

## **Beteiligung spezifischer miRNAs an Muskelatrophie und Lipolyse bei Patienten mit Tumorkachexie**

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Tanja Lisa-Maria Krauß

Vorsitz: Prof. Dr. Martin Klingenspor  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Johann J. Hauner  
2. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janßen

Die Dissertation wurde am 17.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 10.07.2023 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungen	VI
Tabellen	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1 Kachexie	3
1.1.1 Definition und Pathophysiologie	3
1.1.2 Tumorkachexie: Epidemiologie, Diagnose und Verlauf	3
1.1.2.1 Epidemiologie	3
1.1.2.2 Gastrointestinale Tumorerkrankungen	3
1.1.2.3 Diagnosekriterien, Verlauf und Behandlung	4
1.2 Tumorkachexie als Multiorgan-Syndrom	5
1.2.1 Zirkulierende Faktoren der Tumorkachexie	5
1.2.2 Leberdysfunktion in der Tumorkachexie	6
1.3 Rolle des skelettalen Muskels in der Tumorkachexie	7
1.3.1 Muskelatrophie unter Tumorkachexie	7
1.3.2 Molekularbiologische Regulatoren der Muskelatrophie	7
1.3.2.1 Interleukin-15	7
1.3.2.2 Myostatin	8
1.3.2.3 Myogenin	9
1.3.2.4 Alpha-Aktinin3	10
1.3.2.5 Muscle RING-Finger-1/Tripartite Motif Containing 63	10
1.4 Veränderungen im subkutanen und viszeralen Fettgewebe bei Tumorkachexie	11
1.4.1 Regulatoren der Lipolyse	12
1.4.1.1 Adipozyten-Triglycerid-Lipase und Hormonsensitive Lipase	13

---

1.4.1.2	Lipoproteinlipase _____	13
1.4.2	Abbau von Fettgewebe und Lipolyse in der Tumorkachexie _____	13
1.5	Mikro-Ribonukleinsäuren _____	14
1.5.1	Definition und Biogenese _____	14
1.5.2	miRNAs und ihre Rolle im Fettgewebe _____	15
1.5.3	miRNAs in der Tumorkachexie _____	16
1.5.3.1	miR-27b-3p _____	17
1.5.3.2	miR-375 _____	17
1.5.3.3	miR-424-5p _____	18
1.6	Zielsetzung _____	18
2.	Material _____	19
2.1	Software _____	19
2.2	Kits _____	20
2.3	ELISA _____	20
2.4	Chemikalien _____	20
2.5	Medien, Puffer und Lösungen _____	22
2.5.1	Puffer und Lösungen für die Zellkultur _____	22
2.5.2	Medien Zellkultur Präadipozyten _____	24
2.5.3	Medien Zellkultur C2C12-Zellen _____	25
2.5.4	Lösungen für die Zellfärbungen _____	25
2.5.5	Puffer für die Zell-Ernte _____	26
2.5.6	Lösungen für die siRNA Transfektion _____	26
2.6	Primer _____	27
2.6.1	mRNA Primer _____	27
2.6.2	miRNA Primer _____	28
3.	Methoden _____	29
3.1	Aufbau einer humanen Kachexie-Biobank _____	29
3.1.1	Präparation des Blutes _____	29
3.1.2	Muskel- und Leberbiopsien _____	29
3.1.3	Fettgewebsbiopsien _____	30

---

3.1.4	Klinische Daten und Follow-Up	30
3.2	Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1	miRNA-Isolierung aus Serum	30
3.2.2	mRNA/miRNA-Isolierung mit TRIzol Reagenz	30
3.2.3	mRNA/miRNA-Isolierung mit <i>mirVana</i> <sup>TM</sup> Isolation Kit	31
3.2.4	miRNA: cDNA-Synthese und RT-qPCR	31
3.2.5	mRNA: cDNA-Synthese und RT-qPCR	33
3.2.6	Serum-miRNA Array Analyse	34
3.3	ELISA	35
3.3.1	Insulin ELISA	35
3.3.2	PTH1H ELISA	35
3.3.3	Bio-Plex Pro <sup>TM</sup> Diabetes Assays	35
3.4	Allgemeine Zellkultur	36
3.4.1	Auftauen und Einfrieren der Zellen	36
3.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	36
3.4.3	Ernte der miRNA/mRNA	37
3.5	Prädipozyten	37
3.5.1	Isolation der Prädipozyten aus Fettgewebe	37
3.5.2	Passagieren der Zellen	37
3.5.3	Ablauf der Differenzierung von Prädipozyten	38
3.5.4	Viabilitätstest mit alamarBlue <sup>TM</sup> Reagenz	39
3.5.5	Lipidfärbung der Fettzellen mit Öl-Rot O	40
3.5.6	Fluoreszenzfärbung der Zellen	40
3.5.6.1	Färbevorgang	40
3.5.6.2	Aufnahme der Fluoreszenzbilder	40
3.5.7	siRNA-Transfektion ( <i>Knock-down</i> )	41
3.5.8	Histologie zur Fettzellgrößenbestimmung	41
3.5.8.1	Anfertigung histologischer Schnitte	41
3.5.8.2	Automatisierte Hämatoxylin-Eosin-Färbung	42
3.5.8.3	Größenbestimmung der Fettzellen	42

---

3.6	C2C12-Zellen	42
3.6.1	Passagieren der Zellen	42
3.6.2	Differenzierung der C2C12-Zellenlinie	42
3.6.3	siRNA-Transfektion der C2C12-Zellen	43
3.7	Bioinformatische Analysen	43
3.8	Statistische Analysen	44
4.	Ergebnisse	45
4.1	Patienten-Demographien	45
4.2	Blutanalysen mittels ELISA	47
4.3	Charakterisierung der Präadipozyten	51
4.3.1	Größenbestimmung	51
4.3.2	Fluoreszenz- und HE-Färbung der Präadipozyten	52
4.4	miRNA-Expressionsanalyse im Serum	54
4.4.1	Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum mittels miRNA-Panel	54
4.4.2	Expressionsniveau der miR-122-5p im Serum ist assoziiert mit Tumorkachexie	55
4.5	miRNA- und mRNA-Expressionsanalysen in Leber, Muskel, subkutanem und viszeralem Fettgewebe	58
4.5.1	Keine miRNA-Expressionsunterschiede in der Leber	58
4.5.2	Expressionsniveau der miR-27b-3p im Muskel ist assoziiert mit Tumorkachexie	59
4.5.2.1	Analyse der miRNA-Expressionsunterschiede im Muskel	59
4.5.2.2	Target-Gene der miR-27b-3p	62
4.5.3	Expressionsniveaus der miR-375 und miR-424-5p im viszeralen Fettgewebe sind assoziiert mit Tumorkachexie	65
4.5.3.1	Analyse der miRNA-Expressionsunterschiede im Fettgewebe	65
4.5.3.2	Keine miRNA-Expressionsunterschiede im subkutanen Fettgewebe	66
4.5.3.3	Expressionsunterschiede der miR-375 und miR-424-5p im viszeralen Fettgewebe	67
4.5.3.4	Target-Gene der miR-375- und miR-424-5p	70

---

4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
5.	Diskussion	77
5.1	Etablierung eines Biomarkers durch Blutanalysen	77
5.2	Die Fettgewebe von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie weisen keine histologischen Unterschiede auf	80
5.3	Expressionsniveau von miR-122-5p im Serum ist assoziiert mit Tumorkachexie	81
5.4	Organ-spezifische miRNAs bei humaner Tumorkachexie	82
5.4.1	Patienten mit Tumorkachexie weisen kein verändertes miRNA-Profil in der Leber auf	82
5.4.2	miR-27b-5p und die Target-Gene IL-15 und TRIM63 im Muskel sind assoziiert mit Tumorkachexie	83
5.4.3	miR-375 und miR-424-5p beeinflussen Tumorkachexie im viszeralen Fettgewebe	84
5.5	Limitierungen der vorliegenden Arbeit	86
6.	Fazit und Ausblick	88
	Danksagung	89
	Publikationen und Tagungsbeiträge	91
	Literaturverzeichnis	92

## Abbildungen

Abbildung 1: Stadien der Tumorkachexie _____	5
Abbildung 2: Cross-Talk zwischen Tumor, Leber, Muskel und Fettgewebe _____	6
Abbildung 3: Molekularer Stoffwechselweg der Muskelproteindegradation durch Myostatin _____	9
Abbildung 4: Aufbau des Sarkomers eines Muskels _____	10
Abbildung 5: Verteilung des Fettgewebes im menschlichen Körper _____	11
Abbildung 6: Erhöhte lipolytische Aktivität in Adipozyten bei Tumorkachexie _____	12
Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Präadipozyten-Kultivierung _____	39
Abbildung 8: Übersicht der unterschiedlichen Erkrankungen der Patienten-Gruppen _____	47
Abbildung 9: Plasmakonzentrationen von Resistin, Insulin und Visfatin in Patienten mit und ohne Kachexie _____	48
Abbildung 10: Korrelationsanalysen der Plasma-Analyte Resistin, Insulin und Visfatin mit dem prozentualen Gewichtsverlust in den sechs Monaten vor Op _____	49
Abbildung 11: Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven der Plasma-Analyten _____	50
Abbildung 12: Histologische Schnitte von subkutanem und viszeralem Fettgewebe _____	51
Abbildung 13: Fluoreszenz- und HE-Färbung viszeraler und subkutaner Präadipozyten _____	53
Abbildung 14: Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum von Krebspatienten mit und ohne Kachexie mittels miRNA-Panel _____	55
Abbildung 15: miRNA-Expressionsprofil der Serumproben _____	56
Abbildung 16: Analyse der miR-122-5p-Expression in Serumproben der Kachexie- und einer Vergleichskohorte _____	57
Abbildung 17: miRNA-Expressionsprofil der Leberproben _____	59
Abbildung 18: miRNA-Expressionsprofil der Muskelproben _____	60
Abbildung 19: Analyse der miR-27b-3p-Expression in Muskelproben der Kachexiekohorte _____	61

---

Abbildung 20: Netzwerk von Genen der skelettalen Muskelatrophie _____	62
Abbildung 21: Differenzierungsverlauf der C2C12-Zellen _____	63
Abbildung 22: Expressionsniveau der miR-27b-3p in der Differenzierung von C2C12-Zellen_ _____	64
Abbildung 23: Verlauf der miR-27b-3p und der Gen-Expressionen über die Differenzierung von C2C12-Zellen im Knock-down-Experiment _____	64
Abbildung 24: Analyse von IL-15- und TRIM63-Expression in Muskelproben der Kachexie- kohorte _____	65
Abbildung 25: miRNA-Expressionsprofil der subkutanen Fettgewebsproben _____	66
Abbildung 26: miRNA-Expressionsprofil der viszeralen Fettgewebsproben _____	68
Abbildung 27: Analyse der miR-375- und miR-424-5p-Expressionen in viszeralen Fettgewebsproben der Kachexiekohorte _____	69
Abbildung 28: Netzwerk der involvierten Gene in Triglycerid-Lipase-Metabolismus _____	70
Abbildung 29: Expressionslevel der miR-375 und miR-424-5p in der Differenzierung von humanen Präadipozyten mit und ohne siRNA _____	71
Abbildung 30: Expressionsniveau der Lipolyse-assoziierten Gene in siRNA-375 und siRNA-424-5p transfizierten humanen Präadipozyten _____	72
Abbildung 31: Expressionsanalyse der Lipolyse-assoziierten Gene in viszeralen Fettgewebs- proben der Kachexiekohorte _____	73
Abbildung 32: Single cell-Daten der Lipolyse-assoziierten Gene PNPLA2, LIPE und LPL in unterschiedlichen Zelltypen _____	74
Abbildung 33: Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalysen bei Tumorpatienten mit Kachexie _____	76

## Tabellen

Tabelle 1:	Fünfstufige Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Tumorentitäten	4
Tabelle 2:	miRNAs in der Tumorkachexie	16
Tabelle 3:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Software-Programme	19
Tabelle 4:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kits	20
Tabelle 5:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten ELISA	20
Tabelle 6:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 7:	Medien Zellkultur Präadipozyten	24
Tabelle 8:	Medien Zellkultur C2C12-Zellen	25
Tabelle 9:	Übersicht der Houskeeping-Gene abhängig vom Zell- und Gewebetyp	27
Tabelle 10:	Primer-Sequenzen für mRNA	27
Tabelle 11:	Primer-GeneGlobe Nummern für miRNA	28
Tabelle 12:	Reverse Transcription der miRNA	31
Tabelle 13:	Mastercycler-Programm der miRNA cDNA-Synthese	32
Tabelle 14:	RT-qPCR Mastermix für miRNA	32
Tabelle 15:	RT-qPCR Programm für miRNA mit dem LightCyclers® 480	32
Tabelle 16:	Reverse Transcription der mRNA	33
Tabelle 17:	Mastercycler-Programm der mRNA cDNA-Synthese	33
Tabelle 18:	RT-qPCR Mastermix für mRNA	34
Tabelle 19:	RT-qPCR-Programm für miRNA mit dem LightCycler® 480	34
Tabelle 20:	Übersicht der eingesetzten Zellzahl abhängig vom Kulturgefäß	38
Tabelle 21:	Übersicht der Einstellungen der einzelnen Fluoreszenzkanäle	41
Tabelle 22:	Übersicht der Patienten-Demographien der ELISA-Messung	45

Tabelle 23: Übersicht der nach Gewebetyp geordneten Patienten-Demographien für die mRNA und miRNA Bestimmungen \_\_\_\_\_ 45

Tabelle 24: Übersicht der Fettzellendiameter von Patienten mit und ohne Kachexie \_\_\_\_\_ 52

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
3'URT	<i>three prime untranslated region</i>
aP2	<i>acid-binding Protein</i>
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ALK	Aktivin Rezeptor- <i>like</i> Kinase
BSA	Bovines Serum Albumin
BMI	<i>Bodymassindex</i>
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein-<math>\alpha</math></i>
CRP	C-reaktives Protein
d	<i>Day, Tag</i>
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Fettsäuren
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein O3</i>
GPS	<i>Glasgow Prognostic Score</i>
h	human
H <sub>2</sub> O	Wasser
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HSL	Hormonsensitive-Lipase
IL-6	Interleukin-6
IL-15	Interleukin-15
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
LMF	Lipid-mobilisierender Faktor
LPL	Lipoprotein Lipase
m	murin

---

MGL	Monoacylglycerol-Lipase
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MuRF	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
N	Gesamtanzahl
NFκB	Nuklearfaktor-κB
PAC	<i>Preadipocyte</i> ; Präadipozyte
p-Akt	Protein-Kinase B
Pax3	<i>paired box gen 3</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDAC	duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse
PGC1-α	<i>PPARγ coactivator 1 α</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIF	Proteolyse-induzierender Faktor
PPAR	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierte</i> Rezeptoren
RISC	<i>RNA-inducer silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>
Smad2/3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2/3</i>
sub	subkutan
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TG	Triglycerid
TRIM63	<i>Tripartite Motif Containing 63</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
vis	viszeral

## Zusammenfassung

Tumorkachexie ist ein komplexes, multifaktorielles und organübergreifendes Syndrom, bei dem die betroffenen Patienten unter erheblichem Abbau von Muskel- und Fettgewebe leiden und eine schlechte Überlebensprognose aufweisen. Ein besseres Verständnis der molekularbiologischen Mechanismen, die an der Erkrankung beteiligt sind, ist daher unerlässlich. Ziel dieser Arbeit war es, eine Biobank mit Gewebeproben betroffener Patienten aufzubauen und spezifische Micro-RNAs zu identifizieren, die mit dem für Kachexie typischen Auszehrungssyndrom in Verbindung stehen.

In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar konnten 119 Patienten in eine Biobank eingeschlossen werden, von denen die meisten an gastrointestinalen Tumoren erkrankt waren. Als kachektisch galten die Patienten, die einen prozentualen Gewichtsverlust von über fünf Prozent innerhalb eines halben Jahres vor ihrer Operation erlitten. Um molekulare Veränderungen im kachektischen Status aufzudecken, wurden neben Plasma auch Serum, Leber-, Muskel- und viszerales sowie subkutanes Fettgewebe untersucht.

Die analysierten Serummarker Resistin und Visfatin eigneten sich zur moderaten Unterscheidung zwischen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie und wiesen eine Assoziation mit prozentualem Gewichtsverlust auf. Auch bei der Messung des Expressionsniveaus der miR-122-5p im Serum konnte eine negative Korrelation mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb sechs Monate vor der Operation der Patienten ermittelt werden. Die Zellgrößenbestimmung auf Grund einer durchgeführten HE-Färbung von Schnitten des viszeralen und subkutanen Fettgewebes ließ keine Unterscheidung zwischen den Tumorpatienten mit und ohne Kachexie zu.

Die Analyse des miRNA-Panels in den Gewebstücken der Leber und des subkutanen Fettgewebes ergaben keine Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit Tumorkachexie und Kontrollen. Jedoch konnten signifikant niedrigere Expressionsniveaus im Serum, den viszeralen Fettgewebeproben und in den Muskelproben der Patienten mit Kachexie detektiert werden. Die ergänzenden *Knock-down*-Versuche in muskulären C2C12-Zellen und humanen viszeralen Präadipozyten legten die Zusammenhänge zwischen den Expressionsniveaus der miRNAs (miR-27b-3p, miR-375 und miR-424-5p) und entsprechender Targetgene offen. Die Assoziation zwischen miR-27b-3p und deren Targetgenen IL-15 und TRIM63 konnte auch durch die Analyse von Muskelbiopsien in der Kachexie-Kohorte bestätigt werden. Da alle bioinformatisch ermittelten Targetgene zum Muskel- und Lipidverlust beitragen, deutet dies auf eine funktionelle Rolle dieser miRNAs bei der Tumorkachexie hin.

## Abstract

Tumor cachexia is a complex, multifactorial, and organ-wasting syndrome in which affected patients suffer from significant loss of muscle and adipose tissue and have a poor prognosis for survival. A better understanding of the molecular biological mechanisms involved in the disease is therefore essential. The aim of this work was to establish a biobank of tissue samples from affected patients and to identify specific micro-RNAs associated with the emaciation syndrome typical of cachexia.

In cooperation with the Department of Surgery, Klinikum rechts der Isar, University Hospital of the Technical University of Munich, 119 patients were included in a biobank, most of them had gastrointestinal tumors. Patients were considered cachectic if they experienced a percentage weight loss of more than 5% within half a year prior to their surgery. To reveal molecular changes in cachectic status, serum, liver, muscle, visceral, and subcutaneous adipose tissue were analyzed in addition to plasma.

The analyzed serum markers resistin and visfatin were suitable for moderate discrimination between tumor patients with and without cachexia and showed an association with percent weight loss. Measurement of the expression level of miR-122-5p in serum also revealed a negative correlation with percent weight loss within six months before patients underwent surgery. Cell sizing based on HE staining performed on sections of visceral and subcutaneous adipose tissue did not allow differentiation between tumor patients with and without cachexia. Analysis of the miRNA panel in the tissue sections of liver and subcutaneous adipose tissue did not reveal expression differences between CCx and controls. However, significantly lower expression levels were detected in serum, visceral adipose tissue samples, and muscle biopsies from patients with cachexia. The complementary knockdown experiments in muscular C2C12 cells and human visceral preadipocytes revealed the associations between the expression levels of miRNAs (miR-27b-3p, miR-375, and miR-424-5p) and corresponding target genes. The association between miR-27b-3p and their target genes IL-15 and TRIM63 was also confirmed by analysis of muscle biopsies in the cachexia cohort. Since all bioinformatically identified target genes contribute to muscle and lipid loss, this suggests a functional role of these miRNAs in tumor cachexia.

# 1. Einleitung

## 1.1 Kachexie

### 1.1.1 Definition und Pathophysiologie

Der Begriff Kachexie ist griechischen Ursprungs und setzt sich aus den beiden Wörtern „*kakos*“ = schlecht und „*hexis*“ = Zustand zusammen. Er wurde erstmals vor mehr als 2000 Jahren von Hippocrates zur Beschreibung eines Erkrankten verwendet (Katz und Katz 1962). Trotz der seither enormen Entwicklungen in Medizin und Wissenschaft ist die Festlegung einer spezifischen Definition für Kachexie auf Grund der Komplexität dieser Erkrankung sehr schwierig. Im Rahmen eines internationalen Konsenses wurde Kachexie schließlich als ein multifaktorielles Syndrom definiert, welches sich durch einen „schwerwiegenden Verlust von skelettaler Muskel- und Fettmasse auszeichnet und dieser Zustand durch konventionelle Ernährungstherapie nicht zu beheben ist“. Der starke Abbau der Muskelmasse und die damit einhergehende Abnahme der Funktionalität wird als „Sarkopenie“ bezeichnet (Fearon et al. 2011; Schwarz et al. 2017). Hinzu kommen starke metabolische Veränderungen durch eine negative Protein- und Energiebilanz sowie eine systemische Inflammation (Argilés et al. 2018). All diese Dysregulationen führen zu Appetitlosigkeit, Schwäche und Fatigue, wodurch die Lebensqualität, das Ansprechen auf Medikation und das Überleben der betroffenen Patienten stark sinken (Tisdale 2002; Haehling und Anker 2010).

### 1.1.2 Tumorkachexie: Epidemiologie, Diagnose und Verlauf

#### 1.1.2.1 Epidemiologie

Kachexie wird bei Krankheitsentitäten wie chronischen Herzinsuffizienz, chronischen Lungenerkrankungen, rheumatoider Arthritis oder AIDS beobachtet. Die höchste Prävalenz zeigen jedoch maligne Tumorerkrankungen (Da Peixoto Silva et al. 2020). Klinischen Daten zufolge leiden 50 bis 80 % der Krebspatienten an Tumorkachexie, wovon ca. 20 % der Patienten daran versterben (Ryan et al. 2016). Eine besonders hohe Prävalenz zeigt sich bei duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC) mit 85 %, gefolgt von Magenkarzinom mit 76 % und die Hälfte aller Patienten mit Ösophaguskarzinom erleiden eine Tumorkachexie (Sun et al. 2015; Hendifar et al. 2019).

#### 1.1.2.2 Gastrointestinale Tumorerkrankungen

Gastrointestinale Tumorerkrankungen sind seit Jahrzehnten eine der weltweit häufigsten Todesursachen in Zusammenhang mit Krebs. Zu dieser Gruppe zählt man PDAC, Magenkarzinom, Kolorektalkarzinom und Ösophaguskarzinom. Wie bereits erwähnt, erreicht die Prävalenz für Kachexie bei diesen Tumorerkrankungen bis zu 85 %. Daneben eint diese aggressiven Krebsarten das späte Erkennen der Tumorerkrankung und eine sehr niedrige

Überlebenschance der Patienten (Tabelle 1). Beispielsweise überleben nur 10 % der an PDAC Erkrankten die nächsten fünf Jahre (Zheng et al. 2017; Sperlich et al. 2018; Maharaj et al. 2019).

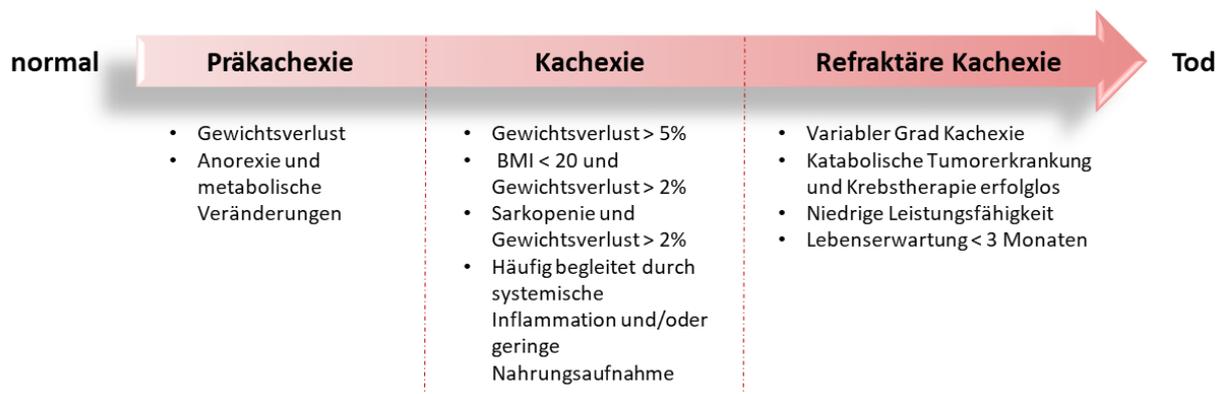
**Tabelle 1: Fünfjährige Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Tumorentitäten**

Tumor	fünfjährige Überlebenswahrscheinlichkeit [%]
Pankreas	9,8
Ösophagus	22
Magen	30,3

Die Behandlung der gastrointestinalen Tumorerkrankungen setzt sich meist multimodal durch chirurgische Eingriffe und einer neoadjuvanten Therapie zusammen. Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Wahrscheinlichkeit eine Tumorkachexie zu erleiden mit der Gabe von Chemotherapeutika steigt. Dabei können Bestandteile der Chemotherapeutika, wie z.B. cis-Platin, zu einer negativen Stickstoffbilanz im Körper führen oder, durch Aktivierung des Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), Muskelgewebsabbau triggern (Whistance und Blazeby 2011; Pin et al. 2019). Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass das Tumorwachstum, die durch den Tumor ausgelöste chronische Inflammation und die daraus resultierenden metabolischen Veränderungen die Entwicklung des kachexie-assoziierten Syndroms auslösen (Maccio et al. 2021).

### 1.1.2.3 Diagnosekriterien, Verlauf und Behandlung

Neben der inzwischen etablierten Definition wurden nicht- und minimalinvasive Kriterien festgelegt, um Tumorkachexie bei Patienten zu diagnostizieren. Zudem kann so zusätzlich der Schweregrad der Erkrankung beurteilt werden. Der Verlauf wird in Präkachexie, Kachexie und refraktäre Kachexie unterteilt (Abbildung 1). Als diagnostische Kriterien dienen zusätzlich zum progressiven Gewichtsverlust das Auftreten von Anämie (Hb < 12 g/dl), geringe Nahrungsaufnahme (< 1500 kcal/Tag) und die Einteilung in den sogenannten *Glasgow Prognostic Score* (GPS), welcher den Albumingehalt (< 35 g/L) und die Menge an C-reaktivem Protein (CRP) (> 10 mg/l) im Blut klassifiziert (Fearon et al. 2011; Douglas und McMillan 2014).



**Abbildung 1: Stadien der Tumorkachexie**

Bereits während der Präkachexie nimmt der Patient an Gewicht ab und Veränderungen im Protein- und Energiemetabolismus sind zu verzeichnen. Kommt es weiterhin zu einem kontinuierlichen Abbau von Fettmasse und dem Auftreten von Sarkopenie, meist in Kombination mit erhöhtem CRP-Spiegel, liegt Kachexie vor. Ist der Patient bereits im Stadium der refraktären Kachexie angelangt, spricht er häufig auf keine Therapieform mehr an, weist einen schlechten Allgemeinzustand und eine geringe Lebenserwartung auf. BMI = Bodymassindex; (Fearon et al. 2011).

Obwohl in den letzten Jahren intensive Forschungen auf diesem Gebiet betrieben wurden, konnten die vielschichtigen Zusammenhänge und molekularen Veränderungen dieser Erkrankung noch nicht hinreichend geklärt werden. Keine der durchgeführten klinischen Studien mit Medikamenten, die auf die Verbesserung der systemischen Inflammation, den Hormonhaushalt oder den verschobenen Energie- und Proteinmetabolismus abzielten, brachten bislang den gewünschten Erfolg. Ein multidisziplinärer Ansatz, der die Verabreichung von kalorienreicher Nahrung, Bewegungsübungen und pharmakologische Therapieformen einschließt, ermöglicht zukünftig eventuell die erfolgreiche Behandlung der Tumorkachexie (Baracos et al. 2018; Nishikawa et al. 2021).

## 1.2 Tumorkachexie als Multiorgan-Syndrom

Tumorkachexie stellt eine komplexe und organübergreifende Erkrankung dar, bei der es in Leber, Muskel, Gehirn, braunen und weißen Fettgewebe, sowie dem Herzen zu Veränderungen im Aminosäure- und Proteinmetabolismus kommt. Charakteristisch ist zudem nicht nur die systemische Inflammation, sondern auch ein erhöhter Energieverbrauch des Körpers (Argilés et al. 2018; Argilés et al. 2019).

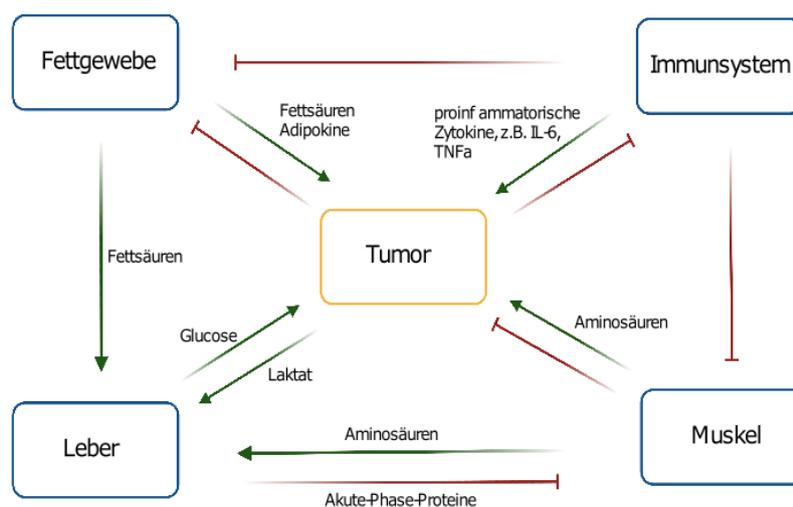
### 1.2.1 Zirkulierende Faktoren der Tumorkachexie

Indem Immunzellen, die durch den Tumor stimuliert werden, eine Vielzahl von Zytokinen ausschütten, werden auch Transkriptionsfaktoren (TF) aktiviert, die maßgeblich am Abbau von Muskel- und Fettmasse beteiligt sind (Loumaye und Thissen 2017). Sowohl in Tierversuchen mit Mäusen als auch bei der Analyse von Patientenkohorten konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen an Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), NF $\kappa$ B und Resistin vorliegen (Oliff et al. 1987; Baltgalvis et al. 2009; He et al. 2013; Diakowska et al.

2014). Darüber hinaus können erhöhte Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins Visfatin zu Gewichtsverlust führen, da es zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme beiträgt (Ezeoke und Morley 2015). Die durch diese Faktoren ausgelöste chronische Inflammation der Kachexiepatienten führt oftmals zu einer Schädigung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, was in einer gestörten Insulin-Sekretion resultiert (Pouliou et al. 2020).

### 1.2.2 Leberdysfunktion in der Tumorkachexie

Neben der Muskulatur und dem Fettgewebe ist die Leber ein essenzielles Organ zur Metabolismus- und Glukoseregulation im gesamten Körper. Die drei Organe stehen dabei durch den Austausch (*Cross-Talk*) von Aminosäuren in Interaktion (Abbildung 2) (Argilés et al. 2001). Wird dieser *Cross-Talk* durch den Tumor und die Ausbildung einer Kachexie verändert, sind Abweichungen in der Proteinregulation und -synthese die Folge. Dies resultiert in einer Funktionsstörung des endokrinen Systems (Argilés et al. 2001; Narsale et al. 2015; Da Fonseca et al. 2020). Bei Patienten mit Pankreaskrebs und Kachexie infiltrieren eine erhöhte Konzentration an Makrophagen das Lebergewebe. Die Makrophagen schütten dort verstärkt IL-6 aus, so dass die Sezernierung von hepatischen Akute-Phase-Proteinen, wie z.B. CRP oder Fibrinogen, getriggert wird (Martignoni et al. 2009). Der über Zytokine resultierende *Cross-Talk* zwischen den Organen führt schließlich zum Muskelabbau durch Proteindegradation (Argilés et al. 2015). Die durch den Abbau freigesetzten Aminosäuren können zur Generierung von Glukose durch Glukoneogenese wieder verstoffwechselt werden. Dies ist jedoch energetisch ineffizient und trägt zum metabolischen Ungleichgewicht, hepatischen Schäden sowie Gewichtsverlust in den Patienten mit Kachexie bei (Porporato 2016; Da Peixoto Silva et al. 2020).



**Abbildung 2: Cross-Talk zwischen Tumor, Leber, Muskel und Fettgewebe**

Der Tumor aktiviert in der Leber die Neusynthese von Glukose aus Laktat (Glukoneogenese). Dies führt zu einem höheren Energieverbrauch mit Hypermetabolismus. Die Sezernierung von Akute-Phase-Proteine aus der Leber führt zur Lipolyse von Adipozyten und muskulärem Proteinabbau. All diese metabolischen Veränderungen sprechen für einen direkten Einfluss der Leber auf die Entwicklung einer Kachexie (nach Porporato 2016).

Die beiden weiteren Hauptorgane, Fettgewebe und Skelettmuskel, die bei Tumorkachexie eine entscheidende Rolle spielen, werden nachfolgend in gesonderten Kapiteln behandelt.

## **1.3 Rolle des skelettalen Muskels in der Tumorkachexie**

### **1.3.1 Muskelatrophie unter Tumorkachexie**

Tumorkachexie als multifaktorielles Syndrom lässt sich vor allem durch den Abbau von Fett- und Muskelmasse kennzeichnen. Dabei wird die Abnahme der Muskelmasse und –kraft als Sarkopenie bezeichnet. Zur Charakterisierung der Sarkopenie wird der *Skeletal Muscle Area Index* (SMAI) des Patienten durch CT-Messungen bestimmt. Liegt der ermittelte SMAI-Wert bei Frauen unter  $38,5 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  und bei Männern unter  $52,4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  leiden diese an Sarkopenie (Prado et al. 2008). Durch den massiven Verlust von Körpergewicht und den Rückgang der Skelettmuskulatur erhöht sich die Mortalität und Morbidität betroffener Patienten (Hu et al. 2018a; Chen et al. 2020). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind komplex, beeinflussen Transkriptionsfaktoren, Proteinsynthese, anabole Signalwege oder den Proteinkatabolismus. Letztlich führen sie alle direkt oder indirekt zum Abbau des Muskels. Vom Tumor sezernierte, zirkulierende Faktoren wie die E3-Ubiquitin-Ligase Muskel RING-Finger - 1 (MuRF1) oder *Forkhead-Box-Proteine* (FOXO) bewirken eine ständige Aktivierung des Ubiquitin-Proteasoms und verändern die Protein-Homöostase in Muskelzellen. Dies unterdrückt nicht nur die Proteinsynthese, sondern führt auch zum Abbau von Muskelproteinen. Indirekt wird die Muskelatrophie durch metabolische Veränderungen anderer Organe getriggert. Beispielsweise schüttet die Leber unter kachektischen Bedingungen vermehrt Zytokine (z.B. CRP) aus. Dadurch wird die Inflammation im ganzen Körper verstärkt und die Synthese von Proteinen (sog. Plasma-Proteine), die für die Immunabwehr nötig sind, aktiviert. Die benötigten Aminosäuren zur Proteinsynthese werden vom Muskel durch verstärkte Proteindegradation freigesetzt und in die Zirkulation abgegeben (Biswas und Acharyya 2020; Gorza et al. 2021).

### **1.3.2 Molekularbiologische Regulatoren der Muskelatrophie**

#### **1.3.2.1 Interleukin-15**

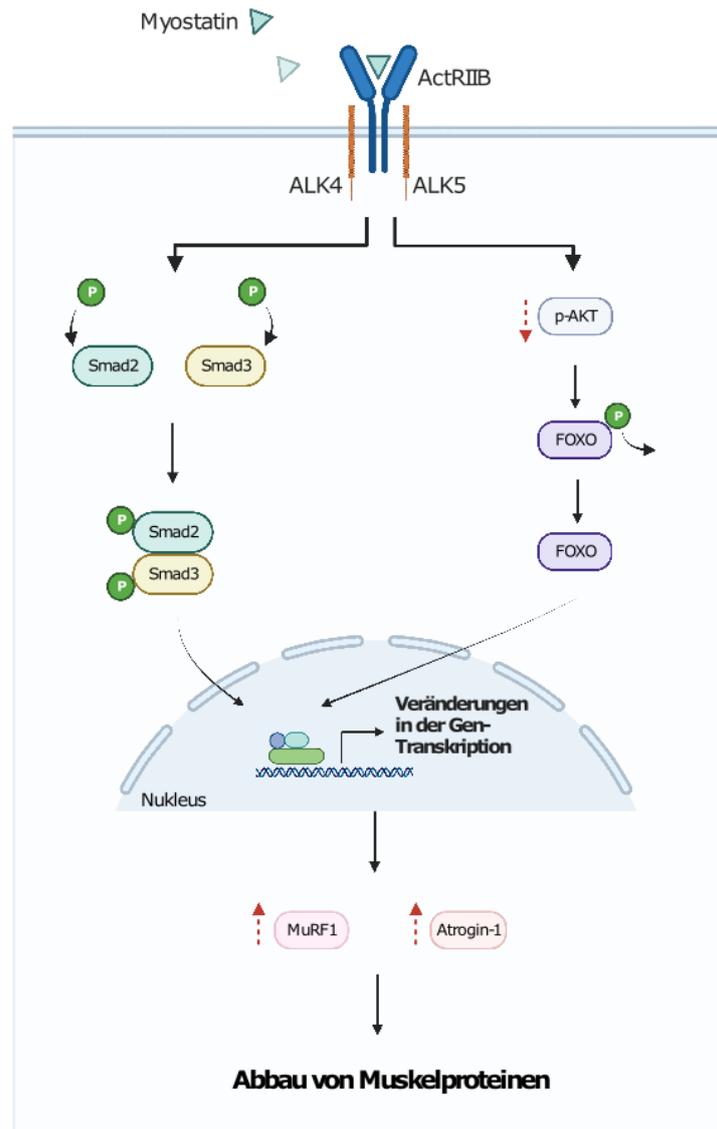
Interleukin-15 (IL-15; Gen-Name IL-15) ist ein Zytokin, welches in einer Vielzahl von Geweben (z.B. Lunge, Herz, Fettgewebe) und Zelltypen (z.B. Monozyten, Makrophagen) exprimiert wird. Vermehrt kommt es in Myozyten vor, weshalb es auch der Gruppe der Myokine zugeordnet wird (Steel et al. 2012; Yoshida et al. 2022). In Versuchen mit Ratten wurde bei der systemischen Verabreichung von IL-15 eine Atrophie durch erhöhte Apoptose im skelettalen Muskel nachgewiesen (Pistilli und Alway 2008). IL-15 ist, neben dem Muskel, auch im weißen Fettgewebe vorhanden und hat dort einen lipolytischen Effekt: Im Fettgewebe werden durch erhöhte IL-15-Spiegel weniger Triacylglyceride durch die Lipoprotein-Lipase (LPL)

aufgenommen und die Lipogenese sinkt (Argilés et al. 2005; Argilés et al. 2009). In 3T3-Präadipozyten (immortalisierte Maus-Fibroblasten-Zelllinie) vermindert das Zytokin deren Proliferation und Differenzierung (Fuster et al. 2011). IL-15 ist somit auch bei der Interaktion zwischen Fettgewebe und skelettalem Muskel involviert (Manole et al. 2018).

### 1.3.2.2 Myostatin

Myostatin (Gen-Name MSTN), ist ebenfalls ein Myokin, es gehört zur *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ )-Familie und hemmt, als negativer Regulator, das Muskelwachstum (Walker et al. 2016).

Nach einer proteolytischen Spaltung wird das Myostatin-Vorläufermolekül zum aktiven Liganden, der nun an den Aktivin Typ II (ActRIIB)-Rezeptor bindet und die Aktivin Rezeptor-*like* Kinase 4/5 (ALK4 und ALK5) aktiviert (Abbildung 3). Der aktivierte Rezeptor phosphoryliert daraufhin das Protein *Mothers against decapentaplegic homolog 2/3* (Smad2/3). Dieser Smad-Komplex löst als Transkriptionsfaktor Veränderungen in der Gen-Transkription aus, wodurch es zum Muskelabbau kommt (Ojima et al. 2020; Webster et al. 2020). Durch die Bindung von Myostatin an seinen Rezeptor wird zudem die Menge an Protein-Kinase B (pAkt) reduziert. Dies zieht wiederum die Aktivierung von Caspase 3 und *Forkhead-Box-Protein O3* (FOXO3) nach sich (Amirouche et al. 2009). FOXO3 sorgt durch seine Funktion als TF für die vermehrte Expression von E3-Ubiquitin-Ligasen *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF/TRIM63) und Atrogin-1. Die beiden Proteine sorgen über Ubiquitinierung für den verstärkten Abbau von Muskelproteinen im Proteasom (Han und Mitch 2011). So wird durch Myostatin sowohl die Glukose-Aufnahme als auch die Proteindegradation im Muskel beeinflusst (Baczek et al. 2020).



**Abbildung 3: Molekularer Stoffwechselweg der Muskelproteindegradation durch Myostatin**

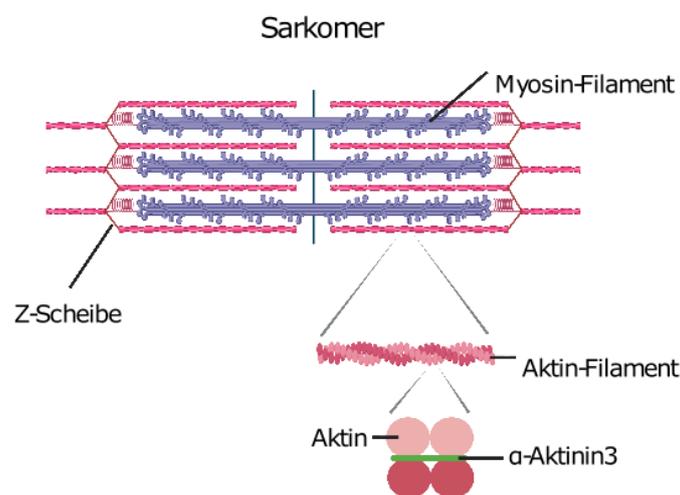
Myostatin bindet an den Aktin Typ II (ActRIIB)-Rezeptor und aktiviert dadurch die Aktin Transmembran-Kinasen 4/5 (ALK 4/5). Dies katalysiert die Phosphorylierung von *Mothers against decapentaplegic homolog 2 und 3* (Smad2/3). Der Smad2/3-Komplex gelangt in den Zellkern woraufhin es zu Änderungen in der Gen-Expression kommt. Daneben sinkt durch die Myostatin-Bindung an den Rezeptor die Menge an phosphorylierter Protein-Kinase B (p-Akt) in der Muskelzelle. Durch die daraus resultierende Dephosphorylierung von *Forkhead-Box-Protein O3* (FOXO) kann der Transkriptionsfaktor in den Zellkern gelangen und dort die Transkription von E3-Ubiquitin-Ligasen Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) und Atrogen-1 aktivieren. Im Proteasom der Muskelzelle kommt es schließlich durch E3-Ligasen zur Ubiquitinierung und resultierender Proteindegradation (nach Han und Mitch 2011).

