

**Autophagiemodulation und Sorafenibwirkung
in hepatischen Tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Fusco, Stefano**

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Pfannenberger

Tag der Disputation: 13.10.2016

Meiner Frau Christina

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	4
II. Abbildungsverzeichnis	6
III. Tabellenverzeichnis	8
IV. Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	15
1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)	15
1.1.1 Epidemiologie	15
1.1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und Pathogenese	18
1.1.3 Klinik des Hepatozellulären Karzinoms	24
1.1.4 Diagnostik des Hepatozellulären Karzinoms	26
1.1.5 Klassifikation der Leberfunktion und Stadieneinteilung des HCC	30
1.1.6 Therapie des HCC	35
1.2 Die HCC-Therapie mit Sorafenib als Multikinaseinhibitor	38
1.3 Sorafenib und Autophagie	41
1.4 Die Rolle der Autophagie im menschlichen Körper	42
1.5 Die Rolle der Autophagie in Tumoren	47
1.6 Fragestellung	52
2. Material und Methoden	53
2.1 Materialien	53
2.1.1 Laborchemikalien	53
2.1.2 Reagenzien	53
2.1.3 Zelllinien	54
2.2 Methoden	54
2.2.1 Zellkultur	54
2.2.1.1 Allgemeines	54
2.2.1.2 Auftauen von Zellen	55
2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen	55
2.2.1.4 Zellpassage	56
2.2.1.5 Zellzahlbestimmung nach Neubauer	56
2.2.2 Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay)	57

2.2.3 Sulforhodamin-B-Assay.....	58
2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	59
2.2.5 DNA-Laddering	60
3. Ergebnisse	62
3.1. Sorafenib-Konzentrationsreihen	62
3.2. Wirkung des Serum-Entzuges auf die Hepatomzelllinien-Proliferation ..	64
3.3. Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug im LDH-Assay	65
3.3.1 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in DMEM.....	65
3.3.2 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in HBSS Medium	72
3.4 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug im SRB-Assay	78
3.4.1 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in DMEM.....	78
3.4.2 Sorafenibwirkung in FCS-freiem HBSS-Medium	80
3.5 Die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin im LDH-Assay	81
3.6 Die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin im SRB-Assay	83
3.7 Mikroskopische Morphologie (Phasenkontrast und Hoechst-Färbung)...	85
3.8 „DNA-Laddering“ zum Nachweis von Apoptose.....	91
3.9 Wirkung von Autophagieinduktoren auf die Toxizität von Sorafenib	92
3.10 Wirkung von Autophagieinhibitoren auf die Toxizität von Sorafenib	93
4. Diskussion	97
4.1 Die Wirkung von FCS-Entzug auf Hepatomzelllinien.....	97
4.2 Die Wirkung von Sorafenib auf Hepatomzelllinien	99
4.3 Die Wirkung von Sorafenib unter FCS-Entzug in DMEM.....	101
4.4 Die Wirkung von Sorafenib unter FCS-Entzug in HBSS	101
4.5 Zellschutz durch Kombination von Sorafenib und 3-Methyladenin	102
4.6 Modulation der Wirkung von Sorafenib durch Autophagieinhibitoren ...	103
4.7 Modulation der Wirkung von Sorafenib durch Autophagieinduktoren ...	103
4.8 Schlussfolgerung	104
5. Zusammenfassung.....	106
6. Literaturverzeichnis	108
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	143
8. Danksagung.....	144
9. Curriculum vitae	145

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Weltweite regionale Unterschiede der Sterblichkeitsrate des HCC.....	16
Abb. 2 Entscheidungsbaum für die Diagnostik beim HCC (EASL-Kriterien)	29
Abb. 3 Therapiealgorithmus nach der BCLC-Klassifikation.....	38
Abb. 4 Strukturformel von Sorafenib	40
Abb. 5 Phasen des Autophagie-Signalweges.....	43
Abb. 6 Autohagosom-Lebenszyklus durch ATG-Konjugationssysteme.....	45
Abb. 7 Signalweg der Autophagie	46
Abb. 8 Signalweg der ATG bei der Regulierung der Autophagie.....	48
Abb. 9 Sorafenib-Konzentrationsreihe von HepG2 + Hep3B nach 48 h	63
Abb. 10 Sorafenib-Konzentrationsreihe von HepG2 + Hep3B nach 48 h.....	63
Abb. 11 Verdünnungsreihe des FCS im DMEM bei HepG2 nach 48 h	64
Abb. 12 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 +/- FCS	66
Abb. 13 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B +/- FCS.....	66
Abb. 14 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf PLC/PRF/5 +/- FCS	67
Abb. 15 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 +/- FCS	68
Abb. 16 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 +/- FCS	69
Abb. 17 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B +/- FCS.....	69
Abb. 18 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 +/- FCS	70
Abb. 19 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf PLC/PRF/5 +/- FCS	70
Abb. 20 Kinetik der LDH-Freisetzung von HepG2 mit Sorafenib in DMEM	71
Abb. 21 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 in DMEM oder HBSS ...	72
Abb. 22 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 in DMEM + HBSS	73
Abb. 23 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B in DMEM + HBSS.....	74
Abb. 24 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf PLC/PRF/5 in DMEM + HBSS .	75
Abb. 25 Kinetik der LDH-Freisetzung von HepG2 mit Sorafenib in DMEM	76
Abb. 26 Unterschiede der HBSS-Wirkung +/- FCS bei HepG2	77
Abb. 27 Proliferation von HepG2 bei Sorafenib +/- FCS nach 48 h.....	78
Abb. 28 Proliferation von Hep3B bei Sorafenib +/- FCS nach 48 h.....	79
Abb. 29 Proliferation von HepG2 bei Sorafenib in DMEM/HBSS nach 24 h.....	80
Abb. 30 Proliferation von Hep3B bei Sorafenib in DMEM/HBSS nach 24 h.....	81

Abb. 31 24-stündige Inkubation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA	82
Abb. 32 24-stündige Inkubation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM/HBSS.....	83
Abb. 33 Proliferation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM ohne FCS ..	84
Abb. 34 Proliferation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM + FCS	85
Abb. 35 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in DMEM + FCS 10%	86
Abb. 36 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib ohne FCS	87
Abb. 37 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in DMEM + 10% FCS	88
Abb. 38 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 in DMEM +/- Sorafenib ohne FCS.....	89
Abb. 39 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in HBSS ohne FCS.....	90
Abb. 40 DNA-Laddering von HepG2 mit Sorafenib + DMEM nach 48 h.....	91
Abb. 41 Wirkung von Sorafenib, Lithiumchlorid und Rapamycin auf HepG2....	92
Abb. 42 Proliferation von HepG2 in DMEM mit Sorafenib + Wortmannin.....	93
Abb. 43 Proliferation von HuH7 in DMEM mit Sorafenib + Wortmannin	94
Abb. 44 Proliferation von HepG2 in DMEM mit Sorafenib + Chloroquin.....	95
Abb. 45 Proliferation von HuH7 in DMEM mit Sorafenib + Chloroquin.....	95

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Risikofaktoren für das HCC in ausgewählten Ländern	20
Tab. 2 Bekannte Risikofaktoren, die zu einem HCC führen können.....	21
Tab. 3 TNM-Klassifikation des HCC nach der UICC	31
Tab. 4 UICC-Stadieneinteilung des HCC	31
Tab. 5 Child-Pugh-Stadien mit 1-JÜR	32
Tab. 6 Child-Pugh-Score bei Leberzirrhose	32
Tab. 7 Stadieneinteilung des HCC gemäß der BCLC-Klassifikation	33

