ann K.; Galmozzi, Enrico; Rametta, Raffaella; Dongiovanni, Paola et al. (2010): Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (4), S. 1209–1217. DOI: 10.1002/hep.23622.
- (150) Verhulst, Stefaan; van Os, Elise Anne; Smet, Vincent de; Eysackers, Nathalie; Mannaerts, Inge; van Grunsven, Leo A. (2021): Gene Signatures Detect Damaged Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Chronic Liver Diseases. In: *Frontiers in medicine* 8, S. 750044. DOI: 10.3389/fmed.2021.750044.
- (151) Vlahopoulos, Spiros; Pan, Lang; Varisli, Lokman; Dancik, Garrett M.; Karantanos, Theodoros; Boldogh, Istvan (2023): OGG1 as an Epigenetic Reader Affects NFκB: What This Means for Cancer. In: *Cancers* 16 (1). DOI: 10.3390/cancers16010148.
- (152) Wang, Hong; Eckel, Robert H. (2009): Lipoprotein lipase: from gene to obesity. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297 (2), E271-88. DOI: 10.1152/ajpendo.90920.2008.
- (153) Wang, Jun; Conti, David V.; Bogumil, David; Sheng, Xin; Nouredin, Mazen; Wilkens, Lynne R. et al. (2021a): Association of Genetic Risk Score With NAFLD in An Ethnically Diverse Cohort. In: *Hepatology communications* 5 (10), S. 1689–1703. DOI: 10.1002/hep4.1751.
- (154) Wang, Yang; Kory, Nora; BasuRay, Soumik; Cohen, Jonathan C.; Hobbs, Helen H. (2019): PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69 (6), S. 2427–2441. DOI: 10.1002/hep.30583.
- (155) Wang, Zhanwei; Budhu, Anuradha S.; Shen, Yi; Wong, Linda Lou; Hernandez, Brenda Y.; Tiirikainen, Maarit et al. (2021b): Genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma in chromosome 22q13.31, findings of a genome-wide association study. In: *JGH open : an open access journal of gastroenterology and hepatology* 5 (12), S. 1363–1372. DOI: 10.1002/jgh3.12682.

- (156) Weinstock, P. H.; Bisgaier, C. L.; Aalto-Setälä, K.; Radner, H.; Ramakrishnan, R.; Levak-Frank, S. et al. (1995): Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. In: *The Journal of clinical investigation* 96 (6), S. 2555–2568. DOI: 10.1172/JCI118319.
- (157) Westerbacka, Jukka; Kolak, Maria; Kiviluoto, Tuula; Arkkila, Perttu; Sirén, Jukka; Hamsten, Anders et al. (2007): Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. In: *Diabetes* 56 (11), S. 2759–2765. DOI: 10.2337/db07-0156.
- (158) Wion, K. L.; Kirchgessner, T. G.; Lusi, A. J.; Schotz, M. C.; Lawn, R. M. (1987): Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. In: *Science (New York, N.Y.)* 235 (4796), S. 1638–1641. DOI: 10.1126/science.3823907.
- (159) Xiang, Hongjiao; Wu, Zecheng; Wang, Junmin; Wu, Tao (2021): Research progress, challenges and perspectives on PNPLA3 and its variants in Liver Diseases. In: *Journal of Cancer* 12 (19), S. 5929–5937. DOI: 10.7150/jca.57951.
- (160) Yang, Chen; Zhang, Hailin; Zhang, Linmeng; Zhu, Andrew X.; Bernards, René; Qin, Wenxin; Wang, Cun (2023): Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 20 (4), S. 203–222. DOI: 10.1038/s41575-022-00704-9.
- (161) Yang, Qi; Yu, Xiao-Ling; Wang, Ying; Cheng, Zhi-Gang; Han, Zhi-Yu; Liu, Fang-Yi et al. (2020): Predictive effects of a combined indicator in patients with hepatocellular carcinoma after thermal ablation. In: *Journal of cancer research and therapeutics* 16 (5), S. 1038–1050. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_1080_19.
- (162) Younossi, Zobair M.; Yilmaz, Yusuf; Yu, Ming-Lung; Wai-Sun Wong, Vincent; Fernandez, Marlen Castellanos; Isakov, Vasily A. et al. (2022): Clinical and Patient-Reported Outcomes From Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Across the World: Data From the Global Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)/ Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Registry. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the*

official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 20 (10), 2296-2306.e6. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.11.004.

(163) Yuan, Xin; Waterworth, Dawn; Perry, John R. B.; Lim, Noha; Song, Kijoung; Chambers, John C. et al. (2008): Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. In: *American journal of human genetics* 83 (4), S. 520–528. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.09.012.

(164) Yun, Byungyoon; Park, Heejoo; Ahn, Sang Hoon; Oh, Juyeon; Kim, Beom Kyung; Yoon, Jin-Ha (2024): Liver Cancer Risk Across Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease and/or Alcohol: A Nationwide Study. In: *The American journal of gastroenterology*. DOI: 10.14309/ajg.0000000000002920.