### 1.3.2.3 Myogenin

Der Transkriptionsfaktor Myogenin (Gen-Name MYOG) fördert die Differenzierung von Myoblasten in Myozyten und ist somit entscheidend für die Entwicklung der Muskulatur (Hasty et al. 1993; Karalaki et al. 2009). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor spielt Myogenin jedoch auch bei skelettaler Muskelatrophie eine Rolle. Dabei bindet MYOG an die Promotorensequenz der beiden E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und Atrogen-1 und aktiviert so über transkriptionelle Kaskaden Proteolyse und Atrophie (Moresi et al. 2010).

### 1.3.2.4 Alpha-Aktinin3

Die zur Spektrin-Protein-Superfamilie gehörenden  $\alpha$ -Aktininen sind konservierte Proteine. Neben ihrer Funktion als Strukturproteine, interagieren sie auch als Signalproteine mit Membranrezeptoren, Ionenkanälen und metabolischen Enzymen. Das Aktinin  $\alpha$ -Aktinin3 (Gen-Name ACTN3) wird nur in Typ II-Muskelfasern exprimiert und sorgt dort in der sogenannten Z-Scheibe von Sarkomere für Stabilität, indem es Aktin-Filamente vernetzt (Abbildung 4) (MacArthur und North 2004; Houweling und North 2009). Kommt es bei Patienten zur Muskelatrophie, ubiquitiniert die E3-Ligase MuRF1 das  $\alpha$ -Aktinin3 der Z-Scheiben und leitet damit die Degradation der Proteine durch das 26S-Proteasom ein (Palus et al. 2014).



**Abbildung 4: Aufbau des Sarkomers eines Muskels**

Das Protein  $\alpha$ -Aktinin3 vernetzt in der Z-Scheibe von Sarkomeren Aktin-Filamente und sorgt durch seine Funktion als Strukturprotein für Stabilität in der Muskelfaser.

### 1.3.2.5 Muscle RING-Finger-1/Tripartite Motif Containing 63

Die E3-Ubiquitin-Ligase Muskel RING-Finger-1 (MuRF1), welche auch Tripartite Motif Containing 63 (TRIM63, Gen-Name TRIM63) genannt wird, ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt:

- im Energiemetabolismus
- in der transkriptionellen Regulation
- bei der Proteindegradation (Heras et al. 2019).

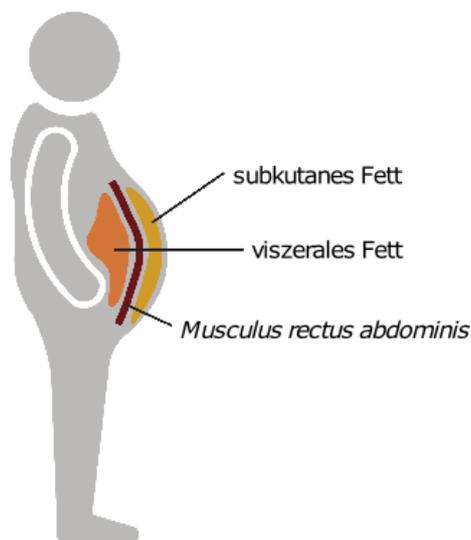
Letzteres ist vor allem für den Zusammenhang mit Muskelatrophie entscheidend. In seiner Funktion als Ligase ubiquitiniert MuRF1 seine Protein-Substrate über eine Isopeptid-Verknüpfung am Lysin-Rest (Polge et al. 2018). Durch diese posttranskriptionelle Modifikation werden die Sarkomer-Proteine anschließend im Proteasom abgebaut (Clarke et al. 2007; Dodson et al. 2011). Während des kachektischen Status eines Patienten liegen erhöhte Menge von *PPAR $\gamma$  coactivator 1 alpha* (PGC1- $\alpha$ ), NF $\kappa$ B, Myostatin, Myogenin und FOXO3

vor. All diese Faktoren fungieren als Aktivatoren der MuRF1-Transkription und verstärken somit den Abbauprozess von Proteinen (Peris-Moreno et al. 2020).

Beim kachektischen Syndrom kommt es nicht nur zum starken Abbau von Muskelmasse und –kraft, sondern auch zum Verlust von Fettgewebe.

## 1.4 Veränderungen im subkutanen und viszeralen Fettgewebe bei Tumorkachexie

Fettgewebe weist einen äußerst komplexen Aufbau auf und hat durch seine zahlreichen Funktionen im Körper einen starken Einfluss auf die gesamte Physiologie. Es ist nicht nur das größte Energie-Depot des Körpers, sondern auch das größte endokrine Organ (Kawai et al. 2021). Neben der Freisetzung von Faktoren wie Leptin, Adiponectin oder TNF- $\alpha$  regelt es die Energie-Homöostase, nimmt Einfluss auf das Immunsystem und ist an der Steuerung des Glukose- und Lipid-Stoffwechsels beteiligt (Kershaw und Flier 2004; Hauner 2005). Im Körper lässt sich das Fettgewebe in den subkutanen und den viszeralen Bereich unterteilen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Verteilung des Fettgewebes im menschlichen Körper**

Das subkutane Fettgewebe befindet sich beim Menschen unter der Haut. Das intraabdominale Fett wird auch als viszerale Fettgewebe bezeichnet. Es ist unter der Bauchmuskulatur (*Musculus rectus abdominis*) lokalisiert und umgibt dort die inneren Organe.

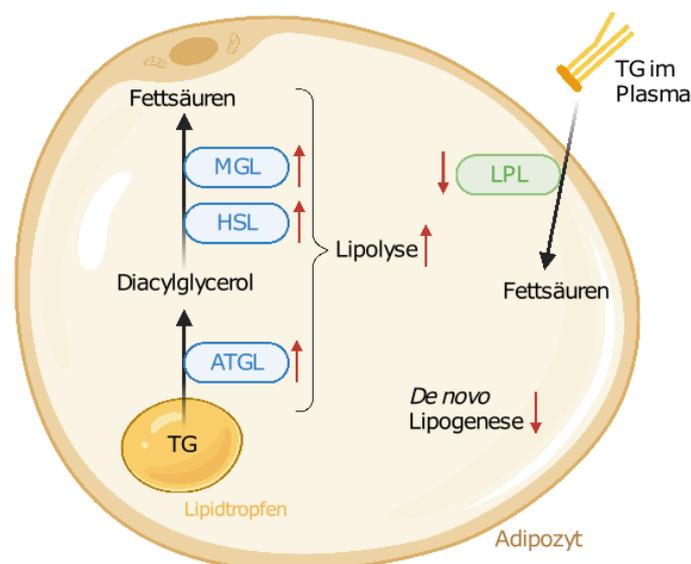
Dabei befinden sich im viszeralen Fettgewebe mehr Immunzellen und der Anteil an Adipozyten ist höher. Zudem zeigen die vorhandenen Präadipozyten eine geringere Differenzierungskapazität auf und die Gensignatur der Präadipozyten unterscheidet sich zwischen den beiden Depots (Ibrahim 2010; Chau et al. 2014; Rosen und Spiegelman 2014). Nicht nur die Fettgewebsbereiche werden differenziert betrachtet, auch die darin vorkommenden Adipozyten werden klassifiziert: der im Körper eines Erwachsenen prädominierend vorkommende unilokuläre weiße Adipozyt, und der braune Adipozyt. Letzterer kommt im

braunen Fettgewebe vor, zeichnet sich durch eine multilokuläre Lipidspeicherung und die Expression des *Uncoupling protein 1* (UCP1) aus. Dieses, in der Mitochondrienmembran angesiedelte Protein, ist ein zentrales Molekül in der Thermogenese und ermöglicht eine von der Atmungskette entkoppelte Energieerzeugung, bei der die Energie in Form von Wärme freigesetzt wird (Cypess et al. 2009; Virtanen et al. 2009). Reife Adipozyten entsprechen durch ihre Füllung mit Lipiden über 90 % des Volumens im Fettgewebe, sind jedoch prozentual nicht zellulärer Hauptbestandteil. In einem Gramm Fettgewebe befinden sich nur ca. ein bis zwei Millionen Adipozyten aber vier bis sechs Millionen stromal-vaskuläre Zellen, darunter z.B. Leukozyten. Neben weiteren Immunzellen, enthält Fettgeweben darüber hinaus Fibroblasten, Präadipozyten und Stammzellen (Rosen und Spiegelman 2014; Emont et al. 2022).

Wie oben ausgeführt, fungiert humanes Fettgewebe als größtes Energie-Depot des Körpers. Wird Energie benötigt, kommt es in den Adipozyten zur hydrolytischen Spaltung von Triglyceriden (TG) in Fettsäuren (FS).

### 1.4.1 Regulatoren der Lipolyse

Der komplexe, enzymatische Prozess, bei dem TG in FS gespalten werden, bezeichnet man als Lipolyse. An dessen Regulation sind Lipasen, Hormone und andere biochemische Botenstoffe beteiligt (Yang und Mottillo 2020; Li et al. 2022). Der Abbau der TG wird im Fettgewebe hauptsächlich von den drei Enzymen Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), Hormonsensitive-Lipase (HSL) und der Monoacylglycerol-Lipase (MGL) katalysiert (Abbildung 6) (Tornqvist und Befrage 1976; Befrage et al. 1977; Zimmermann et al. 2004).



**Abbildung 6: Erhöhte lipolytische Aktivität in Adipozyten bei Tumorkachexie**

Der Verlust von Fettgewebe bei Krebspatienten mit Kachexie entsteht durch den vermehrten Abbau von Triglyceriden (TG) durch die Enzyme Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL, blau), Hormonsensitive Lipase (HSL, blau) und der Monoacylglycerol-Lipase (MGL, blau). Ebenso findet weniger *de novo* Lipogenese in der Fettzelle statt und die enzymatische Umsetzung von im Plasma vorhandenen TG in Fettsäuren durch die Lipoproteinlipase (LPL, grün) ist vermindert (nach Sun et al. 2020).

#### 1.4.1.1 Adipozyten-Triglycerid-Lipase und Hormonsensitive Lipase

ATGL, welche vom Gen PNPLA2 codiert wird, und HSL, deren Sequenz auf dem Gen LIPE codiert ist, hydrolysieren ca. 90 % der im Fettgewebe vorliegenden TG (Schweiger et al. 2006; Haemmerle et al. 2011). Die beiden lipolytischen Enzyme werden in vielen Geweben exprimiert, wobei ihre höchste Expressionsrate im weißen und braunen Fettgewebe zu finden ist (Holm et al. 2000; Schreiber et al. 2019). Neben MGL sind ATGL und HSL die beiden limitierenden Enzyme bei der Hydrolyse von TG in Adipozyten (Abbildung 6) (Hofer et al. 2020). Im initialen Schritt schneidet ATGL die Esterbindung im TG und interagiert mit dem Coaktivator Protein CGI-58, wodurch eine weitere Lipase, HSL, phosphoryliert wird. Das entstandene Diacylglycerid wird anschließend von der aktivierten HSL hydrolysiert und es entsteht FS und Monoacylglycerol (Tsolis und Robertson 2013; Vaitkus und Celi 2016). Hunger,  $\beta$ -adrenerge Stimuli wie Glukokortikoide und *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR)-Agonisten wirken auf die hydrolytische Funktion von ATGL aktivierend. Dagegen wirkt bei ATGL das durch Nahrungsaufnahme im Körper freigesetzte Insulin inhibitorisch auf die Transkription (Zechner et al. 2012).

#### 1.4.1.2 Lipoproteinlipase

Die Lipoproteinlipase (LPL) wird vom gleichnamigen Gen kodiert, gehört ebenfalls zur TG-Hydrolase-Familie und kommt vor allem auf Endothelzellen im weißen Fettgewebe und im Muskel vor (Roberts et al. 2022). In der Zirkulation vorliegende TG werden durch die Lipase in Glycerol und FS gespalten (Abbildung 6) (Beigneux et al. 2019). Die Aktivität der LPL wird in Adipozyten durch Insulin stimuliert, wohingegen TNF- $\alpha$  und PPAR negativ regulierend auf die Transkription und Aktivität des Enzyms wirken (Marshall et al. 1994; Schoonjans et al. 1996).

#### 1.4.2 Abbau von Fettgewebe und Lipolyse in der Tumorkachexie

Humanes Fettgewebe nimmt großen Einfluss auf den Metabolismus, da es stark an der Energie-Homöostase beteiligt ist und durch die Freisetzung von z.B. Adipokinen auch eine sekretorische Funktion hat (Rosen und Spiegelman 2014). Viele Krankheiten wie Adipositas, Typ-2 Diabetes oder Kachexie sind mit Störungen im Fettgewebe assoziiert (Wang et al. 2019; Honecker et al. 2021). In longitudinalen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tumorkachexie erst Fettmasse verlieren, bevor auch ein Verlust der Muskelmasse zu verzeichnen ist (Bing und Trayhurn 2008). Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Größe der Adipozyten ab. Es verkleinern sich deshalb nicht nur die Bereiche des viszeralen Fettgewebes, zusätzlich findet auch eine Remodellierung im Gewebsaufbau statt. Genexpressionsprofile subkutanen Fetts kachektischer Tumorpatienten legen starke Abweichungen in der Zell- und Gewebestruktur offen. Im Vergleich zu intaktem Fettgewebe sind die Zelladhäsion, das Zytoskelett sowie der Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM) verändert. All dies führt zu einer

reduzierten Lipidspeicherkapazität bei Patienten mit Tumorkachexie (Ogiwara et al. 1994; Dahlman et al. 2010; Mracek et al. 2011; Bing 2011).

Die detaillierte Betrachtung der lipolytischen Aktivität im Adipozyten eines kachektischen Tumorpatienten sind in Abbildung 6 zusammengefasst dargestellt.

Der Abbau von Fettgewebe und die damit verbundene Lipolyse sind spezie-spezifisch stark reguliert und unterscheiden sich oftmals interindividuell (Kulyté et al. 2020). Sowohl in kachektischen Mausmodellen als auch in Untersuchungen mit humanem Probenmaterial von Kachexie-Patienten wurde eine erhöhte lipolytische Rate im Fettgewebe detektiert (Dalal 2019). Ausschlaggebend hierfür ist, dass neben der Menge an mRNA auch die Proteinmenge der beiden Enzyme ATGL und HSL im weißen Fettgewebe von kachektischen Krebspatienten erhöht vorliegt (Das und Hoefler 2013; Daas et al. 2018; Dalal 2019). Die vermehrte Mobilisierung von FA durch die gesteigerte Lipasen-Aktivität „überschwemmt“ andere Organe im Körper mit diesen. Insulinsensitivität, Dysfunktionen in Mitochondrien und Apoptose im Muskel von Patienten mit Kachexie sind die Folge (Das und Hoefler 2013). Zusätzlich ist bei Patienten mit Tumorkachexie die LPL-Aktivität vermindert, da oftmals eine erhöhte Menge an TNF- $\alpha$  vorliegt (Briddon et al. 1991). Durch die geringere enzymatische Aktivität der Lipase werden weniger TG aus der Zirkulation aufgenommen. Die Lipidaufnahme im weißen Fettgewebe ist somit bei Patienten mit Kachexie vermindert. In diesem katabolen Zustand nimmt auch die *de novo*-Lipogenese ab und die Menge an TG in der Zelle sinkt (Argilés et al. 2005).

Neben den genannten Veränderungen, die in Blut, Leber, Muskel und Fettgewebe, unter Tumorkachexie auftreten, ist die Erforschung von beteiligten Micro-Ribonukleinsäuren (miRNA) und deren Einfluss auf die Erkrankung bisher nicht eingehend beleuchtet worden. Im nachfolgenden Kapitel wird daher auf deren Funktion in Zusammenhang mit Tumorkachexie eingegangen und einige dieser miRNAs näher betrachtet.

## 1.5 Mikro-Ribonukleinsäuren

### 1.5.1 Definition und Biogenese

Als Micro-Ribonukleinsäuren (miRNA) werden endogene, kurze, nichtcodierende RNAs bezeichnet. Diese bestehen aus bis zu 23 Nukleotiden, regulieren zwischen 30 bis 80 % der Expression des menschlichen Genoms und sind in ihrer Funktion als bioaktive Moleküle an der metabolischen Regulation beteiligt. Dabei unterdrücken sie meist die Gen-Expression auf posttranskriptioneller Ebene (Baek et al. 2008; Lorente-Cebrián et al. 2019; Wang et al. 2020a). Um jedoch in die Transkriptionsprozesse eingreifen zu können, sind einige Schritte der Prozessierung nötig. Nach der Transkription der miRNA-Gene von der RNA-Polymerase II wird das *primary microRNA*-Transkript (pri-miRNA) durch die RNase III *Drosha* auf ca. 60 –

80 Nukleotid-lange RNAs (pre-miRNA) gekürzt. Die pre-miRNA weist nun die charakteristische Haarnadelstruktur auf und es erfolgt der Transport ins Zytoplasma (Bartel 2004; Lin und Gregory 2015). Die dort vorhandene RNase-III *Dicer* schneidet die pre-miRNA in 21 bis 23 Nukleotid lange doppelsträngige miRNAs. Durch anschließende Interaktion von *Dicer* mit dem Bindeprotein *transactivation response element RNA-binding protein* (TRBP) wird das miRNA-Duplex entwunden und liegt daher anschließend einzelsträngig vor. Nachdem der einzelne miRNA-Strang vom *RNA-inducer silencing complex* (RISC) aufgenommen und zur entsprechenden Ziel-mRNA transportiert wird, fungiert er als regulatorische Einheit. Die Inhibierung der Zielgene ergibt sich letztlich durch zwei unterschiedliche Vorgänge. Entweder kommt es zur Hybridisierung der miRNA mit der Target-mRNA, wodurch diese degradiert wird, oder der RISC-miRNA-Komplex bewirkt durch seine Bindung an die Target-mRNA die Repression der Translation (Ha und Kim 2014; Bose und Bhattacharyya 2016; Magri et al. 2018).

miRNAs sind wichtige Regulatoren der Transkription und beeinflussen die Genexpression in zahlreichen Geweben, so auch im Skelettmuskel oder Fettgewebe. Indem sie vielfältige Funktionen in der Entwicklung, Homöostase und Metabolismus von Geweben haben, sind sie infolgedessen auch an der Entstehung von Krankheiten beteiligt (Seeliger et al. 2016; Lorente-Cebrián et al. 2019; Singh et al. 2020; Wang et al. 2020a)

### 1.5.2 miRNAs und ihre Rolle im Fettgewebe

Im Fettgewebe haben miRNAs eine Vielzahl an Funktionen und wirken dabei als transkriptionelle und epigenetische Regulatoren pro- oder anti-adipogen (Xie et al. 2009; Icli und Feinberg 2017). Sie sind beteiligt an der Adipogenese, am Lipid-Metabolismus, an Phänotyp und Funktion weißer und brauner Adipozyten, „Browning“, Zell-Zell-Kommunikation sowie der Glukose-Homöostase (Heyn et al. 2020). Während miR-519 durch ihre transkriptionelle Funktion die Lipid-Akkumulation während des Differenzierungsprozesses erhöht (Improta Caria et al. 2018), beeinflussen miR-26 und miR-27 die Proliferation und Differenzierung von Adipozyten über den TF *Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ* (PPAR $\gamma$ ) oder den Akt/PKB-Stoffwechselweg negativ (Karbiener et al. 2009; Karbiener et al. 2014). In Präadipozyten binden miR-103 und miR-107 an Target-Proteine des Wnt/Catenin-Stoffwechselwegs, wodurch Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress induzierte Apoptose ausgelöst wird. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Adipogenese in den Zellen inhibiert wird (Zhang et al. 2018). Ferner wird der inflammatorische Status des Fettgewebes unter anderem von miRNAs reguliert. Durch den Austausch von miRNAs zwischen Adipozyten und Makrophagen werden letztere in ihrem Phänotyp und ihrer Polarisierung beeinflusst und

führen schließlich zu chronischen Immunreaktionen im Gewebe (Zhang et al. 2013b; Miranda et al. 2018; Hu et al. 2018a).

Die chronische Inflammation bei Tumorkachexie trägt entscheidend zu der schlechten Gesamtverfassung der Patienten bei. Im Folgenden wird die Rolle der miRNAs in Bezug auf den kachektischen Status von Krebspatienten weiter ausgeführt.

### 1.5.3 miRNAs in der Tumorkachexie

Die Veränderung molekularer Stoffwechselwege durch miRNAs und deren stimulierender Einfluss auf Krebs und systemische Inflammation, lassen auf einen relevanten Beitrag zur Pathogenese von Tumorkachexie schließen. Die in der nachfolgenden Tabelle beispielhaft aufgezeigten miRNAs wurden bereits in humanem Gewebe oder Zelllinien humanen Ursprungs detektiert und mit Tumorkachexie in Verbindung gebracht (Tabelle 2).

**Tabelle 2: miRNAs in der Tumorkachexie**

miRNA	Funktion	Publikation
miR-27b	Inhibierung Muskelwachstum	(Freire et al. 2019)
miR-122	Regulierung Lipid-Metabolismus	(Yang et al. 2015)
miR-199a	Inhibierung Myogenese	(Jia et al. 2014)
miR-378	Aktivierung Expression Lipasen	(Kulyté et al. 2014)
miR-424	Inhibierung Myogenese	(Sarkar et al. 2010)

Da miRNAs eine hohe Stabilität in Körperflüssigkeiten aufweisen, eignen sie sich zudem sehr gut als potentielle Biomarker und als Moleküle für therapeutische Ansätze (Donzelli et al. 2020; Kottorou et al. 2021).

Studien mit Krebspatienten zeigen, dass geringe miR-130a-Konzentrationen im Serum mit einem erhöhten Level von TNF- $\alpha$  assoziiert sind und sich damit das Risiko eine Kachexie auszubilden erhöht (Powrózek et al. 2018). Daneben wurde bei Patienten mit Kolorektalkarzinomen, die einen niedrigen Lendenmuskel-Index aufwiesen, erhöhte Konzentrationen der miRNAs miR-203 und miR-21 im Serum detektiert. Die erhöhten Spiegel gingen mit einer niedrigeren Muskelmasse einher (Okugawa et al. 2018; Okugawa et al. 2019). Unter den ca. 2.600 bekannten reifen miRNAs kommen einige spezifisch im Skelettmuskel vor und verändern dort die Physiologie. Unter anderem greifen solche miRNAs über Genexpressionsveränderungen in die Myogenese sowie die Muskelregeneration ein (Marceca et al. 2020). Beispielsweise wird die Regulation der Muskelatrophie bei Kachexie von einigen miRNAs über den Akt-FOXO-Signalweg begünstigt. So inhibiert miR-18a die Phosphorylierung von Akt, was in einer verstärkten Aktivierung von FOXO resultiert. Letztlich kommt es dabei zur vermehrten Regulierung von Atrogin-1 und MuRF1, welche den

kachektischen Status der Patienten begünstigt (siehe 1.3.2.2.). Daneben führt die Inhibierung der Translation zu Veränderungen, die sich negativ auf die mitochondriale Funktion (z.B. miR-206) auswirken oder auch direkt Muskelzell-Apoptose begünstigen (z.B. miR-628) (Soares et al. 2014; Yu et al. 2016; Narasimhan et al. 2017a).

Einige miRNAs (z.B. let-7i-5p, miR-21) beeinflussen zudem auch molekulare Mechanismen im Fettgewebe. Über die Stimulierung des *Tumor-Growth-Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ )-Stoffwechselwegs ist beispielsweise die miR-21 an der Differenzierung von Präadipozyten zu ausgereiften Adipozyten beteiligt. Resultierende Zytokin-Überexpression unterbindet nicht nur die Differenzierung der Zellen, sondern initiiert auch den Abbau von Fettgewebe (Kim et al. 2009; Giroud et al. 2016). In kachektischem Fettgewebe kommt es zu erhöhter Lipolyse, indem z.B. miR-375 die Expression einiger Schlüsselgene (z.B. HSL, ATGL) des lipolytischen Stoffwechselwegs in Adipozyten stimulierend reguliert (Kulyté et al. 2014).

Die miRNAs, die in der vorliegenden Arbeit mit dem kachektischen Status bei Tumorpatienten assoziiert werden konnten, werden in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

### **1.5.3.1 miR-27b-3p**

Im humanen Fettgewebe sowie dem Muskel kann die Expression von miR-27b nachgewiesen werden. Im Muskel reguliert sie die mitochondriale Biogenese in Myozyten und ist zudem an der Myogenese beteiligt (Crist et al. 2009; Shen et al. 2016; Wang et al. 2020b). Dabei scheint es zur Bindung von miR-27b an MSTN zu kommen, wodurch der negative Regulator skelettaler Muskelmasse selbst inhibiert wird (Freire et al. 2019).

Die miR-27-Genfamilie spielt jedoch nicht nur im Muskel eine Rolle, sondern auch im Fettgewebe. Während des adipogenen Differenzierungsprozesses liegen nur geringe Expressionsmengen dieser miRNAs vor. Die miRNAs der Genfamilie binden an die entsprechenden Masterregulatoren der Adipogenese, so dass diese unterdrückt werden (Lin et al. 2009; Karbiener et al. 2009).

### **1.5.3.2 miR-375**

Die evolutionär hochkonservierte miR-375 ist eine essenzielle miRNA. Sie ist bei der embryonalen Ausbildung und Funktion des Pankreas beteiligt und darüber hinaus auch für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Motorneuronen (Xueling Li 2013; Bhinge et al. 2015). In Zusammenhang mit Kachexie ist vor allem ihr regulatorischer Einfluss auf Fettgewebsstoffwechselprozesse anzuführen (Kraus et al. 2015; Seeliger et al. 2022). miR-375 steuert dort über den Akt-Stoffwechselweg die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (Chen et al. 2017a; Chen et al. 2019) und begünstigt die adipogene Differenzierung durch Erhöhung der mRNA der beiden Regulatoren

CCAAT/Enhancer Binding Protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) und PPAR $\gamma$ . Zudem werden durch die miRNA sowohl das *acid-binding Protein* (aP2) aktiviert als auch die TG-Akkumulation gesteigert (Ling et al. 2011).

### 1.5.3.3 miR-424-5p

Eine weitere, in Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen stehende miRNA, ist miR-424-5p. Sie ist ein Mitglied der miR-16-Familie, deren regulative Funktion stark vom Zelltyp abhängig ist (Zhao et al. 2013). Bindet diese miRNA z.B. im Muskel an Cyclin-abhängige Kinasen, wird die Differenzierung von Myoblasten in Myotuben initiiert (Sarkar et al. 2010). Auf der anderen Seite weisen auch mRNA-codierende Proteine, die bei der Transkription von rRNA nötig sind, passende Targetsequenzen auf, wodurch die Muskel-Protein-Synthese inhibiert wird und es zum Muskelabbau kommt (Connolly et al. 2018; van de Worp et al. 2018). Neben den regulatorischen Prozessen im Muskel werden auch im Fettgewebe durch das miR-424-Cluster zelluläre Funktionen gesteuert. Bindet miR-424 an Synuclein, wird die Differenzierung von Fettzellen aktiviert, was zu einer Zunahme von Fettgewebe führt (Rodríguez-Barrueco et al. 2022).

## 1.6 Zielsetzung

Wenngleich die Forschung in den letzten Jahren regelmäßig neue Erkenntnisse zu molekularen Veränderungen in Stoffwechselwegen der Tumorkachexie offenlegen konnte und stetig präzisere Mausmodelle zu dieser Erkrankung entwickelt wurden, blieb die Entdeckung eines zuverlässigen Biomarkers bislang aus.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch den Aufbau einer humanen Biobank, in Kooperation mit der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, Gewebebiopsien und klinische Parameter von Tumorpatienten zu erhalten. Die molekularen Untersuchungen des Blutes, der Leber-, Muskel-, subkutanen und viszerale Fettgeweben von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie sollen die pathologischen Unterschiede und Veränderungen zwischen den Patientengruppen aufzeigen und mögliche Biomarker für die klinische Anwendung herausarbeiten. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich dabei auf die Analyse von mRNA- und miRNA-Expressionsniveaus im Gewebe sowie auf zellulärer Ebene.

Nach Erläuterung der theoretischen Grundlagen im vorhergehenden Kapitel, liegt der Schwerpunkt des folgenden Abschnittes auf den verwendeten Materialien und der Beschreibung der praktischen Versuchsdurchführungen.

## 2. Material

### 2.1 Software

In der nachstehenden Tabelle sind alle Software-Programme gelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Software-Programme**

Name der Software	Firma
2100 Expert	© Agilent Technologies, Inc.
Adiposoft	Center of Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra
Bio-Plex Manager 4.1.1	© Bio-Rad Laboratories, Inc.
Citavi 6	© Swiss Academic Software
Cytoscape	U.S. National Institute of General Medical Sciences (NIGMS)
Gene Ontology	
GraphPad PRISM Version 9	© Graphpad Software, Inc.
INSTINCT V, 1.9	© Hamilton Bonaduz AG
LAS X	© Leica Microsystems CMS GmbH
LightCycler® 480 Software release 1.5.0	© Hoffmann-La Roche AG
MultMiR in R	Department of Surgery, School of Medicine, University of Colorado Denver
R	Free Software Foundation's GNU project
String, 11,5	© STRING CONSORTIUM 2021
SPSS Statistics 26	© IBM
Tecan i-control, 2.0.10.0	© Tecan Group AG
VHX 6000 Series	© Keyence Corporation

## 2.2 Kits

In der nachstehenden Tabelle sind die verwendeten Kits aufgeführt.

**Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kits**

Name des Kits	Firma
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen N. V.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
miRCURY LNA RT Kit	Qiagen N. V.
miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	Qiagen N. V.
mirVana™ miRNA Isolation Kit, without phenol	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 2.3 ELISA

Folgende ELISA-Kits wurden zur Etablierung eines Biomarkers verwendet:

**Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten ELISA**

Name des ELISA-Kits	Firma
Bio-Plex Pro™ Diabetes Assays	Bio-Rad Laboratories, Inc.
PTHLH ELISA KIT (Human)	Aviva Systems Biology Corporation
Insulin ELISA	DRG International, Inc.

## 2.4 Chemikalien

Der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zu entnehmen.

**Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien**

Chemikalien	Firma
(+)D-Biotin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Acid-phenol:chlorophorm 5:1	Ambion Corp
alamarBlue Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.
apo-Transferrin, human	Merck KGaA
s-Mercaptoethanol	Merck KGaA
BSA Lösung 10 % in DPBS (Dulbecco's phosphatebuffered saline)	Merck KGaA
Dexamethason	Merck KGaA
DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Thermo Fisher Scientific Inc.
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)	Merck KGaA
EGF (epidermal growth factor)	R&D Systems
Eosin	
EtOH (ethanol) abs	VWR International
EtOH abs. analytical reagent grade	Thermo Fisher Scientific Inc.
FCS (fetales Kälberserum)	Merck KGaA
FGF (fibroblast growth factor)	R&D Systems
FHS (fetales Pferdeserum)	
Formaldehyd-Lösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hämatoxylin (Heamalum (Mayer´s) Gurr	VWR International
Hydrocortison	Merck KGaA
Insulin, human	Merck KGaA
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)	SERVA Electrophoresis GmbH
Kollagenase 0.2 U	SERVA Electrophoresis GmbH
Linolsäure	Merck KGaA
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KGaA
NucBlue Live ReadyProbes Reagent Hoechst	Thermo Fisher Scientific Inc.
Oil Red O	Merck KGaA
Ölsäure	Merck KGaA
Pantothenate (D-pantothenic acid hemicalcium salt)	Merck KGaA
PBS (phosphate-buffered saline) w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Merck KGaA
Penicillin-Streptomycin (10.000 units/10 mg/ml)	Merck KGaA
RLT buffer, RNeasy Kit	Qiagen N. V.
Rosiglitazon	Merck KGaA
T3 (3,3'-5-triiodo-L-thyronin sodium salt)	Merck KGaA
Triethanolamine-HCl (hydrochloric acid)	Merck KGaA
Tris-HCl	Merck KGaA
Trypan Blue solution 0.4 %	Merck KGaA
Trypsin/EDTA (TrypLE Express)	Merck KGaA

## 2.5 Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer filtriert (Merck KGaA, Steritop, 0,22 µm PES) und bei 4°C gelagert. Es wurde bi-distilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) (Veolia Water, Purelab flex) verwendet.

### 2.5.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

#### Biotin/Pantothenat-Lösung

3,3 mM Biotin, 1,7 mM Pantothenat in DMEM-F12  
bei -20°C gelagert

#### β-Mercaptoethanol-Lösung

5 mM β-Mercaptoethanol in ddH<sub>2</sub>O  
Lagerung im Dunkeln, RT

#### BSA-Lösung

200 mg/ml BSA in ddH<sub>2</sub>O

#### BSA PBS-Lösung

0,1 % BSA in PBS

#### Gekoppelte Fettsäuren (FFA)

6 mM Linolsäure-Lösung in 10% BSA-DPBS-Lösung  
30 min bei 37°C  
Zugabe 6 mM Ölsäure-Lösung in Linolsäure-BAS-DPBS-Lösung  
30 min bei 37°C  
bei 4 °C gelagert

#### Dexamethason-Stock-Lösung

25 mM Dexamethason in 95% EtOH  
bei -20°C gelagert

#### Dexamethason-Arbeits-Lösung

25 µM Dexamethason-Stock-Lösung in 50 % EtOH  
bei -20°C gelagert

#### EGF-Stock-Lösung

50 µg/ml EGF in BSA-Lösung  
bei -20°C gelagert

#### EGF-Arbeits-Lösung

5 µg/ml EGF-Stock-Lösung in BSA-Lösung  
bei -20°C gelagert

#### FGF-Stock-Lösung

50 µg/ml FGF in BSA-Lösung  
bei -20°C gelagert

#### FGF-Arbeits-Lösung

5 µg/ml FGF-Stock-Lösung in BSA-Lösung  
bei -20°C gelagert

**Hydrocortison-Stock-Lösung**

10 nM Hydrocortison in 100 % EtOH  
bei -20°C gelagert

**Hydrocortison-Arbeits-Lösung**

100 µM Hydrocortison Stock Lösung in 50 % EtOH  
bei -20°C gelagert

**IBMX-Lösung**

20 mM IBMX in ddH<sub>2</sub>O, Spatelspitze Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Rosiglitazon-Stock-Lösung**

10 mM Rosiglitazon in DMSO  
bei -20°C gelagert

**Rosiglitazon-Arbeits-Lösung**

2 mM Rosiglitazon-Stock-Lösung in DMSO  
bei -20°C gelagert

**T3-Stock-Lösung**

50 µM T3 in 50 % EtOH  
bei -20°C gelagert

**T3-Arbeits-Lösung**

2 µM T3-Stock-Lösung in 50 % EtOH  
bei -20°C gelagert

**Transferrin-Lösung**

1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O  
bei -20°C gelagert

**Linolsäure-Lösung**

200 mM Linolsäure in EtOH abs.  
bei -20°C gelagert

**Ölsäure-Lösung**

200 mM Ölsäure in EtOH abs.  
bei -20°C gelagert

**Transfektions-Puffer**

10 mM Tris, pH 7,5  
1 mM EDTA

## 2.5.2 Medien Zellkultur Präadipozyten

Die Medien für die Zellkultur wurden bei 4 °C gelagert, ca. 3 Wochen verwendet und vor Zugabe zu den Zellen auf 37 °C erwärmt.

Tabelle 7: Medien Zellkultur Präadipozyten

### Isolationsmedium

	Konzentration
DMEM/F12	-
Pen/Strep	1 %

### Proliferationsmedium (PM)

	Konzentration
DMEM/F12	-
B/P	B: 33 µM/ P: 17 µM
P/S	1 %
FCS F	2,5 %
Insulin-Lösung	0,13 µM
EGF-Arbeits-Lösung	10 ng/ml
FGF-Arbeits-Lösung	1 ng/ml

### Differenzierungsmedium (DM)

	Konzentration
DMEM/F12	-
B/P	B: 33 µM/ P: 17 µM
P/S	1 %
Transferrin-Lösung	0,01 mg/ml
Insulin-Lösung	0,86 µM
T3-Arbeits-Lösung	1 nM
Hydrocortison-Arbeits-Lösung	0,1 µM
Gekoppelte Fettsäuren	6 mM

### Induktionsmedium (IM)

	Konzentration
Differenzierungsmedium	-
Rosiglitazon-Arbeits-Lösung	1 µM
Dexamethason-Arbeits-Lösung	25 nM
IBMX	0,25 nM

**Einfriermedium**

	Konzentration
DMEM/F12	-
DMSO	10 %

**2.5.3 Medien Zellkultur C2C12-Zellen**

Die Medien für die Zellkultur wurden bei 4 °C gelagert, ca. 3 Wochen verwendet und vor Zugabe zu den Zellen auf 37 °C erwärmt.

**Tabelle 8: Medien Zellkultur C2C12-Zellen**

**C2C12-Proliferationsmedium (C2C12 PM)**

	Konzentration
DMEM	-
P/S	1%
FCS F	10%

**C2C12-Differenzierungsmedium (C2C12 DM)**

	Konzentration
DMEM	-
P/S	1%
Pferdeserum	2%

**2.5.4 Lösungen für die Zellfärbungen****NucBlue-Lösung**

gebrauchsfertig

**Permeabilisations-Lösung**

0,1 % Triton X-100 in PBS  
Zur besseren Lösung kurz erwärmen

**MitoTracker-Stock-Lösung**

1 mM lyophilizierter MitoTracker in DMSO  
Lagerung im Dunkeln, -20 °C

**MitoTracker-Arbeits-Lösung**

500 nM MitoTracker-Stocklösung in Medium  
Direkt vor Verwendung frisch angesetzt, Lagerung im Dunkeln

**Phalloidin-Stock-Lösung**

66 µM in Methanol  
Lagerung im Dunkeln, -20 °C

**Phalloidin-Arbeits-Lösung**

0,44  $\mu\text{M}$  Phalloidin Stock-Lösung in 2 ml 1 % BSA-Lösung  
Direkt vor Verwendung frisch angesetzt, Lagerung im Dunkeln

### Bodipy-Stock-Lösung

3,8 mM Bodipy in DMSO  
Lagerung im Dunkeln, -20 °C

### Bodipy-Arbeits-Lösung

2  $\mu\text{M}$  Bodipy-Stock-Lösung in 2 ml PBS  
Direkt vor Verwendung frisch angesetzt, Lagerung im Dunkeln

## 2.5.5 Puffer für die Zell-Ernte

### RNA-Ernte-Puffer

1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol in RLT Puffer (gebrauchsfertig)  
Lagerung im Dunkeln, RT

### TRIzol Reagenz

gebrauchsfertig, 4 °C

## 2.5.6 Lösungen für die siRNA Transfektion

### siRNA-Stock-Lösung

Verdünnung nach Herstellerangaben  
Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$

### siRNA-Arbeits-Lösung

Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$  bzw. 30 nM in einem Well der 6-Well-Platte durch

A:	siRNA-Stock-Lösung	0,783 $\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	7,05 $\mu\text{l}$
B:	A	7,65 $\mu\text{l}$
	OptiMEM	247,35 $\mu\text{l}$

5 min inkubieren, RT

### Lipofectamin-siRNA-Lösung

A:	Lipofectamin	6,63 $\mu\text{l}$
	OptiMEM	248,4 $\mu\text{l}$
B:	A	252 $\mu\text{l}$
	siRNA-Arbeits-Lösung	252 $\mu\text{l}$

15 min inkubieren, RT

## 2.6 Primer

Als *Houskeeper* der Messungen wurden die folgenden Gene eingesetzt.

**Tabelle 9: Übersicht der *Houskeeping*-Gene abhängig vom Zell- und Gewebetyp**

	Bezeichnung Primer	Anwendung
miRNA	let-7i-5p	Serum
	miR-30e-5p	Serum
	Snord38	Fett-, Muskel- und Lebergewebe
	Snord48	Fett-, Muskel- und Lebergewebe
	RNU-6	C2C12-Zellen
mRNA	GAPDH	Fett-, Muskel- und Lebergewebe, C2C12-Zellen
	IPO8	Fettgewebe
	RPS20	Muskelgewebe
	ABCC2	Lebergewebe

Die Sequenzen der verwendeten mi/mRNA-Primer sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgelistet.

### 2.6.1 mRNA Primer

Die in Tabelle 10 aufgeführten Primer wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen und in den RT-qPCR-Ansätzen mit mRNA verwendet.