IV. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
1-JÜR	Ein-Jahresüberlebensrate
2-JÜR	Zwei-Jahresüberlebensrate
3-JÜR	Drei-Jahresüberlebensrate
3-MA	3-Methyladenin
5-JÜR	Fünf-Jahresüberlebensrate
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
µMol	Mikromol
AASLD	American association for the study of liver diseases
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFL	alkoholische Fettleber
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Angiografie
AIH	Autoimmunhepatitis
Akt	Synonym für Proteinkinase B
al.	andere
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated kinase
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ASH	alkoholische Steatohepatitis
ATG	autophagy related gene
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BCL-X _L	B-cell lymphoma extra large

bidest.	zweifach destilliert
BSA	bovine serum protein
BSC	best supportive care
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Karzinom
CBBC	Coomassie Brilliant Blau G-250
CD95	cluster of differentiation 95
CE-US	contrast enhanced ultrasound (s. KM-Sono)
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor (synonym CD117)
CLIP	Cancer of the Liver Italian Program
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS	Child-Pugh-Score
CT	Computertomografie
ctrl.	Kontrolle
dl	Deziliter (100 cm ³)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRAM	damage-regulated autophagy modulator
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epithelial growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK-1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
etc.	et cetera
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm oder Gravitation

GIDEON	global investigation of therapeutic decisions in hepatocellular carcinoma and of its treatment with sorafenib
h	Stunde
HBcAG	Hepatitis-C-core-Antigen
HBeAG	Hepatitis-B-envelope Antigen
HBsAG	Hepatitis-B-surface Antigen
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBV	Hepatitis-B-Virus oder Virushepatitis B
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus oder Virushepatitis C
HE	hepatische Enzephalopathie
Hep3B	bestimmte humane Hepatomzelllinie
HepG2	bestimmte humane Hepatomzelllinie
inkl.	inklusive
INR	International Normalized Ratio
JIS-Score	Japan Integrated Staging Score
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
KM-Sono	Kontrastmittel verstärkte Sonografie
KS	Konjugationssystem
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LiCl	Lithiumchlorid
LKB1	liver kinase B1
ln	Logarithmus naturalis
LR	Leber(teil)resektion
LT	Lebertransplantation
LZ	Leberzirrhose
m	männlich
max.	maximal
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

Mcl-1	myeloic cell leukemia-1
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MELD	model for end-stage liver disease
mg	Milligramm
mind.	mindestens
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter (cm ³)
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	metabolisches Syndrom
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NaCl	Natriumchlorid
NAFL	nicht-alkoholische Fettleber
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCCN	national comprehensive cancer network
NF-κB	nuclear factor kappa of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nrf2	nuclear factor-like 2
NSCLC	non-small cell lung cancer
NW	Nebenwirkung
OLT	orthotope Lebertransplantation
OR	Odds Ratio
p.	probability
p53	Tumorsuppressorgen p53
p62	Nucleoporin p62

PAT	perkutanes ablatives Therapieverfahren
PBC	primäre biliäre Zirrhose
PBS	phosphate buffered saline
PCD	programmierter Zelltod
PDGF	platelet-derived growth factor receptor
PDGFR	platelet-derived growth factor
PEI	perkutane Ethanolinstillation
pH	potentia hydrogenii
PH	portale Hypertonie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC δ	Proteinkinase C delta
PLC/PRF/5	bestimmte Hepatomzelllinie
PLGF	placental growth factor
PPW	positiver prädiktiver Wert
PS	s. PST
PST	Performance Status Test
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAF-1	Serin/Threonin-Proteinkinase
RAS	G-Protein aus Rat sarcoma
RECIST	response evaluation criteria in solid tumours
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reactive oxygen species
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SE	standard exception
SHARP	Sorafenib HCC assessment randomized protocol
siRNA	small interfering RNA
SIRT	selektive interne Radiotherapie
SOFIA	sorafenib italian assessment
sog.	sogenannt
SRB	Sulforhodamin B

Tab.	Tabelle
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TCA	Trichloressigsäure
TGF	transforming growth factor
TNM	Tumorklassifikation der WHO
TSC1/2	tuberous sclerosis protein 1/2
u. a.	unter anderem
UCSF	University of California, San Francisco
UICC	Union internationale contre le cancer
ULK1	uncoordinated-51-like kinase 1
ULK 2	uncoordinated-51-like kinase 2
US/USA	United States of America
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
V.	Vena
VEGF	vascular epithelial growth factor
VEGFR	vascular epithelial growth factor receptor
VH	Venae hepaticae
VP	Vena porta
vs.	versus
Vv.	Venae
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
WT	Wortmannin
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Primäre Lebertumore unterteilt man je nach Ursprungsgewebe in epitheliale, mesenchymale und gemischte Tumore. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine Entität der primären Lebertumoren. Es handelt sich hierbei um einen epithelialen malignen Tumor, der in unterschiedlichen Formen auftreten kann. So sind solitäre, multizentrische als auch infiltrierende Formen bekannt. Der Metastasierungsweg kann hämatogen und/oder lymphogen sein. Von der Metastasierung sind folgende Organe in absteigender relativer Häufigkeit betroffen: Lunge (39-55%), Lymphknoten (34-53%), Knochen (25-38%), Nebennieren (8-11%), Peritoneum (11%) und Gehirn (1-2%) [1-8].

Die Manifestationsrate extrahepatischer Metastasen des HCC beträgt 5 Jahre nach Diagnosestellung laut Kanda et al. 13% [9].

Die meisten malignen Lebertumore (90%) sind sekundär und somit Lebermetastasen von Primarien extrahepatischer Herkunft [10]. Unter den primären Lebermalignomen stellt das HCC mit einem Anteil von 75-90% die Hauptentität dar [11-18]. In der überwiegenden Anzahl aller Fälle (80-90%) entwickelt sich das HCC aus einer vorbestehenden Leberzirrhose unterschiedlicher Genese [19-21].

1.1.1 Epidemiologie

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt heutzutage zu den sechs häufigsten malignen Tumorentitäten weltweit. Geschlechtsbezogen ist das HCC die fünft-häufigste Karzinomentität bei Männern und die siebthäufigste bei Frauen [22-24]. Die Inzidenz beläuft sich in Europa und den USA auf etwa 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, während sie in Afrika und Asien 20-35/100.000 Einwohner jährlich beträgt [23, 24]. In der Gruppe der 75-84-jährigen Asiaten und Pazifikinselnbewohnern erreichte die Inzidenz in den Jahren 2003-2005 sogar Werte von 83/100.000 pro Jahr [25]. Damit weist das

HCC global die dritthäufigste Malignom-bedingte Mortalität auf, bei Männern steht das HCC dabei sogar an zweiter Stelle [23, 24, 26]. Das HCC macht europaweit 5,6-7,5% aller Krebsentitäten aus [27, 28]. Gemessen an den primären Lebermalignomen befindet sich das HCC mit bis zu 90% an erster Stelle [11-17]. Im Jahre 2008 standen weltweit 748.000 HCC-Neuerkrankungen 696.000 HCC-Todesfällen gegenüber. Das entspricht einer jährlichen Mortalitäts-Inzidenz-Ratio von 0,93. Das Geschlechterverhältnis beträgt global in etwa m:w = 2,4:1 [23]. In einigen europäischen Ländern liegt das Geschlechterverhältnis deutlicher auf der männlichen Seite: Italien und Frankreich haben eine Männer-Frauen-Ratio von 4:1, die Schweiz gar ein Verhältnis von 5:1 [29].

Allein 77% aller HCC-Neuerkrankungen stammen aus dem Hochinzidenzgebiet Ost- und Südasiens. Auch die afrikanischen Länder südlich der Sahara zählen zu den Hochprävalenzgebieten. Allein in China kommen bereits etwa 50% der weltweiten HCC-Fälle vor [23].

Einen Überblick über die globale Mortalität des HCC gibt Abb. 1.