(165) Zhang, He; Jiang, Peng-Jun; Lv, Meng-Yuan; Zhao, Yan-Hua; Cui, Ju; Chen, Jie (2022): OGG1 contributes to hepatocellular carcinoma by promoting cell cycle-related protein expression and enhancing DNA oxidative damage repair in tumor cells. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 36 (7), e24561. DOI: 10.1002/jcla.24561.

(166) Zhang, Liyan; Lookene, Aivar; Wu, Gengshu; Olivecrona, Gunilla (2005): Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (52), S. 42580–42591. DOI: 10.1074/jbc.M507252200.

(167) Zhao, Yaqin; Tan, Huabing; Zhang, Xiaoyu; Zhu, Jing (2024): Roles of peroxisome proliferator-activated receptors in hepatocellular carcinoma. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 28 (5), e18042. DOI: 10.1111/jcmm.18042.

(168) Zhong, Huiqin; Yin, Huiyong (2015): Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. In: *Redox biology* 4, S. 193–199. DOI: 10.1016/j.redox.2014.12.011.

9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen Dank an alle Menschen ausrichten, die mir meine Promotion ermöglicht und mich fachlich und persönlich während dieser Zeit begleitet haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg für die Möglichkeit bedanken meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn anzufertigen. Ferner danke ich auch meinen Gutachtern PD Dr. med. Philipp Lutz, Prof. Dr. Marc Hübner, Prof. Dr. med. Jacob Nattermann und Prof. Dr. med. Tony Bruns für die Korrektur der Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Erstgutachter Philipp Lutz, der mich von den ersten Versuchen bis zur Fertigstellung der Arbeit betreut und unterstützt hat und stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht weniger Unterstützung habe ich von unserem Laborleiter Hans Dieter Nischalke bekommen, der auch während labortechnischer Durststrecken immer einen kühlen Kopf bewahrt und stets neue Ideen eingebracht hat.

Ein besonderer Dank geht an unsere TA Christine, die sich ebenfalls im besonderen Maße engagiert hat. Christine, mit Deinem Durchblick und Deinem Organisationstalent hast Du dafür gesorgt, dass ich auch in der Zeit Deiner Abwesenheit mithilfe perfekt geführter Laborbücher nicht auf der Strecke blieb. Ich bin sehr froh, dass wir zu zweit genau in dieser Arbeitsgruppe gelandet sind und freue mich ebenso sehr darüber, dass unsere Freundschaft auch nach der Laborzeit bestehen wird.

Natürlich möchte ich auch an dieser Stelle nicht unsere zwei Auszubildenden, Laura und Felix, unerwähnt lassen, die beide ein hohes Maß an Engagement und Motivation gezeigt haben. Ich wünsche Euch nur das Beste für Euren weiteren Weg!

Philipp, Hans Dieter und Christine – ich habe unser Arbeitsklima, unsere Zusammenarbeit und den Zusammenhalt in unserer Arbeitsgruppe sehr wertgeschätzt. Wir hatten stets einen respektvollen und kollegialen, aber auch freundschaftlichen Umgang miteinander, für den ich sehr dankbar bin. Ich wünsche Euch alles Gute für die Zukunft und hoffe an meiner nächsten Arbeitsstelle ebenso wunderbare Kolleg*innen zu finden.

Gudrun, als ehemaliges Mitglied der AG Nischalke bist Du stets interessiert und neugierig geblieben, was unsere Forschungsvorhaben betraf. Ich kann nicht zählen, wie oft ich mit Fragen zu Dir gekommen bin, die Du immer nach bestem Wissen und Gewissen in

passenden (und auch unpassenden Momenten) beantwortet hast. Ich bin an dieser Stelle nicht allein, wenn ich Danke sage – für Deine fachliche Unterstützung und Dein Engagement, sowie Deine stets positive und humorvolle Art.

Ich habe mich sehr wohlfühlt in unserer Arbeitsgruppe, doch auch meine Kolleg*innen aus den Arbeitsgruppen AG Nattermann und AG Vietinghoff haben meine Promotionszeit so besonders gemacht. Angefangen mit einer kleinen Gruppe von Leuten sind wir gewachsen, die Labore sind voller geworden, die Mittagspausen länger. Die gemeinsamen Erlebnisse - Karnevalsfeiern, Laser Tag, Karaoke im Dubliner, Glühwein trinken auf dem Weihnachtsmarkt, Feiern gehen in Köln oder die „Friday sweets“ Tage – haben diese Zeit unvergesslich gemacht.

Zuletzt geht ein nicht minder großer Dank an meinen Partner, meine Freunde und meine Familie für die Unterstützung, das Verständnis und das immerwährende Vertrauen, was ihr mir und meiner Arbeit geschenkt habt. Ich bin zutiefst dankbar, so wundervolle Menschen an meiner Seite zu haben, die mich nicht nur während meiner Promotion, sondern in allen Lebenslagen begleiten und unterstützen.