**Tabelle 10: Primer-Sequenzen für mRNA**

Bezeichnung Primer	Sequenz (5' - 3' Orientierung)
hABCC2-for	TGAGCAAGTTTCAAACGCACAT
hABCC2-rev	AGCTCTTCTCCTGCCGTCTCT
hACTN3-for	TCCAGCACCTGGCTGAGAAGTT
hACTN3-rev	CACCTCCTGTAGCAAAGCCGAA
mACTN3-for	TGCCAAGCCATCTGTGACCAGT
mACTN3-rev	GGTCAATGGTCTCCAGGAGCTT
mACTb-for	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA
mACTb-rev	GTA AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
hATGL-for	CTGCCGGGAGAAGATCAC
hATGL-rev	AGAGGGTGGTCAGCAGGTC
hBCL2-for	TCGCCCTGTGGATGACTGA
hBCL2-rev	CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA
mBCL2-for	GTACCTGAACCGGCATCTG
mBCL2-rev	GGGGCCATATAGTTCCACAA
hGAPDH-for	GATCATCAGCAATGCCTCCTGC
hGAPDH-rev	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA
mGAPDH-for	ATCCCAGAGCTGAAC
mGAPDH-rev	GAAGTCGCAGGAGAC
hIPO8-for	CGGATTATAGTCTCTGACCATGTC
hIPO8-rev	TGTGTCACCATGTTCTTCAGG
hIL-15-for	AACAGAAGCCAACCTGGGTGAATG
hIL-15-rev	CTCCAAGAGAAAGCACTTCATTGC
mIL-15-for	GTAGGTCTCCCTAAAACAGAGGC

mIL-15-rev	TCCAGGAGAAAGCAGTTCATTGC
hLIPE-for	TCCTCATGGCTCAACTCCTT
hLIPE-rev	AAGTCCCTCAGGGTCAGGTT
hMYOG-for	AGTGCCATCCAGTACATCGAGC
hMYOG-rev	AGGCGCTGTGAGAGCTGCATTC
mMYOG-for	CCATCCAGTACATTGAGCGCCT
mMYOG-rev	CTGTGGGAGTTGCATTCACTGG
hMyostatin-for	GTAGTAGACCGCTGTGGGTG
hMyostatin-rev	AGGCCTATAGCCTGTGGTACT
mMyostatin-for	AACCTTCCCAGGACCAGGAGAA
mMyostatin-rev	GGCTTCAAATCGACCGTGAGG
hPNPLA2-vor	CCCCTTCAACTCCAAGGACGA
hPNPLA2-rev	GCAGGTTGTCTGAAATGCCACC
hPPARGC1A-for	CCAAAGGATGCGCTCTCGTTCA
hPPARGC1A-rev	CGGTGTCTGTAGTGGCTTGACT
mPPARGC1A-for	CCAAAGGATGCGCTCTCGTTCA
mPPARGC1A-rev	CGGTGTCTGTAGTGGCTTGACT
hRPS20-for	GCGACTCATTGACTTGCACA
hRPS20-rev	TCAAAGTGTACTGCTGGCCC
hTRIM63-for	AAGCCAGTGGTCATCTTGCCGT
hTRIM63-rev	CTCCAGACATGGACACTGAGCT
mTRIM63-for	AAGCCAGTGGTCATCTTGCCGT
mTRIM63-rev	CTCCAGACATGGACACTGAGCT

### 2.6.2 miRNA Primer

In nachfolgender Tabelle sind alle miRCURY LNA miRNA PCR Assay-Primer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland gelistet.

**Tabelle 11: Primer-GeneGlobe Nummern für miRNA**

Name	GeneGlobe Nummer
let-7i-5p	YP00204394
miR-19b-3p	YP00204450
miR-27a-3p	YP00206038
miR-30e-5p	YP00204714
miR-103a-3p	YP00204063
miR-122-5p	YP00205664
miR-142-5p	YP00204722
miR-194-5p	YP00204080
miR-199a-3p	YP00204536
miR-375	YP00204362
miR-424-5p	YP00204736
miR-486-5p	YP00204001
Snord38b	YP00203901
Snord48	YP00203902
RNU-6	YP02119464

## 3. Methoden

### 3.1 Aufbau einer humanen Kachexie-Biobank

Die Kooperation des Lehrstuhls für Ernährungsmedizin mit der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar ermöglichte den Aufbau einer humanen Kachexie-Biobank. Im Rahmen dieser Studie wurden Patienten mit Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts im Klinikum rekrutiert, durch den Studienarzt vor Ort aufgeklärt und nach deren schriftlicher Einwilligung in die Studie aufgenommen. Die Studie (Projektnummer 409/16 S) war zuvor durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt worden und ist im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS) unter der Nummer DRKS00017285 hinterlegt.

In dieser Arbeit gelten alle Krebs-Patienten, die fünf Prozent ihres Gewichts innerhalb von sechs Monaten vor ihrer Operation verloren haben (Definition modifizierte nach Konsensus 2011, Fearon *et al.*), als Patienten mit Kachexie bzw. Tumorkachexie.

Am Tag der Operation wurden die humanen Blut- und Gewebeproben von Chirurgen entnommen und wie nachfolgend beschrieben, verarbeitet.

#### 3.1.1 Präparation des Blutes

Vor Beginn der Operation wurde vom Op-Personal je ein Serum- und EDTA-Röhrchen Blut abgenommen. Das EDTA-Röhrchen (S-Monovette® 9 ml, K3E EDTA, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) wurde sofort nach Erhalt zentrifugiert (45000 rcf, 10 min, RT) (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Hamburg, Deutschland). Das erhaltene Plasma wurde aliquotiert und der Buffycoat abgenommen. Nach halbstündiger Inkubation bei RT erfolgte die Zentrifugation (45000 rcf, 10 min, RT) (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Hamburg, Deutschland) und Aliquotierung des Serums im Serum-Röhrchen (S-Monovette® 9 ml, Serum-Gel, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland). Alle erhaltenen Proben wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das gewonnene Plasma wurde bei den ELISA-Messungen eingesetzt (siehe 3.3) und das Serum für die miRNA Array Analyse verwendet (siehe 3.2.6).

#### 3.1.2 Muskel- und Leberbiopsien

Nach Erhalt der Muskel- und Lebergewebsstücke durch den Chirurgen wurden diese mit einem Skalpell in zwei bis drei Stücke zerteilt und sofort auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung bis zur RNA-Isolation (siehe 3.2.3) erfolgte bei -80 °C.

### **3.1.3 Fettgewebsbiopsien**

Für die RNA-Isolation aus Fettgewebe wurden zwei kleinere Gewebestücke in ein Röhrchen mit RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und sofort auf Trockeneis eingefroren, um die Degradation der RNA zu vermeiden. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

Desweiteren wurde für die Anfertigung histologischer Schnitte ein Stück des Gewebes in ein mit Formaldehyd gefülltes Röhrchen gegeben und für 24 h bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Stück bis zur weiteren Bearbeitung (siehe 3.5.8) in 70 % EtOH eingelegt.

Die Isolierung der Präadipozyten (PAC) aus dem erhaltenen Fettgewebe erfolgte am Folgetag der Operation (siehe 3.5.1). Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Gewebstück in Isolationsmedium im Inkubator (Heraeus, Hera cell 240, Hanau, Deutschland) gelagert.

### **3.1.4 Klinische Daten und Follow-Up**

Zum Aufbau der Biobank wurden neben den Gewebeproben auch zahlreiche, klinische Daten und Parameter wie z.B. Größe, Gewicht, Alter, Tumorklassifikation, ASA-Fragebogen, CRP-, Albumin-, Hämoglobin- oder Quick-Wert vom Klinikum rechts der Isar aufgenommen und ermittelt. Zudem fanden bei einigen Patienten auch Messungen zur Bestimmung des SMAI statt.

Die Erfassung des Gewichtsverlaufs nach der Operation erfolgte durch einen Follow-Up. Bei diesem wurden die Patienten (oder ihr Angehörigen) nach drei, sechs und zwölf Monaten telefonisch oder per E-Mail kontaktiert und die Gewichtsdaten aufgenommen.

Die Ergebnisse des Follow-Up sind Bestandteil der Dissertation von Frau Simone Heisz, AG Prof. Hauner.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 miRNA-Isolierung aus Serum**

Die Isolation der miRNA aus Serum basiert auf einer organischen phenol-chloroform Extraktionsmethode mit Hilfe einer Silicamembran der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland (miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit). Es wurden 200 µl Probenmaterial eingesetzt und abschließend die miRNA mit 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 mRNA/miRNA-Isolierung mit TRIzol Reagenz**

Auch bei dieser Extraktionsmethode basiert die Gesamt-RNA-Isolierung aus PAC- und C2C12-Zellen auf Phenol-Chloroform. Die RNA-Isolierung mit TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfolgte nach den Herstellerangaben. Mit dem Infinite® M200

(Tecan Trading AG, Mannedorf, Schweiz) wurde die mRNA-Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3 mRNA/miRNA-Isolierung mit *mirVana*<sup>™</sup> Isolation Kit

Das *mirVana*<sup>™</sup> Isolation Kit der Firma Invitrogen<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) kombiniert eine phenol/guanidine-basierte Lyse der Proben mit der Reinigung über eine Silica-Säulenmatrix. Mit diesem Kit wurde sowohl die mRNA als auch die miRNA, aus Präadipozyten, Leber-, Muskel-, und Fettgewebstücken isoliert. Dazu wurden ca. 80 – 100 mg Gewebe abgewogen, auf Trockeneis zu einem feinen Pulver gemörsert und in 700 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Um eine Degradation der RNA zu vermeiden, erfolgt das sofortige Einfrieren bei -80 °C. Zur Ernte der Zellen für die RNA-Isolierung siehe 3.4.3.

Alle weiteren Schritte erfolgten, wie vom Hersteller angegeben. Durch das Auftragen von 50 µl Elutions-Puffer (95 °C) wurden die mRNA und miRNA von der Säule eluiert.

Die Konzentration der mRNA wurde mit dem Infinite<sup>®</sup> M200 (Tecan Trading AG, Mannedorf, Schweiz) bestimmt und die Qualität mittels Gelelektrophorese im Bioanalyzer (Small RNA Chip, Agilent Technologies, 2100 Bioanalyzer Instrument, Santa Clara, USA) überprüft. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.4 miRNA: cDNA-Synthese und RT-qPCR

Durch das Enzym reverse Transkriptase wurde aus miRNA, die vorher aus den Zellen isoliert wurde, cDNA synthetisiert. Die Verwendung der revers transkribierten cDNA erfolgte anschließend in der *real-time quantitative* PCR (RT-qPCR).

Die cDNA-Synthese erfolgte mit den Reagenzien des miRCURY LNA RT Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) und wurde, wie im Handbuch beschrieben, durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Mastermixes der reversen Transkription ist Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12: Reverse Transcription der miRNA**

miRCURY LNA RT Kit	pro RNA Probe (Serum, Fettgewebe)	pro RNA Probe (PACs, Leber- u Muskelgewebe)
5x RT <i>Reaction buffer</i>	2 µl	2 µl
RNase-free <i>water</i>	0 µl	3 µl
Spike in (UniSp6)	0,5 µl	0,5 µl
10x RT Enzyme Mix	1 µl	1 µl
RNA Probe	6,5 µl	3,5 µl
gesamt	10 µl	10 µl

Die folgende Tabelle zeigt das Programm des Mastercycler® gradient (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland), mit dem die Reaktion durchgeführt wurde.

**Tabelle 13: Mastercycler-Programm der miRNA cDNA-Synthese**

Temperatur (°C)	Zeit
42	60 min
95	5 min

Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O 1:20 verdünnt und bei -20 °C eingefroren. Die anschließende RT-qPCR erfolgte mit dem miRCURY Sybr Green Kit und LNA-enhanced miRNA Primern (Qiagen, Hilden, Deutschland), nach den im Handbuch beschriebenen Pipettierschemata (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: RT-qPCR Mastermix für miRNA**

miRCURY SYBR Green Kit	pro Probe
2x SYBRGreen Master Mix	5 µl
LNA-PCR Primer Mix	1 µl
c-DNA Probe	4 µl
total	10 µl

Die synthetisierten Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung in der RT-qPCR bei -80 °C eingefroren. Nachstehende Tabelle zeigt das RT-qPCR-Programm des verwendeten LightCyclers® 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz).

**Tabelle 15: RT-qPCR Programm für miRNA mit dem LightCyclers® 480**

	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition (per °C)	Zyklen	Analysis mode
<i>Denaturation</i>	95	<i>None</i>	00:02:00	4,8	-	1	<i>None</i>
<i>Cycle</i>	95	<i>None</i>	00:00:10	4,8	-	50	<i>Quantification</i>
	56	<i>Single</i>	00:01:00	2,5	-		
<i>Melting Curve</i>	95	<i>None</i>	00:00:10	4,8	-	1	<i>Melting Curves</i>
	60	<i>None</i>	00:00:01	2,5	-		
	95	<i>Continuous</i>	-	0,11	5		
	95	<i>None</i>	00:00:20	4,8	-		

Die Kalkulation der C<sub>q</sub>-Werte erfolgte nach der 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>-Methode (Bustin et al. 2009).

Um eine Hämolyse der Serum-Proben auszuschließen, wurde in all diesen die Konzentration der besonders in roten Blutkörperchen häufig vorkommenden miR-451 überprüft (Cutoff Cq-Wert = 15).

### 3.2.5 mRNA: cDNA-Synthese und RT-qPCR

Zur cDNA-Synthese von mRNA wurde das *High capacity* cDNA RT Kit der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet und deren Angaben im Handbuch befolgt. Nachfolgend ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes aufgeführt.

**Tabelle 16: Reverse Transcription der mRNA**

<i>High capacity</i> cDNA RT Kit	pro Probe
H <sub>2</sub> O	4,2 µl
10x RT Reaction buffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT random primer	2 µl
MultiScribe RTase	1 µl
RNA Probe	variiert (1 mg RNA)

Nachstehende Tabelle zeigt das verwendete-Programm zur cDNA-Synthese (Eppendorf Mastercycler gradient, Hamburg, Deutschland).

**Tabelle 17: Mastercycler-Programm der mRNA cDNA-Synthese**

Temperatur (°C)	Zeit
25	10 min
37	2 h
85	5 min

Anschließend wurden die Proben auf 5 ng/µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C gelagert.

Die RT-qPCR der cDNA-Proben aus mRNA erfolgte ebenfalls mit dem LightCyclers® 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz). Die Zusammensetzung des Mastermixes ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: RT-qPCR Mastermix für mRNA

<i>High capacity</i> cDNA RT Kit	pro Probe
H <sub>2</sub> O	2,4 µl
Maxima 2x SYBRGreen Master mix	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,3 µl
Primer reverse (10 µM)	0,3 µl
cDNA Probe	2 µl (= 20 ng)
gesamt	10 µl

Die synthetisierten Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nachstehende Tabelle zeigt das RT-qPCR-Programm.

Tabelle 19: RT-qPCR-Programm für miRNA mit dem LightCycler® 480

	<i>Target</i> (°C)	<i>Acquisition</i> <i>Mode</i>	<i>Hold</i> (hh:mm:ss)	<i>Ramp</i> <i>Rate</i> (°C/s)	<i>Acquisition</i> (per °C)	Zyklen	<i>Analysis</i> <i>mode</i>
<i>Pretreatment</i>	50	<i>None</i>	00:02:00	4,8	-	1	<i>None</i>
<i>Initial-</i> <i>denaturation</i>	95	<i>None</i>	00:10:00	1	-	1	<i>None</i>
<i>Cycle</i>	95	<i>None</i>	00:00:15	4,8	-	40	<i>Quanti-</i> <i>fication</i>
	60	<i>None</i>	00:00:30	2,5	-		
	72	<i>Single</i>	00:00:30	4,8	-		
<i>Melting</i> <i>Curve</i>	95	<i>None</i>	00:00:10	4,8	-	1	<i>Melting</i> <i>Curves</i>
	60	<i>None</i>	00:00:01	2,5	-		
	95	<i>Continuous</i>	-	0,29	2		
	95	<i>None</i>	00:00:20	4,8	-		

Die angegebene *Annealing*-Temperatur (hier 60 °C) variierte je nach verwendetem Primer. Die Kalkulation der C<sub>q</sub>-Werte erfolgte mit der 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>-Methode (Bustin et al. 2009).

### 3.2.6 Serum-miRNA Array Analyse

Zur Identifizierung unterschiedlich regulierter miRNAs bei Patienten mit und ohne Kachexie wurden die Proben zwei weiblicher und zwei männlicher Patienten gemischt und die Expression von 169 miRNAs mit dem humanen miRCURY LNA Focus PCR Panel YAHS-106YG-2 (Qiagen, Hilden, Deutschland) analysiert. Durch die Anzahl der Zyklen in der RT-qPCR (Roche Diagnostics, LightCycler® 480, Basel, Schweiz) konnten Unterschiede im Expressionslevel nach der 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>-Methode bestimmt werden.

### 3.3 ELISA

Die ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) Technik beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern gegen ein Antigen. Diese Interaktion kann durch einen Farbumschlag sichtbar und quantifiziert werden. Bei den folgenden ELISAs wurde Plasma als Probenmaterial eingesetzt. Bei allen genannten ELISAs wurde ein Pool an Plasmen als Positivkontrolle und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle verwendet.

Die Pipettierschritte wurden mit dem Hamilton<sup>®</sup> Microlab VANTAGE pipetting robot (Hamilton Company, Reno, USA) durchgeführt.

#### 3.3.1 Insulin ELISA

Zur Bestimmung des Insulingehalts der Patienten der Kachexie-Kohorte wurden ELISA-Platten der Firma DRG International, Inc. (Marburg, Deutschland) verwendet und die Messung wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen (Infinite<sup>®</sup> M200, Tecan Trading AG, Mannedorf, Schweiz).

#### 3.3.2 PTHrP ELISA

In diesem Fall wurde die Menge an *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) der Patienten der Kachexie-Kohorte mit dem PTHLH ELISA Kit der Firma Aviva Systems Biology Corporation (San Diego, USA) analysiert. Dazu wurden die Proben 1:10 mit *Sample Diluent* verdünnt. Die Messung wurde, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei OD 450 nm und 540 nm (Infinite<sup>®</sup> M200, Tecan Trading AG, Mannedorf, Schweiz).

#### 3.3.3 Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Diabetes Assays

Mit dieser magnetteilchen-basierten (*beads*) Technik von Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA) ist es möglich, mehrere, mit Diabetes assoziierte Biomarker zu detektieren. Das Diabetes-Panel wurde ausgewählt, da einige der enthaltenen Marker (z.B. Resistin, Visfatin, Ghrelin) auch mit Tumorkachexie assoziiert sind (Diakowska et al. 2014; Ezeoke und Morley 2015; Rohm et al. 2019). Quantitativ konnten mit diesem Assay die Analyten C-Peptid, Ghrelin, GLP-1, Glukagon, Leptin, PAI-1, Resistin und Visfatin gemessen werden. Die Messung wurde, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt. Im Bio-Plex Array Reader (BioRad, Bio-Plex System, Hercules, USA) wurden die *Beads* abschließend detektiert.

### 3.4 Allgemeine Zellkultur

Das sterile Arbeiten mit humanen Fettzellen erfolgte unter der Sterilwerkbank (Hera safe, Heraeus, Hanau, Deutschland). Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellkulturen im Brutschrank (Hera cell 240, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Alle Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt und mit Hilfe von sterilen, serologischen Pipetten (Greiner Bio-One, CELLSTAR<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland) verwendet.

Die Zellen wurden in Falcon<sup>®</sup>-Kulturgefäßen der Firma Corning B.V. Life Sciences (Corning, USA) kultiviert (Corning<sup>™</sup> Falcon<sup>™</sup> tissue culture flask T25, T75 und Corning<sup>™</sup> Costar<sup>™</sup> 6 well plates flat bottom).

Die Beurteilung der Zellen erfolgt mithilfe des VHX Series-Mikroskops der Firma Keyence (Osaka, Japan).

#### 3.4.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt, in 20 ml Medium aufgenommen und je 10 ml in zwei T25-Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um DMSO und tote Zellen zu entfernen.

Die Zellen wurden zum Einfrieren mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, die Zellzahl bestimmt und daraufhin zentrifugiert (200 g, 10 min, RT) (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde das Zellpellet in entsprechender Menge Einfriermedium (0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) vorsichtig aufgenommen. Nach Überführung von je 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen wurden diese über Nacht bei -80 °C in einem *Cryo-Safe Cooler* eingefroren und am Folgetag in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der morphologischen Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Der Farbstoff Hämatoxylin färbt dabei basophile Strukturen, wie die Nukleinsäuren des Zellkerns, blau an. Acidophile Bereiche im Gewebe, z. B. Komponenten des Zytoplasmas, werden dagegen durch Eosin rötlich sichtbar (Avwioro 2011). Zur Färbung der Zellen wurden diese für 20 min bei RT mit Formaldehyd-Lösung am Plattenboden fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe von Hämatoxylin (VWR International, Heamalum (Mayer's) Gurr für Mikroskopie, Radnor, USA) für 4 min, gefolgt von weiteren Waschschriften bis keine Farbe mehr im PBS erkennbar war. Anschließend wurde mit Eosin für 2 min gefärbt und die Zellen danach mit PBS gewaschen, bevor Aufnahmen mit dem Mikroskop (Keyence, VHX Serie, Osaka, Japan) erfolgten.

### 3.4.3 Ernte der miRNA/mRNA

Zur Ernte der miRNA/mRNA wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal mit je 2 ml/Well gewaschen. Für die anschließende Isolierung mit dem mirVana™-Kit (siehe 3.2.3) für zwei Wells 350 µl RNA-Ernte-Puffer oder zur Kit-freien Isolation 250 µl TRIzol Reagent (siehe 3.2.2) pro Well einer 6-Well-Platte auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und sofort bei -80 °C eingefroren, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

## 3.5 Präadipozyten

### 3.5.1 Isolation der Präadipozyten aus Fettgewebe

Durch mechanische Trennung und enzymatische Digestion wurden die Gewebsbestandteile von subkutanem und viszeralem Fett getrennt und eine Primärkultur humaner Präadipozyten (PAC) gewonnen. Die Isolation erfolgte nach dem Präparationsprotokoll von Skurk *et al.* (Scurk und Hauner 2012).

Das Gewebstück wurde am Tag nach der Operation unter der Sterilwerkbank (Heraeus, Hera safe, Hanau, Deutschland) mit entsprechendem Operations-Besteck von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit. Die einzelnen Fettdepots anschließend mit einer Schere zerkleinert und im Kollagenasepuffer (5 ml/g Fett) für 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad (GFL, 1083, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 200 g, RT) (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland). Die im Pellet enthaltenen PACs wurden mit Isolationsmedium resuspendiert und über einen Zellfilter (Sterile Cell Strainer, 70 µm Nylon Mesh, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) gegeben. Entsprechend der ursprünglichen Gewebemenge wurden die im Durchfluss enthaltenen Zellen in ein passendes Kulturgefäß ausgesät und im Brutschrank kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Am nächsten Tag erfolgte die Abnahme des Mediums, ein Waschschriff mit PBS und die anschließende Zugabe von PM.

### 3.5.2 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurden diese zuerst mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und in frischem Proliferationsmedium (PM) resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer wurden 50 µl Zellsuspension 1:1 mit Trypan Blau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemischt und die lebenden Zellen in 8 Großquadraten unter dem Mikroskop (Leica, DMIL, Wetzlar, Deutschland) gezählt. Mit der folgenden Formel wurde die gewünschte Zellzahl ermittelt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{8} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{ml Zellsuspension Kulturgefäß} = \text{erforderliche Zellzahl Kulturgefäß} / \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)$$

Die nachstehende Tabelle 20 gibt Auskunft über die Zellenzahlen, die je nach Kulturgefäß nötig sind.

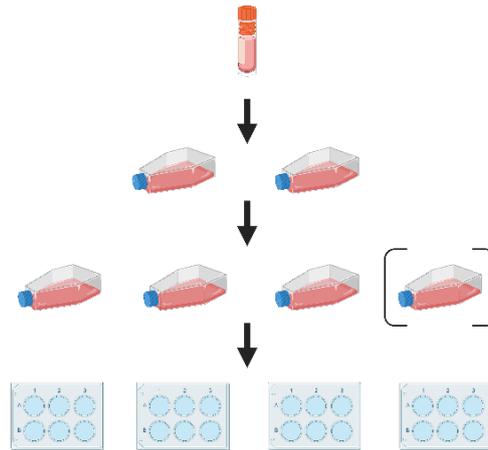
**Tabelle 20: Übersicht der eingesetzten Zellzahl abhängig vom Kulturgefäß**

Gefäß	Zellzahl
T25 Flasche	0,125 x 10 <sup>6</sup>
T75 Flasche	0,25 x 10 <sup>6</sup>
6 Well-Platte	0,25 x 10 <sup>6</sup>
96 Well-Platte	0,101 x 10 <sup>6</sup>

Zum Einstellen der geforderten Zellzahl wurde das benötigte Zellsuspensionsvolumen mit PM gemischt, auf die entsprechenden Falschen oder Platten verteilt und durch vorsichtiges Schwenken der Flaschen oder Platten eine gleichmäßige Aussaat erzielt.

### 3.5.3 Ablauf der Differenzierung von Präadipozyten

Zur Differenzierung der PACs wurde die Zellsuspension eines Kryoröhrchens (0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) auf zwei T25-Zellkulturflaschen aufgeteilt und bei einer Konfluenz von 90-95 % die Zellen erneut in T25-Zellkulturflaschen (0,125 Mio. Zellen/Flasche) passagiert, um die Zellzahl zu erhöhen (subkutane PACs: 3-mal T25-Flaschen; viszerale PACs: 4-mal T25-Flaschen). Nach erreichter Konfluenz von 90-95 % wurden die Zellen auf vier 6-Well-Platten (0,25 Mio. Zellen/Platte; 2 ml/Well) passagiert (eine Platte pro Erntezeitpunkt plus eine Reserveplatte). Die Kultivierung der Zellen bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte mit PM.



**Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Präadipozyten-Kultivierung**

Pro Patient und Fettdepot wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zum Auftauen der Zellen der Inhalt des Röhrchens auf zwei T25-Flaschen aufgeteilt. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 95 % werden die Zellen passagiert. Um die benötigte Zellzahl zu erlangen, werden für die subkutanen PACs drei T25-Flaschen angesetzt und vier T25-Flaschen für die viszeralen PACs. Nach erneuter 95 %-iger Konfluenz der Zellen, werden diese in einem weiteren Passagier-Schritt auf 4-mal 6-Well-Platten ausplattiert. Die vier Platten stehen für die drei Erntezeitpunkte (d0, d3 und d14) sowie eine Reserveplatte.

Sofern in den 6-Well-Platten eine Konfluenz von 95-100 % erreicht wurde, entfernte man das gesamte PM und gab frisch angesetztes Induktionsmedium (IM) (2 ml/Well) auf die Zellen.

Nach drei Tagen Kultivierung der Zellen mit IM wurde dieses komplett entfernt und durch 2 ml/Well Differenzierungsmedium (DM) ersetzt (Erntetag d0). Im weiteren Differenzierungsverlauf wurde das DM zwei Mal wöchentlich gewechselt. Die Ernte der Zellen erfolgte an Tag 0 (d0), Tag 3 (d3) und Tag 14 (d14) der Differenzierung.

Bei der Differenzierung der Präadipozyten aus Patienten der Kachexie-Kohorte wurden am entsprechenden Erntetag zu Beginn in einem Well die Vitalität der Zellen mit alamarBlue™ bestimmt (siehe 3.5.4). Für den weiteren Erntevorgang wurden die Zellkultur-Platte auf Eis gestellt und die Wells für die miRNA/mRNA-Ernte 2-mal mit kaltem PBS gewaschen.

Für das detaillierte Vorgehen der Differenzierung im Versuch, bei dem die Präadipozyten mit siRNA transfiziert wurden, siehe 3.5.7.

### 3.5.4 Viabilitätstest mit alamarBlue™ Reagenz

Das im alamarBlue™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) Reagenz enthaltene, nicht fluoreszierende Resazurin wird durch die Aufnahme von metabolisch vitalen Zellen zu fluoreszierendem Resorufin reduziert und ist dadurch photometrisch messbar.

Zur Überprüfung der Zellvitalität über die Differenzierung hinweg wurde vor Beginn der Ernte in ein Well 200 µl alamarBlue™ Reagenz gegeben und die Zellkulturplatte wieder in den Inkubator zurückgestellt. Über einen Zeitraum von 20 min wurde alle 5 min ein Aliquot des Mediums von 200 µl entnommen und zur Messung in einen 96-well-Streifen überführt. Das

Fluoreszenz-Signal wurde bei 560 nm im Photometer (Tecan, Infinite® M200, Männedorf, Schweiz) gemessen.

### **3.5.5 Lipidfärbung der Fettzellen mit Öl-Rot O**

Zur Färbung der Lipidtröpfchen wurde auf die fixierten Zellen 2 ml/Well Öl-Rot O gegeben und für ca. 1 h inkubiert. Nach Abnahme des Öl-Rot Os wurde das Well 2-mal mit PBS gewaschen und Aufnahmen unter dem Mikroskop (VHX Series, Keyence, Osaka, Japan) getätigt.

### **3.5.6 Fluoreszenzfärbung der Zellen**

#### **3.5.6.1 Färbevorgang**

Für die Färbung der Mitochondrien wurde die MitroTracker-Arbeits-Lösung frisch angesetzt und nach Abnahme des Mediums eines Wells 2 ml davon auf die Zellen pipettiert. Zusätzlich kamen vier Tropfen der NucBlue-Lösung in das Well um parallel die Zellkerne zu färben. Nach 30-minütiger Inkubation im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde die Lösung abgenommen und das Well 2-mal mit PBS gewaschen (2 ml/Well) um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Formaldehyd-Lösung (20 min, RT, dunkel) am Plattenboden fixiert und konserviert. Durch Abnahme der Fixierlösung, nochmaligem Waschen mit PBS (2 ml/Well) und Zugabe von 2 ml/Well Permeabilisations Lösung (15 min, RT, dunkel) wurden die Zellen für die Färbung der Actinfilamente vorbereitet. Hierzu wurde die Permeabilisations-Lösung abgenommen, 2-mal mit PBS (2 ml/Well) gewaschen und 2 ml/Well Phalloidin-Arbeits-Lösung für 30 min bei RT und Dunkelheit auf den Zellen inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung, erneutem 2-maligem Waschen mit PBS (2 ml/Well) erfolgte die Zugabe von Bodipy-Arbeits-Lösung um die Lipidtröpfchen der Zellen anzufärben (2 ml/Well, 15 min, RT, dunkel). Das Well wurde nach Abnahme der Bodipy-Arbeits-Lösung 2-mal mit PBS gewaschen (2 ml/ Well), anschließend mit 3 ml/Well PBS + 1 % Pen/Strep benetzt und die Platte mit Parafilm verschlossen, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Platten wurden bis zur Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

#### **3.5.6.2 Aufnahme der Fluoreszenzbilder**

Die Aufnahmen der gefärbten Zellen erfolgten mit dem fluoreszenzfähigem Mikroskop Leica DMI6000B (Leica Mikroskop Gerätenr. 10612298, Kamera DFC 320FX, Wetzlar, Deutschland). Die Kamera 14x/Visual 200x wurde auf eine Vergrößerung von 20 eingestellt. Mit den folgenden Einstellungen wurden die Zellstrukturen am Mikroskop aufgenommen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht der Einstellungen der einzelnen Fluoreszenzkanäle

Filterwürfel	Farbstoff	Gewebe	Exposure [ms]	Gain
Durchlicht	-	-	20,00	1,0
Y3	MitoTracker	Mitochondrien	400,00	1,0
YFP	Bodipy	Lipide	100,00	1,5
L5	Phalloidin	Aktinfilamente	150,00	1,5
A4	NucBlue	Kerne	350,00	4,0

### 3.5.7 siRNA-Transfektion (*Knock-down*)

Mit Hilfe der Transfektion wird ein antisens Oligonukleotid in die Zellen einbracht, wodurch sich stabile Heteroduplexe mit der Target-miRNA bilden. Dies unterbindet die normale zelluläre Interaktion der miRNA.

Soweit nachstehend nicht anders beschrieben, wurden miRCURY LNA miRNA Inhibitors and Target Site und Inhibitor Control-Reagenzien (Qiagen, Hilden) verwendet und sich an die Angaben im Handbuch gehalten.

Zur Transfektion wurden die PAC Zellen in PM kultiviert. Es wurden in eine 6-Well-Platte pro Well 10.000 Zellen/2 ml ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 % (= d-3) mit 30 nM siRNA für 72 h. Hierfür wurde die Lipofektamin-siRNA-Lösung (Lipofektamin RNAiMAX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hergestellt, Mediumwechsel mit PM durchgeführt und anschließend die Lösung tropfenweise in das Well gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten wurde die Lösung im Medium verteilt. Nach der 72-stündigen Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und die Einleitung der Differenzierung (= d0) mit DM für die weitere Kultivierung bis Tag 14 (= d14) oder die Ernte der Zellen mit TRIzol Reagenz. Parallel dazu wurde die entsprechende Negativkontrolle (keine Zugabe siRNA) prozessiert. Die Zellen wurden an den Zeitpunkten d0, d3, d7, d10 und d14 geerntet. Die Ernte und Isolierung der RNA erfolgten wie unter 3.2.2 und 3.4.3 beschrieben. Die Unterschiede der Expressionsniveaus wurden mittels RT-qPCR gemessen.

### 3.5.8 Histologie zur Fettzellgrößenbestimmung

Die Einfärbung des Fettgewebes ermöglicht die Größenbestimmung der einzelnen Fettzellen im histologischen Schnitt.

#### 3.5.8.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Zur Anfertigung histologischer Schnitte wurde das Fettgewebe für 24 – 48 h in Fixierpuffer inkubiert und anschließenden in 70 % EtOH gelagert.

Die Dehydrierung der Proben erfolgte mit Hilfe des TP1020 (Leica, Wetzlar, Deutschland), bevor sie nachfolgend an der Tissue Infiltration Automat ASP200 S-Station (Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffin eingebettet wurden.

Mit dem Mikrotom (Thermo Fisher Scientific, Rotations Microtome HM 355 S, Waltham, USA) wurden 5 µm dünne Schnitte des Fettgewebes angefertigt, diese zur Entspannung in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben und anschließend auf einen Objektträger überführt.

### **3.5.8.2 Automatisierte Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE-Färbung (vgl. 3.4.2) der Objektträger wurde mit dem ST5020 Multistainer Workstation (Leica Microsystems, Wetzlar) automatisiert durchgeführt. Zur abschließenden Eindeckelung wurden einige Tropfen Mounting Medium (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen und der Schnitt mit einem Deckglas (24 x 60 mm, 15 mm Dicke, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verschlossen.

### **3.5.8.3 Größenbestimmung der Fettzellen**

Mit der automatisierten, *open source* Software Adiposoft, die als *Plug-in* für Fiji (ImageJ) verfügbar ist, war es möglich die Anzahl und Größe der Fettzellen des histologischen Schnittes zu analysieren. Für die Erkennung der Fettzellen wurde 25 µm als minimaler und 250 µm als maximaler Durchmesser festgelegt, zudem ein *Scaling*-Faktor von 1,103 (Adiposoft (imagej.net)).

## **3.6 C2C12-Zellen**

Murine C2C12-Zellen sind ein Subklon einer Myoblasten-Zelllinie, die ursprünglich aus einem gesunden C3H-Beinmuskel einer Maus etabliert wurde (Blau 1993). Die Zelllinie wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.6.1 Passagieren der Zellen**

An jedem zweiten Tag wurde zum Passagieren der Zellen das Medium abgenommen und diese mit 5 ml PBS/T25-Flasche gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Trypsin, um die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen. Nach einer 5 min Inkubation im Brutschrank wurde der enzymatische Prozess durch Zugabe von 5 ml PM abgestoppt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension nach Bedarf (z.B. 1:5 oder 1:20) oder das Einstellen auf eine bestimmte Zellzahl mit entsprechender Menge an PM. Die weitere Kultivierung der C2C12-Zellen erfolgte im Brutschrank (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>).

### **3.6.2 Differenzierung der C2C12-Zellenlinie**

Zur Differenzierung der C2C12-Zellen wurde die Zellsuspension eines Kryoröhrchens (0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) auf eine T75-Zellkulturflasche aufgeteilt und bei einer Konfluenz von ca. 80 % die Zellen erneut in T75-Zellkulturflaschen (0,3 x 10<sup>6</sup> Zellen/Flasche) passagiert. Nach

erneuter Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen auf 6-Well-Platten (2 ml/Well) passagiert. Die Kultivierung der Zellen bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte mit C2C12 PM.

Sofern in den 6-Well-Platten eine Konfluenz von 80 % eintraf, wurde das gesamte Medium entfernt und frisch angesetztes C2C12 DM (2 ml/Well) zum Einleiten der Differenzierung (= d0) auf die Zellen gegeben. Im siebentägigem Differenzierungsverlauf wurde das DM 2-mal wöchentlich gewechselt.

### 3.6.3 siRNA-Transfektion der C2C12-Zellen

Mit Hilfe der Transfektion wird ein antisense Oligonukleotid in die Zellen eingebracht, wodurch sich stabile Heteroduplexe mit der Target-miRNA bilden. Dies unterbindet die normale zelluläre Interaktion der miRNA.

Soweit nachstehend nicht anders beschrieben, wurden miRCURY LNA miRNA Inhibitors and Target Site und Inhibitor Control-Reagenzien (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und es wurden die Angaben im Handbuch eingehalten.

Zur Transfektion wurden die C2C12-Zellen in PM kultiviert. Es wurden in eine 6-Well-Platte pro Well 70.000 Zellen/2 ml ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 60 % (= d-3) mit 30 nM siRNA für 72 h. Hierfür wurde die Lipofektamin-siRNA-Lösung (Lipofektamin RNAiMAX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hergestellt, Mediumwechsel mit PM durchgeführt und anschließend die Lösung tropfenweise in das Well gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten wurde die Lösung im Medium verteilt. Nach der 72-stündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und die Einleitung der Differenzierung (= d0) mit DM für die weitere Kultivierung bis Tag 7 oder die Ernte der Zellen mit TRIzol Reagenz. Parallel dazu wurde die entsprechende Negativkontrolle (keine Zugabe siRNA) prozessiert. Die Zellen wurden an den Zeitpunkten d0, d4 und d7 geerntet. Die Ernte und Isolierung der RNA erfolgten wie unter 3.2.2 und 3.4.3 beschrieben. Die Unterschiede der Expressionsniveaus wurden mittels RT-qPCR detektiert.

## 3.7 Bioinformatische Analysen

Mit Hilfe der miRNA-Such-Anwendung MulitMiR in R, welche über 50 Millionen Ergebnisse aus 14 verschiedenen Datenbanken (z.B. miRTarBase, TarBase miRanda, miRDB und Targetscan) abgleicht, konnten potentielle Target-Gene ermittelt werden (Ru et al. 2014). Anschließend wurden funktionelle Interaktionen zwischen den potenziellen Target-Genen und einem Verzeichnis von Muskel-Atrophie sowie Triglycerid-Lipase-Aktivität assoziierter Gene (*Gen-Ontology-Term* 0014889/ 0004806) aufgezeigt. Die resultierenden Target-Gene wurden mittels *String DB*-Anwendung und dem Programm *Cytoscape* dargestellt (Szkłarczyk et al. 2015).

### 3.8 Statistische Analysen

Die Ergebnisse wurden nach Adjustierung auf Alter und BMI als Heatmaps, Punkt-, Kastendiagramme, Violin-Plots oder als Mittelwerte (MW) mit dem Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$  SEM) dargestellt. Alle Daten folgten nicht der Gaußschen Verteilungskurve (Kolmogorov-Smirnov-Test  $p < 0.05$ ). Zur Bestimmung der Signifikanz zwischen den Ergebnissen zweier Gruppen wurde ein zweiseitiger ungepaarter Mann-Whitney-Test durchgeführt. Beim Vergleich aller drei Patientengruppen wurden die Signifikanzen mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test ermittelt. Zur Bestimmung der Korrelation zweier Variablen wurde eine lineare Regression durchgeführt. Für die Berechnungen wurden die Graph Pad Software (Version 9, San Diego, USA) und SPSS (IBM, Version 26, New York, USA) verwendet.

Zur Beurteilung der Spezifität und Sensitivität eines miRNA-Biomarkers im Serum wurden *Receiver operating characetersitc* (ROC)-Kurven erstellt und die *Area under the curve* (AUC) berechnet.

Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen klassifiziert: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

## 4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer humanen Biobank mit Blut- und Gewebeproben an Kachexie erkrankten Krebspatienten. Die Untersuchung der Gewebeproben soll neue molekularbiologische Erkenntnisse zugrundeliegender Mechanismen und Veränderungen dieser Krankheit aufzeigen.

### 4.1 Patienten-Demographien

Aus der 119 Individuen umfassenden Biobank wurden anhand von Geschlecht, Alter, Kachexie-Status, Erkrankung und Vollständigkeit der Gewebearten die entsprechenden Patientengruppen ausgewählt.

Die Charakterisierung der einzelnen Gruppen ist der Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen.

**Tabelle 22: Übersicht der Patienten-Demographien der ELISA-Messung**  
Die Daten repräsentieren MW  $\pm$  SEM

	<b>Kachexie &amp; Krebs</b>	<b>Keine Kachexie &amp; Krebs</b>
Anzahl Patienten	23	12
Alter (Jahren)	69	63
Geschlecht (w:m)	12:11	6:6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,55 $\pm$ 4,15	25,53 $\pm$ 3,32

BMI = Bodymassindex

**Tabelle 23: Übersicht der nach Gewebetyp geordneten Patienten-Demographien für die mRNA und miRNA Bestimmungen**  
Die Daten repräsentieren MW  $\pm$  SEM

	<b>Kachexie &amp; Krebs</b>	<b>Keine Kachexie &amp; Krebs</b>	<b>Keine Kachexie &amp; kein Krebs</b>
<b>Serum</b>			
Anzahl Patienten	23	12	18
Alter (Jahren)	70	63	32
Geschlecht (w:m)	12:11	6:6	9:9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,48 $\pm$ 4,24	25,50 $\pm$ 3,48	22,33 $\pm$ 1,55
Gewichtsverlust 6 M vor Op (%)	10,93 $\pm$ 4,16	1,84 $\pm$ 1,59	-
<b>Muskel</b>			
Anzahl Patienten	20	11	5
Alter (Jahren)	68	62	49

Geschlecht (w:m)	10:10	6:5	4:1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,30 ± 4,49	25,45 ± 3,64	24,60 ± 4,72
Gewichtsverlust 6 M vor Op (%)	10,65 ± 4,26	2,01 ± 1,55	-
SMAI (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	43,53 ± 8,89 (N = 19)	42,20 ± 8,29 (N = 8)	-
Sarkopenie (ja:nein)	10:9 (fehlend: 1)	4:4 (fehlend: 3)	-

**Leber**

Anzahl Patienten	22	12	6
Alter (Jahren)	69	63	52
Geschlecht (w:m)	11:11	6:6	5:1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,50 ± 4,34	25,50 ± 3,48	24,00 ± 4,47
Gewichtsverlust 6 M vor Op (%)	10,97 ± 4,25	1,84 ± 1,59	-

**Fett subkutan**

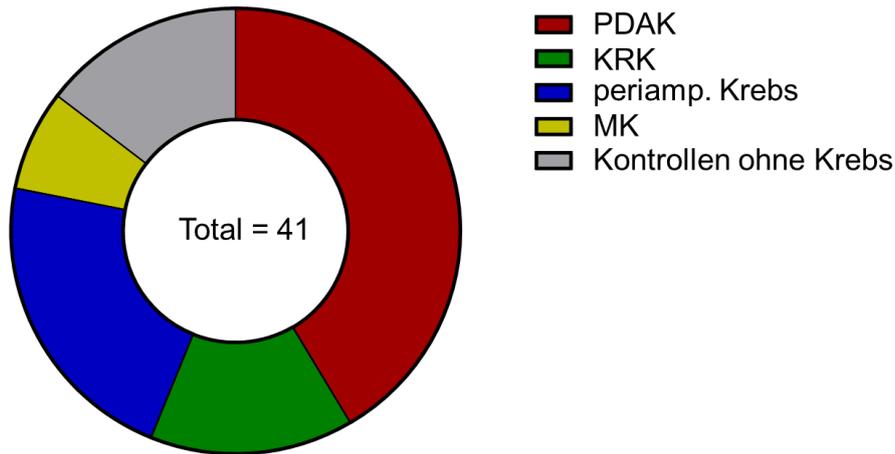
Anzahl Patienten	23	10	10
Alter (Jahren)	70	64	56
Geschlecht (w:m)	12:11	4:6	7:3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,48 ± 4,24	26,00 ± 3,50	25,30 ± 4,26
Gewichtsverlust 6 M vor Op (%)	10,93 ± 4,16	1,46 ± 1,44	-

**Fett viszeral**

Anzahl Patienten	23	12	11
Alter (Jahren)	70	63	56
Geschlecht (w:m)	12:11	6:6	8:3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,48 ± 4,24	25,50 ± 3,48	25,02 ± 4,14
Gewichtsverlust 6 M vor Op (%)	10,93 ± 4,16	1,84 ± 1,59	-

BMI = Bodymassindex; M = Monate; SMAI = *Skeletal muscle area index*

Die Kohorte setzte sich aus Kachexie-Patienten mit duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse, kolorektalem Karzinom, periampullärem Karzinom, Magenkarzinom und Krebs-freien Patienten, die als Kontrolle dienen, zusammen. Die Kontrollpatienten wiesen Erkrankungen wie chronische Pankreatitis oder Adenome in Leber oder Kolon auf (Abbildung 8).