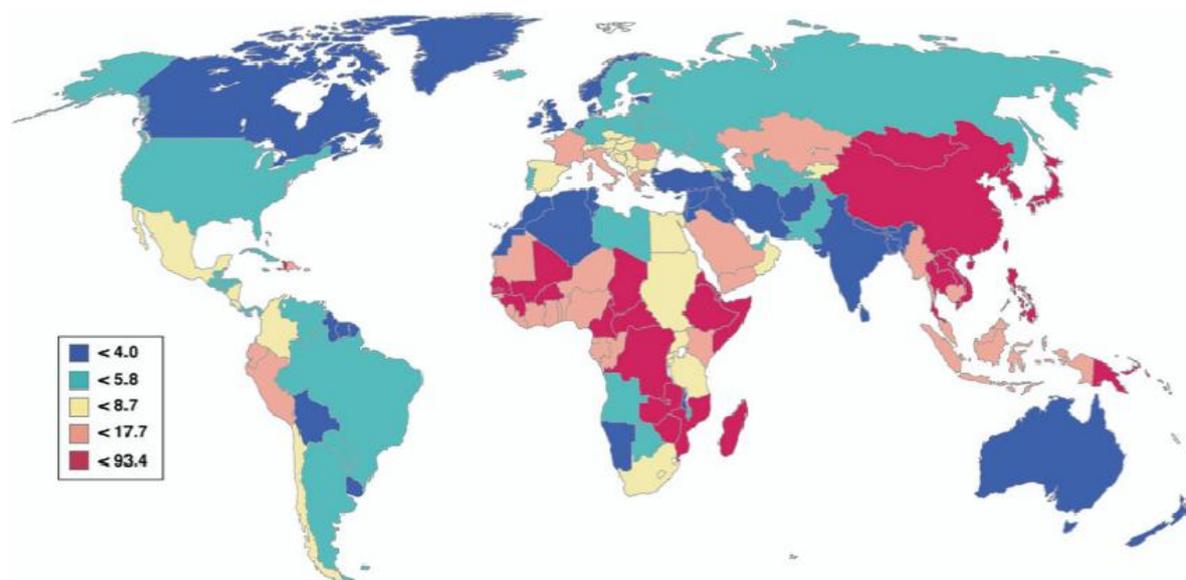


Abb. 1 Weltweite regionale Unterschiede der Sterblichkeitsrate des HCC Klassifiziert nach alters-standardisierten Sterberaten. Die Raten werden pro 100.000 Personen angegeben [30].

Die geographische Häufigkeitsdifferenz zwischen Hoch- und Niedrigprävalenzgebieten scheint weniger auf ethnischen oder genetischen Ursachen in der Bevölkerung zu beruhen, als vielmehr auf einer unterschiedlichen geographischen Distribution der klassischen HCC-Risikofaktoren.

Die hohe Prävalenz von Hepatitis-Virus-Infektionen sowie das Vorkommen von Aflatoxinen als Nahrungskarzinogenen wird als Ursache für die höhere Rate von HCC-Erkrankungen in Ostasien und Afrika (Hoch-Risiko-Gebiete) gegenüber europäischen und nordamerikanischen Prävalenzgebieten angenommen [31].

Zu beobachten ist aktuell eine rückläufige Inzidenz des HCC in Entwicklungsländern, möglicherweise als Folge der etablierten HBV-Impfungen, bei tendenziell steigender Inzidenz in den USA, in Europa und in Australien als Folge einer HCV-Infektionswelle, die überwiegend auf intravenösen Drogenabusus zurückzuführen ist [32-37]. Des Weiteren kommen auch die Fettlebererkrankungen und -hepatitiden (namentlich die nicht-alkoholische Steatohepatitis [NASH] und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung [NAFLD]) in Europa und in den USA als progrediente Inzidenzfaktoren für das HCC in Betracht [38-41].

Der Altersgipfel für die Erstdiagnose eines HCC beträgt 55-59 Jahre in China, 63-65 Jahre in Europa und Nordamerika und über 75 Jahre in Niedriginzidenzgebieten wie Ozeanien [42]. Im Anfangsstadium eines HCC liegt die durchschnittliche Überlebensrate ohne Therapie bei 6-9 Monaten, während weit fortgeschrittene HCC-Stadien im Durchschnitt 1-2 Monate ohne Therapie überlebt werden [43]. Bei Vorliegen eines HCC mit einem Child-Pugh-C-Status beträgt die durchschnittliche Überlebensrate lediglich 3-4 Monate [44]. In einem australischen Probandenkollektiv erhöhte sich die mittlere Überlebensrate des HCC von 10,4 im Erhebungszeitraum von 1993-1997 auf 18,4 Monate im Zeitfenster von 1998-2002. Seit 2003 stagniert die mittlere Überlebensrate bei 18,1 Monaten [45]. Die Überlebensraten des HCC divergieren in der Literatur erheblich, was sich überwiegend aus dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad und den unterschiedlichen Ursachen des HCC ergibt.

Die Ein-Jahres-Überlebensrate des HCC stieg laut Altekruse et al. in den USA von 25% in den Jahren 1992-1993 auf 47% in den Jahren 2003-2005 an [25]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt hingegen weiterhin niedrig bei ungefähr 7-8% [46, 47]. Eine Metaanalyse von Cabibbo et al. liefert deutlich niedrigere weltweite Überlebensraten: Die Ein-Jahres-Überlebensrate (1-JÜR) für das HCC beläuft sich auf 17,5%, während die Zwei-Jahres-Überlebensrate (2-JÜR) 7,3% beträgt [48]. Simard et al. zeigen einen Anstieg der Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) in der US-Bevölkerung. Während die 5-JÜR 1992-1995 für Leberkarzinome in den USA bei ca. 12% lag, konnte im Zeitfenster 2000-2007 ein Anstieg der 5-JÜR auf 26% verzeichnet werden [49]. Pichlmayr et al. belegen eine 1- bzw. 5-JÜR bei HCC aufgrund einer Leberzirrhose (LZ) von 52% bzw. 24% ohne Therapie gegenüber 83% bzw. 60% bei erfolgter orthotoper Lebertransplantation [50]. Patienten, die an einem HCC erkrankt sind und die festgelegten Mailand-Kriterien (s. Kap. 1.1.5) erfüllen, können aufgrund des kurativen Ansatzes eine 5-JÜR von 50-75% erreichen [44, 51-54].

1.1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und Pathogenese

Es existieren verschiedene Präkanzerosen und Risikofaktoren für die Begünstigung der Entwicklung eines HCC. Sie können für sich alleine oder auch in der Kombination zur Bildung des HCC beitragen [55].

Ätiologisch sind ungefähr 80-90% aller HCC auf eine vorbestehende Leberzirrhose zurückzuführen [17, 19, 21, 56-61]. Die hierfür häufigsten Ursachen sind regional unterschiedlich, jedoch sind global die Virushepatitiden B und C, sowie die äthyltoxische Pathogenese führend in der Hepatokarzinogenese primärer Lebermalignome [62], wie Tab. 1 zu entnehmen ist. Als weitere, jedoch seltenere Risikofaktoren eines HCC sind Leberzirrhosen anderer Ätiologien, wie das Aflatoxin B₁ des *Aspergillus flavus* und die hereditäre Hämochromatose sowie der Morbus Wilson und der Alpha-1-Antitrypsinmangel zu nennen [20, 43, 63], siehe hierzu Tab. 2. Auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis, sowie Adipositas und Diabetes mellitus zählen zu

den Komponenten, die einen Einfluss auf die Bildung einer Leberzirrhose und sukzessive eines HCC haben [42, 64, 65]. Bei Vorliegen der Komorbiditäten eines Diabetes mellitus und einer chronischen HBV-Infektion ist das HCC ebenfalls signifikant erhöht [65].

Durch die Virushepatitiden B und C wird das Risiko an einem HCC zu erkranken weltweit um den Faktor 20 erhöht [66]. Bei der HBV-Infektion kommt es bei serologischem Nachweis des HBsAg zu einem 9,6-fachen Risiko für die Entstehung eines HCC; sind sowohl HBsAg als auch HBeAg positiv im Blut, so ist das HCC-Risiko 60-fach erhöht [67]. Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion haben Franceschi et al. zufolge eine bis zu 30-fache Risikoerhöhung bezüglich der Bildung eines HCC als Nicht-HBV-Infizierte. Einige Studien weisen eine 100-fache Erhöhung des HCC-Risikos unter HBV-Einfluss auf [68]. Die Untersuchung von indischen Probanden mit und ohne Vorliegen eines HCC erbrachte ein 40-fach erhöhtes Risiko für die Bildung eines HCC bei dem Nachweis irgendeines positiven serologischen HBV-Markers und ein 5-fach erhöhtes HCC-Risiko für HCV-Infektionen [60]. Sun et al. weist ein 3,6-fach erhöhtes Risiko für die Bildung eines HCC bei chronischer HCV-Infektion und eine 16-fache Risikoerhöhung für ein HCC bei positivem HBsAg nach [69]. Liegt eine Komorbidität aus Diabetes mellitus und einer chronischen HCV-Infektion vor, so steigt die 5-Jahresinzidenz für die Entwicklung eines HCC von 5% bei alleiniger HCV-Infektion auf 11,4% an [70]. Eine chronische Koinfektion sowohl mit HBV als auch mit HCV weist mit einer Odds Ratio (OR) von 165 einen erheblich höheren Wert auf, verglichen mit den OR für die Monoinfektion mit HBV (OR 22,5) oder HCV (OR 17,3) [66].