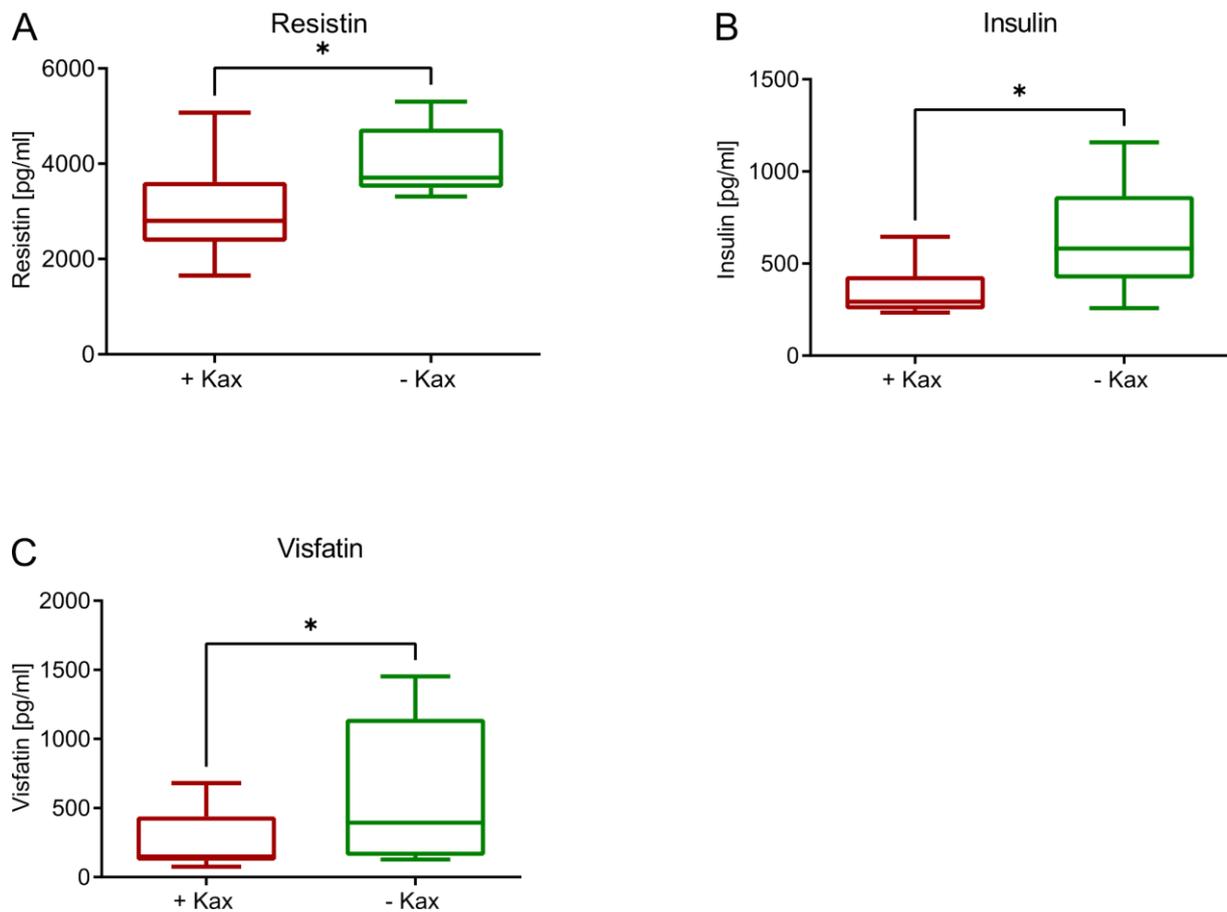


**Abbildung 8: Übersicht der unterschiedlichen Erkrankungen der Patienten-Gruppen**

Als häufigste Erkrankung in der Kohorte ist bei 17 Patienten das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC; rot) zu nennen. 9 Patienten sind an periampullärem Karzinom (blau) und 6 Patienten an Kolorektalkrebs (KRK; grün) erkrankt. Des Weiteren lag bei 3 der 41 Patienten ein Magenkarzinom (MK, gelb) vor. Die Kontrollgruppe ohne eine Krebserkrankung umfasste 6 Patienten (grau).

## 4.2 Blutanalysen mittels ELISA

Zur Ermittlung möglicher Biomarker, mit deren Messung Patienten mit und ohne Kachexie unterschieden werden können, wurden die Plasmakonzentrationen von Insulin und PTHrP mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die Analyten C-Peptid, Ghrelin, GLP-1, Glukagon, Leptin, PAI-1, Resistin und Visfatin wurden mit einem Multiplex-ELISA gemessen. Die nachfolgend abgebildeten Ergebnisse sind auf Alter und BMI der Patienten adjustiert (Abbildung 9).

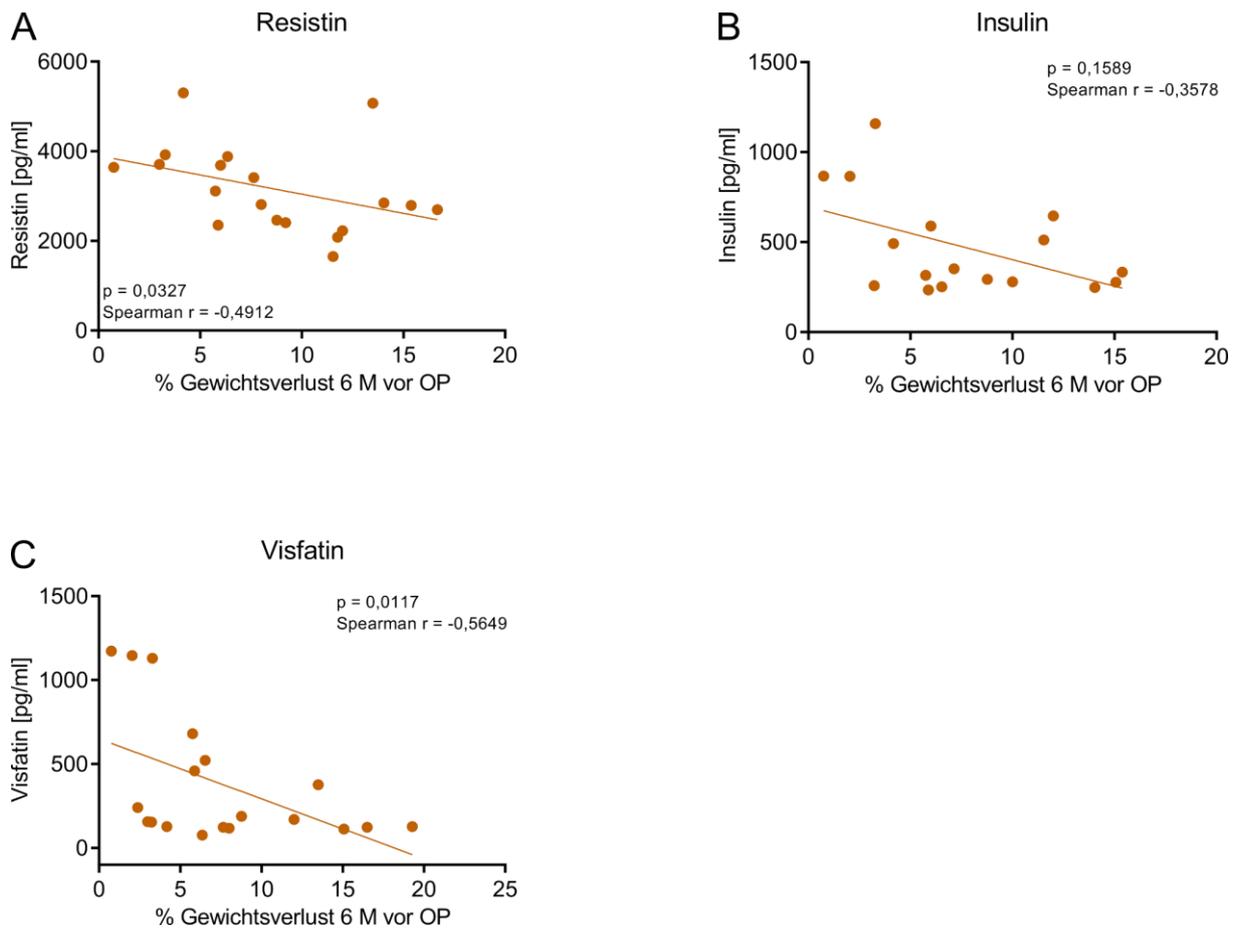


**Abbildung 9: Plasmakonzentrationen von Resistin, Insulin und Visfatin in Patienten mit und ohne Kachexie**

Zur Etablierung eines Biomarkers wurde das Plasma von Patienten mit (+ Kax; rot) und ohne (- Kax; grün) Kachexie untersucht. Die Konzentrationen der drei Analyten (A) Resistin (+ Kax: N = 16; - Kax: N = 7), (B) Insulin (+ Kax: N = 13; - Kax: N = 11) und (C) Visfatin (+ Kax: N = 12; - Kax: N = 11) wurden mittels eines Multiplex-ELISAs bestimmt. Mann-Whitney-Test mit \*p ≤ 0,05.

Die Messungen ergaben keine Konzentrationsunterschiede von C-Pepid, Ghrelin, GLP-1, Glucagon und PTHrP zwischen Patienten mit und ohne Kachexie (Daten nicht abgebildet). Der Mittelwert in der Gruppe der Patienten mit Kachexie (N = 16) für Resistin lag mit  $2990 \pm 895,2$  pg/ml unter dem Wert der Patienten ohne Kachexie (N = 7) mit  $4018 \pm 729,2$  pg/ml. Auch bei Insulin und Visfatin zeigte sich dieses Bild. Bei Patienten mit Kachexie (N = 13) lag der durchschnittliche Wert bei  $375,5 \pm 138,2$  pg/ml Insulin und bei Patienten ohne Kachexie (N = 11) betrug er  $637,5 \pm 291,2$  pg/ml. Die 12 Kachexie-Patienten, bei denen Visfatin gemessen werden konnte, wiesen mit  $256,5 \pm 200,5$  pg/ml ebenfalls einen niedrigeren Wert auf als die Kontrollgruppe (N = 11) mit  $653,6 \pm 526,8$  pg/ml.

Zur Bestätigung, dass die drei Analyten Resistin, Insulin und Visfatin mit dem Kachexiestatus zusammenhängen, wurden Spearman r-Korrelationsanalysen durchgeführt.

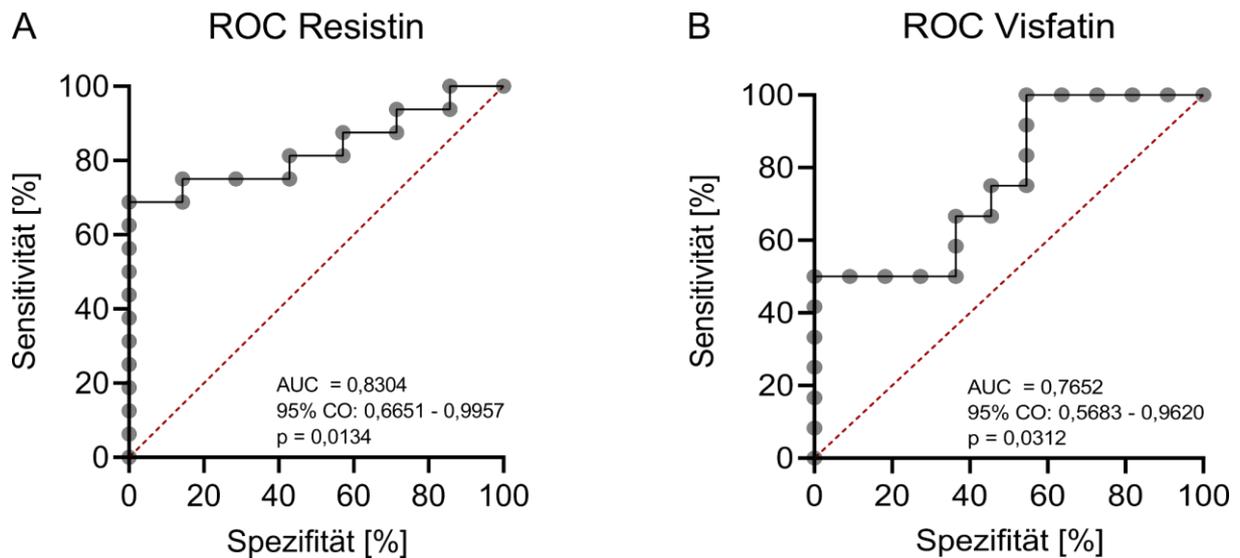


**Abbildung 10: Korrelationsanalysen der Plasma-Analyte Resistin, Insulin und Visfatin mit dem prozentualen Gewichtsverlust in den sechs Monaten vor Op**

Resistin, Insulin und Visfatin wurden mittels ELISA in Plasmaproben bestimmt und der prozentuale Gewichtsverlust aller Krebspatienten (+ Kax und – Kax) sechs Monate vor der Operation ermittelt. (A) Korrelation der Resistin-Konzentration mit der Gewichtsabnahme in Prozent (N = 19). (B) Korrelation der Insulin-Konzentration mit der Gewichtsabnahme in Prozent (N = 17). (C) Korrelation der Visfatin-Konzentration mit der Gewichtsabnahme in Prozent (N = 19). M = Monate. Statistische Analysen durch lineare Regression.

In Abbildung 10 wird deutlich, dass niedrigere Konzentrationen der detektierten Analyte mit einem höheren prozentualen Gewichtsverlust der Patienten in Zusammenhang stehen. Signifikante negative Korrelationen zwischen den beiden Parametern zeigten sich bei Resistin ( $p = 0,0327$ ; Abbildung 10 A) und Visfatin ( $p = 0,0117$ ; Abbildung 10 C).

Um ihre diagnostische Fähigkeit als Biomarker für die minimalinvasive Unterscheidung zwischen Krebs-Patienten mit und ohne Kachexie zu prüfen, wurden *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Kurven von Resistin und Visfatin erstellt und die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven der Plasma-Analyten**  
 Die errechneten Flächen unter der Kurve (AUC) der ROC-Kurve zur Unterscheidung zwischen Patienten mit und ohne Kachexie betrug (A) 0,8304 für Resistin (+ Kax; N = 16; - Kax; N = 7) und (B) 0,7652 für Visfatin (+ Kax; N = 12; - Kax; N = 11) (beide  $p \leq 0,05$ ).

Resistin (Abbildung 11 A) zeigte mit einem AUC-Wert von 0,8304 eine ebenso moderate Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne Kachexie, wie Visfatin (AUC-Wert 0,7652; Abbildung 11 B).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den Analyten Resistin, Insulin und Visfatin die mittels ELISA bestimmten Konzentrationen bei den Patienten ohne Kachexie signifikant über den Werten der Patienten mit Kachexie lagen ( $p \leq 0,05$ ). Bei Resistin und Visfatin lag zudem eine negative Korrelation zum prozentualen Gewichtsverlust sechs Monate vor der Operation vor.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass in dieser ausgewählten Patientengruppe die beiden Analyten Patienten mit Kachexie von Patienten ohne moderat unterscheiden können. Zur abschließenden Validierung ist die Messung in einer größeren Kohorte nötig.

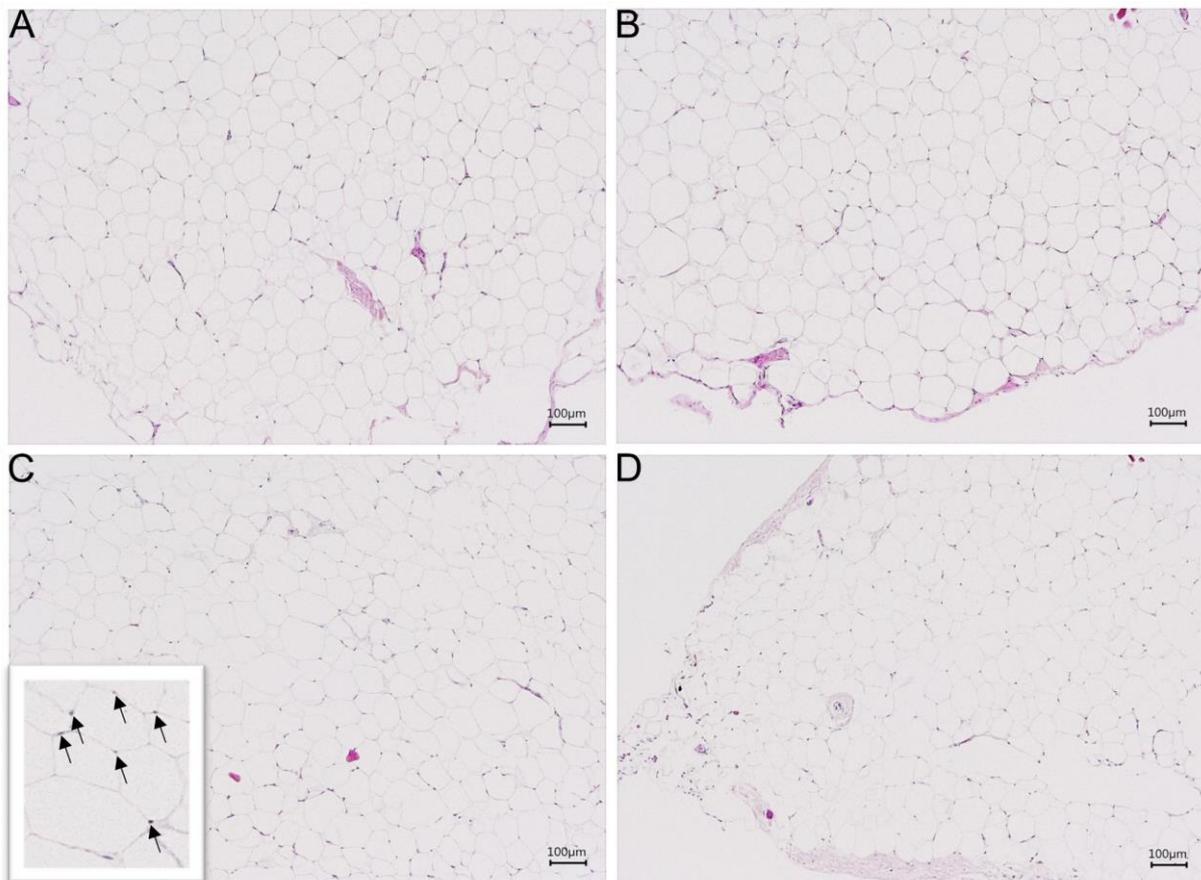
Da der Verlust von Fettmasse einer der zu Grunde liegenden Mechanismen für Kachexie ist, wurde im Folgenden das Fettgewebe und die daraus isolierten PACs untersucht.

### 4.3 Charakterisierung der Prädipozyten

Zur Charakterisierung der PACs von Krebspatienten mit und ohne Kachexie wurden histologische Schnitte angefertigt, diese HE gefärbt und anschließend die Größe der Fettzellen bestimmt (Abbildung 12). Des Weiteren wurden PACs ausdifferenziert und zu den Zeitpunkten d0, d3 und d14 mit immunfluoreszierenden Farbstoffen und HE verschiedene Zellkompartimente markiert und diese mikroskopisch aufgenommen (Abbildung 13).

#### 4.3.1 Größenbestimmung

Die Größe der PACs wurden auf den H/E-gefärbten histologischen Schnitten mit Hilfe des Software-Tools Adiposoft ermittelt.



**Abbildung 12: Histologische Schnitte von subkutanem und viszeralem Fettgewebe**

Die Gewebstücke, die während der Operation entnommen wurden, wurden entwässert, fixiert und geschnitten. Die anschließend H/E-gefärbten Schnitte zeigen (A) subkutanes und (B) viszerale Fettgewebe eines Patienten ohne Kachexie sowie (C) subkutanes und (D) viszerale Fettgewebe eines Patienten mit Kachexie. Die blau gefärbten Kerne befinden sich am Rand der rot gefärbten Fettzellwand, die die typische Wabenform aufweist. Die Kerne sind beispielhaft adressiert durch die schwarzen Pfeile unter (C). 100-fache Vergrößerung.

Wie aus der Abbildung 12 exemplarisch hervorgeht, zeigen die Schnitte die für Fettgewebe charakteristische Wabenform der Fettzellen.

**Tabelle 24: Übersicht der Fettzelldiameter von Patienten mit und ohne Kachexie**  
 Die Daten repräsentieren die MW  $\pm$  SEM

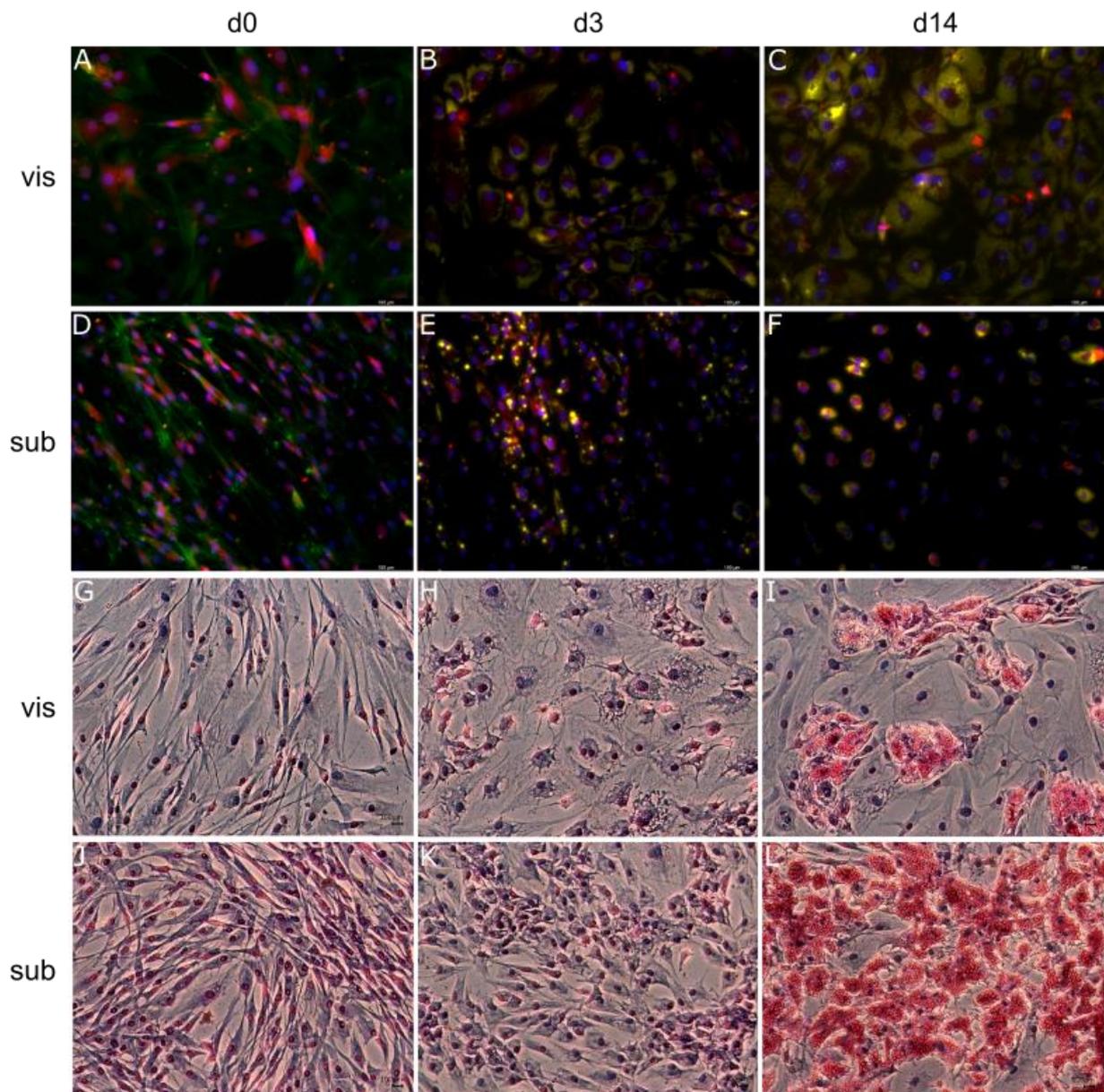
	<b>Kachexie</b>	<b>Keine Kachexie</b>
Anzahl Patienten	22	17
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,38 $\pm$ 4,16	24,63 $\pm$ 3,33
<b>Subkutan</b>		
Fettzellgröße ( $\mu$ m)	54,24 $\pm$ 7,33	58,74 $\pm$ 7,81
<b>Viszeral</b>		
Fettzellgröße ( $\mu$ m)	48,80 $\pm$ 8,33	49,43 $\pm$ 6,17

BMI = Bodymassindex

Die Größe der subkutanen und viszeralen Fettzellen von Patienten mit und ohne Kachexie unterschied sich nicht signifikant, unabhängig von der Herkunft des Fettgewebes (siehe Tabelle 24).

#### **4.3.2 Fluoreszenz- und HE-Färbung der Präadipozyten**

Die in 6-Well-Platten ausgesäten subkutanen und viszeralen PACs wurden zwei Wochen lang kultiviert. Dabei wurden die Zellen an den Tagen d0, d3 und d14 des Differenzierungsvorgangs mit Öl-Rot O und HE gefärbt sowie den Fluoreszenzfarbstoffen NucBlue, MitoTracker, Phalloidin und Bodipy (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Fluoreszenz- und HE-Färbung viszeraler und subkutaner Präadipozyten**

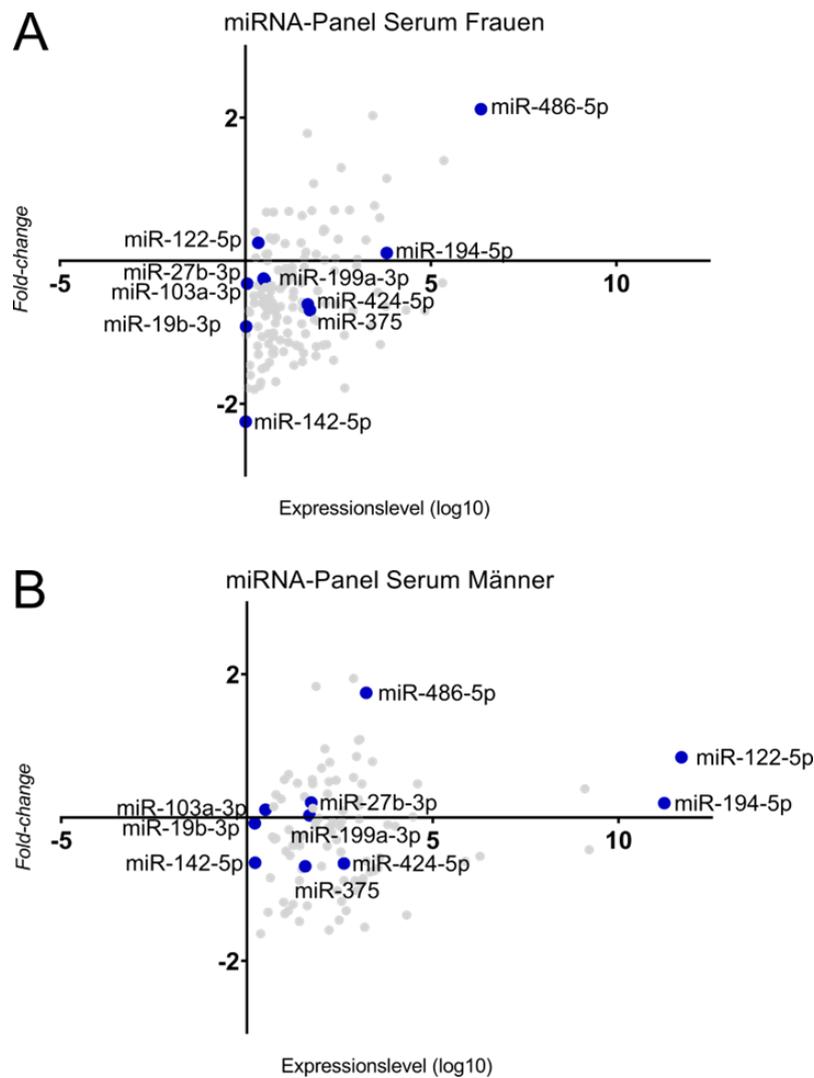
Die viszeralen (vis) und subkutanen (sub) Fettgewebe entnommenen Präadipozyten wurden 14 Tage kultiviert. An den Tagen d0, d3 und d14 des Differenzierungsverlaufs wurden die Zellen sowohl Fluoreszenz (A - F), als auch HE und Öl-Rot O (G - L) gefärbt. Bei beiden Färbemethoden ist die Lipideinlagerung in Fettropfen in den ausdifferenzierten (d14) Zellen zu erkennen (C, F, I, L). In den Fluoreszenzbildern sind die Kerne (blau), Mitochondrien (rot), Aktin-Zytoskelett (grün) und die Lipidtropfen (gelb) ersichtlich. Die HE-Färbung zeigt das Aktin-Zytoskelett (blau) und den Zellkern (pink). Im Verlauf der Differenzierung wurde das Öl-Rot O von den triglycerid-gefüllten Vakuolen (rot) eingelagert. 20-fache Vergrößerung.

Neben der Charakterisierung der Patienten mittels ELISA und der histologischen Untersuchung der beiden Fettgewebe, war die Analyse von miRNAs der Hauptbestandteil dieser Arbeit.

## **4.4 miRNA-Expressionsanalyse im Serum**

### **4.4.1 Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum mittels miRNA-Panel**

Zur Bestimmung molekularer Prozesse, die einen Einfluss auf die Entwicklung von Kachexie haben könnten, wurde ein miRNA-Spektrum mittels des humanen miRCURY LNA miRNA Focus PCR Panel im Patienten-Serum durchgeführt. Hierfür wurden die nach Geschlecht getrennten Proben je zweier Patienten mit und zweier Patienten ohne Kachexie separat gemischt und das miRNA-Expression-Profil mittels RT-qPCR erfasst. Im Panel der weiblichen Patienten konnten 152 verschiedene miRNAs detektiert werden, bei den männlichen Patienten waren es 103. Jeweils 27 bzw. 79 miRNAs befanden sich unter der Nachweisgrenze. Signifikant unterschiedlich lagen die folgenden fünf miRNAs in Seren von Patienten mit und ohne Kachexie vor: miR-19b-3p, miR-122-5p, miR-142-5p, miR-194-5p und miR-486-5p (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum von Krebspatienten mit und ohne Kachexie mittels miRNA-Panel**

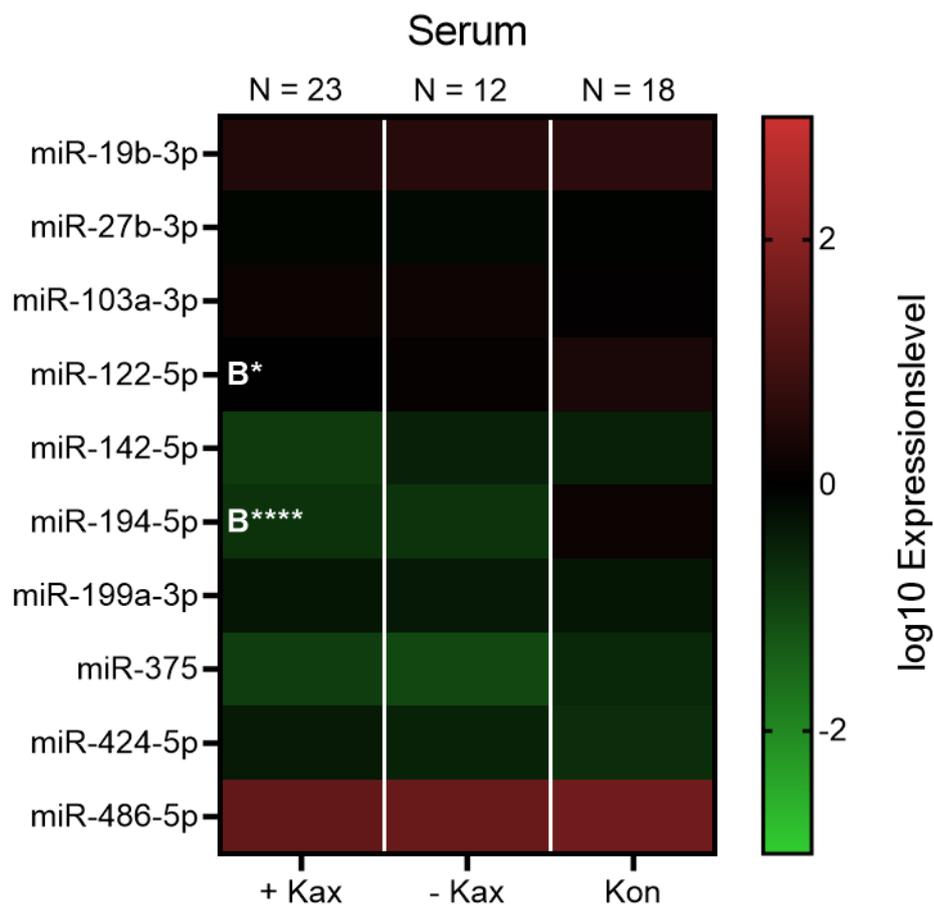
Die Seren zweier weiblicher und zweier männlicher Patienten jeweils mit und ohne Kachexie wurden analysiert. Im Panel der (A) Frauen konnten 152 miRNAs detektiert werden, bei den (B) Männern waren es 105 miRNAs. Bei miR-19b-3p, miR-122-5p, miR-142-5p, miR-194-5p und miR-486-5p (blau) liegen die größten Expressionsunterschiede zwischen den Kachektikern und den Kontrollen vor. Die Daten wurden normalisiert und logarithmiert.

Zur Validierung der im Panel detektierten miRNAs wurden RT-qPCR-Analysen im gesamten Probenatz durchgeführt und weitere, aus der Literatur bekannten miRNAs analysiert.

#### 4.4.2 Expressionsniveau der miR-122-5p im Serum ist assoziiert mit Tumorkachexie

Neben den fünf im Panel ermittelten miRNAs wurden noch miR-27b-3p (Xie et al. 2016; Marceca et al. 2020), miR-103a-3p (Hu et al. 2018b), miR-199a-3p (Narasimhan et al. 2017b; Freire et al. 2019), miR-375 (Shrestha et al. 2014) und miR-424-5p (Chen et al. 2020) untersucht, da diese in früheren Studien mit Kachexie, Lipolyse oder Muskelatrophie in Verbindung stehen (s. Referenzen).

Zur Validierung mittels RT-qPCR wurden Serumproben von Krebspatienten mit und ohne Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebserkrankungen herangezogen. Im Serum zeigten die miRNAs miR-122-5p und miR-194-5p eine signifikant niedrigere Expression bei Krebspatienten mit Kachexie als die Patienten der Kontrollgruppe (Abbildung 15). Dabei lag miR-122-5p signifikant 0,4-fach niedriger bei Krebspatienten mit Kachexie als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,0333$ ; Abbildung 16 A) vor.



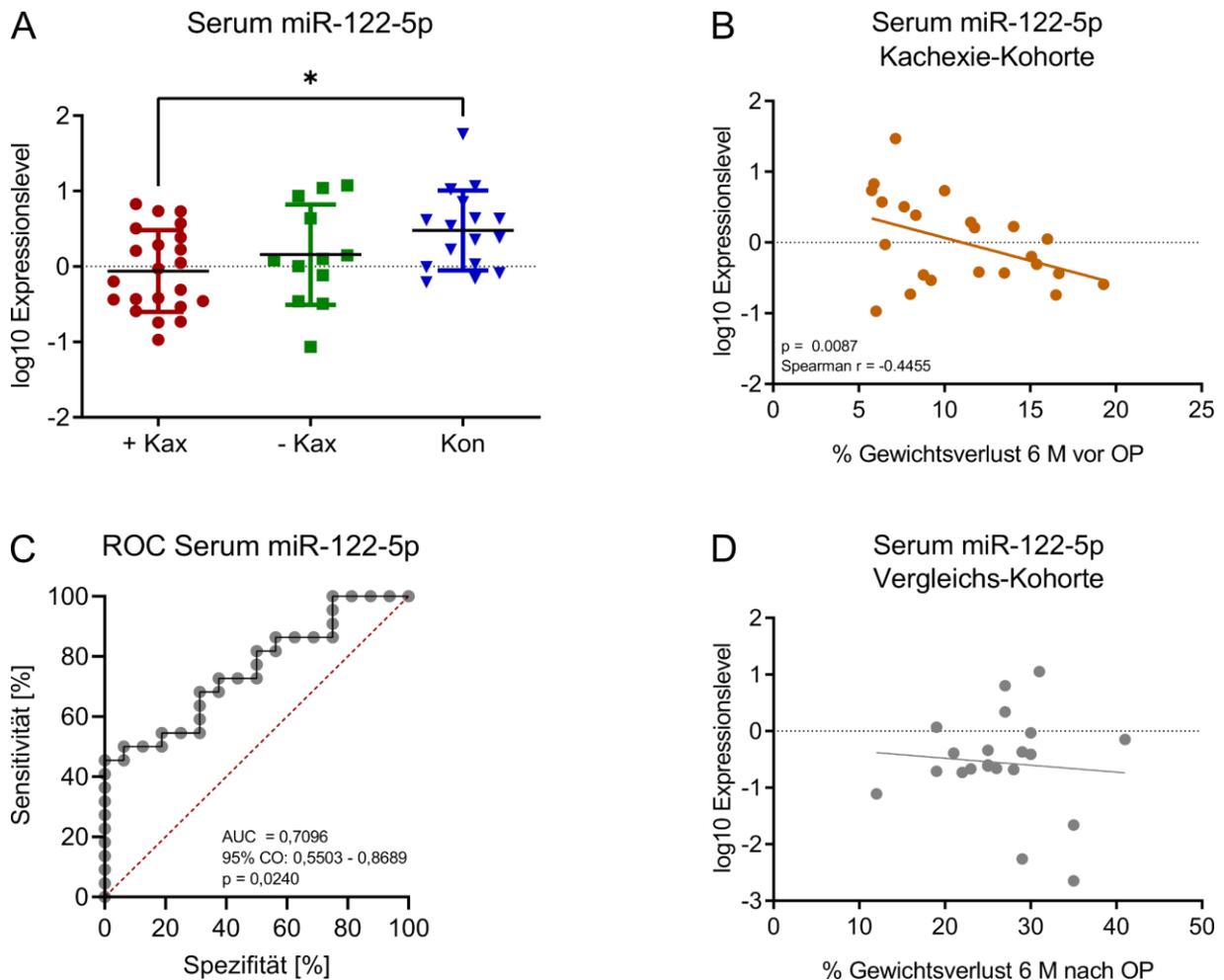
**Abbildung 15: miRNA-Expressionsprofil der Serumproben**

Mittels RT-qPCR wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in Seren von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 23) und ohne (- Kax; N = 12) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 18) analysiert. Die Analyse zeigte keine Unterschiede bei den miRNAs miR-19b-3p, miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-142-5p, miR-199a-3p, miR-375, miR-424-5p und miR-486-5p. Dagegen lagen die Expressionslevel bei miR-122-5p und miR-194-5p bei Patienten mit Kachexie unter den Werten der Kontrollgruppe (weißes B) vor. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als Mediane abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test mit \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,001$ .

Zur weiteren Etablierung eines möglichen Biomarkers für Kachexie wurde die Expression der ermittelten miRNAs mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation in Korrelation gesetzt.

Keine Korrelation ergab sich hierbei mit miR-194-5p. miR-122-5p hingegen zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen dem prozentualen Gewichtsverlust und der miRNA-Expression ( $p = 0,0087$ ;  $r = -0,45$ ; Abbildung 16 B). Um ausschließen zu können, dass sich die Expression der miR-122-5p nur auf Grund von Gewichtsabnahme änderte, wurde das

Expressionslevel in einer Vergleichskohorte (keine Krebserkrankung, keine Kachexie) bestimmt. Hier lag trotz prozentual ähnlichen Gewichtsverlustes der Patienten keine Korrelation mit der Expressionsmenge vor (Abbildung 16 D). Die errechnete AUC der ROC-Kurve zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Kachexie und Patienten ohne Krebs und ohne Kachexie betrug 0,71 ( $p = 0,0240$ ; Abbildung 16 C).