Die jährliche Inzidenzrate bei Leberzirrhose an HCC zu erkranken beträgt laut Lau et al. und Montalto et al. etwa 2-7% [13, 43]. Sangiovanni et al. kommen auf ähnliche Jahresinzidenzraten von 3-5%, wobei etwa jeder dritte Patient mit Leberzirrhose im Laufe seines Lebens ein HCC erleiden wird [71].

57% aller Leberzirrhosen sind durch Virushepatitis B (HBV) (30%) oder Virushepatitis C (HCV) (27%) bedingt. Als Hauptätiologien des HCC sind mit

78% der Fälle die HBV- (53%) und HCV-Infektion (25%) zu nennen [46]. Dabei gibt es weltweit regionale Unterschiede der Ätiologien der Leberzirrhosen.

Etwa 25% der chronischen HBV-Infektionen münden mit oder ohne Ausbildung einer Leberzirrhose (LZ) in ein HCC [72].

Bosch et al. gehen von 50-55% HBV und 25-30% HCV assoziierten HCC-Fällen aus [73]. Regional sowie interkontinental differiert die Genese des HCC bedeutend. In Europa und Nordamerika steht die HCV-Infektion als Ursache der neu auftretenden HCC-Fälle an erster Stelle, während in den meisten asiatischen Ländern sowie in Afrika die HBV-Infektion als HCC-Ursache dominiert [62]. Dies ist auf die hohen Durchimpfungsraten mit den HBsAg-Vakzinen in den Industriestaaten zurückzuführen, bei denen die Inzidenz der HBV bedingten HCC-Fälle deutlich verringert werden konnte [74].

Risikofaktor	Risikoschätzung und Risikospanne		
	Europa/USA (%)	Japan (%)	Afrika/Asien (%)
Hepatitis B	22 (4–58)	20 (18–44)	60 (40–90)
Hepatitis C	60 (12–72)	63 (48–94)	20 (9–56)
Alkohol	45 (8–57)	20 (15–33)	– (11–41)
Andere/NASH	< 5	unbekannt	< 5

Tab. 1 Risikofaktoren für das HCC in ausgewählten Ländern
Die Tabelle ist nach Bosch modifiziert [62].

Betrachtet man die 5-Jahresinzidenzrate des HCC bei Patienten mit vorbekannter Leberzirrhose, so entwickeln Patienten bei einer HCV-Infektion als Kausalität der Leberzirrhose in bis zu 30% der Fälle binnen 5 Jahren seit Bestehen der Leberzirrhose ein HCC [20, 75]. Laut einer anderen Studie sind es ungefähr 20% der chronischen HCV-Infektionen, die in eine Leberzirrhose münden, wovon weitere 2-8% jährlich zum HCC entarten [76, 77]. Eine andere Studie geht von einer HCV bedingten Entstehung einer Leberzirrhose nach 25-30 Jahren von 15-35% aus [78]. Bei HBV assoziierten LZ beläuft sich die jährliche HCC-Entartung auf 2%, während es bei HCV assoziierten LZ jährlich in 3-8% der Fälle zum HCC kommt [79].

Bei den HBV bedingten Leberzirrhosen liegt die 5-Jahresinzidenz für die Entstehung eines HCC bei 15%-25%; für die nicht-zirrhosen HBV assoziierten HCC-Fälle beträgt die 1-Jahresinzidenz dagegen 0,5% [68].

Somit weist das HCV eine höhere Entartungsrate bei Leberzirrhosen auf als es bei HBV der Fall ist.

In Japan, Europa, Lateinamerika und den USA ist eine chronische HCV-Hepatitis die Hauptursache für das HCC. In China und den Subsaharastaaten Afrikas macht hingegen die chronische HBV-Hepatitis die häufigste Entität unter den HCC-Erkrankungen aus [80].

Haupttrisikofaktoren, die mit dem HCC assoziiert sind:

- | | |
|--------|---|
| a) 80% | Leberzirrhose oder fortgeschrittene Leberfibrose, <ul style="list-style-type: none">- HBV-Infektion- HCV-Infektion- Alkohol- NASH- Angeborene Erkrankungen:<ul style="list-style-type: none">• Hämochromatose• Morbus Wilson• α_1-Antitrypsinmangel- PBC- Betel-Nüsse |
| b) 20% | Ohne Leberzirrhose <ul style="list-style-type: none">- HBV-Infektion- NASH- Aflatoxin B₁ |

Tab. 2 Bekannte Risikofaktoren, die zu einem HCC führen können
Die Tabelle ist nach Bosch modifiziert [62].

21% beträgt das HCC-Risiko bei Hämochromatose als Ätiologie der Leberzirrhose [81], 8% bei den alkoholischen Leberzirrhosen und lediglich jeweils 4% bei den primären biliären Zirrhosen (PBC) und den Autoimmunhepatitiden (AIH). Der Morbus Wilson spielt bei einer 5-

Jahresinzidenzrate von 0,5% unter den Leberzirrhosen nur eine untergeordnete Rolle als Entität der HCC-Ätiologie [20, 75, 82, 83].

Bei chronischem Alkoholabusus mit einer täglich konsumierten Alkoholmenge von ≥ 80 g/Tag bildet sich in 10-35% der Fälle eine alkoholische Steatohepatitis (ASH), hiervon entwickeln sich 10-20% zu einer LZ, die in weiteren 10% zu einem HCC entarten [84]. Andere Studien zeigen einen ähnlichen Trend, bei dem unter chronischem Alkoholkonsum in bis zu 30% der Fälle eine alkoholische Leberfibrose und in 10-20% eine LZ entsteht, die mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2% der Fälle ein HCC initiieren kann [61, 85]. Eine US-Studie wies ein 7,7-fach erhöhtes HCC-Risiko unter Alkoholeinfluss lediglich für das weibliche Geschlecht nach [86]. Eine italienische Studie konnte eine Signifikanz des Alkohols als Ätiologie für ein HCC lediglich bei mittlerweile abstinenten Personen feststellen (OR 4), während Personen mit fortwährendem Alkoholkonsum keine Signifikanz bezüglich eines HCC-Risikos aufwiesen [87].

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis als weitere Ursache eines HCC entwickelt sich in bis zu 20% der Fälle in eine Leberzirrhose weiter, die wiederum den Ausgangspunkt für ein mögliches HCC darstellt [88]. Die NASH bedingten Leberzirrhosen bilden in 2,6% der Fälle ein HCC [89]. Es sind jedoch auch Fälle eines NASH bedingten HCC in der Literatur berichtet, die ohne vorliegende LZ entstanden sind [90, 91].

Während bei den meisten der genannten HCC-Ätiologien eine Leberzirrhose als Vorstufe zum HCC auftritt, erfolgt bei der chronischen HBV-Infektion die Hepatokarzinogenese auch unabhängig vom Vorliegen einer Leberzirrhose durch Integration der HBV-DNA in das Genom der Hepatozyten [75, 92]. Auch die Entstehung des HCC bedingt durch Aflatoxin B₁ kann unter Umgehung einer Leberzirrhose durch Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen direkt kanzerogen wirksam sein. Vor allem die Kombination aus HBV-Infektion und Aflatoxin-B₁-Ingestion wirkt dabei synergistisch [93].