**Abbildung 16: Analyse der miR-122-5p-Expression in Serumproben der Kachexie- und einer Vergleichskohorte**

(A) Mittels qPCR wurde die Expression der miR-122-5p in Seren von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 23; rot) und ohne (- Kax; N = 12; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 18; blau) analysiert und (B) mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation in Korrelation gesetzt (N = 23). (C) Eine Unterscheidung zwischen Krebspatienten mit Kachexie (N = 22) und ohne Kachexie (N = 16) war durch Messung der miR-122-5p-Expression möglich. Dazu wurde eine ROC (*Receiver Operating Characteristic*) Kurve erstellt und die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. (D) Zwischen dem Expressionslevel der miR-122-5p im Serum und dem prozentualen Gewichtsverlust einer Vergleichskohorte (N = 21) ergab sich keine Korrelation. (A) Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als MW  $\pm$  SEM abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test (A) und lineare Regression (B, D) mit  $*p \leq 0,05$ . M = Monate.

Abschließend ist festzuhalten, dass bei der Panel-Analyse im Serum von Krebspatienten mit Kachexie und ohne Kachexie zwar einige miRNAs Expressionsunterschiede auffielen, diese Ergebnisse jedoch in der Validierung nicht bestätigt werden konnten. Signifikante Unterschiede in miRNA-Expressionen ergeben sich in der gesamten Kohorte nur zwischen Kachektikern

und der Kontrollgruppe ohne Krebs. Dabei lag einzig zwischen der miR-122-5p-Expression und dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation eine signifikant negative Korrelation vor.

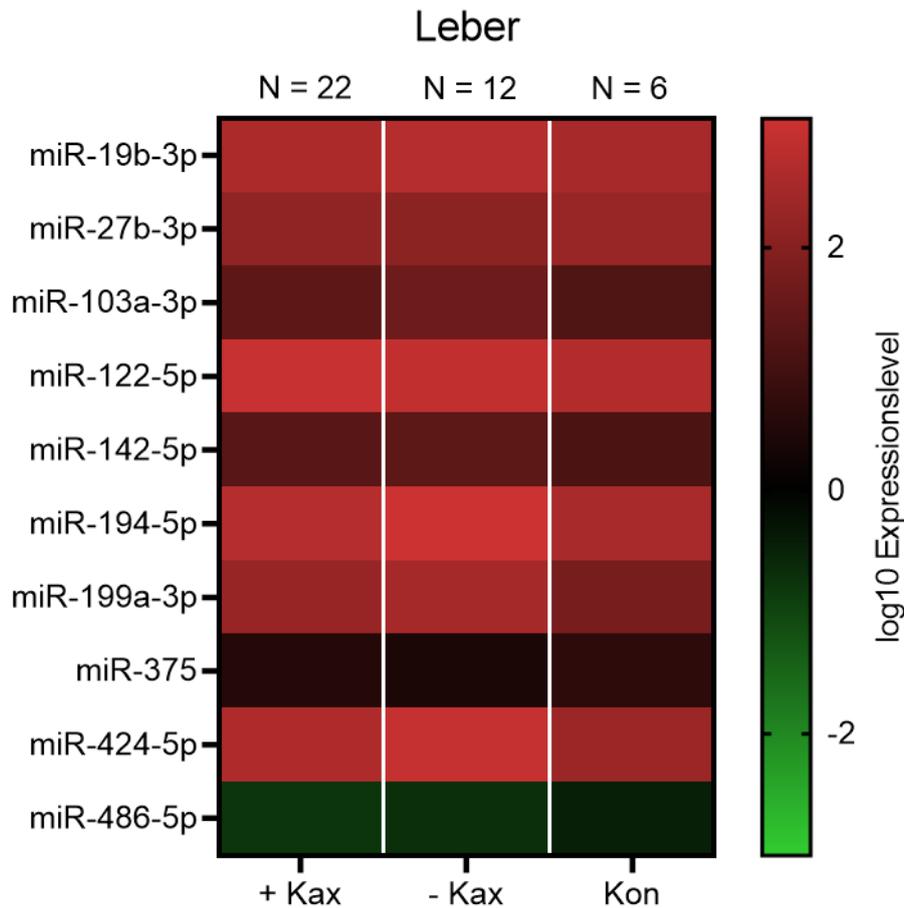
Da es sich bei Kachexie um eine Multiorgan-Erkrankung handelt, bei der zahlreiche Organe involviert sein können, wurden, neben der Abnahme von Blut, den Patienten bei ihrer Operation auch Gewebstücke der Leber, des Muskels und des viszeralen und subkutanen Fetts entnommen und auf das miRNA-Panel hin analysiert.

## **4.5 miRNA- und mRNA-Expressionsanalysen in Leber, Muskel, subkutanem und viszeralem Fettgewebe**

Zur Erforschung der komplexen molekularbiologischen Veränderungen und Zusammenhänge im Metabolismus von Patienten mit Tumorkachexie wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in den entnommenen humanen Geweben untersucht und der Zusammenhang mit potenziellen Target-Genen der miRNAs mittels Zellkulturversuchen evaluiert.

### **4.5.1 Keine miRNA-Expressionsunterschiede in der Leber**

Aus dem durch den Chirurgen entnommenen Lebergewebstück wurde die miRNA isoliert und die Expression der zehn miRNAs, die durch Literatur und das Serum-Panel ermittelt werden konnten, untersucht. Die resultierenden Ergebnisse sind in der folgenden *Heatmap* dargestellt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: miRNA-Expressionsprofil der Leberproben**

Mittels RT-qPCR wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in Leberbiopsien von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 22) und ohne (- Kax; N = 12) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 6) analysiert. In der Expression der miRNAs konnten keine sig. Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als Mediane abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test.

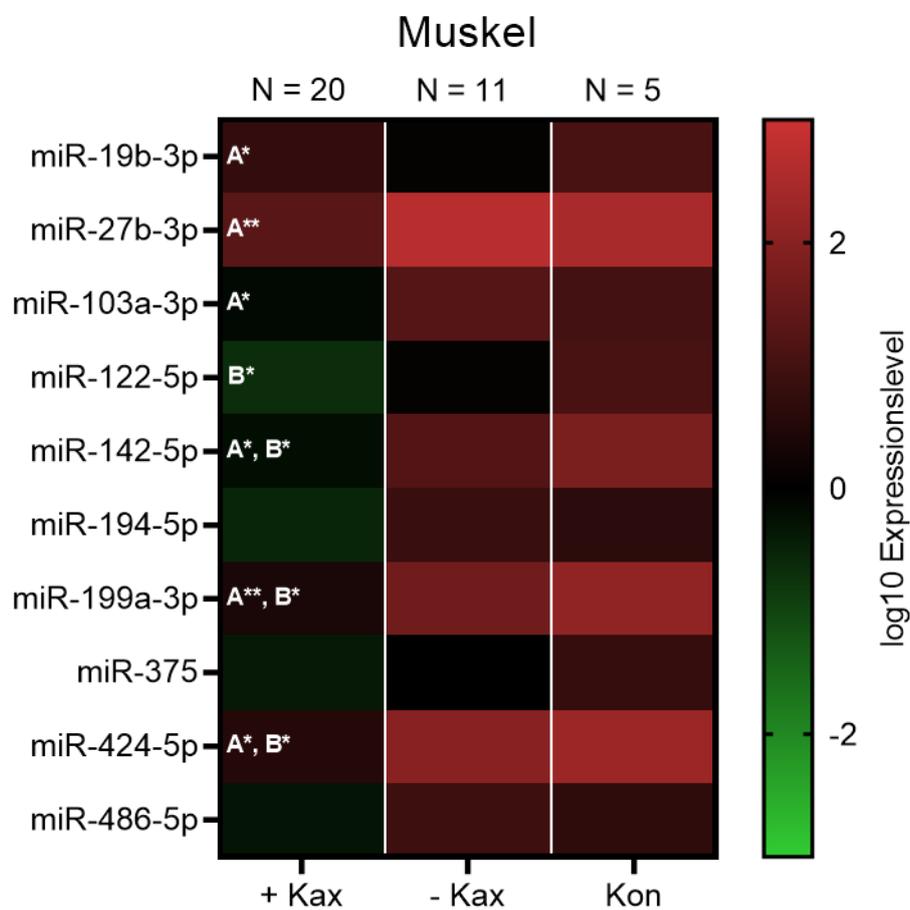
Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen den drei Gruppen (+ Kax, - Kax und Kon) im Lebergewebe. Auch bei den Korrelationsberechnungen zwischen der miRNA-Expression und dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation zeigten sich keine Signifikanzen (Daten nicht abgebildet). Es wurden daher keine weiteren statistischen und zellbasierten Analysen durchgeführt.

#### 4.5.2 Expressionsniveau der miR-27b-3p im Muskel ist assoziiert mit Tumorkachexie

##### 4.5.2.1 Analyse der miRNA-Expressionsunterschiede im Muskel

Da neben dem Verlust von Fettgewebsmasse, der Abbau von Skelettmuskel die Pathophysiologie von Kachexie beschreibt, wurden neben der Analyse von miRNAs in der Leber auch Muskelproben von Krebspatienten mit und ohne Kachexie sowie der Kontrollgruppe untersucht. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus sind als *Heatmap* in

Abbildung 18 dargestellt. Bei den sechs miRNAs miR-19b-3p, miR-27b-3p (siehe auch Abbildung 19 A), miR-103a-3p, miR-142-5p, miR-199a-3p und miR-424-5p lagen signifikante Expressionsunterschiede im Muskelgewebe zwischen Krebspatienten mit Kachexie und Krebspatienten ohne Kachexie sowie der Kontrollgruppe vor ( $p \leq 0,05$ ). Dabei lag das Expressionsniveau der miRNAs in der Tumorkachexie-Gruppe deutlich unter dem Niveau der beiden Vergleichsgruppen. miR-122-5p war nur zwischen den Krebspatienten mit Kachexie und der Kontrollgruppe signifikant differentiell exprimiert. Dagegen lag das miR-486-5p-Expressionsniveau in der Kachexie-Gruppe signifikant unter dem der Krebspatienten ohne Kachexie. Bei den beiden miRNAs miR-194-5p und miR-375 konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen in deren Expression detektiert werden.

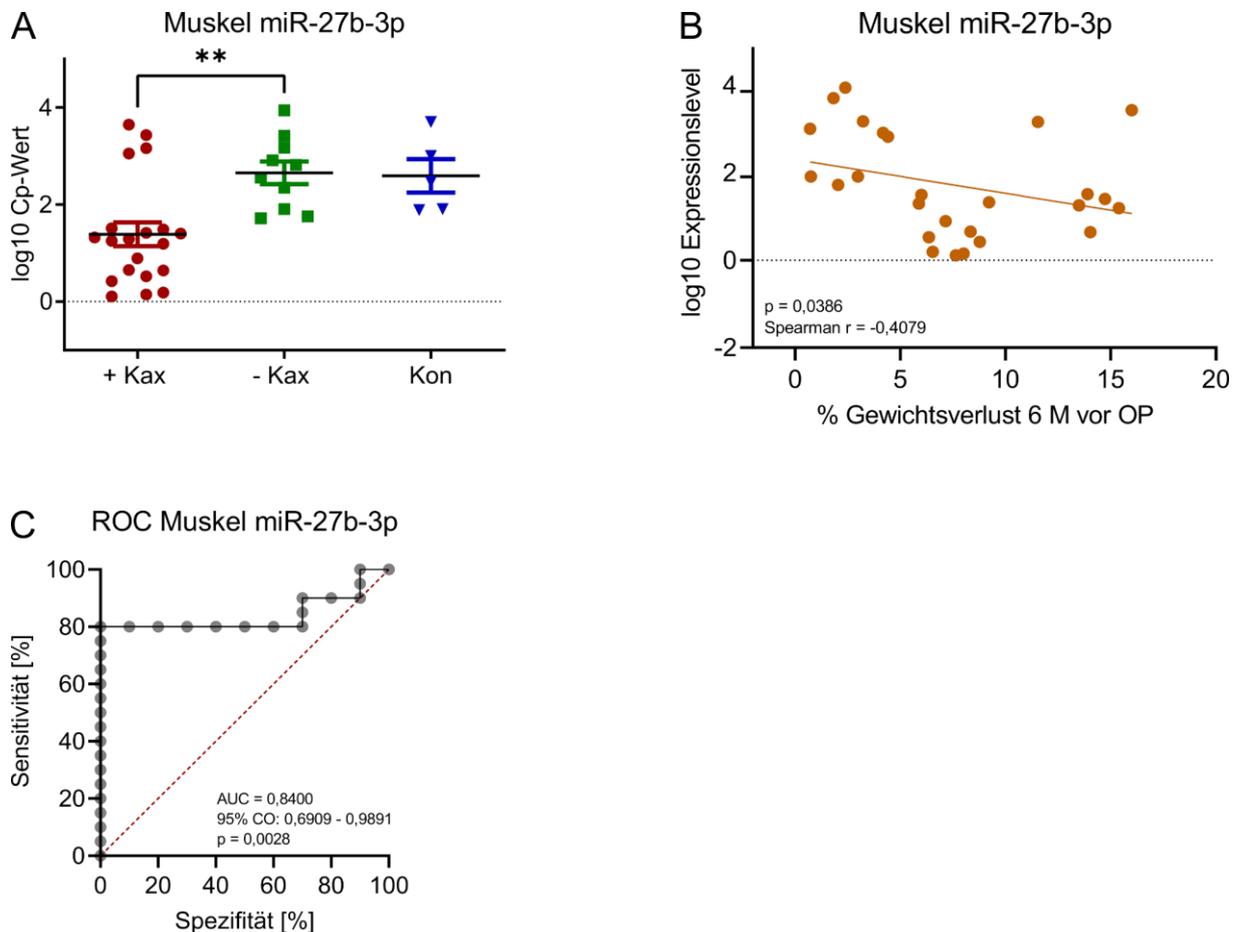


**Abbildung 18: miRNA-Expressionsprofil der Muskelproben**

Mittels qPCR wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in Muskelproben von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 20) und ohne (- Kax; N = 11) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 5) analysiert. Das miRNA-Expressionsprofil von Krebspatienten mit Kachexie wurde sowohl mit dem der Krebspatienten ohne Kachexie (weißes A), als auch mit dem Profil der Kontrollgruppe (weißes B) verglichen. Die Analyse zeigte Unterschiede in der Expression von miR-19b-3p, miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-122-5p, miR-142-5p, miR-199a-3p und miR-424-5p. Dagegen konnten bei miR-194-5p, miR-375 und miR-486-5p keine Differenzen ermittelt werden. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als Mediane abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

In der Tumorkachexie-Gruppe lagen im Vergleich zu den Krebspatienten ohne Kachexie niedrigere Expressionsniveaus vor. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen den

genannten sechs miRNAs und der der Veränderungen im Muskelgewebe hin. Zur weiteren Etablierung wurde die Expression der ermittelten miRNAs mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation in Korrelation gesetzt.



**Abbildung 19: Analyse der miR-27b-3p-Expression in Muskelproben der Kachexiekohorte**

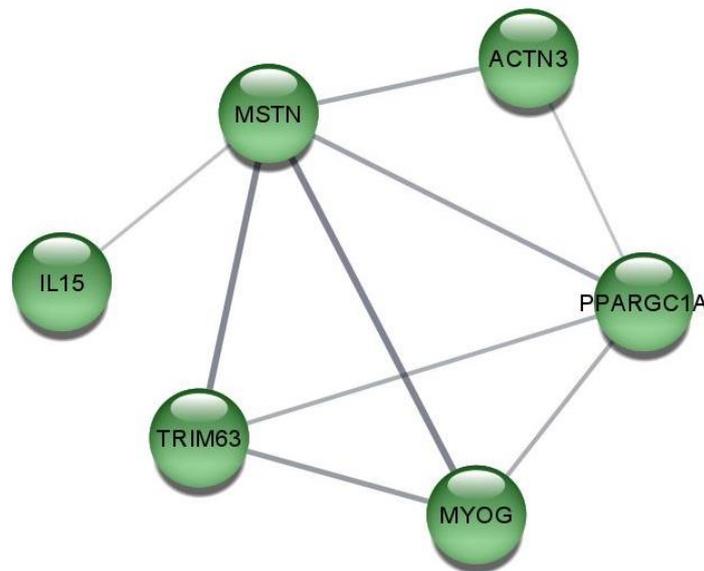
(A) Mittels RT-qPCR wurden die Expression der miR-27b-3p im Muskel von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 20; rot) und ohne (- Kax; N = 11; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 5; blau) analysiert und (B) mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation in Korrelation gesetzt (N = 27). (C) Eine Unterscheidung zwischen Krebspatienten mit Kachexie (N = 20) und ohne Kachexie (N = 10) war durch Messung der miR-27b-3p-Expression möglich. Dazu wurde eine ROC (*Receiver Operating Characteristic*) Kurve erstellt und die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als MW ± SEM abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test (A) und lineare Regression (B) mit \*\*p ≤ 0,01. M = Monate.

Die miR-27b-5p zeigte ein signifikant niedrigeres Expressionsmuster bei Tumorkachexie-Patienten im Vergleich zu Tumorpatienten ohne Kachexie (p = 0,0081; Abbildung 19 A). Ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation und der miRNA-Expression, konnte nur bei miR-27b-5p gezeigt werden. Auch hier nahm das Expressionsniveau mit steigendem Gewichtsverlust ab (p = 0,039; r = - 0,41; Abbildung 19 B). Die errechnete AUC der ROC-Kurve ergab eine 84 %ige Wahrscheinlichkeit zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Kachexie und Krebspatienten ohne Kachexie (p = 0,0028; Abbildung 19 C).

Für die Analyse potenzieller Target-Gene der miR-27b-3p wurden Experimente mit C2C12-Zellen *in vitro* durchgeführt.

#### 4.5.2.2 Target-Gene der miR-27b-3p

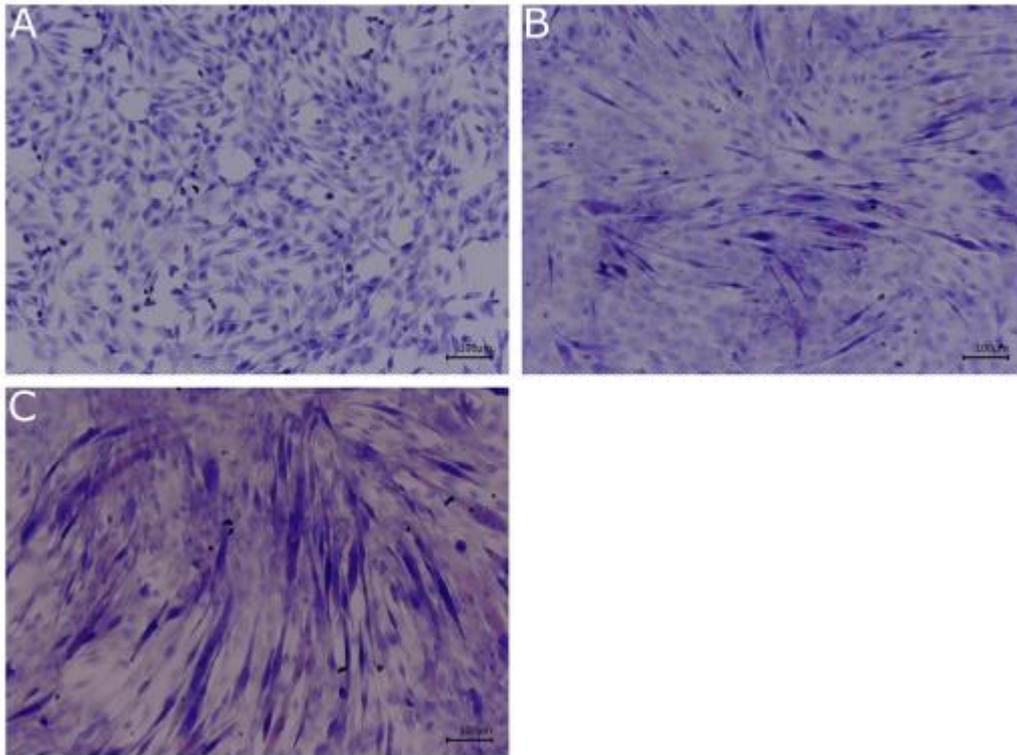
Zur Identifizierung möglicher Target-Gene der miR-27b-3p wurde eine *in silico* Prognose mittels Ontologie-Datenbankanalysen durchgeführt. Es fanden sich hierbei die folgenden Gene des humanen, skelettalen Muskelatrophie-Stoffwechselwegs: Actinin alpha 3 (ACTN3), Interleukin 15 (IL-15), Myostatin (MSTN), Peroxisome proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma-Koaktivator 1-alpha (PPARGC1A), Myogenin (MYOG) und *Tripartite Motif Containing 63* (TRIM63/MuRF1) (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Netzwerk von Genen der skelettalen Muskelatrophie**

Mögliche Target-Gene (grüne Kugeln) der miR-27b-3p in Zusammenhang mit humaner skelettaler Muskelatrophie: Actinin alpha 3 (ACTN3), Interleukin 15 (IL-15), Myostatin (MSTN), Peroxisome proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma-Koaktivator 1-alpha (PPARGC1A), Myogenin (MYOG) und Tripartite Motif Containing 63 (TRIM63). Die Angabe zu den validierten Interaktionen wurden dem *Gene Ontology* (GO) Term GO:0014732; *skeletal muscle atrophy*, entnommen.

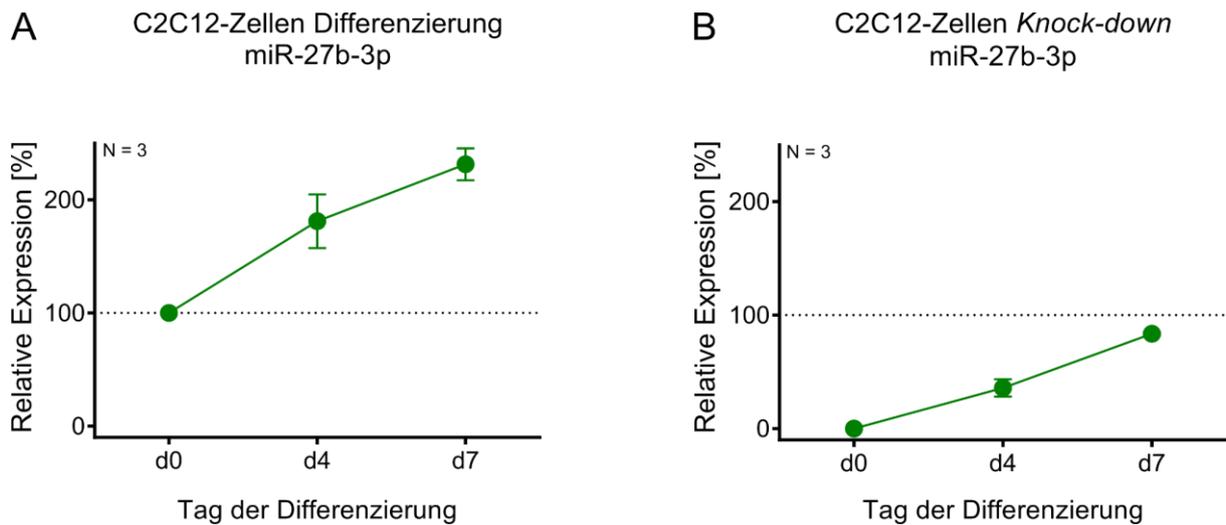
Zur Evaluierung des Einflusses der miR-27b-3p auf molekularer Ebene wurden C2C12-Zellen differenziert (Abbildung 21) und der Expressionsverlauf dieser miRNA untersucht (Abbildung 22).



**Abbildung 21: Differenzierungsverlauf der C2C12-Zellen**

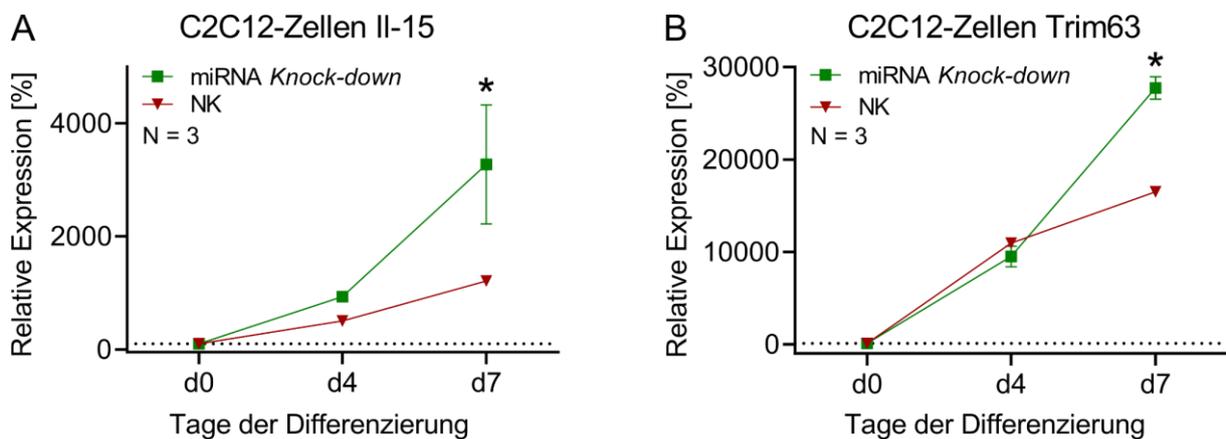
Die Differenzierung der C2C12-Zellen wurde durch Zugabe von Pferdeserum initiiert. Die in 6-Well-Platten ausgesäten Zellen wurden an den Tagen (A) d0, (B) d4 und (C) d7 des Differenzierungsverlaufs fixiert und H/E gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen repräsentativ die Fusionierung der undifferenzierten Myoblasten zu langgestreckten Myotuben. 20x Vergrößerung.

Über die siebentägige Differenzierungsphase der C2C12-Zellen fusionierten die undifferenzierten Myoblasten und bildeten Myotuben. Diese ausdifferenzierten Zellen wiesen eine langgestreckte Form auf (Abbildung 21). Während dieses Prozesses stieg das Expressionsniveau der miR-27b-3p an (Abbildung 22 A). Um den direkten Einfluss der miR-27b-3p auf die Target-Gene nachweisen zu können, wurden *Knock-down*-Experimente in C2C12-Zellen durchgeführt. Die Myoblasten wurden hierfür an Tag -3 der Differenzierung mit der entsprechenden siRNA transfiziert und die Zellen für die Isolation der kompletten RNA an den Tagen d0, d4 und d7 geerntet. Die Analyse der miR-27b-3p im *Knock-down*-Experiment zeigte, dass nur an Tag 0 (d0) der Differenzierung keine miR-27b-3p detektiert werden konnte. Bereits an Tag 4 (d4) waren im Vergleich zur Negativkontrolle ohne den miR-27b-Inhibitor 35 % der miR-Expression in den transfizierten Zellen wieder vorhanden (Abbildung 22 B).



**Abbildung 22: Expressionsniveau der miR-27b-3p in der Differenzierung von C2C12-Zellen**  
 Die C2C12-Zellen wurden an den Tagen d0, d4 und d7 des Differenzierungsverlaufs geerntet, die RNA isoliert und in RT-qPCR-Analysen gemessen. (A) Anstieg der Expression der miR-27b-3p (N = 3). (B) Verlauf der Expression der miR-27-3p nach Zugabe der siRNA im *Knock-down*-Experiment. Die gestrichelte 100 %-Linie entspricht dabei dem Basalwert vor Zugabe der siRNA (N = 3). Dargestellt wurden die MW  $\pm$  SEM.

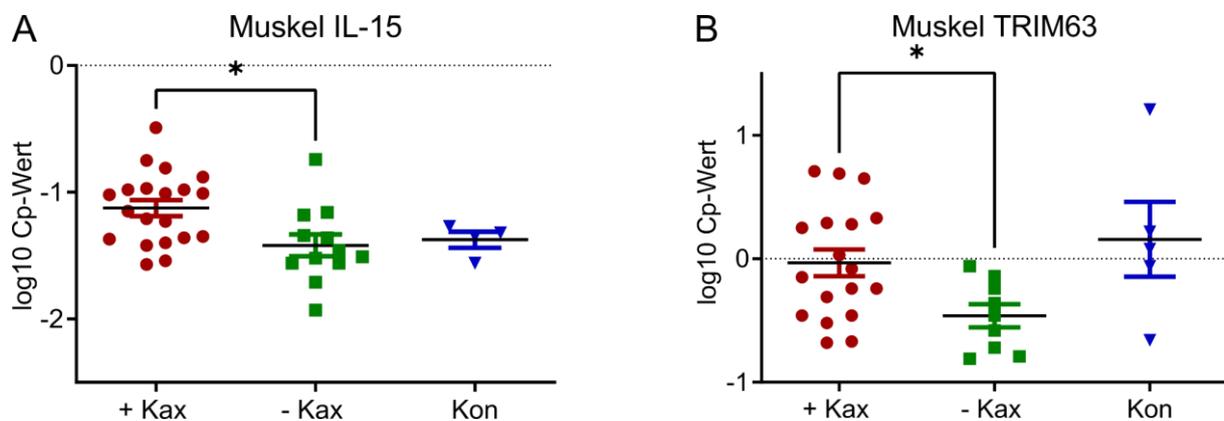
Bei den beiden möglichen miRNA-Target-Genen Il15 und Trim63 stieg die Expression bei den mit anti-27b-3p transfizierten C2C12-Zellen an. Im Vergleich mit transfizierten Zellen ohne die entsprechende siRNA erhöhte sich die Expression von Il15 um 60 % (Abbildung 23 B) und bei Trim63 um 74 % (Abbildung 23 C). Die Regulation der Gene Myog und Mstn wurde durch den kurzzeitigen *Knock-down* der miRNA nicht nachweisbar beeinflusst. Ebenso ließ sich keine Änderung in der Expression der Gene Ppargc1 und Actn3 feststellen (Daten nicht abgebildet).



**Abbildung 23: Verlauf der miR-27b-3p und der Gen-Expressionen über die Differenzierung von C2C12-Zellen im *Knock-down*-Experiment**  
 Für den *Knock-down* der miR-27b-3p wurden die C2C12-Zellen am Tag d-3 mit der siRNA transfiziert und Expression der miRNA an den Tagen d0, d4 und d7 der Differenzierung überprüft. Neben der miR-27b-3p stieg auch die Expression der Target-Gene (A) Il-15 und (B) Trim63. Dargestellt wurden die MW  $\pm$  SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test mit  $*p \leq 0,05$ .

Die beiden bioinformatisch ermittelten und im *Knock-down*-Experiment verifizierten Target-Gene wurden durch RT-qPCR-Analysen der Muskel-mRNA in der Kachexie-Gruppe untersucht (Abbildung 24). Die durchschnittliche Expression der beiden Gene IL-15 und

TRIM63 in der Kachexie-Gruppe lag über dem Mittel der Krebserkrankten ohne Kachexie ( $p = 0,036$  und  $p = 0,045$ ).



**Abbildung 24: Analyse von IL-15- und TRIM63-Expression in Muskelproben der Kachexiekohorte**

Aus den Proben des humanen Muskelgewebes der Kachexie-Gruppe wurde die mRNA isoliert und die Expression der bioinformatisch ermittelten Target-Gene Interleukin 15 (IL-15) und Tripartite Motif Containing 63 (TRIM63), die im Zusammenhang mit skelettaler Muskelatrophie stehen, mittels RT-qPCR analysiert. (A) IL15-Expression im Muskel von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 20; rot) und ohne (- Kax; N = 12; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 4; blau). (B) TRIM63-Expression im Muskel von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 18; rot) und ohne (- Kax; N = 9; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 5; blau). Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als MW  $\pm$  SEM abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test mit  $*p \leq 0,05$ .

In den untersuchten Muskelproben der Kachexiegruppe zeigten die an Kachexie erkrankten Patienten im Vergleich zu den Patienten ohne Kachexie signifikant niedrigere Expressionsniveaus der miR-27b-3p. Der *Knock-down* der miRNA in der murinen Muskelzelllinie C2C12 bestätigte die Interaktion der miRNA mit den bioinformatisch ermittelten Muskelatrophie-Target-Genen. Bei den Patienten mit Tumorkachexie zeigten sich erhöhte Expressionsniveaus der Atrophie-assoziierten Gene IL-15 und TRIM63.

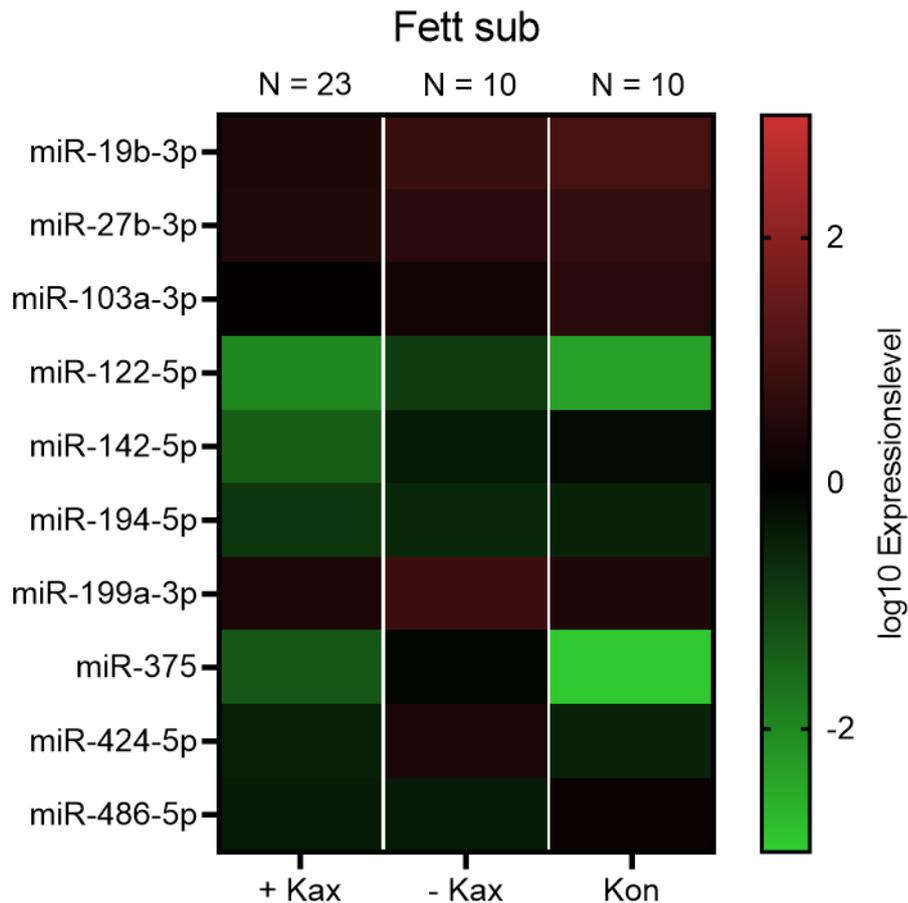
### 4.5.3 Expressionsniveaus der miR-375 und miR-424-5p im viszeralen Fettgewebe sind assoziiert mit Tumorkachexie

#### 4.5.3.1 Analyse der miRNA-Expressionsunterschiede im Fettgewebe

Der Gewichtsverlust bei Tumorkachexie lässt sich sowohl auf den Abbau von Muskel- als auch von Fettmasse zurückführen. Die körperlichen Fettreserven können während des kachektischen Zustands nicht durch kalorienreiche Nahrung ausgeglichen werden. Daher wurden neben den Leber- und Muskelproben auch Biopsien des subkutanen und viszeralen Fettgewebes entnommen und diese mittels RT-qPCR analysiert, um die zugrundeliegenden molekularbiologischen Veränderungen im Fettgewebe zu untersuchen.

### 4.5.3.2 Keine miRNA-Expressionsunterschiede im subkutanen Fettgewebe

Aus dem entnommenen subkutanen Fettgewebstückchen wurde die miRNA isoliert und das Expressionsniveau der zehn ausgewählten miRNAs bei den Krebspatienten mit und ohne Kachexie, sowie in der tumorfreien Kontrollgruppe bestimmt (Abbildung 25).



**Abbildung 25: miRNA-Expressionsprofil der subkutanen Fettgewebeproben**

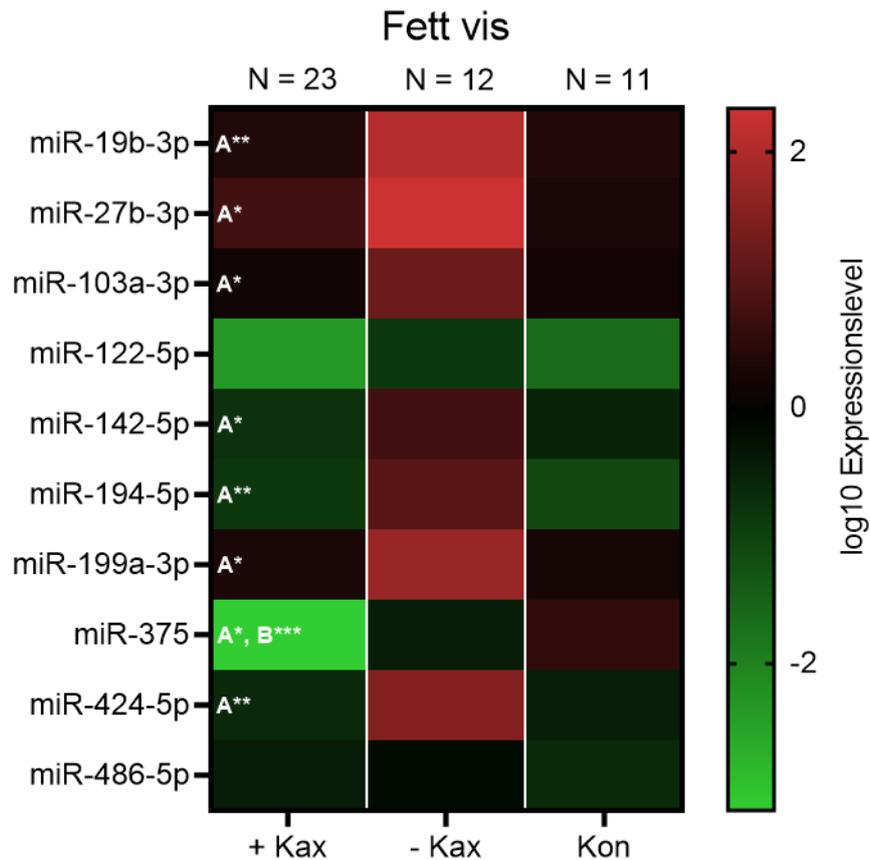
Mittels RT-qPCR wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in subkutanen Fettgewebstripsien von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 23) und ohne (- Kax; N = 10) Kachexie sowie der Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 10) analysiert. Beim Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zeigten sich keine Unterschiede. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als Mediane abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test.

Die Expressionsniveaus zwischen Krebspatienten mit Kachexie und ohne Kachexie zeigten bei der Messung der ausgewählten miRNAs keine signifikanten Unterschiede im subkutanen Fettgewebe. Es wurden daher keine weiteren Analysen mit miRNA aus diesem Gewebe durchgeführt.

#### 4.5.3.3 Expressionsunterschiede der miR-375 und miR-424-5p im viszeralem Fettgewebe

Die obengenannten Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalysen im subkutanen Fettgewebe lassen darauf schließen, dass die ausgewählten miRNAs keinen Einfluss auf die Pathophysiologie der Tumorkachexie haben. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum und woher bei Kachexiepatienten ein deutlicher Verlust der Fettmasse zu verzeichnen ist. Daher wurden auch die viszeralem Fettgewebeproben einer miRNA-Expressionsanalyse unterzogen.

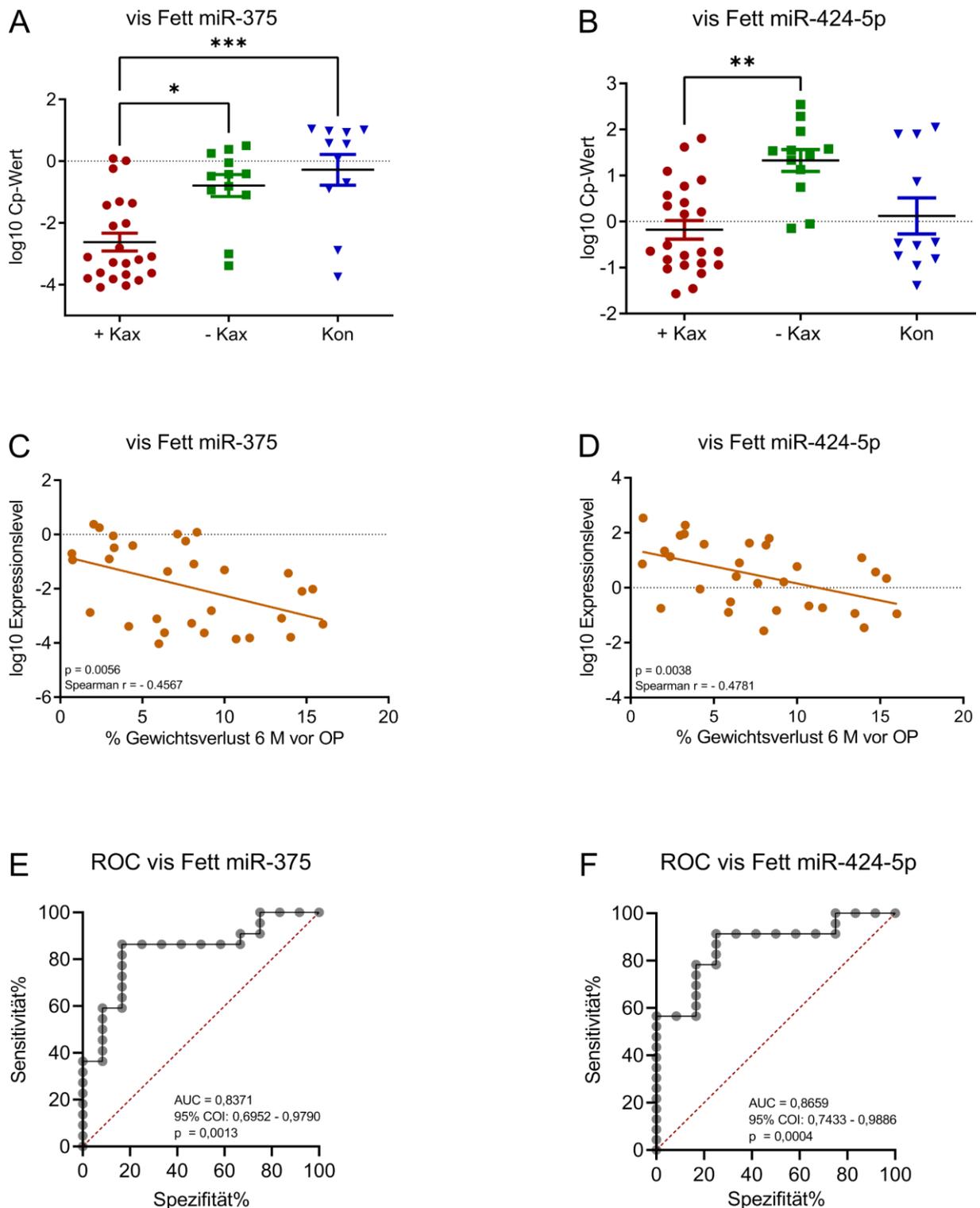
Die Ergebnisse, die als *Heatmap* in Abbildung 26 dargestellt sind, zeigten, dass im viszeralem Fettgewebe bei den miRNAs miR-19b-3p, miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-142-5p, miR-199a-3p, miR-375 und miR-424-5p deutliche Expressionsunterschiede zwischen Krebspatienten mit und ohne Kachexie vorhanden sind. Hierbei wiesen miR-19b-3p ( $p = 0,0014$ ), miR-194-5p ( $p = 0,0028$ ) und miR-424-5p ( $p = 0,0011$ ; siehe auch Abbildung 27 B) eine Signifikanz auf. Die Expressionsniveaus lagen hier in der Kachexiegruppe im Vergleich zur Tumorpatientengruppe niedriger. Vergleicht man die miR-375-Expression der Kachexie-Proben mit der Kontrollgruppe, fand sich eine Signifikanz von  $p = 0,0003$  und mit der Gruppe ohne Kachexie eine Signifikanz von  $p = 0,0096$  (siehe auch Abbildung 27 A). Bei den beiden miRNAs miR-122-5p und miR-486-5p konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.



**Abbildung 26: miRNA-Expressionsprofil der viszeralen Fettgewebsproben**

Mittels RT-qPCR wurden die miRNA-Expressionsunterschiede in viszeralen Fettgewebsproben von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 23) und ohne (- Kax; N = 12) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 11) analysiert. Die Analyse wies keine Unterschiede bei den miRNAs miR-122-5p und miR-486-5p auf. Dagegen lagen bei miR-19b-3p, miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-142-5p, miR-194-5p, miR-199a-3p, miR-375 und miR-424-5p Unterschiede in der Expression zwischen Krebspatienten mit Kachexie und Krebspatienten ohne Kachexie (weißes A) vor. Beim Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Krebspatienten mit Kachexie und der Kontrollgruppe (weißes B) zeigte sich bei miR-375 eine Differenz im Expressionniveau. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als Mediane abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test mit \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001.

Die detektierten miRNAs wurden zur Verifizierung, dass sie Einfluss auf den kachektischen Status von Tumorpatienten nehmen, mit dem prozentualen Gewichtsverlust der letzten sechs Monate vor ihrer Operation in Korrelation gesetzt. Eine negative Korrelation mit dem prozentualen Gewichtsverlust zeigte sich bei miR-375 (p = 0,0056; r = -0,46; Abbildung 27 C) und bei miR-424-5p (p = 0,0038; r = -0,48; Abbildung 27 D). Durch die Expressionsniveaus der beiden miRNAs miR-375 und miR-424-5p konnten Krebspatienten mit Kachexie von diesen ohne Kachexie unterschieden werden. Dies war auch aus den erstellten *Receiver Operating Characteristic*-Kurven (ROC) in Abbildung 27 E und F ersichtlich (AUC > 0,83; p < 0,005).

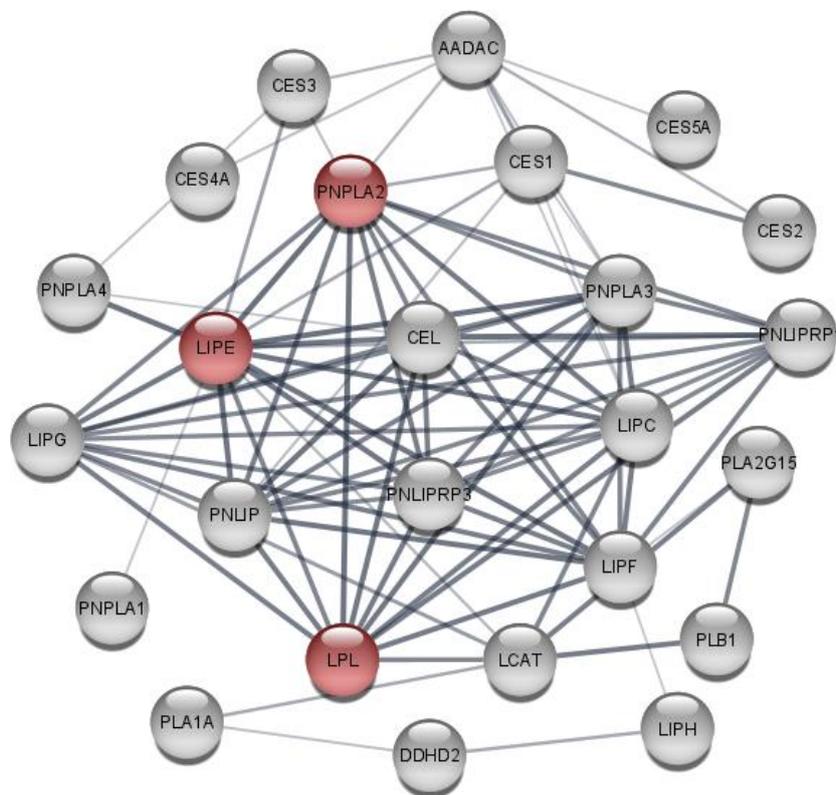


**Abbildung 27: Analyse der miR-375- und miR-424-5p-Expressionen in viszeralen Fettgewebeproben der Kachexiekohorte**

(A) Mittels RT-qPCR wurden die Expressionen der miR-375 und miR-424-5p in viszeralen Fettgewebeproben von Krebspatienten mit (+ Kax; N = 23; rot) und ohne (- Kax; N = 12; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; N = 11; blau) analysiert und (B) mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation in Korrelation gesetzt (miR-375: N = 30; miR-424-5p: N = 30). (C) Eine Unterscheidung zwischen Krebspatienten mit Kachexie (miR-375: N = 22; miR-424-5p: N = 23) und ohne Kachexie (miR-375: N = 12; miR-424-5p: N = 12) war durch Messung der miR-375 und miR-424-5p-Expression möglich. (E und F) Dazu wurde eine ROC (*Receiver Operating Characteristic*) Kurve erstellt und die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Die Daten wurden normalisiert, logarithmiert und als MW ± SEM abgebildet. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test (A) und Spearman-Korrelation (B) mit \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01 und \*\*\*p ≤ 0,001. M = Monate.

#### 4.5.3.4 Target-Gene der miR-375- und miR-424-5p

Mit Hilfe der Ontologie-Datenbank von *Gene Ontology* (GO) konnten potenziell gemeinsame Target-Gene der beiden miRNAs miR-375 und miR-424-5p *in silico* ermittelt werden (Abbildung 28). Als validierte, überlappende Gene, welche eine Schlüsselrolle in der Lipolyse aufweisen, sind hier zu nennen: LIPE, welches das Enzym hormonsensitive Lipase kodiert (HSL), PNPLA2, welches die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) kodiert und LPL, welches die Lipoproteinlipase kodiert. Diese mit Kachexie assoziierten Gene wurden in Zellkulturexperimenten untersucht.



**Abbildung 28: Netzwerk der involvierten Gene in Triglycerid-Lipase-Metabolismus**

Die in dieser Studie validierten Target-Gene (rote Kugeln) der beiden miRNAs miR-375 und miR-424-5p in Zusammenhang mit humaner Lipolyse: Lipase E (LIPE), Lipoproteinlipase (LPL) und *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2). Die Angabe zu den validierten Interaktionen wurden dem *Gene Ontology* (GO) Term GO:0004806; *triglyceride lipase activity*; entnommen.

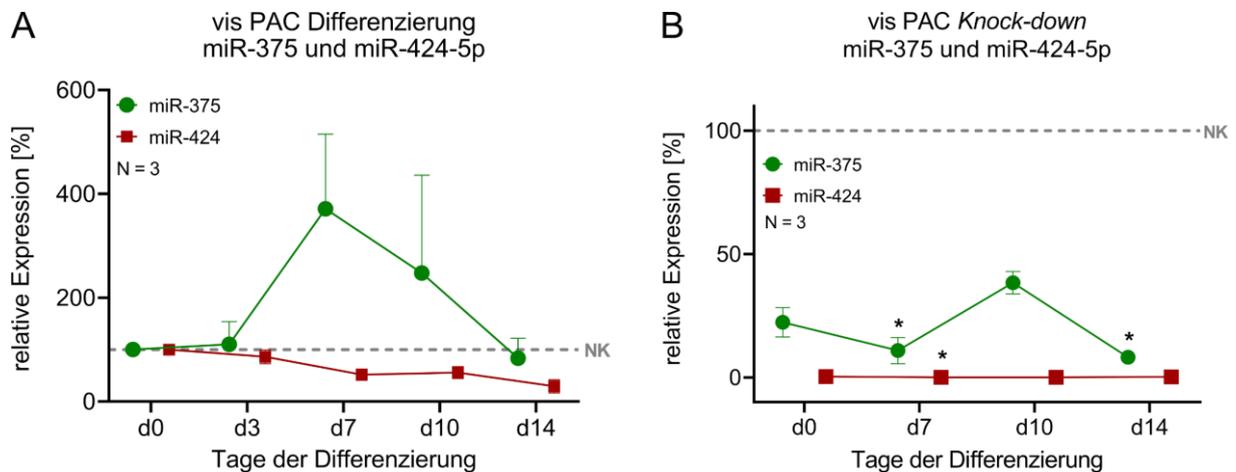
Um den Einfluss der beiden miRNAs auf die bioinformatisch ermittelten Target-Gene nachzuweisen, wurden ebenfalls *Knock-down*-Experimente mit den entsprechenden miRNAs durchgeführt. Dazu wurden humane, aus viszeralem Fettgewebe isolierte PACs differenziert und das Expressionsniveau von miR-375 und miR-424-5p während der Differenzierung bestimmt (Abbildung 29 A).

In der frühen Differenzierungsphase stieg die miR-375 bis Tag 7 an. An Tag 10 der Differenzierung wurde deutlich weniger miRNA von den Zellen exprimiert, bevor am Ende der

Differenzierung die Expression auf das Anfangsniveau sank. Bei miR-424-5p wurde bereits im Anfangsstadium des Differenzierungsverlaufs das höchste Expressionsniveau detektiert. Im weiteren Verlauf sank die miRNA unter das anfängliche Niveau.

Da beide miRNAs ihren miRNA-Expressions-Peak in der frühen Phase der Differenzierung aufwiesen, wurden die PACs für die *Knock-down*-Experimente drei Tage vor Einleitung der Differenzierung (d-3) mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und das Expressionsniveau der beiden miRNAs über den Verlauf der Differenzierung gemessen.

Wie Abbildung 29 B zeigt, wurde die Expression der miR-424-5p über den kompletten Differenzierungsverlauf durch die entsprechende siRNA unterbunden (NK zu d7:  $p = 0,018$ ). Auch beim *Knock-down*-Ansatz der miR-375 wurde deren Expression über die Differenzierung unterdrückt (NK zu d7:  $p = 0,042$ , NK zu d14:  $p = 0,010$ ).

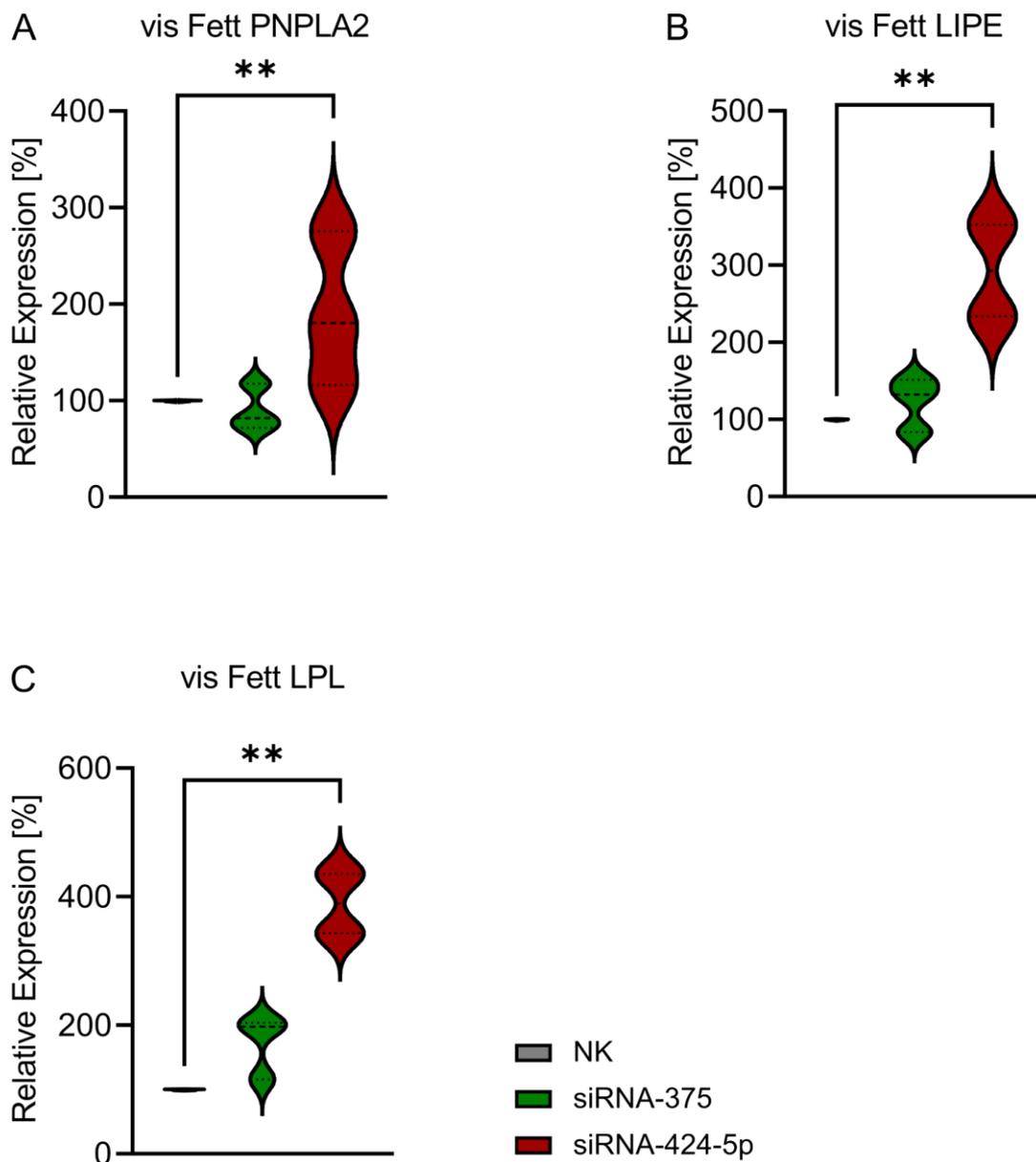


**Abbildung 29: Expressionslevel der miR-375 und miR-424-5p in der Differenzierung von humanen Präadipozyten mit und ohne siRNA**

Die viszerale PACs wurden an den Tagen d0, d3, d7, d10 und d14 des Differenzierungsverlaufs geerntet, die RNA isoliert und in RT-qPCR-Analysen gemessen. (A) Expressionsniveau der miR-375 (grün) und miR-424-5p (rot) ( $N = 3$ , NK = Negativkontrolle: miRNA-Expressionsniveau an Tag 0 der Differenzierung, rot). (B) Verlauf der Expression der miR-375 (grün) und miR-424-5p (rot) nach Zugabe der jeweiligen siRNA im *Knock-down*-Experiment. Die Negativkontrolle (NK) entsprach dem miRNA-Expressionsniveau transfizierter Zellen ohne siRNA ( $N = 3$ ). Dargestellt wurden die MW  $\pm$  SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn`s-Post-hoc-Test mit  $*p \leq 0,05$ .

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Expressionsniveaus der bioinformatisch ermittelten Lipolyse-Gene in Zellen des *Knock-down*-Ansatzes.

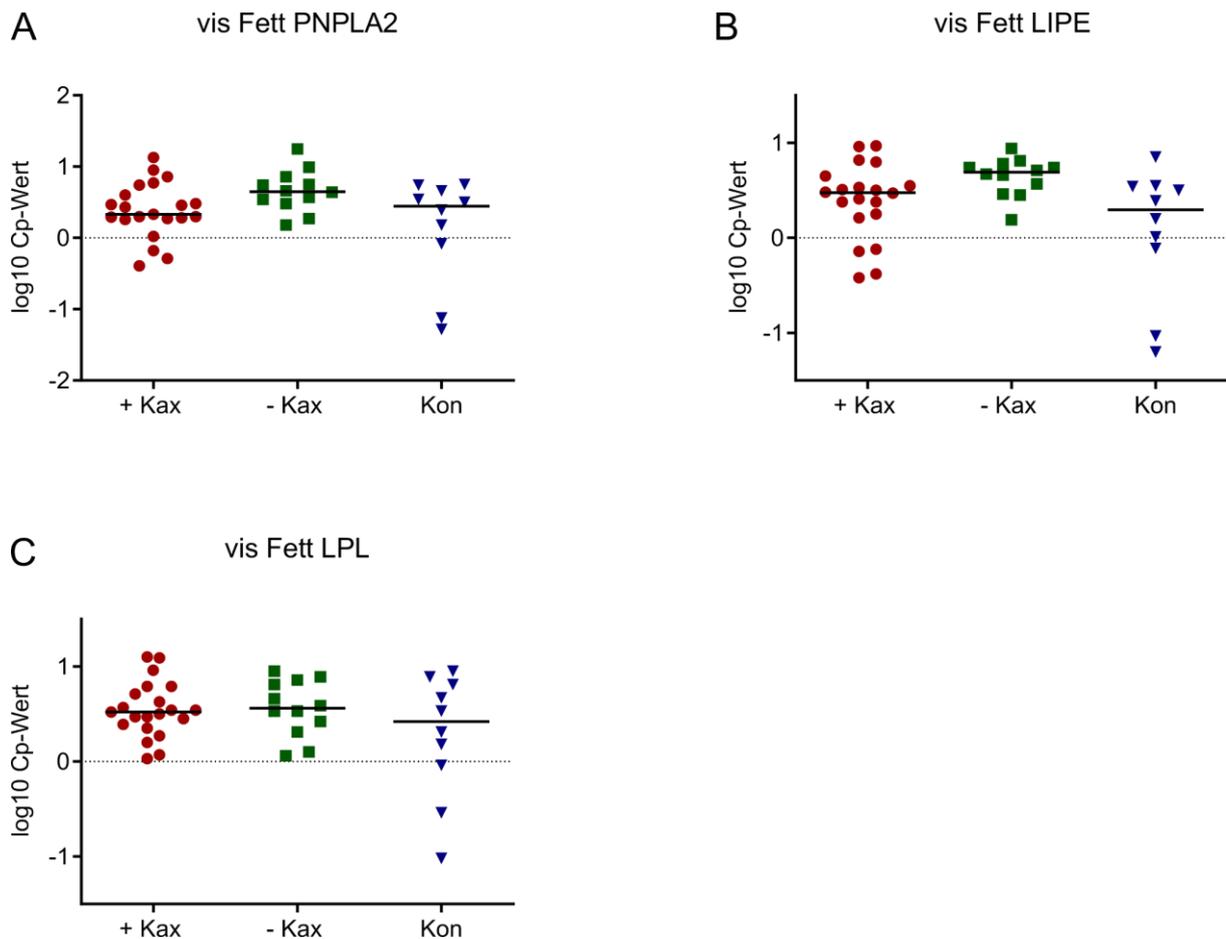
Im Vergleich der mit siRNA-375 transfizierten PACs zu den Kontroll-Zellen ohne siRNA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen der im Triglycerid-Lipase-Stoffwechselweg angesiedelten Gene. Dagegen zeigten sich bei den mit anti-miR-424-5p transfizierten Zellen signifikante Zunahmen in der Expression dieser Enzyme (PNPLA2:  $p = 0,0022$ , LIPE:  $p = 0,0095$  und LPL:  $p = 0,0095$ ) (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Expressionsniveau der Lipolyse-assoziierten Gene in siRNA-375 und siRNA-424-5p transfizierten humanen Präadipozyten**

Für den *Knock-down* von miR-375 (grün) und miR-424-5p (rot) wurden die humanen, viszeralen PACs am Tag d-3 mit der entsprechenden siRNA transfiziert. Die Expressionen der Target-Gene (A) *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2), (B) Lipase E (LIPE) und (C) Lipoproteinlipase (LPL) wurden mit den transfizierten Zellen ohne siRNA verglichen (NK, grau) (N = 3). Dargestellt wurden die MW ± SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-hoc-Test mit \*\* p ≤ 0,01.

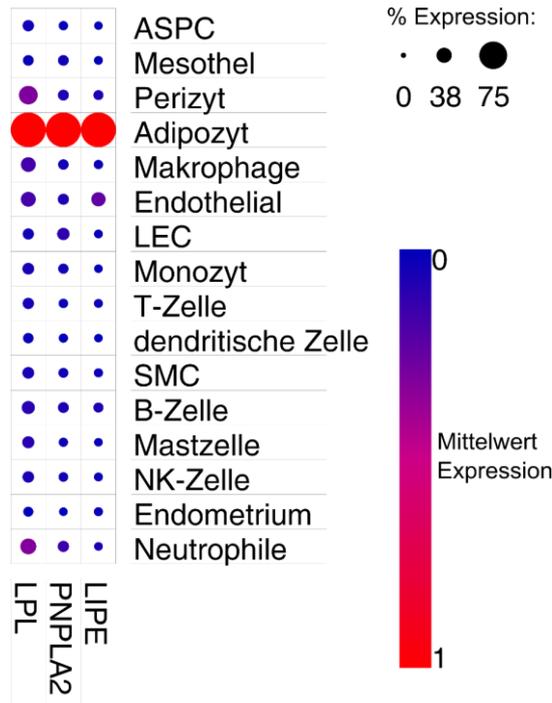
Die Expression-Analysen der drei Lipase-Gene LIPE, PNPLA2 und LPL im viszeralen Fettgewebe der eingeschlossenen Patienten mit Kachexie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie sowie der Kontrollgruppe (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Expressionsanalyse der Lipolyse-assoziierten Gene in viszeralen Fettgewebsproben der Kachexiekohorte**

Mittels RT-qPCR analysierte Expressionen der Lipolyse-Gene (A) *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2) (+ Kax: N = 21; - Kax: N = 12; Kon: N = 10), (B) Lipase E (LIPE) (+ Kax: N = 20; - Kax: N = 12; Kon: N = 10) und (C) Lipoproteinlipase (LPL) (+ Kax: N = 21; - Kax: N = 12; Kon: N = 10) in viszeralen Fettgewebsproben von Krebspatienten mit (+ Kax; rot) und ohne (- Kax; grün) Kachexie sowie einer Kontrollgruppe ohne Krebs (Kon; blau). Dargestellt wurden die  $MW \pm SEM$ .

Um Aufschluss über die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen den Expressionsanalysen im viszeralen Fettgewebe von Patienten der Kachexiekohorte und den ermittelten Daten im *Knock-down*-Experiment mit humanen, viszeralen PACs zu erhalten, wurden *Single-cell/nucleus* RNA-Sequenzierungsdaten über eine *Online*-Plattform abgerufen (Studien-Nr. SCP137). Mit diesem publizierten, frei zugänglichen Datensatz konnte gezeigt werden, dass die Lipolyse-assoziierten Gene PNPLA2, LIPE und LPL hauptsächlich in Adipozyten exprimiert werden (Abbildung 32). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei nur ca. 30 % der Zellen im Fettgewebe um Adipozyten handelt. Bei der Analyse der mRNA-Expression in humanem Fettgewebe wird demnach größtenteils auch das Expressionsprofil von stromal-vaskulären Zellen analysiert (siehe auch 1.4).



**Abbildung 32: Single cell-Daten der Lipolyse-assoziierten Gene PNPLA2, LIPE und LPL in unterschiedlichen Zelltypen**

Die Expression der im Triglycerid-Lipase-Stoffwechselweg vorkommenden Lipasen *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2), Lipase E (LIPE) und Lipoproteinlipase (LPL) wurde überwiegend in humanen Adipozyten nachgewiesen (nach Single Cell Portal (broadinstitute.org)).

Die Expressionsanalysen der ausgewählten miRNAs in Gewebeproben des subkutanen Fettgewebes ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Im viszeralen Fettgewebe konnte dagegen eine um das 3-fache niedrigere Expression der miR-375 bei Tumorpatienten mit Kachexie im Vergleich zu Patienten ohne Kachexie ermittelt werden. Auch die Expression der miR-424-5p zeigte eine signifikant geringere Expression in der Kohorte. Tumorpatienten ohne Kachexie exprimierten 7-fach höhere Mengen der miRNA im Unterschied zu Tumorpatienten mit Kachexie. Als gemeinsames Target der beiden miRNAs wurden die Lipolyse-assoziierten Gene PNPLA2, LIPE und LPL ermittelt, deren Expression durch den *Knock-down* der miR-424-5p in viszeralen PACs induziert wird.

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse nochmals kurz zusammengefasst.

## 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung der Plasmaproben der Tumorpatienten mit Kachexie zeigte niedrigere Konzentrationen der Analyten Resistin und Visfatin. Beide Analyten korrelierten negativ mit Gewichtsverlust und konnten Patienten mit und ohne Kachexie moderat unterscheiden.

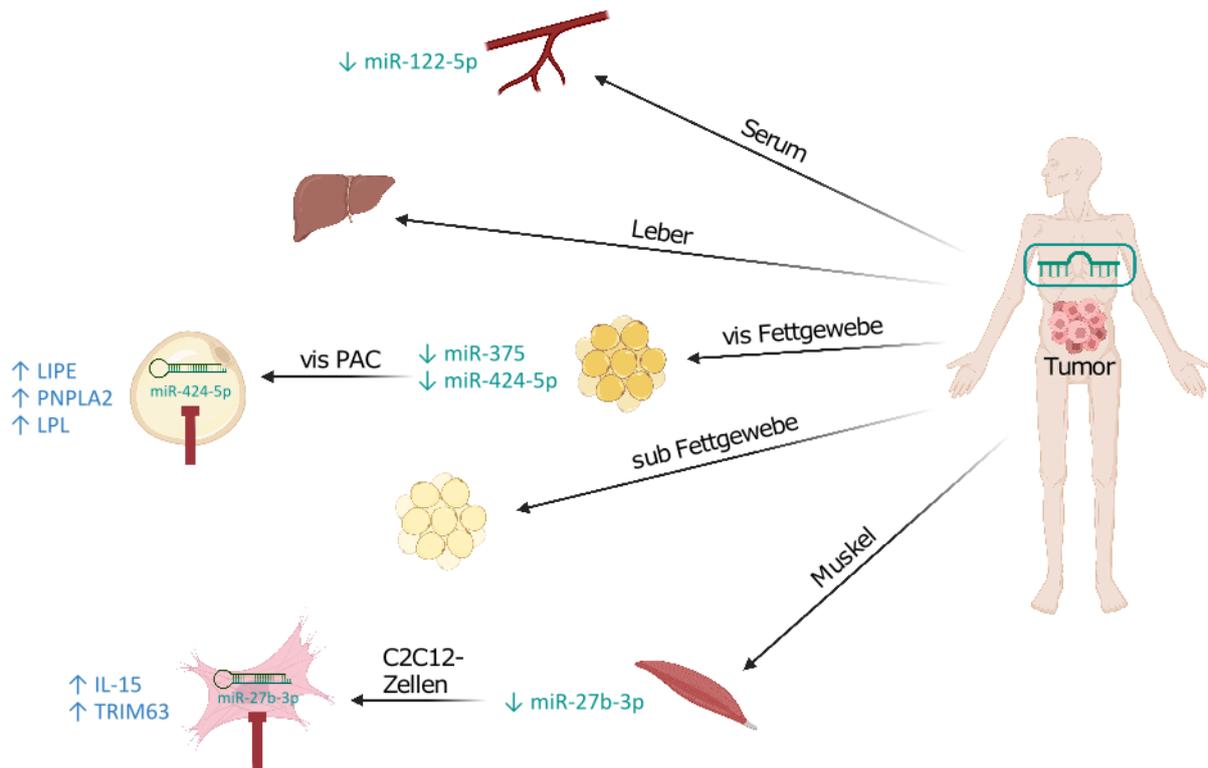
Die Messung des Expressionsniveaus der miR-122-5p im Serum korrelierte negativ mit dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der sechs Monate vor der Operation der Patienten.

Auch die miR-27b-3p lag in den Muskelproben der Patienten mit erhöhtem prozentualen Gewichtsverlust auf deutlich niedrigerem Expressionsniveau als bei Patienten ohne Kachexie. Experimente mit der Muskelzelllinie C2C12 bestätigten die zwei bioinformatisch ermittelten Target-Gene der miR-27b-3p, nämlich IL-15 und TRIM63. Die Expression beider Gene war im Muskel der Tumorpatienten mit Kachexie signifikant erhöht.

Unterschiede in der Größe der PACs zwischen den Tumorpatienten mit und ohne Kachexie ergaben sich weder im subkutanen noch viszeralen Fettgewebe. Letzteres zeigte jedoch signifikante Abweichungen im Expressionsniveau der beiden miRNAs miR-375 und miR-424-5p zwischen der Kachexie- und Kachexie-freien-Patientengruppe. Eine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb der letzten sechs Monate vor der Operation der Patienten und der Expression konnte auch bei diesen beiden miRNAs ermittelt werden. Ein Zusammenhang zwischen der Expression der miR-424-5p und mit den Lipolyse-assoziierten miRNA-Target-Genen LIPE, PNPLA2 und LPL bestätigte sich in Zellkulturexperimenten mit humanen, viszeralen PACs.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Expression von miRNAs im Serum, Muskel- und viszeralem Fettgewebe von Tumorpatienten mit Kachexie im Vergleich zu Tumorpatienten ohne Kachexie niedriger war. Dabei konnten die miRNAs miR-27-3p, miR-122-5p, miR-375 und miR-424-5p als mögliche Biomarker identifiziert werden, da deren Target-Gene in Kachexie-assoziierten Stoffwechselwegen vorkommen.

Die Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalysen im Serum und den Gewebeproben von Tumorpatienten mit Kachexie sind in nachfolgender Abbildung 33 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 33: Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalysen bei Tumorkachexie**

Zur Untersuchung molekularer Veränderungen bei Tumorkachexie wurden neben Serum auch Gewebestücke der Leber, des Muskels und dem subkutanen und viszeralen Fett entnommen. Im Serum von kachektischen Patienten war miR-122-5p supprimiert im Vergleich zu Tumorkachexie-Patienten ohne Kachexie. Geringere Expressionen der miRNAs miR-375 und miR-424-5p im viszeralen Fettgewebe ließen auf eine Beteiligung an kachektischen Stoffwechselstörungen schließen. In viszeralen Präadipozyten inhibierte nur miR-424-5p die Lipase-Gene Lipase E (LIPE), *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2) und Lipoproteinlipase (LPL) signifikant. Das Muskelgewebe von Tumorkachexie-Patienten zeigte ein niedrigeres Expressionsniveau der miR-27b-3p. Die beiden Atrophie-assoziierten Target-Gene Interleukin-15 (IL-15) und Tripartite Motif Containing 63 (TRIM63) waren sowohl im Zellversuch als auch im Gewebe signifikant höher reguliert. In den Proben der Leber und des subkutanen Fettgewebes wurden keine Expressionsunterschiede der ausgewählten miRNAs detektiert.

## 5. Diskussion

Kachexie als Begleiterkrankung bei Tumorpatienten ist ein multifaktorielles Syndrom, bei dem es zu einer Vielzahl an molekularen Veränderungen im Fettgewebe, dem Skelettmuskel, der Leber und dem Immunsystem kommt (Nishikawa et al. 2021; Feng et al. 2021). Geringere Erfolge mittels Chemotherapie, ein erhöhtes Risiko bei operativen Eingriffen, ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten und letztlich eine geringere Überlebenschance sind diesem hyper-katabolischen Zustand geschuldet (Martin und Freyssenet 2021). Trotz intensiver Forschung und der Etablierung neuer Kachexie-Maus-Modelle sind viele zugrundeliegende pathophysiologische Dysfunktionen dieser Erkrankung noch nicht aufgeklärt (Luan et al. 2022). Neben der Entwicklung effektiver Behandlungsmöglichkeiten ist darüber hinaus die Erforschung geeigneter Biomarker für dieses Syndrom entscheidend, um durch frühzeitiges Erkennen und Handeln die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern (Cortez und Mackenzie 2021).

### 5.1 Etablierung eines Biomarkers durch Blutanalysen

Als Biomarker, der zur Unterscheidung zwischen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie herangezogen werden kann, eignen sich besonders Markermoleküle, die mittels minimalinvasiver Methoden bestimmt und leicht in die klinische Routinearbeit integriert werden können (Hanash et al. 2008).

In den Jahren 2014 und 2016 postulierte die Gruppe um Kir *et al.*, dass PTHrP nicht nur am *Browning* von Fettgewebe beteiligt ist, sondern auch bei Kachexie eine Rolle spielt. Messungen dieser Gruppe stellten erhöhte Konzentrationen des Polypeptids bei Patienten mit Tumorkachexie fest (Kir et al. 2014; Kir und Spiegelman 2016; Kir et al. 2016). Auch die kürzlich erschienene Publikation von Weber *et al.* wies auf eine PTHrP-Beteiligung am *Crosstalk* zwischen Fett- und Muskelgewebsabbau bei Patienten mit Lungenkarzinom und kachektischen Mäusen hin (Weber et al. 2022). Die in dieser Arbeit mittels ELISA gemessenen PTHrP-Konzentrationen zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Krebspatienten mit und ohne Kachexie auf. Ebenso hat die Gruppe von Anderson *et al.* PTHrP als keinen geeigneten Marker für Tumorkachexie deklariert, da Messungen im Plasma keine Konzentrationsdifferenzen des zirkulierenden PTHrP zwischen den Patientengruppen ergaben (Anderson et al. 2022). Ein möglicher Aspekt für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte die kurze Halbwertszeit von PTHrP im Blut sein (Kir et al. 2014). Da diese weniger als zwei Stunden beträgt, ist eine klinische Anwendung von PTHrP als Kachexiemarker eher kritisch zu sehen.

Bei anderen hier untersuchten Biomarkern ist die Datenlage ebenfalls widersprüchlich. Beispielsweise hatten Kerem *et al.* Assoziationen zwischen Tumorkachexie und im Serum

gemessene Konzentrationen von Ghrelin und Leptin festgestellt (Kerem et al. 2008). Entgegen dieser Ergebnisse zeigte die Studie von Wallace *et al.* nicht einmal Unterschiede in der Leptin-Konzentration zwischen gesunden und an gastrointestinalen Krebs erkrankten Personen (Wallace et al. 2002). Ebenso ergaben auch die von Demiray *et al.* durchgeführten Analysen keine Unterschiede der Leptin-Spiegel zwischen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie (Demiray et al. 2017). Auch die hier vorliegenden Messungen zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für Leptin zwischen den beiden Patientengruppen.

Des Weiteren wurden noch die Konzentrationen der Proteine PAI-1, C-Peptid, GLP-1, Insulin, Visfatin und Resistin bei Patienten mit und ohne Kachexie bestimmt.

Trotz des postulierten pathologischen Einflusses von PAI-1 im Skelettmuskel (Rahman und Krause 2020) hat die Analyse unserer Kohorte keinen Unterschied der PAI-1-Konzentrationen zwischen den Patientengruppen ergeben. Nach derzeitigem Wissensstand ist das C-Peptid nicht an Tumorkachexie beteiligt und auch der Einfluss von GLP-1 ist in diesem Zusammenhang noch unzureichend untersucht (Rohm et al. 2019). Anhand der hier vorliegenden Messungen kann dies in der ausgewählten Patientenkohorte gleichermaßen nicht weiter verifiziert werden.

Im Gegensatz dazu ist der Zusammenhang zwischen der Störung der Glukosehomöostase und Kachexie bereits bekannt: die chronische Inflammation, welche bei Patienten mit Kachexie vorliegt, ist einer der Prozesse, der zur Insulin-Resistenz führen kann. Daraus resultiert die Beeinträchtigung des Proteinanabolismus sowie ein erhöhter Abbau von Proteinen (Wyart et al. 2020; Cao et al. 2021). Daneben kommt es durch den enormen Energieverbrauch im Körper zur Umwandlung von Laktat in Glukose. Dieser stark energiezehrende Prozess wird als Cori-Zyklus bezeichnet. Als Kompensation dieser erhöhten Glukoneogenese wird im Skelettmuskel und Fettgewebe weniger Insulin synthetisiert und es kommt zur Insulin-Resistenz (Maccio et al. 2021; Visavadiya et al. 2021). Signifikant niedrigere Insulinwerte zeigten auch die hier gemessenen Plasmaproben der Patienten mit Tumorkachexie. Anzuführen ist allerdings, dass die Mehrzahl der Krebspatienten unter einer gestörten Glukose-Toleranz und verminderter Insulin-Sensitivität leiden (Siddiqui et al. 2020). Dies ist möglicherweise ein Aspekt, warum sich keine Korrelation zwischen dem prozentualen Gewichtsverlust innerhalb von sechs Monaten und der gemessenen Insulinkonzentration ergab.

Visfatin, welches durch die Analyse der Plasmaproben mittels Multiplex-ELISA quantifiziert wurde, kommt im menschlichen Körper hauptsächlich im viszeralen Fettgewebe vor (Park et al. 2011). Bei adipösen Patienten (BMI:  $46 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ ) liegen in Folge dessen erhöhte Serumkonzentrationen des Adipokins vor (Ezeoke und Morley 2015). Im Gegensatz dazu wurden bei den hier untersuchten Patienten mit Tumor-Kachexie (BMI:  $24,55 \pm 4 \text{ kg/m}^2$ ) im Vergleich zu Patienten ohne Kachexie deutlich niedrige Visfatin-Konzentrationen gemessen. Eine Korrelation zwischen Visfatin und BMI lag in unsere Kohorte jedoch nicht vor (Daten nicht

dargestellt). Da für das Syndrom Kachexie der Verlust von Fettgewebe charakteristisch ist, liegt infolge des lipolytischen Prozesses im Fettgewebe bei diesen Patienten eine erhöhte Konzentration von freien FS im Blut vor (Han et al. 2018). Durch diese sinkt die Sensitivität für Insulin und die mRNA-Konzentration von Visfatin wird vermindert (Wen et al. 2006). Auch die von Silvério *et al.* durchgeführten ELISA-Messungen im Plasma zeigten bei fortgeschrittener Tumorkachexie verminderte Konzentrationen von Visfatin im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Silvério et al. 2017). Dagegen beschrieben Park *et al.*, dass Visfatin durch seine Funktionen als Zytokin und Adipokin Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat. Eine Verabreichung von Visfatin bei Ratten führte zu geringerer Nahrungsaufnahme und letztlich zum Gewichtsverlust, worunter kachektische Tumorpatienten ebenfalls leiden (Park et al. 2011). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die detektierten Visfatin-Konzentrationen im Plasma, je nach Tumorerkrankung und verwendeter Messmethode, einem breiten Variationsbereich (zwischen 0,005 ng/ml und 282 ng/ml) unterliegen (Adeghate 2008; Mohammadi et al. 2019). Eine weiterführende Untersuchung in einer größeren Kohorte von Patienten mit und ohne Tumorkachexie könnte Aufschluss über den Zusammenhang von Visfatin mit Kachexie geben. Die Untersuchungen zur pathologischen Beteiligung von Resistin im menschlichen Körper haben ergeben, dass das Protein an der Regulation der systemischen Immunantwort sowie an der Stimulation der Tumorgenese beteiligt ist (Danese et al. 2012; Diakowska et al. 2014). Die Auswertung der hier getätigten Messungen zeigte, dass die Werte der Tumorpatienten mit Kachexie signifikant niedriger lagen als bei den Patienten ohne Kachexie. Auch bei den Analysen von Hung *et al.* wiesen am Ösophaguskarzinom Erkrankte mit niedrigem BMI geringere Resistin-Konzentrationen im Vergleich zu Krebspatienten mit höherem BMI ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) auf (Hung et al. 2021). Da Resistin von Adipozyten sekretiert wird (Diakowska et al. 2014), es bei Tumorkachexie jedoch zum Verlust von Fettgewebe kommt, könnte dies die geringeren Konzentrationen im Plasma der Tumorpatienten mit Kachexie erklären. Die Eignung von Resistin als Biomarker ließ nur eine moderate Unterscheidung von Patienten mit und ohne Tumorkachexie zu. Dies wurde auch von Diakowska *et al.* bestätigt, deren Serumanalysen von gastrointestinalen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie keine absolute Unterscheidung der Patientengruppen zuließ (Diakowska et al. 2014). Auch hier sind weitere Analysen von Resistin in größeren Kachexie-Kohorten nötig.

Zusammenfassend lässt sich durch unsere Analysen feststellen, dass sich die drei Marker nicht als diagnostische Kriterien eignen. Auch wenn Visfatin, Resistin und Insulin an der Entwicklung von Tumorkachexie beteiligt sind, können sie ohne weitere Messungen nicht als diagnostische Marker eingesetzt werden.

Allgemein ist beim Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien zu beachten, dass meist Diskrepanzen in der Stichprobengröße, den eingesetzten ELISA-Kits, dem Probenmaterial und der verwendeten statistischen Methode, vorliegen. Zudem fehlen meist Informationen zum

Lebensstil sowie den ökologischen und genetischen Faktoren der Patienten. Ein weiterer kritischer Aspekt ist, dass es sich bei ELISA-Messungen ausschließlich um eine quantitative Bestimmung handelt, dies jedoch keine Schlussfolgerung über die Aktivität des Proteins zulässt (Farahani et al. 2020). Daneben ist die Therapieform der Patienten (z. B. Chemotherapie) eine entscheidende Variable, die bei der Suche nach einem geeigneten Biomarker berücksichtigt werden muss. In Folge dessen wäre es sinnvoll, in eine solche Studie nur Therapie-naive Patienten einzuschließen (Talbert et al. 2018).