Kontrovers diskutiert wird der Tabakkonsum als weitere unmittelbare bzw. mittelbare Ätiologie des HCC. Einige Studien weisen auf ein erhöhtes Risiko hin an HCC zu erkranken, wenn man Tabak raucht; dies unabhängig vom HBV-Status [62] [94]. An einem Probandenkollektiv aus Shanghai wurde eine signifikant erhöhte OR von Rauchern gegenüber Nichtrauchern bezüglich des Auftretens eines HCC nachgewiesen. Die OR betrug unabhängig von der Anzahl der „pack years“ 1,9-4,9 [95, 96]. Eine US-Studie konnte eine signifikante Tabak-assoziierte Erhöhung des HCC-Risikos lediglich beim männlichen Geschlecht nachweisen. Die ermittelte OR betrug 1,9 für die Entwicklung eines HCC unter regelmäßigem Tabakkonsum. Des Weiteren zeigte dieselbe Studie, dass es einen synergistischen Effekt bei der Risikoerhöhung des HCC bei Kombination aus Tabakkonsum und chronischer HCV-Infektion gab. Hierfür konnte eine OR von 136 ermittelt werden [86].

Keine Signifikanz zwischen Rauchern und Nichtrauchern für das Risiko an einem HCC zu erkranken erbrachte eine Studie von Siegel et al., die eine Probandenkohorte aus den USA untersuchte [97]. Auch Franceschi et al. konnten bei einer italienischen Studie keine Signifikanz für eine durch Tabakkonsum bedingte Risikoerhöhung bei der Entstehung eines HCC nachweisen [87]. Sun et al. bestätigte in einer taiwanesischen Studie die mangelnde Signifikanz beim Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und der Entwicklung eines HCC [69].

Der Verzehr von sogenannten Betel-Nüssen, die im asiatischen Raum weit verbreitet sind gilt ebenfalls als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer Leberzirrhose und sukzessive eines HCC [98]. So beträgt die OR für die Entwicklung eines HCC beim Kauen von Betel-Nüssen 3,5-5,8 bei Probanden mit nicht-zirrhöser Leber und 1,6 bei Probanden mit LZ [99, 100]. Der Genuss von Betel-Nüssen wirkt sich bei vorliegender chronischer HBV- oder HCV-Hepatitis synergistisch auf die Entstehung einer LZ aus. Der Synergie-Index beträgt bei ständigem Kauen von Betel-Nüssen und chronischer HBV-Hepatitis 5,3 und bei regelmäßigem Kauen von Betel-Nüssen und chronischer HCV-Hepatitis 1,6 [101]. Eine Studie aus Taiwan konnte hingegen keine

Kausalität zwischen Betel-Nüssen und dem Vorkommen von HCC feststellen [69].

Seit langem wird diskutiert, ob Faktoren des metabolischen Syndroms (MS), hierzu zählen die arterielle Hypertonie, die Hyper- und Dyslipidämie, die abdominelle Adipositas und die Insulinresistenz, ätiologisch mit der Hepatokarzinogenese in Verbindung stehen [102]. Eine Studie kommt zu diesem Schluss, wenn mindestens zwei Faktoren des metabolischen Syndroms zeitgleich vorliegen [103]. Andere Studien zeigten einen kausalen Zusammenhang zwischen HCC und dem MS lediglich bezüglich den Faktoren Adipositas und Diabetes mellitus in einer Kohorte mit HCV-positiven Serologien [104].

Der Zusammenhang zwischen dem erhöhten Risiko für die Neubildung eines HCC und dem gemeinsamen Vorliegen von Adipositas und Diabetes mellitus besteht über die Entstehung einer NAFL bzw. einer NASH [105-107]. Dabei kann es in Einzelfällen wohl auch ohne die Entwicklung einer LZ direkt zum HCC kommen [108].

Bei Patienten mit HCV- und HBV-negativen Serologien ließ sich ein höheres (6-fach vs. 4-fach) HCC-Risiko feststellen, wenn mindestens zwei Kriterien, die das metabolische Syndrom definieren, vorlagen [103].

1.1.3 Klinik des Hepatozellulären Karzinoms

Eine pathognomonische Symptomatik ist beim HCC leider nicht zu verzeichnen. Auch sind Frühsymptome untypisch, sodass ohne (akzidentielle) Diagnose eines HCC infolge auffälliger laborchemischer Parameter z. B. im Rahmen von ärztlichen Check-Up-Untersuchungen oder von Sonografie-Untersuchungen bei vorbekannter Leberzirrhose oder bekannter HBV- bzw. HCV-Infektion, vorliegende Symptome erst in Spätstadien des HCC auftreten [109]. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch kurative Maßnahmen meist nicht mehr zugänglich. Die 5-JÜR liegt dann nach einer älteren Arbeit bei höchstens 10% [12].

Bei Patienten, die am HCC erkrankt sind können Symptome auftreten, die meist der Grunderkrankung Leberzirrhose geschuldet sind. So können bei diesen Patienten Symptome wie z.B. (Therapie refraktärer) Aszites, Ikterus, Pruritus, eine hepatische Enzephalopathie, hypoalbuminämische Ödeme, ein hepatorenales Syndrom sowie ein hepatopulmonales Syndrom, aber auch eine Portalvenenthrombose oder eine Leberventhrombose auftreten [110-112].

Unspezifische, jedoch direkt Tumor (HCC) bedingte Symptome sind drückende Oberbauchschmerzen infolge des Tumorwachstums, meist als Folge der Leberkapselspannung [110, 113, 114]. Als klinisches Zeichen ist dabei die palpable derb-harte subcostale Tumormasse zu nennen, die bei peripher-hepatischer Lokalisation des HCC bzw. bei Leberkapsel nahem HCC-Wachstum zum Tragen kommen kann [115]. Die klassische B-Symptomatik, bestehend aus Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von mehr als 10 % binnen 6 Monaten, ist beim HCC selten [116]. Blutungskomplikationen im Sinne einer Ösophagusvarizenblutung aufgrund einer bestehenden portalen Hypertension durch direkte Tumorkompression der Vena portae oder bedingt durch den zirrhotischen Leberumbau sowie bei vorliegender paraneoplastischer Portalvenenthrombose können lebensbedrohlich und dementsprechend auch ein limitierender bzw. prognostischer Faktor des HCC sein [117-119].

In einer Studie von Alswat et al. galten die Portalvenenthrombose, die portale Hypertonie (PH), das Vorliegen von Aszites, die hepatische Enzephalopathie (HE), ein fortgeschrittener Child-Pugh-Score, sowie eine Bilirubin-Konzentration von $> 22 \mu\text{mol/l}$ und ein INR-Wert $> 1,2$ als signifikant und prognostisch ungünstige und unabhängige Prädiktoren bezüglich der HCC-Überlebensrate [109]. Leerapun et al. sehen die Portalvenenthrombose als signifikanten und unabhängigen letalen Prädiktor des HCC [120].

Typische prognostisch ungünstige Symptome, klinische Zeichen oder bildgebende Zeichen des HCC sind laut Jia et al. die Tumordinvasion in die Lebervenen (VH) und in die Gallengänge, die unbehandelte Portalvenen-Tumorthrombose, die intrahepatische Tumorausbreitung über beide Leberlappen und ein Child-Pugh-Score C [121]. Eine direkte (letale) Tumorblutung bei Leberkapselruptur ist eher selten. Als weitere Spätsymptome

können Pruritus, Depression, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, und Leistungsminderung, Übelkeit und Erbrechen, sowie die Tumorkachexie auftreten und die Lebensqualität des Patienten erheblich beeinträchtigen [116, 117, 122-125].

Eine italienische Studie untersuchte die Symptome bei 461 Patienten mit diagnostiziertem HCC, die zur OLT geplant waren und auf die entsprechende Warteliste gesetzt wurden. Dabei kam folgende Symptomverteilung zustande: 23% asymptomatisch, 32% abdominelle Schmerzen, 9% Unwohlsein, 8% Fieber, 8% Aszites, 8% Ikterus, 6% Anorexie, 4% Gewichtsverlust, 4% Blutungen und 2% Enzephalopathie. Hierbei war eine Mehrfachnennung der Symptome möglich [126].

1.1.4 Diagnostik des Hepatozellulären Karzinoms

Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein Tumormarker, welcher bezüglich des HCC eine Sensitivität von 40-70%, eine Spezifität von 76-91% sowie einen positiven prädiktiven Wert (PPW) von 9-32% aufweist [43, 127]. Es ist ein embryonales Protein, dessen Bildung und Blutkonzentration postpartum deutlich herunterreguliert wird. Dabei gibt es inter- und intrakontinental sehr große Schwankungen. Die höchste Sensitivität hat AFP als Tumormarker in den Subsaharastaaten Afrikas mit einer Rate von 90%. In China beträgt die Sensitivität etwa 75%, während man in den Industriestaaten eine AFP-Erhöhung in gerade mal 55% der HCC-Fälle beobachten kann [128]. Die Spezifität von AFP betrug bei einem cut-off-Wert der Blutkonzentration von 20 ng/ml ca. 70-80% [129, 130], bei einem Wert von 500 ng/ml betrug die Sensitivität des AFP 50% und die Spezifität 90% [131].

Dabei ist das AFP aufgrund der eingeschränkten Sensitivität weniger als Primärdiagnostikum, als vielmehr als Verlaufsparemeter geeignet [132]. So spricht ein initial hohes AFP bei diagnostiziertem HCC, ein Abfallen der Serumkonzentration desselben nach Radiofrequenzablation oder Resektion

und ein sodann im Verlauf erneutes Ansteigen des AFP-Spiegels z. B. für ein HCC-Rezidiv [133]. Das AFP für sich allein genommen reicht demzufolge nicht als Primärdiagnostikum aus. Einige Autoren plädieren mangels hoher Sensitivität und Spezifität sogar ganz auf die Bestimmung der AFP-Serumkonzentrationen zu verzichten [134].

Weitere Diagnostikverfahren zur Detektion eines HCC sind die Sonografie (mit und ohne Kontrastmittel), die Kontrastmittel-Computertomografie (CT) und die Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie (MRT) [135, 136].

In allen drei Verfahren typisch ist zum einen das klassische „wash-out“ Phänomen des HCC in der portalvenösen Phase, bei der das eingesetzte Kontrastmittel (nahezu) komplett aus dem HCC-Herd ausgeschwemmt bzw. ausgewaschen wird, sowie die anschließende relative Kontrastumkehr zum umgebenden (gesunden) Leberparenchym und zum anderen die in der arteriellen Phase der Aufnahme bestehende arterielle Hypervaskularisation [136-144]. Letztere hängt mit der durch VEGF induzierten Angiogenese zusammen und der letztendlich nahezu ausschließlichen arteriellen Blutversorgung der HCC Herde [145-148]. Die Sensitivität bzw. Spezifität für das Vorliegen der arteriellen Hypervaskularisation mit anschließendem „wash-out“ Phänomen in der portalvenösen Phase in nur einer der beiden radiologischen Modalitäten (CT, MRT) werden laut Serste et al. auf 96% bzw. 100% beziffert [149]. Andere Studien belegen ähnliche Raten an Sensitivität bzw. Spezifität von bis zu 89% bzw. 94-100% für die CT-Untersuchung und von 60-90% bzw. 52-100% für die MRT-Untersuchung [137, 138, 141, 149-157].

Bei suspekten Leberherden von einer diametralen Größe > 2 cm ist die HCC-Diagnose erfolgt, wenn in zwei unterschiedlichen bildgebenden Modalitäten (CT, MRT) die arterielle Hypervaskularisation desselben vorliegt [158, 159]. Alternativ kann bei fehlendem typischem Kontrastverhalten oder Läsionen die kleiner als 2 cm sind die Leberzielpunktion zur Gewinnung einer Leberstanzbiopsie die erforderliche Diagnose bestätigen.

HCC-verdächtige Leberherde mit einem maximalen Durchmesser von < 1 cm sind denselben radiologischen Modalitäten, bezüglich der typischen, oben genannten Vaskularisationsmuster, meist nicht zugänglich. In diesen Fällen bedarf es hinsichtlich einer sicheren HCC-Diagnose ausnahmslos der bioptischen Sicherung, sei es als zytologisch verwertbare Feinnadelpunktion oder als histologisch verwertbare Leberstanze, was aufgrund der geringen Größe je nach Tumorage schwierig sein kann.

Die sog. EASL-Kriterien erlauben, bei mind. 2 cm durchmessenden HCC-suspekten Läsionen, die Diagnose eines HCC durch zwei unabhängige bildgebende Verfahren (CT und MRT) zu sichern, sofern es sich um eine zirrhotisch veränderte Leber handelt [160, 161]. Werden zur Diagnosesicherung die MRT und die KM-Sonografie kombiniert angewandt, kommt es bei nahezu 100%iger Spezifität zu einer Sensitivität von gerade mal 33%. Jede Untersuchungsentität für sich genommen kommt hingegen auf Sensitivitäten von 61% (MRT) und 51% (KM-Sono) [139]. Jedoch werden aktuell von Eurotransplant und der Bundesärztekammer nur die CT und die MRT, sowie die Angiografie als gängige bildgebende Verfahren für die valide Histologie-prive Diagnostik des HCC anerkannt, um auf die Warteliste zur Lebertransplantation zu gelangen [162].

Einen schematischen Überblick über die Vorgehensweise bei der Diagnostik und den jeweiligen Ergebnissen der bioptischen und radiologischen Befunde gibt Abb. 2. Als dynamische Bildgebung gemäß Abb. 2 gelten entweder eine invasive Angiografie oder eine Kontrastmittel angehobene CT-Untersuchung mit arterieller, venöser und portalvenöser Phase sowie eine Kontrastmittel angehobene MRT-Untersuchung mit lebergewebsspezifischem Kontrastmittel, wie z.B. das gadoliniumhaltige Primovist, wobei letztgenanntes eine höhere Detektionsrate als das CT aufweist [163].

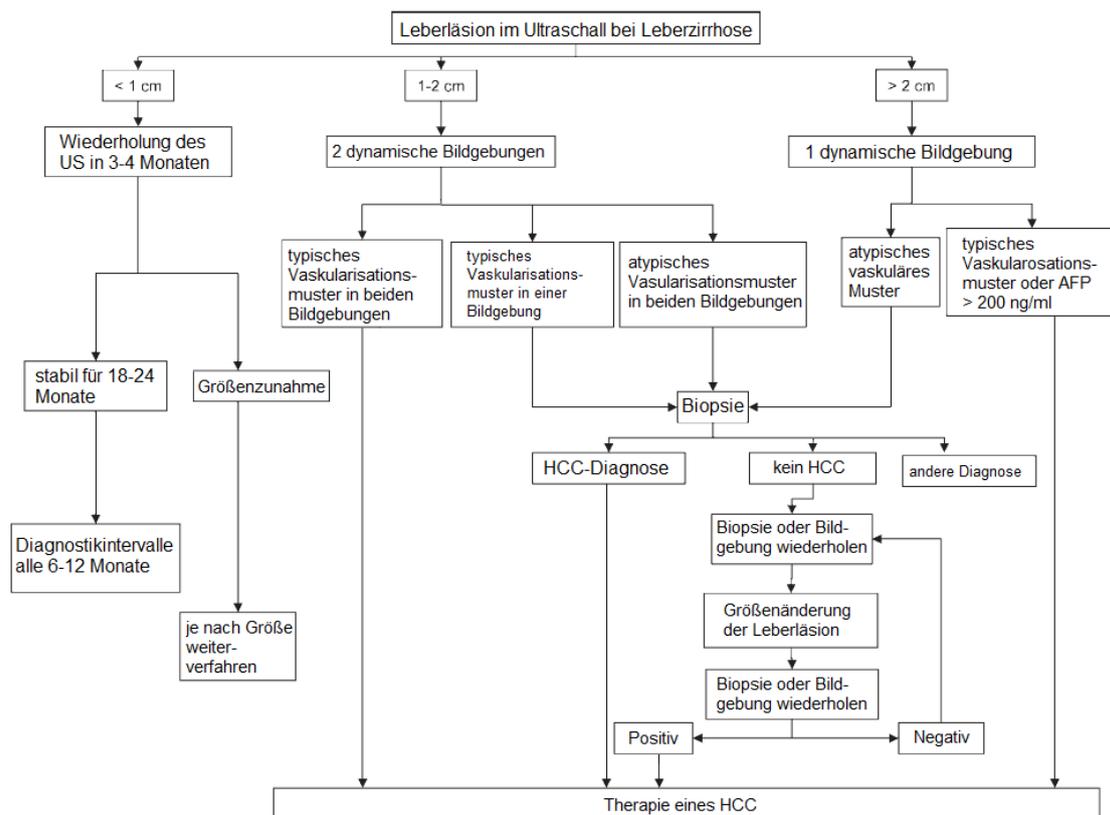


Abb. 2 Entscheidungsbaum für die Diagnostik beim HCC (EASL-Kriterien)
Aus der European Association for Study of the liver [164].

Gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer, sowie der S3-Leitlinie des Leitlinienprogramms Onkologie und den Richtlinien von Eurotransplant gelten zusammenfassend folgende drei Diagnostikkriterien als beweisend für das Vorliegen eines HCC:

1. die positive Biopsie oder
2. eine typische Hypervaskularisation des suspekten Leberrundherdes in zwei unabhängigen dynamischen Bildgebungen (CT, MRT, Angiografie [5]) oder
3. AFP > 400 ng/ml und eine typische Hypervaskularisation des suspekten Leberrundherdes in einer Bildgebung (CT, MRT, AG)[162, 165, 166].

Bezüglich der AFP-Konzentration divergieren die Angaben eben genannter Diagnostikkriterien der BCLC, die eine AFP-Konzentration von 200 ng/ml propagieren, gegenüber den Angaben der Bundesärztekammer und des

Leitlinienprogramms Onkologie, die eine AFP-Konzentration von 400 ng/ml neben einer weiteren Bildgebung für einen HCC-Nachweis fordern.

Für die Ausbreitungsdiagnostik des diagnostizierten HCC im Sinne eines Stagings empfiehlt sich zum intrahepatischen Staging das Kontrastmittel verstärkte MRT und für das extrahepatische Staging ein Thorax- und Abdomen-CT [165, 167].

1.1.5 Klassifikation der Leberfunktion und Stadieneinteilung des HCC

Das HCC kann nach mannigfaltigen Kriterien in unterschiedliche Stadien klassifiziert werden, die prognostische und therapeutische Relevanz aufweisen. Ein kurzer Überblick in diesem Kapitel beschränkt sich auf die UICC-Einteilung, die BCLC-Klassifikation, den MELD-Score, sowie den Child-Pugh-Score, der bei der Beurteilung der Leberzirrhose und respektive bei durch Leberzirrhose bedingten HCC ebenfalls zum Tragen kommt, als auch die sogenannten Mailandkriterien für die Indikationsstellung zu einer Lebertransplantation [168]. Daneben gibt es zahlreiche weitere Klassifikationen, die die Überlebensrate des HCC prognostizieren. Zu nennen wären hierbei die „French Classification“, der „Chinese University Prognostic Index“ [169, 170] und der „Japan Integrated Staging Score“, kurz JIS-Score. [171, 172].

Die global anerkannte TNM-Klassifikation ist eine Klassifikation der Tumorausbreitung, die Größe und Invasion des Primarius in die benachbarten anatomischen Strukturen (T-Entität), den Befall von Primarius nahen Lymphknoten (N-Entität) und den Befall von Primarius fernen Lymphknoten sowie Fernmetastasen (M-Entität) berücksichtigt, wie in Tabelle 3 aufgeführt.

T1	solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
T2	solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren alle < 5 cm
T3a	multiple Tumore > 5 cm
T3b	multiple Tumore mit Befall eines größeren Astes der V. portae oder der Vv. hepaticae
T4	Tumor mit Infiltration von Nachbarorganen oder Perforation des viszeralem Peritoneums
N0	keine lokoregionären Lymphknotenmetastasen
N1	lokoregionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tab. 3 TNM-Klassifikation des HCC nach der UICC

Die UICC-Einteilung lehnt sich an die vorliegende TNM-Klassifikation aus Tabelle 3 und fasst Tumorstadien mit ähnlicher Prognose und gleichen Therapieempfehlungen zusammen (Tab. 4).

Stadien (UICC)	TNM	Stadien (UICC)	TNM
I	T1 N0 M0	II	T2 N0 M0
IIIA	T3a N0 M0	IIIB	T3b N0 M0
IIIC	T4 N0 M0		
IVA	jedes T, N1 M0	IVB	jedes T, jedes N, M1

Tab. 4 UICC-Stadieneinteilung des HCC

Die 1964 nach Child und Turcotte benannte und im Jahre 1973 von Pugh modifizierte Klassifikation der Leberfunktionsleistung bei Leberzirrhosen ist als Child-Pugh-Score bekannt und beinhaltet 5 Kriterien und teilt die Schwere der Leberzirrhose in drei Grade A, B und C ein. Der Punktwert respektive der Schweregrad lässt Schlüsse auf die Prognose der Grunderkrankung bzw. auf

deren Überlebensrate zu und wird in den Tabellen 5 und 6 wiedergegeben [173, 174].

Child-Pugh-Stadium	Child-Pugh-Punkte	1-JÜR
A	5-6	84%
B	7-9	62%
C	10-15	42%

Tab. 5 Child-Pugh-Stadien mit 1-JÜR

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serum-Albumin (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Serum-Bilirubin (mg/dl)	< 2,0	2,0 - 3,0	> 3,0
Aszites	keiner	Leichtgradig	mittel-/hochgradig
INR	< 1,7	1,7 - 2,2	> 2,2
Enzephalopathie	keine	Stadium I-II	Stadium III-IV

Tab. 6 Child-Pugh-Score bei Leberzirrhose

Bei der HCC-Stadieneinteilung nach der BCLC-Klassifikation unterscheidet man die Stadien A1-A4, sowie die fortgeschrittenen Stadien B-D.

Die herangezogenen Kriterien, die für die Stadieneinteilung maßgebend sind, sind im Einzelnen der PST als Marker des Allgemeinzustandes der HCC erkrankten Patienten, die Tumoreigenschaften im Sinne der Tumorgroße, der Tumoranzahl und der infiltrierenden Eigenschaften bezüglich Nachbargewebe/-organe, sowie das Okuda-Stadium, welches die Parameter Serum-Albumin, Serum-Bilirubin, Aszitesmenge und die relative Tumorgroße beinhaltet [175]. Einen grafischen Überblick gibt hierbei nachfolgend aufgeführte Tabelle 7.

Stadium	PST	Tumor-eigenschaften	Okuda-Stadium	Leberfunktionsstatus
<u>Stadium A:</u> frühes HCC				
A1	0	einzel	I	Keine Portale Hypertension, normales Bilirubin
A2	0	einzel	I	Portale Hypertension, normales Bilirubin
A3	0	einzel	I	Portale Hypertension, anormales Bilirubin
A4	0	3 Tumore < 3 cm	I-II	Child Pugh A-B
<u>Stadium B:</u> intermediate HCC				
	0	Groß, multinodular	I-II	Child Pugh A-B
<u>Stadium C:</u> advanced HCC				
	1-2*	Gefäßinvasion oder extrahepatische Ausbreitung	I-II*	Child Pugh A-B
<u>Stadium D:</u> end-stage HCC				
	3-4*	mehrere	III*	Child Pugh C*

Stadium A und B: Alle Kriterien sollten erfüllt sein

Stadium C: Zumindest ein Kriterium*: PST 1-2 oder vaskuläre Invasion/extrahepatische Ausbreitung

Stadium D: Zumindest ein Kriterium*: PST 3-4 oder Okuda-Stadium III/Child Pugh C

Tab. 7 Stadieneinteilung des HCC gemäß der BCLC-Klassifikation
Mit freundlicher Genehmigung des „Seminar in liver disease“ [176]

In der aktuellen deutschen HCC-Leitlinie, die 2013 erschienen ist, findet das Alpha-Fetoprotein, das ein hepatisch synthetisiertes Eiweiß ist, mangels Sensitivität keine Bedeutung in der Primärdiagnostik bzw. in den Diagnostikkriterien des HCC [165]. Jedoch wird es in dieser Leitlinie genauso wie in den amerikanischen und europäischen Leitlinien zum HCC für die prognostische Beurteilung desselben und als Verlaufsparemeter herangezogen [27, 160, 165].