Bei Patienten mit Tumorkachexie kommt es zu pathologischen Veränderungen im Fettgewebe. Diese umfassen Größenveränderungen der Adipozyten sowie Akkumulation von Kollagen und fibrotischen Strukturen (Bing und Trayhurn 2008; Batista Jr. et al. 2016; Alves et al. 2017). Um diese Ergebnisse zu eruieren, sind PACs und mature Adipozyten beider Patientengruppen verglichen worden, um so mögliche Unterschiede zu erfassen.

## **5.2 Die Fettgewebe von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie weisen keine histologischen Unterschiede auf**

Die H/E-gefärbten Schnitte von sub und vis Fettgewebe dienen der automatisierten Durchmesserbestimmung der matura Adipozyten. Dies sollte über deren Zusammenhang mit dem Phänotyp der Patienten Aufschluss geben, da der Durchmesser matura Adipozyten mit deren Funktion und dem Fettgewebismetabolismus assoziiert ist (Verboven et al. 2018). Desweiteren lässt sich an Hand der Adipozytengröße auf die Kapazität der Lipidspeicherung schließen, was vor allem in der Pathophysiologie relevant ist (van Harmelen et al. 2003; Spalding et al. 2008; Verboven et al. 2018). Ein weiterer Aspekt ist die Korrelation zwischen Fettzellgröße und basaler Lipolyse sowie BMI (Arner und Langin 2014; Honecker et al. 2021). Eine Reihe von Studien in Mäusen wie auch beim Menschen legte die Akkumulation von Kollagen, vermehrte Fibrose und eine verminderte Adipozytengröße im Fettgewebe bei Tumorkachexie nahe (Bing et al. 2006; Rydén et al. 2008; Bing und Trayhurn 2009; Batista Jr. et al. 2016; Alves et al. 2017). Der enorme Verlust der Zellgröße ließ sich dabei auf eine gestörte Regulation kataboler und anaboler Stoffwechselprozesse sowie auf die funktionelle Veränderung adipogener und lipolytischer Faktoren zurückführen. Liegt beispielsweise eine Inhibierung der Kinasen Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder mTOR vor, resultiert dies in einer verminderten Zellgröße (Bing et al. 2006; Saini et al. 2006). In der Auswertung der vorliegenden histologischen Experimente konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fettzellgröße oder der Fettgewebsstruktur zwischen Patienten mit und ohne Tumorkachexie ermittelt werden. Dies galt sowohl für die matura wie auch für die Prä-Adipozyten. Tendenziell war der Mittelwert der Adipozytengröße der Patienten mit Kachexie geringer als der der Patienten mit stabilem Gewicht. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht

signifikant. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch die zu geringe Gruppengröße (sub: N = 33, vis: N = 35) begründen. So hat sich bei Honecker *et al.* eine positive Korrelation zwischen Zellgröße und BMI bei einer Kohorte, die 188 Individuen umfasst, ergeben. Zudem stellte die Gruppe fest, dass die Zellgrößenverteilung von den zur Auswertung gesetzten Parametern sowie von der verwendeten Methode zur Größenbestimmung abhängig ist (Honecker *et al.* 2021). Für eine aussagekräftige Unterscheidung der Patientengruppen müssen infolgedessen mehr Individuen für die Messungen eingeschlossen werden.

Um neben der Erfassung der Fettzellgröße weitere molekularbiologische Erkenntnisse zwischen den Patientengruppen zu erlangen, wurde in dieser Studie erstmalig die miRNA-Signatur in fünf Kachexie-assoziierten Geweben (Serum, Leber, Skelettmuskel, vis und sub Fettgewebe) von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie, sowie von Patienten ohne eine Krebserkrankung untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

### **5.3 Expressionsniveau von miR-122-5p im Serum ist assoziiert mit Tumorkachexie**

Da Blutproben wiederholt und nicht-invasiv entnommen werden können, gelten im Serum zirkulierende miRNAs, die zudem eine hohe Stabilität aufweisen, als geeignete diagnostische Biomarker (Oura *et al.* 2020).

Bei Tumorpatienten mit Kachexie war das Expressionsniveau der miR-122-5p im Serum signifikant geringer als bei Tumorpatienten ohne Kachexie. Zudem korrelierte die Expression mit dem prozentualen Gewichtsverlust sechs Monate vor der Operation. Das gleiche Bild zeigte sich auch im Muskelgewebe. Hier ergab sich ebenfalls eine niedrigere Expression in den Proben der Patienten mit Kachexie. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der bisherigen Literatur. Bei Untersuchungen von Chen *et al.* wiesen Magenkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ebenfalls geringere miR-122-Expressionswerte im Plasma auf. Zudem ließen sich anhand des miR-122-Plasmaniveaus Patienten mit metastasiertem Magenkrebs von gesunden Kontrollprobanden unterscheiden (Chen *et al.* 2014). Daneben wurden in Krebszellen von Patienten mit PDAC geringere Expressionsniveaus der miR-122 gemessen, und die miRNA korrelierte negativ mit der Tumorgöße. Bei diesen Analysen wurde gezeigt, dass eine Überexpression der miR-122-5p zu einer geringeren Proliferation, Migration und Invasion humaner Krebszelllinien *in vitro* führt (Dai *et al.* 2020). Des Weiteren berichteten Sun *et al.* von niedrigen Expressionswerten der miR-122-5p im fibrotischen Skelettmuskel (Sun *et al.* 2018). Da auch bei Tumorpatienten mit Kachexie eine systemische Entzündung im Körper vorliegt, deckt sich dies mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Ein weiterer Zusammenhang mit Kachexie kann sich über die regulatorische Funktion der miRNA im Fettgewebe ergeben, da sich die im Plasma

zirkulierende miR-122 inhibitorisch auf PPAR- $\alpha$  auswirkt. Durch die Bindung der miRNA an die *Three prime untranslated region* (3'URT) des Rezeptors wird dessen Expression inhibiert und infolgedessen die Degeneration von Lipiden im Fettgewebe unterbunden (Wang et al. 2020b). Die gemessene niedrige miR-122-5p-Expression bei Tumorpatienten mit Kachexie lässt auf einen erhöhten Abbau von Lipiden schließen, da die Folge ist, dass PPAR- $\alpha$  einer geringeren Suppression durch die miR-122-5p unterliegt. Dies zeigte sich in einer erhöhten Konzentration von Triacylglycerol im Plasma von Tumorpatienten mit Kachexie (Das und Hoefler 2013). Da unsere Untersuchungen mit der Vergleichskohorte gezeigt haben, dass die niedrige Expression der miR-122-5p nicht auf Gewichtsverlust per se zurückzuführen war, kann miR-122-5p als geeigneter Biomarker in Betracht gezogen werden. Um dessen Anwendung eindeutig zu bestätigen, sollten die gewonnen Erkenntnisse in einer größeren Studie wiederholt werden.

Um auch einen Einblick in die innerorganischen Änderungen im miRNA-Profil zu bekommen, wurden neben dem Serum auch die mit Kachexie assoziierten Organen untersucht.

## **5.4 Organ-spezifische miRNAs bei humaner Tumorkachexie**

miRNAs wurden hinsichtlich ihrer potentiellen Anwendung für diagnostische Zwecke bereits umfassend untersucht (Lee et al. 1993). Beispielsweise konnten bei Krankheiten wie Krebs (Rupaimoole und Slack 2017), Typ-2-Diabetes (Mononen et al. 2019) oder Adipositas (Zaiou et al. 2018) spezifische miRNA-Profile in den Proben der Patienten nachgewiesen werden. Um auch bei Tumorkachexie einen möglichen Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und veränderten miRNA-Profilen aufzudecken, wurden miRNA-Arrays mit Serumproben von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie analysiert. Darüber hinaus wurde die Expression von miRNA-Kandidaten in den genannten Geweben analysiert und abschließend eine Expressionsanalyse möglicher regulatorischer Target-Gene in Zellkulturversuchen durchgeführt.

### **5.4.1 Patienten mit Tumorkachexie weisen kein verändertes miRNA-Profil in der Leber auf**

Obwohl einige miRNAs wie z.B. miR-27a (Salehi et al. 2013), miR-193 (Mohr et al. 2021) oder miR-221 (Markovic et al. 2020) mit Lebererkrankungen (z.B. akute Lebertoxizität oder Leberzellkarzinom) in Zusammenhang stehen und zirkulierende miRNAs den pathologischen Zustand in der Leber widerspiegeln (Schueller et al. 2018), konnten in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Expression der ausgewählten miRNAs zwischen Tumorpatienten mit und ohne Kachexie ermittelt werden. Ein Grund hierfür könnte die Heterogenität der Kohorte sein, da das miRNA-Profil der Leber, abhängig von Alter und Geschlecht, stark variiert (Kwekel et al. 2017). Zudem wurde nur eine bestimmte Anzahl an miRNAs, ausgehend von

dem Serum-Screening, validiert. Um eine größere Bandbreite an miRNAs systematisch zu analysieren, bietet sich *small* RNA-Sequenzierung mit entsprechenden *small* RNA-Bibliotheken an (Wu et al. 2018). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse sollten weitere Studien und Versuche geplant werden, um den Zusammenhang von miRNAs in der Leber und Tumorkachexie zu untersuchen.

Da es bei Patienten mit Tumorkachexie zu starken Veränderungen im Skelettmuskel kommt, wurden auch hier miRNA-Expressionsprofile erfasst.

#### **5.4.2 miR-27b-5p und die Target-Gene IL-15 und TRIM63 im Muskel sind assoziiert mit Tumorkachexie**

Die Messungen im Muskelgewebe ergaben, dass miR-27b-3p in Patienten mit Tumorkachexie signifikant niedriger exprimiert wurde als in Tumorpatienten ohne Kachexie. Niedrigere Spiegel dieser miRNA konnten auch in den Analysen von Chen *et al.* bei Patienten mit Darmkrebs gemessen werden, und die Studie legte offen, dass miR-27b-3p neben der Zellproliferation und Migration, auch die Invasion ins Darmgewebe supprimiert (Chen et al. 2017b). Daneben ist bekannt, dass miR-27b das myogene *paired box gen three* (*Pax3*) reguliert, wodurch es zu einer Hemmung der Differenzierung von Muskelzellen kommt (Crist et al. 2009). Die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse zeigte, dass die niedrigeren Expressionslevel mit dem Abbau von Muskelmasse bei Patienten mit Tumorkachexie assoziiert sind. Diese These wird durch die hohen TRIM63-Expressionen im Muskelgewebe der Kachektiker untermauert. TRIM63 ist ein Mitglied der sogenannten „Atrophie-bezogenen Gene“ (Atrogene) und wird im menschlichen Muskel unter normalen Bedingungen nur in geringem Maße exprimiert. Dagegen liegt es bei katabolen Stoffwechselveränderungen im Muskel in erhöhter Menge vor. Die Sequenzierungsdaten von RNA aus Muskelgewebe kachektischer Mausmodelle lassen ebenfalls erhöhte Expressionswerte von TRIM63 erkennen und deuten auf einen hochregulierten proteasomalen Abbau im Muskelgewebe hin (Fernandez et al. 2020). Neben TRIM63 haben auch die IL-15-Messungen erhöhte Expressionsniveau im Muskel von Tumorpatienten mit Kachexie aufgezeigt. Auch in den Untersuchungen von Pistilli *et al.*, bei denen Ratten systemisch IL-15 verabreicht wurde, zeigte sich eine erhöhte Apoptose der Muskelzellen (Pistilli und Alway 2008). Als Zytokin beeinflusst IL-15 das Immunsystem: es stimuliert die Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen (Argilés et al. 2009). Dies kann wiederum die bei Patienten mit Tumorkachexie vorliegende systemische Inflammation verstärken und letztlich zum Abbau des Muskelgewebes führen. Gestützt auf Tierversuche stellt Argilés *et al.* die Hypothese auf, dass IL-15 am Prozess der Fettablagerung im Fettgewebe beteiligt ist. Dabei wird IL-15 aus der Skelettmuskulatur freigesetzt, um die Fettsynthese und -einlagerung im Körper zu regulieren (Argilés et al. 2005). Da es unter Tumorkachexie sowohl zu Veränderungen im skelettalen Muskel als auch im Fettgewebe

kommt, bestätigt dies die Assoziation zwischen IL-15 und dem Kachexie-Syndrom. Im Gegensatz dazu lassen andere Studien darauf schließen, dass IL-15 auch im anabolen Stoffwechsel eine Rolle spielt. Die Daten der Gruppe von Quinn *et al.* zeigten, dass IL-15 nicht nur an der Muskelhypertrophie, sondern auch an der Hemmung des Proteinabbaus beteiligt ist (Quinn *et al.* 2009). Durch die hier ergänzend durchgeführten Zellkulturversuche konnte aber gezeigt werden, dass IL-15 und TRIM63 Targetgene der miR-27b-3p sind und deren niedrigere miRNA-Menge bei Patienten mit Tumorkachexie den Muskelabbau begünstigt. Anzumerken ist, dass die Zellkulturexperimente in einer murinen Zelllinie etabliert wurden. Ergebnisse aus Mausmodellen und -zelllinien können allerdings nicht vollständig auf den menschlichen Organismus übertragen werden (Tomasin *et al.* 2019; Talbert *et al.* 2019). Weiterführende Experimente in humanen primären Muskelzellen sind daher nötig.

Einen Einfluss von miR-27b-3p auf die für die Muskelhomöostase wichtigen Gene MSTN und MYOG konnte nicht festgestellt werden. Die Studienlage zur Beteiligung dieser beiden Gene an Kachexie oder Sarkopenie ist umstritten. Das Expressionsniveau von MSTN und MYOG lag in einigen Studien bei Patienten mit Kachexie signifikant über dem Wert der Kontrollpatienten (Plant *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013a; Kneppers *et al.* 2017). Dagegen lag die Genexpression in den Analysen von Bonetto *et al.* und weiteren Gruppen bei den Patienten mit Kachexie signifikant unter dem Wert der Kontrollen (Ramamoorthy *et al.* 2009; Bonetto *et al.* 2013; Puig-Vilanova *et al.* 2015). Desweiteren wurde in einigen Studien kein signifikanter Unterschied in der Expression detektiert (Vogiatzis *et al.* 2010; Murton *et al.* 2017).

miR-27b-3p scheint einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumorkachexie zu haben. Die hier erfassten Ergebnisse sollten in zukünftigen Arbeiten weiter validiert werden, um miR-27b-3p als mögliches Targetgen für eine pharmakologische Intervention zu etablieren.

Neben dem Verlust der Muskelmasse kommt es bei den Patienten mit Tumorkachexie auch im Fettgewebe zu Abbauprozessen und gesteigerter Lipolyse (Xu *et al.* 2022). Um zu untersuchen, ob die ausgewählten miRNAs an diesen pathologischen Prozessen beteiligt sind, wurden hier ebenfalls Expressionsprofile erstellt und mit Versuchen von humanen PACs ergänzt.

#### **5.4.3 miR-375 und miR-424-5p beeinflussen Tumorkachexie im viszeralem Fettgewebe**

Im sub Fettgewebe haben die Expressionsanalysen der ausgewählten miRNAs keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen (Tumorpatienten mit und ohne Kachexie, Kontrollgruppe ohne Krebs) aufgezeigt. Dagegen ließen sich im vis Fettgewebe signifikant niedrigere Expressionsniveaus der miR-375 und miR-424-5p bei Patienten mit Tumorkachexie detektieren. Es ist bekannt, dass im vis Fettgewebe nicht nur eine höhere

Sekretionsrate von Signalmolekülen vorliegt, sondern auch der Fettsäureumsatz und die Lipolyse-Aktivität stärker sind als im sub Fettgewebe (Engfeldt und Arner 1988; Hocking et al. 2010). Auch eine frühere Analyse unseres Lehrstuhls zu miRNAs und Thermogenese hat signifikant höhere Expressionswerte der miR-375 im vis Fettgewebe im Vergleich zum sub Fettgewebe festgestellt (Seeliger et al. 2022). Die kälteinduzierte Thermogenese bei gesunden Individuen führte auch hierbei zu einer Erniedrigung des Expressionslevels. Zudem wurde gezeigt, dass bei einem *Knock-down* der miR-375 wichtige Thermogenesegene (z.B. PPARGC1A und *PR domain containing 16* (PRDM16)) vermehrt exprimiert werden. Der genaue Zusammenhang zwischen Thermogenese und Kachexie ist in humanen Studien umstritten und noch nicht gänzlich geklärt (Dong et al. 2018).

Die vorliegenden Daten deuten auf einen regulierenden Einfluss von miR-375 auf die Tumorkachexie hin. Diese miRNA liegt auch in den für Kachexie typischen Krebsarten Kolorektalkrebs und duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse in niedrigeren Expressionsniveaus vor (Pietrus et al. 2021). Auch Shrestha *et al.* haben gezeigt, dass aus einer Reihe von Studien hervorgeht, dass das Expressionslevel von miR-375 in Proben von Patienten mit Magenkarzinom sehr niedrig ist (Shrestha et al. 2014).

Die niedrigeren Expressionswerte der miR-424-5p bei Patienten mit Tumorkachexie führten in den Versuchen mit humanen vis PACs zu einer erhöhten Expression der Gene des TG-Lipase-Signalwegs (LIPE, LPL und PNPLA2). Diese erhöhte Expression konnten im vis Fettgewebe der Patientengruppen nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf die zelluläre Heterogenität des vis Fettgewebes zurückführen (Emont et al. 2022). Reife Adipozyten machen zwar über 90 % des Fettgewebsvolumen aus, entsprechen jedoch nur 20 – 40 % des zellulären Anteils. Demzufolge enthält ein Gramm Fett vier bis sechs Millionen stromal-vaskuläre Zellen, aber nur ein bis zwei Millionen Adipozyten (Rosen und Spiegelman 2014). Das lässt darauf schließen, dass auch andere Zellen, wie z.B. Makrophagen, Einfluss auf die lipolytischen Prozesse im vis Fettgeweben haben.

Die Ergebnisse deuten auch auf die Assoziation von miR-424-5p mit Tumorkachexie hin. Dies wird auch durch die Daten von Connolly *et al.* untermauert, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der miR-424-5p und Muskelschwund detektiert haben. Bei erhöhter Expression von miR-424-5p wird die Proteinsynthese inhibiert und ein Verlust von Muskelmasse verzeichnet (Connolly et al. 2018). Folglich liegt bei Patienten mit Tumorkachexie ein niedriges Expressionslevel vor, um vor dem Verlust zusätzlicher Muskelmasse zu schützen. In einer Studie von van der Worp *et al.*, in der sie Muskelbiopsien (*Musculus vastus lateralis*) von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs und Kachexie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersuchten, lag die Expression der miR-424-5p bei den kachektischen Patienten signifikant über dem Wert der Kontrollen (van de Worp et al. 2020). Allerdings gilt es bei diesem Vergleich zu beachten, dass in deren Studie weder ein

Tumor im gastorintestinalen Bereich vorlag noch die Biopsien vom *Musculus recuts abdominis* entnommen und analysiert wurden.

Der Vergleich der lipolytischen Targetgene LIPE, LPL und PNPLA2 im vis Fettgewebe hat keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen ergeben. Eine Reihe von Studien stellte jedoch erhöhte Expressionswerte der Lipolysemarker PNPLA2 und LIPE im Serum und Fettgewebe sowohl in kachektischen Mausmodellen als auch in Humanstudien fest (Das und Hoefler 2013; Daas et al. 2018; Dalal 2019). Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass zelluläre mRNA-Lipase-Levels nicht als geeigneter Marker der Enzymaktivität dienen, da die Enzyme vielen posttranskriptionellen Modifikationen unterliegen (Zechner et al. 2012). Ferner fasste Arner *et al.* in seinem Review zusammen, dass Fettzellen von Tumorpatienten mit Kachexie im Allgemeinen nur eine sehr geringe basale Lipolyse aufweisen, obwohl gleichzeitig eine starke Stimulation wirkt. Er beschrieb diesen Phänotyp als „supereffiziente“ Regulierung der Lipolyse: bei erhöhtem Energiebedarf wird auch eine hohe Lipidmobilisierung geliefert, wohingegen in Ruhe nur eine geringe Mobilisierung vorliegt (Arner und Langin 2014). Bei den von uns gewählten regulierenden Stoffwechselwegen (*GO-Terms*) muss zudem betont werden, dass es sich bei den beiden nicht um spezifisch Kachexie assoziierte Wege handelt. Nach bestem Wissen und aktuellem Stand der Literatur bilden die beiden von uns gewählten *GO Terms* „TG-Lipase-Aktivität“ und „Skelettmuskelatrophie“ jedoch Abbauprozesse ab, wie sie ebenfalls in der Tumorkachexie vorkommen.

## 5.5 Limitierungen der vorliegenden Arbeit

Eine wesentliche Einschränkung der Studie, auf deren Basis die vorliegende Arbeit entstanden ist, ist das Querschnittsdesign und die retrospektive Analyse der Gesundheitsdaten. Die Heterogenität der Studie in Bezug auf Alter, Geschlecht, Krebserkrankung, Staging und Grading der Tumore, Medikation sowie Vorhandensein diverser Vorerkrankungen der Patienten, machen die Untersuchung von Ursache-Wirkungs-Beziehungen schwer möglich und minimieren statistische Signifikanzen. Daher können in dieser Arbeit nur Assoziationen aufgezeigt werden. Daneben macht die Vielzahl an unterschiedlichen Definitionen für Tumorkachexie einen Vergleich der hier ermittelten Ergebnisse mit anderen Studien schwierig. Ein weiterer kritischer Aspekt ist das Fehlen einer gesunden Kontrollkohorte bzw. deren Gewebeproben. Anhand einer gesunden Kontrollgruppe könnte der Einfluss des Tumors in Bezug auf die Kachexie deutlich besser beleuchtet und abgegrenzt werden. Auch das *Sampling* der humanen Gewebeproben unterliegt trotz SOPs und standardisierten Abläufen einer gewissen Varianz. Der Zeitpunkt der Entnahme der Biopsien während der Operation unterschied sich ebenso, wie auch der Chirurg und die damit verbundene exakte Stelle im Organ, aus der das Gewebe entnommen wurde. Zudem wurde auch der Zeitpunkt der

Blutabnahme an die klinischen Routinetätigkeiten vor der Operation angepasst, um eine Störung der Abläufe zu vermeiden. Desweiteren ist bekannt, dass es durch den psychischen Zustand der Patienten vor einer Operation und die Verabreichung der Anästhesie zu Veränderungen im Immunsystem (z.B. Freisetzung von IL-6 oder TNF- $\alpha$ ) kommt (Linn et al. 1988; Rossaint und Zarbock 2019). Dies wiederum kann metabolische Abweichungen im Körper auslösen, und die Messergebnisse entsprechen folglich nicht mehr dem „normalen“ physischen Zustand eines Patienten mit Tumorkachexie.

Nicht nur die Biobank weist gewisse Limitierungen auf, auch bei den *in vitro* Experimenten sind Begrenzungen zu definieren. Das zweidimensionale Zellkultursystem ist nicht in der Lage, die normalen Umgebungsbedingungen und natürlichen physiologischen Konditionen des Gewebes bzw. Körpers nachzuahmen. Durch das flache Wachstum der PACs auf dem Gefäßboden fehlen wichtige Interaktionen zwischen den Zellen und auch zwischen den Zellen und der ECM, mit der sie interagieren (Habanjar et al. 2021). Ebenso ist bekannt, dass bereits ein einzelnes Depot im weißen Fettgewebe der Maus aus vielen verschiedenen Subpopulationen von Adipozyten besteht und diese unterschiedliche physiologische Phänotypen aufweisen (Lee et al. 2019). Die gemessenen Expressionen der Zellen sind also stark variabel und spiegeln nicht zwingend das ganze Gewebe wider. Weitere Limitierungen sind nicht nur die begrenzte Auswahl der Patienten, von denen das Expressionsprofil erstellt wurde, sondern auch die Beschränkung und Wahl der miRNAs.

## 6. Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit ist neben dem Aufbau der humanen Biobank, auch die Identifizierung spezifischer miRNAs, um deren funktionelle Rolle und Beitrag zur Entstehung von Tumorkachexie aufzudecken. Im Serum, Muskel und Fettgewebe konnten die folgenden miRNAs identifiziert werden: miR-122-5p, miR-27b-3p, miR-375 und miR-424-5p. Durch deren molekularbiologische Funktion sind sie an der Hemmung katabolischer Signalwege beteiligt, was zum Abbau vom skelettalen Muskel und Fettgewebe führen kann. Um abschließend festzustellen, ob die genannten miRNAs als *Screening-Tool* dienen und letztlich zum Einsatz in der klinischen Anwendung kommen können, sind weitere Studien erforderlich.

Zudem sollten die im Muskelgewebe aufgezeigten Assoziationen zwischen der miR-27b-3p und den Targetgenen IL-15 und TRIM63 in einer humanen Muskelzelllinie bestätigt werden. Neben der Erweiterung des Zellkulturansatzes durch Einschluss weiterer Patienten, würde auch die Sequenzierung der gesamten Kachexie-Kohorte umfangreichere Einblicke in die pathophysiologischen Prozesse der Tumorkachexie liefern.

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und mir geholfen haben.

Zu Beginn möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herr Professor Hans Hauner, für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Lehrstuhl für Ernährungsmedizin in Freising durchzuführen. Vielen Dank für die vielen Rückmeldungen, Diskussionen und Vorschläge während des Projekts.

Bei Dr. Claudine Seeliger möchte ich mich für ihre Betreuung und Ihre Rolle als Mentorin bedanken. Herzlichen Dank für ihre Unterstützung, ihren Pragmatismus sowie die Einführung in die Welt der miRNAs und ihren grenzenlosen Optimismus.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Olga Prokopchuk für die Zusammenarbeit rund um die medizinischen Fragestellungen und meine Sampling-Zeit im Klinikum rechts der Isar bedanken. Ohne ihren Einsatz, ihre Hilfe und ihr Engagement wäre die Studie so nicht möglich gewesen.

Ich danke Herr Professor Klaus-Peter Janßen und all seinen Mitarbeitern\*innen für die Unterstützung meines Projekts und die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in ihren Labor- und Pausenräumen.

Frau Professor Melina Claussnitzer und ihren Mitarbeiter\*innen danke ich für die Anregungen und fachliche Unterstützung zum Projekt.

Ein großer Dank geht auch an alle Kollegen\*innen und Studenten\*innen, die mich die letzten Jahre während meiner Promotion begleitet haben. Die Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und der Teamgeist hätten nicht besser sein können.

Allen voran möchte ich mich bei meiner „Kachexie-Partnerin“ Simone Heisz bedanken. Danke für die Zusammenarbeit, das gemeinsame Erleben all der Höhen und Tiefen des Projekts, den privaten Austausch und natürlich die unzähligen Zugfahrten während der ganzen Jahre.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit.

Meinem Bruder Daniel danke ich für die Idee ein Studium in Ansbach zu beginnen und für seine Unterstützung während meines Masterstudiums in München.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mum bedanken für ihre unermüdliche Hilfe, grenzenlose Unterstützung und den festen Glauben an mich während meines Ausbildungsweges, der Promotion und in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Stefan, der ebenfalls immer an mich geglaubt hat und jederzeit für mich da war. Ohne seine Unterstützung, Aufmunterung und Motivation wäre es nicht zu dieser Arbeit gekommen.

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

**Krauss T**, Heisz S, Honecker J, Prokopchuk O, Martignoni M, Janssen KP, Claussnitzer M, Hauner H and Seeliger C. Specific miRNAs are associated with human cancer cachexia in an organ-specific manner. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (angenommen)

Seeliger C, **Krauss T**, Honecker J, Mengel LA, Buekens L, Mesas-Fernández A, Skurk T, Claussnitzer M, Hauner H. miR-375 is cold exposure sensitive and drives thermogenesis in visceral adipose tissue derived stem cells. *Sci Rep.* 2022 Jun 10;12(1):9557.

### Tagungsbeiträge / Poster

**Tanja Krauss**, Simone Heisz, Claudine Seeliger, Olga Prokopchuk, Klaus-Peter Janssen, Marc E. Martignoni, Melina Claussnitzer and Hans Hauner

*Tumor-derived PTHrP in patients with cachexia*

13<sup>th</sup> International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Diseases, virtuell, Dezember 2020

Simone Heisz, Olga Prokopchuk, **Tanja Krauss**, Klaus-Peter Janssen, Claudine Seeliger, Melina Claussnitzer, Marc E. Martignoni, Hans Hauner

*Plasma IL-6 is a Sarcopenia Marker in Patients with Colorectal Cancer*

12<sup>th</sup> International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Diseases, Berlin, Dezember 2019

Friederike Stephan, Simone Heisz, **Tanja Krauss**, Hanna Kuzi, Klaus-Peter Janssen, Marc Martignoni, Hans Hauner and Olga Prokopchuk

*Sarcopenic gastrointestinal cancer patients have higher plasma levels of ST2*

15<sup>th</sup> International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Diseases, Lissabon, Juni 2022

Bahareh Nemati Moud, Simone Heisz, **Tanja Krauss**, Olga Prokopchuk, Klaus-Peter Janssen, Marc Martignoni, Melina Claussnitzer, Claudine Seeliger, Hans Hauner

*Investigating the expression pattern of a novel gene in a cancer cachexia biobank*

15<sup>th</sup> International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Diseases, Lissabon, Juni 2022

## Literaturverzeichnis

Adeghate, Ernest (2008): Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. In: *Current medicinal chemistry* 15 (18), S. 1851–1862.

Alves, Michele Joana; Figuerêdo, Raquel Galvão; Azevedo, Flavia Figueiredo; Cavallaro, Diego Alexandre; Neto, Nelson Inácio Pinto; Lima, Joanna Darck Carola et al. (2017): Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: the role of TGF $\beta$  pathway. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 190.

Amirouche, Adel; Durieux, Anne-Cécile; Banzet, Sébastien; Koulmann, Nathalie; Bonnefoy, Régis; Mouret, Catherine et al. (2009): Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle. In: *Endocrinology* 150 (1), S. 286–294.

Anderson, Lindsey J.; Lee, Jonathan; Anderson, Barbara; Lee, Benjamin; Migula, Dorota; Sauer, Adam et al. (2022): Whole-body and adipose tissue metabolic phenotype in cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 13 (2), S. 1124–1133.

Argilés, Josep M.; Busquets, Sílvia; López-Soriano, Francisco J. (2001): Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. In: *Life Sciences* 69 (12), S. 1345–1361.

Argilés, Josep M.; López-Soriano, Francisco J.; Busquets, Silvia (2019): Mediators of cachexia in cancer patients. In: *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 66, S. 11–15.

Argilés, Josep M.; López-Soriano, Francisco J.; Busquets, Sílvia (2009): Therapeutic potential of interleukin-15: a myokine involved in muscle wasting and adiposity. In: *Drug discovery today* 14 (3-4), S. 208–213.

Argilés, Josep M.; López-Soriano, Joaquín; Almendro, Vanessa; Busquets, Sílvia; López-Soriano, Francisco J. (2005): Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? In: *Medicinal research reviews* 25 (1), S. 49–65.

Argilés, Josep M.; Stemmler, Britta; López-Soriano, Francisco J.; Busquets, Silvia (2018): Inter-tissue communication in cancer cachexia. In: *Nature Reviews Endocrinology*.

Argilés, Josep M.; Stemmler, Britta; López-Soriano, Francisco J.; Busquets, Silvia; Keisari, Yona (2015): Nonmuscle Tissues Contribution to Cancer Cachexia. In: *Mediators of inflammation* 2015, S. 182872.

Arner, Peter; Langin, Dominique (2014): Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25 (5), S. 255–262.

- Avwioro, Godwin (2011): Histochemical uses of haematoxylin - a review. In: *JPCS* (1), S. 24–34.
- Baczek, Jan; Silkiewicz, Marta; Wojszel, Zyta Beata (2020): Myostatin as a Biomarker of Muscle Wasting and other Pathologies-State of the Art and Knowledge Gaps. In: *Nutrients* 12 (8).
- Baek, Daehyun; Villén, Judit; Shin, Chanseok; Camargo, Fernando D.; Gygi, Steven P.; Bartel, David P. (2008): The impact of microRNAs on protein output. In: *Nature* 455 (7209), S. 64–71.
- Baltgalvis, Kristen A.; Berger, Franklin G.; Peña, Maria Marjorette O.; Davis, J. Mark; White, James P.; Carson, James A. (2009): Muscle wasting and interleukin-6-induced atrogen-1 expression in the cachectic Apc (Min/+ ) mouse. In: *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 457 (5), S. 989–1001.
- Baracos, Vickie E.; Martin, Lisa; Korc, Murray; Guttridge, Denis C.; Fearon, Kenneth C. H. (2018): Cancer-associated cachexia. In: *Nature reviews. Disease primers* 4, S. 17105.
- Bartel, David P. (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297.
- Batista Jr., Miguel L.; Henriques, Felipe S.; Neves, Rodrigo X.; Oliven, Mireia R.; Matos-Neto, Emídio M.; Alcântara, Paulo S. M. et al. (2016): Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 7 (1), S. 37–47.
- Beigneux, Anne P.; Allan, Christopher M.; Sandoval, Norma P.; Cho, Geoffrey W.; Heizer, Patrick J.; Jung, Rachel S. et al. (2019): Lipoprotein lipase is active as a monomer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (13), S. 6319–6328.
- Belfrage, P.; Jergil, B.; Strålfors, P.; Tornqvist, H. (1977): Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: Identification and some properties of the enzyme protein. In: *FEBS Letters* 75 (1-2), S. 259–264.
- Bhingre, Akshay; Namboori, Seema C.; Bithell, Angela; Soldati, Chiara; Buckley, Noel J.; Stanton, Lawrence W. (2015): MiR-375 is Essential for Human Spinal Motor Neuron Development and May Be Involved in Motor Neuron Degeneration. In: *Stem Cells* 34 (1), S. 124–134.
- Bing, C.; Russell, S.; Becket, E.; Pope, M.; Tisdale, M. J.; Trayhurn, P.; Jenkins, J. R. (2006): Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. In: *British journal of cancer* 95 (8), S. 1028–1037.

- Bing, Chen (2011): Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. In: *Current opinion in supportive and palliative care* 5 (4), S. 356–360.
- Bing, Chen; Trayhurn, Paul (2008): Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 11 (3), S. 201–207.
- Bing, Chen; Trayhurn, Paul (2009): New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia: Symposium on 'Frontiers in adipose tissue biology'. In: *Proceedings of the Nutrition Society* 68 (4), S. 385–392.
- Biswas, Anup K.; Acharyya, Swarnali (2020): Understanding cachexia in the context of metastatic progression. In: *Nature reviews. Cancer*.
- Blau, Helen M. (1993): Plasticity of the Differentiated State. In: Michael Karin (Hg.): *Gene Expression*. Boston, MA: Birkhäuser Boston, S. 25–42.
- Bonetto, Andrea; Penna, Fabio; Aversa, Zaira; Mercantini, Paolo; Baccino, Francesco M.; Costelli, Paola et al. (2013): Early changes of muscle insulin-like growth factor-1 and myostatin gene expression in gastric cancer patients. In: *Muscle & Nerve* 48 (3), S. 387–392.
- Bose, Mainak; Bhattacharyya, Suvendra N. (2016): Target-dependent biogenesis of cognate microRNAs in human cells. In: *Nature communications* 7, S. 12200.
- Bridson, S.; Beck, S. A.; Tisdale, M. J. (1991): Changes in activity of lipoprotein lipase, plasma free fatty acids and triglycerides with weight loss in a cachexia model. In: *Cancer letters* 57 (1), S. 49–53.
- Bustin, Stephen A.; Benes, Vladimir; Garson, Jeremy A.; Hellems, Jan; Huggett, Jim; Kubista, Mikael et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clinical chemistry* 55 (4), S. 611–622.
- Cao, Zhipeng; Zhao, Kening; Jose, Irvin; Hoogenraad, Nick J.; Osellame, Laura D. (2021): Biomarkers for Cancer Cachexia: A Mini Review. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9).
- Chau, You-Ying; Bandiera, Roberto; Serrels, Alan; Martínez-Estrada, Ofelia M.; Qing, Wei; Lee, Martin et al. (2014): Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. In: *Nature cell biology* 16 (4), S. 367–375.
- Chen, Rui; Lei, Si; Jiang, Ting; She, Yanling; Shi, Huacai (2020): Regulation of Skeletal Muscle Atrophy in Cachexia by MicroRNAs and Long Non-coding RNAs. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 577010.
- Chen, Si; Tang, Yiman; Liu, Yunsong; Zhang, Ping; Lv, Longwei; Zhang, Xiao et al. (2019): Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration. In: *Cell proliferation* 52 (5), e12669.

- Chen, Si; Zheng, Yunfei; Zhang, Shan; Jia, Lingfei; Zhou, Yongsheng (2017a): Promotion Effects of miR-375 on the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem Cell Reports* 8 (3), S. 773–786.
- Chen, Yun; Chen, Guojiang; Zhang, Bing; Liu, Changfeng; Yu, Yong; Jin, Ye (2017b): miR-27b-3p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting LIMK1 in colorectal cancer. In: *Int J Clin Exp Pathol* 10 (9), S. 9251–9261.
- Clarke, Brian A.; Drujan, Doreen; Willis, Monte S.; Murphy, Leon O.; Corpina, Richard A.; Burova, Elena et al. (2007): The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. In: *Cell metabolism* 6 (5), S. 376–385.
- Connolly, Martin; Paul, Richard; Farre-Garros, Roser; Natanek, Samantha A.; Bloch, Susannah; Lee, Jen et al. (2018): miR-424-5p reduces ribosomal RNA and protein synthesis in muscle wasting. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 9 (2), S. 400–416.
- Cortez, Natalia E.; Mackenzie, Gerardo G. (2021): Ketogenic Diets in Pancreatic Cancer and Associated Cachexia: Cellular Mechanisms and Clinical Perspectives. In: *Nutrients* 13 (9), S. 3202.
- Crist, Colin G.; Montarras, Didier; Pallafacchina, Giorgia; Rocancourt, Didier; Cumano, Ana; Conway, Simon J.; Buckingham, Margaret (2009): Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32), S. 13383–13387.
- Cypess, Aaron M.; Lehman, Sanaz; Williams, Gethin; Tal, Ilan; Rodman, Dean; Goldfine, Allison B. et al. (2009): Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. In: *The New England journal of medicine* 360 (15), S. 1509–1517.
- Da Fonseca, Guilherme Wesley Peixoto; Farkas, Jerneja; Dora, Eva; Haehling, Stephan von; Lainscak, Mitja (2020): Cancer Cachexia and Related Metabolic Dysfunction. In: *International journal of molecular sciences* 21 (7).
- Da Peixoto Silva, Sara; Santos, Joana M. O.; Costa E Silva, Maria Paula; Da Gil Costa, Rui M.; Medeiros, Rui (2020): Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 11 (3), S. 619–635.
- Daas, Sahar I.; Rizeq, Balsam R.; Nasrallah, Gheyath K. (2018): Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. In: *Journal of cellular physiology*.
- Dahlman, I.; Mejhert, N.; Linder, K.; Agustsson, T.; Mutch, D. M.; Kulyte, A. et al. (2010): Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. In: *British journal of cancer* 102 (10), S. 1541–1548.

Dalal, Shalini (2019): Lipid metabolism in cancer cachexia. In: *Annals of palliative medicine* 8 (1), S. 13–23.

Danese, Elisa; Montagnana, Martina; Minicozzi, Anna Maria; Bonafini, Sara; Ruzzenente, Orazio; Gelati, Matteo et al. (2012): The role of resistin in colorectal cancer. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413 (7-8), S. 760–764.

Das, Suman K.; Hoefler, Gerald (2013): The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. In: *Trends in molecular medicine* 19 (5), S. 292–301.

Demiray, Gökçen; Değirmencioğlu, Serkan; Uğurlu, Erhan; Yaren, Arzu (2017): Effects of Serum Leptin and Resistin Levels on Cancer Cachexia in Patients With Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. In: *Clinical Medicine Insights. Oncology* 11, 1179554917690144.

Diakowska, Dorota; Markocka-Mączka, Krystyna; Szelachowski, Piotr; Grabowski, Krzysztof (2014): Serum levels of resistin, adiponectin, and apelin in gastroesophageal cancer patients. In: *Disease markers* 2014, S. 619649.

Dodson, Shontelle; Baracos, Vickie E.; Jatoi, Aminah; Evans, William J.; Cella, David; Dalton, James T.; Steiner, Mitchell S. (2011): Muscle Wasting in Cancer Cachexia: Clinical Implications, Diagnosis, and Emerging Treatment Strategies. In: *Annual Review of Medicine* 62 (1), S. 265–279.

Dong, Meng; Lin, Jun; Lim, Wonchung; Jin, Wanzhu; Lee, Hyuek Jong (2018): Role of brown adipose tissue in metabolic syndrome, aging, and cancer cachexia. In: *Frontiers of Medicine* 12 (2), S. 130–138.

Donzelli, Sara; Farneti, Alessia; Marucci, Laura; Ganci, Federica; Sacconi, Andrea; Strano, Sabrina et al. (2020): Non-coding RNAs as Putative Biomarkers of Cancer-Associated Cachexia. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 257.

Douglas, Euan; McMillan, Donald C. (2014): Towards a simple objective framework for the investigation and treatment of cancer cachexia: the Glasgow Prognostic Score. In: *Cancer treatment reviews* 40 (6), S. 685–691.

Emont, Margo P.; Jacobs, Christopher; Essene, Adam L.; Pant, Deepti; Tenen, Danielle; Colleluori, Georgia et al. (2022): A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. In: *Nature* 603 (7903), S. 926–933.

Engfeldt, P.; Arner, P. (1988): Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. In: *Hormone and metabolic research. Supplement series* 19, S. 26–29.

- Ezeoke, Chukwuemeka Charles; Morley, John E. (2015): Pathophysiology of anorexia in the cancer cachexia syndrome. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 6 (4), S. 287–302.
- Fearon, Kenneth; Strasser, Florian; Anker, Stefan D.; Bosaeus, Ingvar; Bruera, Eduardo; Fainsinger, Robin L. et al. (2011): Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. In: *The Lancet Oncology* 12 (5), S. 489–495.
- Feng, Lixing; Zhang, Wanli; Shen, Qiang; Miao, Chunxiao; Chen, Lijuan; Li, Yiwei et al. (2021): Bile acid metabolism dysregulation associates with cancer cachexia: roles of liver and gut microbiome. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 12 (6), S. 1553–1569.
- Fernandez, Geysson Javier; Ferreira, Juarez Henrique; Vechetti, Ivan José; Moraes, Leonardo Nazario de; Cury, Sarah Santiloni; Freire, Paula Paccielli et al. (2020): MicroRNA-mRNA Co-sequencing Identifies Transcriptional and Post-transcriptional Regulatory Networks Underlying Muscle Wasting in Cancer Cachexia. In: *Frontiers in genetics* 11.
- Freire, Paula Paccielli; Fernandez, Geysson Javier; Cury, Sarah Santiloni; Moraes, Diogo de; Oliveira, Jakeline Santos; Oliveira, Grasieli de et al. (2019): The Pathway to Cancer Cachexia: MicroRNA-Regulated Networks in Muscle Wasting Based on Integrative Meta-Analysis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (8).
- Fuster, Gemma; Almendro, Vanessa; Fontes-Oliveira, Cibely Cristine; Toledo, Míriam; Costelli, Paola; Busquets, Sílvia et al. (2011): Interleukin-15 Affects Differentiation and Apoptosis in Adipocytes: Implications in Obesity. In: *Lipids* 46 (11), S. 1033–1042.
- Giroud, Maude; Karbiener, Michael; Pisani, Didier F.; Ghandour, Rayane A.; Beranger, Guillaume E.; Niemi, Tarja et al. (2016): Let-7i-5p represses brite adipocyte function in mice and humans. In: *Scientific reports* 6, S. 28613.
- Gorza, Luisa; Sorge, Matteo; Seclì, Laura; Brancaccio, Mara (2021): Master Regulators of Muscle Atrophy: Role of Costamere Components. In: *Cells* 10 (1).
- Ha, Minju; Kim, V. Narry (2014): Regulation of microRNA biogenesis. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (8), S. 509–524.
- Habanjar, Ola; Diab-Assaf, Mona; Caldefie-Chezet, Florence; Delort, Laetitia (2021): 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. In: *International journal of molecular sciences* 22 (22).
- Haehling, Stephan von; Anker, Stefan D. (2010): Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 1 (1), S. 1–5.

- Haemmerle, Guenter; Moustafa, Tarek; Woelkart, Gerald; Büttner, Sabrina; Schmidt, Albrecht; van de Weijer, Tineke et al. (2011): ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- $\alpha$  and PGC-1. In: *Nature medicine* 17 (9), S. 1076–1085.
- Han, H. Q.; Mitch, William E. (2011): Targeting the myostatin signaling pathway to treat muscle wasting diseases. In: *Current opinion in supportive and palliative care* 5 (4), S. 334–341.
- Han, Jun; Meng, Qingyang; Shen, Lei; Wu, Guohao (2018): Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. In: *Lipids in health and disease* 17 (1), S. 14.
- Hanash, Samir M.; Pitteri, Sharon J.; Faca, Vitor M. (2008): Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. In: *Nature* 452 (7187), S. 571–579.
- Hasty, Paul; Bradley, Allan; Morris, Julia H.; Edmondson, Diane G.; Venuti, Judith M.; Olson, Eric N.; Klein, William H. (1993): Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. In: *Nature* 364 (6437), S. 501–506.
- Hauner, Hans (2005): Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 64 (2), S. 163–169.
- He, Wei A.; Berardi, Emanuele; Cardillo, Veronica M.; Acharyya, Swarnali; Aulino, Paola; Thomas-Ahner, Jennifer et al. (2013): NF- $\kappa$ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (11), S. 4821–4835.
- Hendifar, Andrew E.; Petzel, Maria Q. B.; Zimmers, Teresa A.; Denlinger, Crystal S.; Matrisian, Lynn M.; Picozzi, Vincent J.; Rahib, Lola (2019): Pancreas Cancer-Associated Weight Loss. In: *The oncologist* 24 (5), S. 691–701.
- Heras, Gabriel; Namuduri, Arvind Venkat; Traini, Leonardo; Shevchenko, Ganna; Falk, Alexander; Bergström Lind, Sara et al. (2019): Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) functions and cellular localization are regulated by SUMO1 post-translational modification. In: *Journal of molecular cell biology* 11 (5), S. 356–370.
- Heyn, Gabriella Simões; Corrêa, Luís Henrique; Magalhães, Kelly Grace (2020): The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. In: *Frontiers in endocrinology* 11, S. 563816.
- Hocking, Samantha L.; Wu, Lindsay E.; Guilhaus, Michael; Chisholm, Donald J.; James, David E. (2010): Intrinsic Depot-Specific Differences in the Secretome of Adipose Tissue,

Preadipocytes, and Adipose Tissue–Derived Microvascular Endothelial Cells. In: *Diabetes* 59 (12), S. 3008–3016.

Hofer, Peter; Taschler, Ulrike; Schreiber, Renate; Kotzbeck, Petra; Schoiswohl, Gabriele (2020): The Lipolysome-A Highly Complex and Dynamic Protein Network Orchestrating Cytoplasmic Triacylglycerol Degradation. In: *Metabolites* 10 (4).

Holm, C.; Osterlund, T.; Laurell, H.; Contreras, J. A. (2000): Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. In: *Annual review of nutrition* 20, S. 365–393.

Honecker, Julius; Weidlich, Dominik; Heisz, Simone; Lindgren, Cecilia M.; Karampinos, Dimitrios C.; Claussnitzer, Melina; Hauner, Hans (2021): A distribution-centered approach for analyzing human adipocyte size estimates and their association with obesity-related traits and mitochondrial function. In: *International journal of obesity (2005)* 45 (9), S. 2108–2117.

Houweling, Peter J.; North, Kathryn N. (2009): Sarcomeric  $\alpha$ -actinins and their role in human muscle disease. In: *Future Neurology* 4 (6), S. 731–743.

Hu, Wenjun; Ru, Zeyuan; Xiao, Wen; Xiong, Zhiyong; Wang, Cheng; Yuan, Changfei et al. (2018a): Adipose tissue browning in cancer-associated cachexia can be attenuated by inhibition of exosome generation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 506 (1), S. 122–129.

Hu, Xiaoyi; Miao, Jiyu; Zhang, Min; Wang, Xiaofei; Wang, Zhenzhen; Han, Jia et al. (2018b): miRNA-103a-3p Promotes Human Gastric Cancer Cell Proliferation by Targeting and Suppressing ATF7 in vitro. In: *Molecules and cells* 41 (5), S. 390–400.

Hung, Amos C.; Wang, Yen-Yun; Lee, Kun-Tsung; Chiang, Hung-Hsing; Chen, Yuk-Kwan; Du, Je-Kang et al. (2021): Reduced tissue and serum resistin expression as a clinical marker for esophageal squamous cell carcinoma. In: *Oncology letters* 22 (5), S. 774.

Ibrahim, M. Mohsen (2010): Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11 (1), S. 11–18.

Icli, Basak; Feinberg, Mark W. (2017): MicroRNAs in dysfunctional adipose tissue: cardiovascular implications. In: *Cardiovascular research* 113 (9), S. 1024–1034.

Improta Caria, Alex Cleber; Nonaka, Carolina Kymie Vasques; Pereira, Ciro Silveira; Soares, Milena Botelho Pereira; Macambira, Simone Garcia; Souza, Bruno Solano de Freitas (2018): Exercise Training-Induced Changes in MicroRNAs: Beneficial Regulatory Effects in Hypertension, Type 2 Diabetes, and Obesity. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11).

Jia, Long; Li, Yue-Feng; Wu, Guo-Fang; Song, Zi-Yi; Lu, Hong-Zhao; Song, Cheng-Chuang et al. (2014): MiRNA-199a-3p Regulates C2C12 Myoblast Differentiation through IGF-1/AKT/mTOR Signal Pathway. In: *International journal of molecular sciences* 15 (1), S. 296–308.

Karalaki, Maria; Fili, Sofia; Philippou, Anastassios; Koutsilieris, Michael (2009): Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. In: *In Vivo* 23 (5), S. 779–796.

Karbiener, Michael; Fischer, Christoph; Nowitsch, Susanne; Opriessnig, Peter; Papak, Christine; Ailhaud, Gerard et al. (2009): microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. In: *Biochemical and biophysical research communications* 390 (2), S. 247–251.

Karbiener, Michael; Pisani, Didier F.; Frontini, Andrea; Oberreiter, Lisa M.; Lang, Eleonore; Vegiopoulos, Alexandros et al. (2014): MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. In: *Stem Cells* 32 (6), S. 1578–1590.

Katz, A. M.; Katz, P. B. (1962): Diseases of the heart in the works of Hippocrates. In: *British heart journal* 24 (3), S. 257–264.

Kawai, Tatsuo; Autieri, Michael V.; Scalia, Rosario (2021): Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 320 (3), C375-C391.

Kerem, Mustafa; Ferahkose, Zafer; Yilmaz, Utku Tonguc; Pasaoglu, Hatice; Ofluoglu, Ebru; Bedirli, Abdulkadir et al. (2008): Adipokines and ghrelin in gastric cancer cachexia. In: *World journal of gastroenterology* 14 (23), S. 3633–3641.

Kershaw, Erin E.; Flier, Jeffrey S. (2004): Adipose tissue as an endocrine organ. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (6), S. 2548–2556.

Kim, Yeon Jeong; Hwang, Soo Jin; Bae, Yong Chan; Jung, Jin Sup (2009): MiR-21 Regulates Adipogenic Differentiation through the Modulation of TGF- $\beta$  Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. In: *Stem Cells* 27 (12), S. 3093–3102.

Kir, Serkan; Komaba, Hirotaka; Garcia, Ana P.; Economopoulos, Konstantinos P.; Liu, Wei; Lanske, Beate et al. (2016): PTH/PTHrP Receptor Mediates Cachexia in Models of Kidney Failure and Cancer. In: *Cell metabolism* 23 (2), S. 315–323.

Kir, Serkan; Spiegelman, Bruce M. (2016): CACHEXIA & BROWN FAT: A BURNING ISSUE IN CANCER. In: *Trends in cancer* 2 (9), S. 461–463.

- Kir, Serkan; White, James P.; Kleiner, Sandra; Kazak, Lawrence; Cohen, Paul; Baracos, Vickie E.; Spiegelman, Bruce M. (2014): Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. In: *Nature* 513 (7516), S. 100–104.
- Kneppers, Anita E.M.; Langen, Ramon C.J.; Gosker, Harry R.; Verdijk, Lex B.; Cebron Lipovec, Nanca; Leermakers, Pieter A. et al. (2017): Increased Myogenic and Protein Turnover Signaling in Skeletal Muscle of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients With Sarcopenia. In: *Journal of the American Medical Directors Association* 18 (7), 637.e1-637.e11.
- Kottorou, Anastasia; Dimitrakopoulos, Foteinos-Ioannis; Tsezou, Aspasia (2021): Non-coding RNAs in cancer-associated cachexia: clinical implications and future perspectives. In: *Translational oncology* 14 (7), S. 101101.
- Kraus, Matthias; Greither, Thomas; Wenzel, Carina; Bräuer-Hartmann, Daniela; Wabitsch, Martin; Behre, Hermann M. (2015): Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375. In: *Molecular and cellular endocrinology* 414, S. 177–185.
- Kulyté, Agné; Lorente-Cebrián, Silvia; Gao, Hui; Mejhert, Niklas; Agustsson, Thorhallur; Arner, Peter et al. (2014): MicroRNA profiling links miR-378 to enhanced adipocyte lipolysis in human cancer cachexia. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306 (3), E267-74.
- Kulyté, Agné; Lundbäck, Veronika; Lindgren, Cecilia M.; Luan, Jian'an; Lotta, Luca A.; Langenberg, Claudia et al. (2020): Genome-wide association study of adipocyte lipolysis in the GENetics of adipocyte lipolysis (GENiAL) cohort. In: *Molecular metabolism* 34, S. 85–96.
- Kwekel, Joshua C.; Vijay, Vikrant; Han, Tao; Moland, Carrie L.; Desai, Varsha G.; Fuscoe, James C. (2017): Sex and age differences in the expression of liver microRNAs during the life span of F344 rats. In: *Biology of sex differences* 8, S. 6.
- Lee, Kevin Y.; Luong, Quyen; Sharma, Rita; Dreyfuss, Jonathan M.; Ussar, Siegfried; Kahn, C. Ronald (2019): Developmental and functional heterogeneity of white adipocytes within a single fat depot. In: *The EMBO Journal* 38 (3), e99291.
- Lee, Rosalind C.; Feinbaum, Rhonda L.; Ambros, Victor (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.
- Li, Yongguo; Li, Zhen; Ngandiri, Devi Anggraini; Llerins Perez, Mireia; Wolf, Alexander; Wang, Yuanyuan (2022): The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 826314.

- Lin, Qun; Gao, Zhanguo; Alarcon, Rodolfo M.; Ye, Jianping; Yun, Zhong (2009): A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. In: *The FEBS journal* 276 (8), S. 2348–2358.
- Lin, Shuibin; Gregory, Richard I. (2015): MicroRNA biogenesis pathways in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (6), S. 321–333.
- Ling, Hong-Yan; Wen, Ge-Bo; Feng, Shui-Dong; Tuo, Qin-Hui; Ou, He-Sheng; Yao, Chao Hua et al. (2011): MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 38 (4), S. 239–246.
- Linn, Bernard S.; Linn, Margaret W.; Klimas, Nancy G. (1988): Effects of psychophysical stress on surgical outcome. In: *Psychosomatic Medicine* 50, S. 230–244.
- Lorente-Cebrián, Silvia; Herrera, Katya; I Milagro, Fermín; Sánchez, Juana; La Garza, Ana Laura de; Castro, Heriberto (2019): miRNAs and Novel Food Compounds Related to the Browning Process. In: *International journal of molecular sciences* 20 (23).
- Loumaye, Audrey; Thissen, Jean-Paul (2017): Biomarkers of cancer cachexia. In: *Clinical biochemistry* 50 (18), S. 1281–1288.
- Luan, Yi; Zhang, Yaqi; Yu, Seok-Yeong; You, Mikyoung; Xu, Pauline C.; Chung, Soonkyu et al. (2022): Development of ovarian tumour causes significant loss of muscle and adipose tissue: a novel mouse model for cancer cachexia study. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 13 (2), S. 1289–1301.
- MacArthur, Daniel G.; North, Kathryn N. (2004): A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26 (7), S. 786–795.
- Maccio, Antonio; Sanna, Elisabetta; Neri, Manuela; Oppi, Sara; Madeddu, Clelia (2021): Cachexia as Evidence of the Mechanisms of Resistance and Tolerance during the Evolution of Cancer Disease. In: *International journal of molecular sciences* 22 (6).
- Magri, Francesca; Vanoli, Fiammetta; Corti, Stefania (2018): miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 22 (2), S. 755–767.
- Maharaj, Ashika D.; Holland, Jennifer F.; Scarborough, Ri O.; Evans, Sue M.; Ioannou, Liane J.; Brown, Wendy et al. (2019): The Upper Gastrointestinal Cancer Registry (UGICR): a clinical quality registry to monitor and improve care in upper gastrointestinal cancers. In: *BMJ open* 9 (9), e031434.

- Manole, Emilia; Ceafalan, Laura C.; Popescu, Bogdan O.; Dumitru, Carmen; Bastian, Alexandra E. (2018): Myokines as Possible Therapeutic Targets in Cancer Cachexia. In: *Journal of immunology research* 2018, S. 8260742.
- Marceca, Gioacchino P.; Nigita, Giovanni; Calore, Federica; Croce, Carlo M. (2020): MicroRNAs in Skeletal Muscle and Hints on Their Potential Role in Muscle Wasting During Cancer Cachexia. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 607196.
- Markovic, Jovana; Sharma, Amar Deep; Balakrishnan, Asha (2020): MicroRNA-221: A Fine Tuner and Potential Biomarker of Chronic Liver Injury. In: *Cells* 9 (8).
- Marshall, M. K.; Doerrler, W.; Feingold, K. R.; Grunfeld, C. (1994): Leukemia inhibitory factor induces changes in lipid metabolism in cultured adipocytes. In: *Endocrinology* 135 (1), S. 141–147.
- Martignoni, Marc E.; Dimitriu, Corneliu; Bachmann, Jeaninne; Krakowski-Rosen, Holger; Ketterer, Knut; Kinscherf, Ralf; Friess, Helmut (2009): Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. In: *Oncology reports* 21 (2), S. 363–369.
- Martin, Agnès; Freyssenet, Damien (2021): Phenotypic features of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass and function: lessons from human and animal studies. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 12 (2), S. 252–273.
- Miranda, Kathryn; Yang, Xiaoming; Bam, Marpe; Murphy, E. Angela; Nagarkatti, Prakash S.; Nagarkatti, Mitzi (2018): MicroRNA-30 modulates metabolic inflammation by regulating Notch signaling in adipose tissue macrophages. In: *International journal of obesity (2005)* 42 (6), S. 1140–1150.
- Mohammadi, Masoumeh; Mianabadi, Faezeh; Mehrad-Majd, Hassan (2019): Circulating visfatin levels and cancers risk: A systematic review and meta-analysis. In: *Journal of cellular physiology* 234 (4), S. 5011–5022.
- Mohr, Raphael; Özdirik, Burcin; Lambrecht, Joeri; Demir, Münevver; Eschrich, Johannes; Geisler, Lukas et al. (2021): From Liver Cirrhosis to Cancer: The Role of Micro-RNAs in Hepatocarcinogenesis. In: *International journal of molecular sciences* 22 (3).
- Mononen, Nina; Lyytikäinen, Leo-Pekka; Seppälä, Ilkka; Mishra, Pashupati P.; Juonala, Markus; Waldenberger, Melanie et al. (2019): Whole blood microRNA levels associate with glycemic status and correlate with target mRNAs in pathways important to type 2 diabetes. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 8887.
- Moresi, Viviana; Williams, Andrew H.; Meadows, Eric; Flynn, Jesse M.; Potthoff, Matthew J.; McAnally, John et al. (2010): Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. In: *Cell* 143 (1), S. 35–45.

- Mracek, T.; Stephens, N. A.; Gao, D.; Bao, Y.; Ross, J. A.; Rydén, M. et al. (2011): Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. In: *British journal of cancer* 104 (3), S. 441–447.
- Murton, Andrew J.; Maddocks, Matthew; Stephens, Francis B.; Marimuthu, Kanagaraj; England, Ruth; Wilcock, Andrew (2017): Consequences of Late-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer Cachexia on Muscle Metabolic Processes. In: *Clinical Lung Cancer* 18 (1), e1-e11.
- Narasimhan, Ashok; Ghosh, Sunita; Stretch, Cynthia; Greiner, Russell; Bathe, Oliver F.; Baracos, Vickie; Damaraju, Sambasivarao (2017a): Small RNAome profiling from human skeletal muscle: novel miRNAs and their targets associated with cancer cachexia. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 8 (3), S. 405–416.
- Narasimhan, Ashok; Ghosh, Sunita; Stretch, Cynthia; Greiner, Russell; Bathe, Oliver F.; Baracos, Vickie; Damaraju, Sambasivarao (2017b): Small RNAome profiling from human skeletal muscle: novel miRNAs and their targets associated with cancer cachexia. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 8 (3), S. 405–416.
- Narsale, Aditi A.; Enos, Reilly T.; Puppa, Melissa J.; Chatterjee, Saurabh; Murphy, E. Angela; Fayad, Raja et al. (2015): Liver inflammation and metabolic signaling in ApcMin/+ mice: the role of cachexia progression. In: *PloS one* 10 (3), e0119888.
- Nishikawa, Hiroki; Goto, Masahiro; Fukunishi, Shinya; Asai, Akira; Nishiguchi, Shuhei; Higuchi, Kazuhide (2021): Cancer Cachexia: Its Mechanism and Clinical Significance. In: *International journal of molecular sciences* 22 (16), S. 8491.
- Ogiwara, H.; Takahashi, S.; Kato, Y.; Uyama, I.; Takahara, T.; Kikuchi, K.; Iida, S. (1994): Diminished visceral adipose tissue in cancer cachexia. In: *Journal of surgical oncology* 57 (2), S. 129–133.
- Ojima, Chiharu; Noguchi, Yuri; Miyamoto, Tatsuki; Saito, Yuki; Orihashi, Hiroki; Yoshimatsu, Yasuhiro et al. (2020): Peptide-2 from mouse myostatin precursor protein alleviates muscle wasting in cancer-associated cachexia. In: *Cancer science* 111 (8), S. 2954–2964.
- Okugawa, Yoshinaga; Toiyama, Yuji; Hur, Keun; Yamamoto, Akira; Yin, Chengzeng; Ide, Shozo et al. (2019): Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 10 (3), S. 536–548.
- Okugawa, Yoshinaga; Yao, Li; Toiyama, Yuji; Yamamoto, Akira; Shigemori, Tsunehiko; Yin, Chengzeng et al. (2018): Prognostic impact of sarcopenia and its correlation with circulating miR-21 in colorectal cancer patients. In: *Oncology reports* 39 (4), S. 1555–1564.

- Oliff, Allen; Defeo-Jones, Deborah; Boyer, Mark; Martinez, Douglas; Kiefer, David; Vuocolo, Gerald et al. (1987): Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. In: *Cell* 50 (4), S. 555–563.
- Palus, Sandra; Haehling, Stephan von; Springer, Jochen (2014): Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 5 (3), S. 193–198.
- Park, Byong Seo; Jin, Sung Ho; Park, Joong Jean; Park, Jeong Woo; Namgoong, Il Seong; Kim, Young Il et al. (2011): Visfatin Induces Sickness Responses in the Brain. In: *PLoS one* 6 (1), e15981.
- Peris-Moreno, Dulce; Taillandier, Daniel; Polge, Cécile (2020): MuRF1/TRIM63, Master Regulator of Muscle Mass. In: *International journal of molecular sciences* 21 (18).
- Pietrus, Miłosz; Seweryn, Michał; Kapusta, Przemysław; Wołkow, Paweł; Pityński, Kazimierz; Wątor, Gracjan (2021): Low Expression of miR-375 and miR-190b Differentiates Grade 3 Patients with Endometrial Cancer. In: *Biomolecules* 11 (2).
- Pin, Fabrizio; Barreto, Rafael; Couch, Marion E.; Bonetto, Andrea; O'Connell, Thomas M. (2019): Cachexia induced by cancer and chemotherapy yield distinct perturbations to energy metabolism. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 10 (1), S. 140–154.
- Pistilli, Emidio E.; Alway, Stephen E. (2008): Systemic elevation of interleukin-15 in vivo promotes apoptosis in skeletal muscles of young adult and aged rats. In: *Biochemical and biophysical research communications* 373 (1), S. 20–24.
- Plant, Pamela J.; Brooks, Dina; Faughnan, Marie; Bayley, Tanya; Bain, James; Singer, Lianne et al. (2010): Cellular Markers of Muscle Atrophy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (4), S. 461–471.
- Polge, Cécile; Cabantous, Stéphanie; Deval, Christiane; Claustre, Agnès; Hauvette, Antoine; Bouchenot, Catherine et al. (2018): A muscle-specific MuRF1-E2 network requires stabilization of MuRF1-E2 complexes by telethonin, a newly identified substrate. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 9 (1), S. 129–145.
- Porporato, P. E. (2016): Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. In: *Oncogenesis* 5 (2), e200-e200.
- Pouliou, Kalliopi Anna; Sarantis, Panagiotis; Antoniadou, Dimitra; Koustas, Evangelos; Papadimitropoulou, Adriana; Papavassiliou, Athanasios G.; Karamouzis, Michalis V. (2020): Pancreatic Cancer and Cachexia-Metabolic Mechanisms and Novel Insights. In: *Nutrients* 12 (6).

- Powrózek, Tomasz; Mlak, Radosław; Brzozowska, Anna; Mazurek, Marcin; Gołębiowski, Paweł; Małecka-Massalska, Teresa (2018): miRNA-130a Significantly Improves Accuracy of SGA Nutritional Assessment Tool in Prediction of Malnutrition and Cachexia in Radiotherapy-Treated Head and Neck Cancer Patients. In: *Cancers* 10 (9).
- Prado, Carla M. M.; Lieffers, Jessica R.; McCargar, Linda J.; Reiman, Tony; Sawyer, Michael B.; Martin, Lisa; Baracos, Vickie E. (2008): Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. In: *The Lancet Oncology* 9 (7), S. 629–635.
- Puig-Vilanova, Ester; Martínez-Llorens, Juana; Ausin, Pilar; Roca, Josep; Gea, Joaquim; Barreiro, Esther (2015): Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. In: *Clin Sci (Lond)* 128 (12), S. 905–921.
- Quinn, LeBris S.; Anderson, Barbara G.; Strait-Bodey, Lena; Stroud, Ashley M.; Argilés, Josép M. (2009): Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296 (1), E191-E202.
- Rahman, Fasih Ahmad; Krause, Matthew Paul (2020): PAI-1, the Plasminogen System, and Skeletal Muscle. In: *International journal of molecular sciences* 21 (19).
- Ramamoorthy, Sonia; Donohue, Michael; Buck, Martina (2009): Decreased Jun-D and myogenin expression in muscle wasting of human cachexia. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 297 (2), E392-E401.
- Roberts, Benjamin S.; Yang, Chelsea Q.; Neher, Saskia B. (2022): Characterization of lipoprotein lipase storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. In: *Journal of cell science* 135 (5).
- Rodríguez-Barrueco, Ruth; Latorre, Jessica; Devis-Jáuregui, Laura; Lluch, Aina; Bonifaci, Nuria; Llobet, Francisco J. et al. (2022): A microRNA Cluster Controls Fat Cell Differentiation and Adipose Tissue Expansion By Regulating SNCG. In: *Advanced Science* 9 (4), S. 2104759.
- Rohm, Maria; Zeigerer, Anja; Machado, Juliano; Herzig, Stephan (2019): Energy metabolism in cachexia. In: *EMBO reports* 20 (4).
- Rosen, Evan D.; Spiegelman, Bruce M. (2014): What we talk about when we talk about fat. In: *Cell* 156 (1-2), S. 20–44.
- Rossaint, Jan; Zarbock, Alexander (2019): Anesthesia-induced immune modulation. In: *Current Opinion in Anesthesiology* 32 (6).
- Ru, Yuanbin; Kechris, Katerina J.; Tabakoff, Boris; Hoffman, Paula; Radcliffe, Richard A.; Bowler, Russell et al. (2014): The multiMiR R package and database: integration of

- microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. In: *Nucleic acids research* 42 (17), e133.
- Rupaimoole, Rajesha; Slack, Frank J. (2017): MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. In: *Nature reviews. Drug discovery* 16 (3), S. 203–222.
- Ryan, Aoife M.; Power, Derek G.; Daly, Louise; Cushen, Samantha J.; Ní Bhuachalla, Éadaoin; Prado, Carla M. (2016): Cancer-associated malnutrition, cachexia and sarcopenia: the skeleton in the hospital closet 40 years later. In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 75 (2), S. 199–211.
- Rydén, Mikael; Agustsson, Thorhallur; Laurencikiene, Jurga; Britton, Tom; Sjölin, Eva; Isaksson, Bengt et al. (2008): Lipolysis—Not inflammation, cell death, or lipogenesis—Is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. In: *Cancer* 113 (7), S. 1695–1704.
- Saini, Amarjit; Nasser, Al-Shanti; Stewart, Claire E.H. (2006): Waste management—Cytokines, growth factors and cachexia. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17 (6), S. 475–486.
- Salehi, S.; Brereton, H. C.; Arno, M. J.; Darling, D.; Quaglia, A.; O’Grady, J. et al. (2013): Human Liver Regeneration Is Characterized by the Coordinated Expression of Distinct MicroRNA Governing Cell Cycle Fate. In: *American Journal of Transplantation* 13 (5), S. 1282–1295.
- Sarkar, Sukumar; Dey, Bijan K.; Dutta, Anindya (2010): MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. In: *Molecular biology of the cell* 21 (13), S. 2138–2149.
- 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 PPARE in the lipoprotein lipase gene. In: *The EMBO Journal* 15 (19), S. 5336–5348.
- Schreiber, Renate; Xie, Hao; Schweiger, Martina (2019): Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1864 (6), S. 880–899.
- Schueller, Florian; Roy, Sanchari; Vucur, Mihael; Trautwein, Christian; Luedde, Tom; Roderburg, Christoph (2018): The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. In: *International journal of molecular sciences* 19 (1).

- Schwarz, S.; Prokopchuk, O.; Esefeld, K.; Gröschel, S.; Bachmann, J.; Lorenzen, S. et al. (2017): The clinical picture of cachexia: a mosaic of different parameters (experience of 503 patients). In: *BMC cancer* 17 (1), S. 130.
- Schweiger, Martina; Schreiber, Renate; Haemmerle, Guenter; Lass, Achim; Fledelius, Christian; Jacobsen, Poul et al. (2006): Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (52), S. 40236–40241.
- Seeliger, Claudine; Balmayor, Elizabeth R.; van Griensven, Martijn (2016): miRNAs Related to Skeletal Diseases. In: *Stem cells and development* 25 (17), S. 1261–1281.
- Seeliger, Claudine; Krauss, Tanja; Honecker, Julius; Mengel, Laura Aline; Buekens, Lise; Mesas-Fernández, Alberto et al. (2022): miR-375 is cold exposure sensitive and drives thermogenesis in visceral adipose tissue derived stem cells. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 9557.
- Shen, Linyuan; Chen, Lei; Zhang, Shunhua; Du, Jingjing; Bai, Lin; Zhang, Yi et al. (2016): MicroRNA-27b Regulates Mitochondria Biogenesis in Myocytes. In: *PloS one* 11 (2), e0148532.
- Shrestha, Sirjana; Hsu, Sheng-Da; Huang, Wei-Yun; Huang, Hsi-Yuan; Chen, WenLiang; Weng, Shun-Long; Huang, Hsien-Da (2014): A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer. In: *Cancer medicine* 3 (4), S. 878–888.
- Siddiqui, Jawed A.; Pothuraju, Ramesh; Jain, Maneesh; Batra, Surinder K.; Nasser, Mohd W. (2020): Advances in cancer cachexia: Intersection between affected organs, mediators, and pharmacological interventions. In: *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1873 (2), S. 188359.
- Silvério, Renata; Lira, Fábio S.; Oyama, Lila M.; Oller do Nascimento, Cláudia M.; Otoch, José P.; Alcântara, Paulo S. M. et al. (2017): Lipases and lipid droplet-associated protein expression in subcutaneous white adipose tissue of cachectic patients with cancer. In: *Lipids in health and disease* 16 (1), S. 159.
- Singh, Gurinder Bir; Cowan, Douglas B.; Wang, Da-Zhi (2020): Tiny Regulators of Massive Tissue: MicroRNAs in Skeletal Muscle Development, Myopathies, and Cancer Cachexia. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 598964.
- Skurk, Thomas; Hauner, Hans (2012): Primary culture of human adipocyte precursor cells: expansion and differentiation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 806, S. 215–226.

- Soares, Ricardo José; Cagnin, Stefano; Chemello, Francesco; Silvestrin, Matteo; Musaro, Antonio; Pitta, Cristiano de et al. (2014): Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (32), S. 21909–21925.
- Spalding, Kirsty L.; Arner, Erik; Westermark, Pål O.; Bernard, Samuel; Buchholz, Bruce A.; Bergmann, Olaf et al. (2008): Dynamics of fat cell turnover in humans. In: *Nature* 453 (7196), S. 783–787.
- Sperlich, Andreas; Balmert, Alexander; Doll, Dietrich; Bauer, Sabine; Franke, Fabian; Keller, Gisela et al. (2018): Genetic and immunological biomarkers predict metastatic disease recurrence in stage III colon cancer. In: *BMC cancer* 18 (1), S. 998.
- Steel, Jason C.; Waldmann, Thomas A.; Morris, John C. (2012): Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. In: *Trends in pharmacological sciences* 33 (1), S. 35–41.
- Sun, Lei; Quan, Xiao-Qing; Yu, Shiyong (2015): An Epidemiological Survey of Cachexia in Advanced Cancer Patients and Analysis on Its Diagnostic and Treatment Status. In: *Nutrition and cancer* 67 (7), S. 1056–1062.
- Sun, Xiaoting; Feng, Xiaogang; Wu, Xiaojing; Lu, Yongtian; Chen, Kaihong; Ye, Ying (2020): Fat Wasting Is Damaging: Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 33.
- Szklarczyk, Damian; Franceschini, Andrea; Wyder, Stefan; Forslund, Kristoffer; Heller, Davide; Huerta-Cepas, Jaime et al. (2015): STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. In: *Nucleic acids research* 43 (Database issue), D447-52.
- Talbert, Erin E.; Cuitiño, Maria C.; Ladner, Katherine J.; Rajasekerea, Priyani V.; Siebert, Melissa; Shakya, Reena et al. (2019): Modeling Human Cancer-induced Cachexia. In: *Cell reports* 28 (6), 1612-1622.e4.
- Talbert, Erin E.; Lewis, Heather L.; Farren, Matthew R.; Ramsey, Mitchell L.; Chakedis, Jeffery M.; Rajasekera, Priyani et al. (2018): Circulating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is associated with cachexia in treatment-naïve pancreatic cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 9 (2), S. 358–368.
- Tisdale, Michael J. (2002): Cachexia in cancer patients. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (11), S. 862–871.

- Tomasin, Rebeka; Martin, Ana Carolina Baptista Moreno; Cominetti, Márcia Regina (2019): Metastasis and cachexia: alongside in clinics, but not so in animal models. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 10 (6), S. 1183–1194.
- Tornqvist, H.; Belfrage, P. (1976): Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. In: *The Journal of biological chemistry* 251 (3), S. 813–819.
- Tsoli, Maria; Robertson, Graham (2013): Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24 (4), S. 174–183.
- Vaitkus, Janina A.; Celi, Francesco S. (2016): The role of adipose tissue in cancer-associated cachexia. In: *Experimental Biology and Medicine* 242 (5), S. 473–481.
- van de Worp, Wouter R. P. H.; Schols, Annemie M. W. J.; Dingemans, Anne-Marie C.; Op den Kamp, Céline M. H.; Degens, Juliette H. R. J.; Kelders, Marco C. J. M. et al. (2020): Identification of microRNAs in skeletal muscle associated with lung cancer cachexia. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 11 (2), S. 452–463.
- van de Worp, Wouter R. P. H.; Theys, Jan; van Helvoort, Ardy; Langen, Ramon C. J. (2018): Regulation of muscle atrophy by microRNAs: 'AtromiRs' as potential target in cachexia. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 21 (6), S. 423–429.
- van Harmelen, V.; Skurk, T.; Röhrig, K.; Lee, Y-M; Halbleib, M.; Aprath-Husmann, I.; Hauner, H. (2003): Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27 (8), S. 889–895.
- Verboven, K.; Wouters, K.; Gaens, K.; Hansen, D.; Bijnen, M.; Wetzels, S. et al. (2018): Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 4677.
- Virtanen, Kirsi A.; Lidell, Martin E.; Orava, Janne; Heglind, Mikael; Westergren, Rickard; Niemi, Tarja et al. (2009): Functional brown adipose tissue in healthy adults. In: *The New England journal of medicine* 360 (15), S. 1518–1525.
- Visavadiya, Nishant P.; Rossiter, Harry B.; Khamoui, Andy V. (2021): Distinct glycolytic pathway regulation in liver, tumour and skeletal muscle of mice with cancer cachexia. In: *Cell biochemistry and function* 39 (6), S. 802–812.
- Vogiatzis, I.; Simoes, D.C.M.; Stratakos, G.; Kourepini, E.; Terzis, G.; Manta, P. et al. (2010): Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. In: *European Respiratory Journal* 36 (2), S. 301–310.

- Walker, Ryan G.; Poggioli, Tommaso; Katsimpardi, Lida; Buchanan, Sean M.; Oh, Juhyun; Wattrus, Sam et al. (2016): Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and Questions for Future Investigation. In: *Circulation research* 118 (7), 1125-41; discussion 1142.
- Wallace, A. Michael; Kelly, Anne; Sattar, Naveed; McArdle, Colin S. S.; McMillan, Donald C. (2002): Circulating concentrations of "free" leptin in relation to fat mass and appetite in gastrointestinal cancer patients. In: *Nutrition and cancer* 44 (2), S. 157–160.
- Wang, Lifeng; Sinnott-Armstrong, Nasa; Wagschal, Alexandre; Wark, Abigail R.; Camporez, Joao-Paulo; Perry, Rachel J. et al. (2020a): A MicroRNA Linking Human Positive Selection and Metabolic Disorders. In: *Cell* 183 (3), 684-701.e14.
- Wang, Xuebing; Lu, Yingli; Zhu, Lei; Zhang, Haibo; Feng, Lianshi (2020b): Inhibition of miR-27b Regulates Lipid Metabolism in Skeletal Muscle of Obese Rats During Hypoxic Exercise by Increasing PPAR $\gamma$  Expression. In: *Frontiers in physiology* 11, S. 1090.
- Wang, Yu-Xiang; Zhu, Neng; Zhang, Chan-Juan; Wang, Yi-Kai; Wu, Hong-Tao; Li, Qun et al. (2019): Friend or foe: Multiple roles of adipose tissue in cancer formation and progression. In: *Journal of cellular physiology*.
- Weber, Bahar Zehra Camurdanoglu; Agca, Samet; Domaniku, Aylin; Bilgic, Seval Nur; Arabaci, Dilsad H.; Kir, Serkan (2022): Inhibition of epidermal growth factor receptor suppresses parathyroid hormone-related protein expression in tumours and ameliorates cancer-associated cachexia. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 13 (3), S. 1582–1594.
- Webster, Justine M.; Kempen, Laura J. A. P.; Hardy, Rowan S.; Langen, Ramon C. J. (2020): Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. In: *Frontiers in physiology* 11, S. 597675.
- Wen, Yu; Wang, Hong-wei; Wu, Jing; Lu, Hui-ling; Hu, Xiu-fen; Katherine, Cianflone (2006): Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes. In: *Chinese Medical Journal* 119 (20), S. 1701–1708.
- Whistance, Robert N.; Blazeby, Jane M. (2011): Systematic review: quality of life after treatment for upper gastrointestinal cancer. In: *Current opinion in supportive and palliative care* 5 (1).
- Wu, Shengru; Guo, Wei; Liang, Saisai; Lu, Hong; Sun, Wenqiang; Ren, Xiaochun et al. (2018): Systematic analysis of the regulatory roles of microRNAs in postnatal maturation and metergasis of liver of breeder cocks. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 61.

- Wyart, Elisabeth; Bindels, Laure B.; Mina, Erica; Menga, Alessio; Stanga, Serena; Porporato, Paolo E. (2020): Cachexia, a Systemic Disease beyond Muscle Atrophy. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22).
- Xie, Huangming; Lim, Bing; Lodish, Harvey F. (2009): MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. In: *Diabetes* 58 (5), S. 1050–1057.
- Xie, Wei; Li, Liang; Zhang, Min; Cheng, Hai-Peng; Gong, Duo; Lv, Yun-Cheng et al. (2016): MicroRNA-27 Prevents Atherosclerosis by Suppressing Lipoprotein Lipase-Induced Lipid Accumulation and Inflammatory Response in Apolipoprotein E Knockout Mice. In: *PloS one* 11 (6), e0157085.
- Xu, Pauline C.; You, Mikyoung; Yu, Seok-Yeong; Luan, Yi; Eldani, Maya; Caffrey, Thomas C. et al. (2022): Visceral adipose tissue remodeling in pancreatic ductal adenocarcinoma cachexia: the role of activin A signaling. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 1659.
- Xueling Li (2013): miR-375, a microRNA related to diabetes. In: *Gene*.
- Yang, Alexander; Mottillo, Emilio P. (2020): Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. In: *The Biochemical journal* 477 (5), S. 985–1008.
- Yang, Zhihong; Cappello, Tyler; Wang, Li (2015): Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. In: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5 (2), S. 145–150.
- Yoshida, Shino; Fujimoto, Taku; Takahashi, Toshimasa; Sugimoto, Ken; Akasaka, Hiroshi; Tanaka, Minoru et al. (2022): Interleukin-15 receptor subunit alpha regulates interleukin-15 localization and protein expression in skeletal muscle cells. In: *Experimental physiology* 107 (3), S. 222–232.
- Yu, Yonghui; Li, Xiao; Liu, Lingying; Chai, Jiake; Haijun, Zhang; Chu, Wanli et al. (2016): miR-628 Promotes Burn-Induced Skeletal Muscle Atrophy via Targeting IRS1. In: *International journal of biological sciences* 12 (10), S. 1213–1224.
- Zaiou, M.; El Amri, H.; Bakillah, A. (2018): The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. In: *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 28 (2), S. 91–111.
- Zechner, Rudolf; Zimmermann, Robert; Eichmann, Thomas O.; Kohlwein, Sepp D.; Haemmerle, Guenter; Lass, Achim; Madeo, Frank (2012): FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. In: *Cell metabolism* 15 (3), S. 279–291.
- Zhang, Liping; Pan, Jenny; Dong, Yanjun; Twardy, David J.; Dong, Yanlan; Garibotto, Giacomo; Mitch, William E. (2013a): Stat3 activation links a C/EBP $\delta$  to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass. In: *Cell metabolism* 18 (3), S. 368–379.

- Zhang, Yingying; Zhang, Mengying; Zhong, Min; Suo, Qifeng; Lv, Kun (2013b): Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. In: *International journal of molecular medicine* 31 (4), S. 797–802.
- Zhang, Zhenzhen; Wu, Song; Muhammad, Saeed; Ren, Qian; Sun, Chao (2018): miR-103/107 promote ER stress-mediated apoptosis via targeting the Wnt3a/ $\beta$ -catenin/ATF6 pathway in preadipocytes. In: *Journal of lipid research* 59 (5), S. 843–853.
- Zhao, Haiping; Wang, Jun; Gao, Li; Wang, Rongliang; Liu, Xiangrong; Gao, Zhi et al. (2013): MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation. In: *Stroke* 44 (6), S. 1706–1713.
- Zheng, Qiang; Chen, Changyu; Guan, Haiyang; Kang, Weibiao; Yu, Changjun (2017): Prognostic role of microRNAs in human gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. In: *Oncotarget* 8 (28), S. 46611–46623.
- Zimmermann, Robert; Strauss, Juliane G.; Haemmerle, Guenter; Schoiswohl, Gabriele; Birner-Gruenberger, Ruth; Riederer, Monika et al. (2004): Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5700), S. 1383–1386.