Für die Lebertransplantation gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und von Eurotransplant sind die erweiterten Milano-Kriterien maßgebend. Diese setzen sich aus folgenden Parametern und Bestimmungen zusammen:

- solitärer HCC-Herd mit einem maximalen Diameter von 5 cm
- bis zu drei HCC-Herde mit jeweils maximalem Diameter von 3 cm
- keine extrahepatische Manifestation/Metastasierung
- kein makrovaskulär invasives Wachstum (Tumorthrombose der VP/VH)

Dabei müssen für einen Patienten sämtliche dieser Kriterien erfüllt werden, damit dieser auf die Warteliste für eine Lebertransplantation gesetzt werden kann [53, 162, 177, 178].

Die 5-JÜR von 70-80% nach LT beim HCC entspricht bei Erfüllung der Milano-Kriterien annähernd der 5-JÜR bei LT ohne Vorliegen eines HCC (als Transplantationsgrund der LT) [51, 177, 179-182].

Als weiterer Prognosefaktor beim HCC gilt der MELD-Score, der 2002 etabliert wurde und das 3-Monats-Mortalitätsrisiko wiedergibt. Ergo kann anhand des errechneten MELD-Score die Dringlichkeit der OLT numerisch angegeben werden und sich im Rang der Warteliste widerspiegeln [178, 183-185].

Der MELD-Score ist die Summe natürlicher Logarithmen und errechnet sich nach folgender Formel:

$$0,957 \times \ln(\text{Kreatinin mg/dl}) + 0,378 \times \ln(\text{Bilirubin mg/dl}) + 1,12 \times \ln(\text{INR}) + 0,643$$

Nach Berechnung des MELD-Scores wird der Wert auf die nächste natürliche Zahl gerundet und sodann mit 10 multipliziert. Dabei ergeben sich MELD-Scores mit einem numerischen Wert zwischen 6 und 40, da bei einem MELD-Score von 40 bereits eine 3-Monats-Mortalität von 100% besteht und demnach Werte > 40 automatisch auf 40 gesetzt werden [186].

Von allen Klassifikationssystemen zur Stadieneinteilung des HCC scheint die BCLC-Klassifikation die höchste Präzision im Hinblick auf die Mortalitätsprognose zu haben [187, 188].

1.1.6 Therapie des HCC

Je nach Größe und Stadium des HCC bzw. je nach Zeitpunkt der Erstdiagnose des HCC stehen unterschiedliche kurative und palliative, sowie supportive Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Einen aktuellen Überblick zeigt Abb. 3.

Zu den kurativen therapeutischen Ansätzen zählt die orthotope Lebertransplantation (OLT) als Todspende gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und von Eurotransplant oder die Leberlebendspende von engen Angehörigen als Leberteilspende [189]. Die Organzuteilung erfolgt derzeit unter Berücksichtigung der sog. Mailand Kriterien unter Berücksichtigung des MELD-Scores. Bei nachgewiesenem HCC wird ein „standard exception“ (SE) Status verliehen, der die Wartezeit als Kriterium mit berücksichtigt [178].

Des Weiteren handelt es sich bei der Leberteilresektion ebenfalls um ein kuratives Therapieverfahren [190-192]. Diese Therapiemodalität kommt für die HCC in Frage, bei denen die OLT kontraindiziert ist und die auf einen Leberlappen begrenzt sind, keine portale Hypertension (PH) aufweisen, keine extrahepatische Filiae haben sowie keine makrovaskuläre Tumordinvasion beinhalten. Sie kann aber auch bei kleinen solitären HCC-Herden, die < 4 cm durch-messen, in Betracht kommen, sofern keine Blutgefäße an den Herd angrenzend verlaufen [193].

Bei der Leberteilresektion muss allerdings beachtet werden, dass die für die meisten Tumore kausale zirrhatische Leber weiterhin existent ist und ein de-novo-Tumorrezidiv deutlich höher wahrscheinlich ist als in nicht-zirrhatischen Lebern [194-197]. Merchant et al. propagieren die Leberteilresektion auch in leichtgradig zirrhatisch-umgebauten Lebern mit HCC, vor allem wenn die Mailand-Kriterien nicht erfüllt werden [198]. Bartlett et al. sehen in solitären HCC mit einem max. Durchmesser von 5 cm und einer lediglich leicht eingeschränkten Lebersyntheseleistung im Sinne eines CPS A, sowie einer portalvenösen Normotonie (VH-Wedge-Druck < 10 mmHg) den Vorteil einer LR gegenüber einer OLT [199].

Aufgrund der erwähnten zu erfüllenden HCC-Kriterien für die Listung für eine OLT, sind kurative Therapieregimes in den westlichen Ländern nur bei 30-40% aller HCC-Patienten möglich, da sich bei der Mehrheit der HCC-Fälle die Diagnose erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium stellen lässt [12]. Hao et al. zeigen sogar, dass nur 15-25% aller HCC-Patienten für einen kurativen chirurgischen Ansatz in Betracht kommen, während der Großteil der HCC-Patienten an den Folgen des lokal fortgeschrittenen bzw. fernmetastasierten HCC stirbt [200].

Zu den palliativen Therapiekonzepten des HCC gehören im Einzelnen die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die Radiofrequenzablation (RFA), die perkutane Ethanolinstillation (PEI), die selektive interne Radiotherapie (SIRT), und als medikamentöse Tumorthherapie der Multikinaseinhibitor Sorafenib.

Eine Sonderrolle spielt hierbei die RFA, die sowohl bei kurativen, als auch palliativen Therapiesituationen Anwendung findet.

Die RFA kann durch lokal im HCC-Herd angebrachte Thermoelktroden mittels Überhitzung bzw. Verkochung überwiegend des Tumorgewebes in Folge dessen es zur Nekrotisierung desselben kommt, vergleichbar gute Langzeitergebnisse liefern wie die Leberteilresektion. Dabei kann ein Nekroseherd von bis zu 3 cm Durchmesser erzeugt werden, sodass HCC-Herde von bis zu 2 cm Durchmesser inklusive eines tumorfreien Sicherheitsabstands von bis zu 1 cm behandelt bzw. nekrotisiert werden [201, 202]. Andere Studien zeigen Nekroseherde von bis 6-10 cm Größe [203-205]. Die RFA zählt damit heutzutage zu den effektivsten perkutanen ablativen Therapieverfahren (PAT) [206-211]. In > 97% der in einer Studie behandelten Probanden/Patienten mit einem HCC < 2 cm gelang eine komplette lokale Remission des HCC. Die 3-JÜR und 5-JÜR betragen 76% und 55% [212]. Die RFA ist in kurativer Hinsicht einigen Studien zufolge der LR unterlegen, sodass sie nur dann zum Einsatz kommt, wenn Kontraindikationen für eine OLT oder LR vorliegen [213-216].

In einigen US-amerikanischen Leberzentren wird entsprechend diesen Erkenntnissen die RFA bei HCC-Herden ≤ 3 cm als PAT erster Wahl eingesetzt [217-219].

Bei der TACE macht man sich die physiologische Besonderheit zunutze, dass das nicht-tumoröse Lebergewebe zu ca. 80% über die VP perfundiert wird, während das HCC-Gewebe überwiegend ($> 90\%$) über die Leberarterien sein Blut bezieht. Somit kann mittels TACE relativ selektiv überwiegend das HCC-Gewebe durch Hypoperfusion nekrotisiert werden [220].

In Deutschland wird die PEI nicht mehr empfohlen, da sie in Studien gegenüber der RFA bezüglich 5-JÜR und Nebenwirkungen sowie Komplikationen signifikant und relevant unterlegen ist [206, 207, 209, 212, 221-223].

Die Rolle der SIRT, insbesondere die Abgrenzung gegenüber einer Indikation zur TACE, ist derzeit Gegenstand aktueller Diskussionen und Studien, und wird aktuell zunehmend in der klinischen Routine eingesetzt, obwohl dies durch Studienergebnisse bisher nicht eindeutig belegt ist [224-226].

Die RFA, die TACE und die LR können auch bei Patienten angewandt werden, die die Mailand-Kriterien erfüllen und auf der Transplantationsliste für eine OLT stehen. Diese Methode bezeichnet man als sog. Bridging [227-236].

Eine Übersicht über die je nach Stadium bzw. Schweregrad des HCC durchzuführende Diagnostika und Therapeutika gibt Abb. 3 in Form eines Algorithmus.

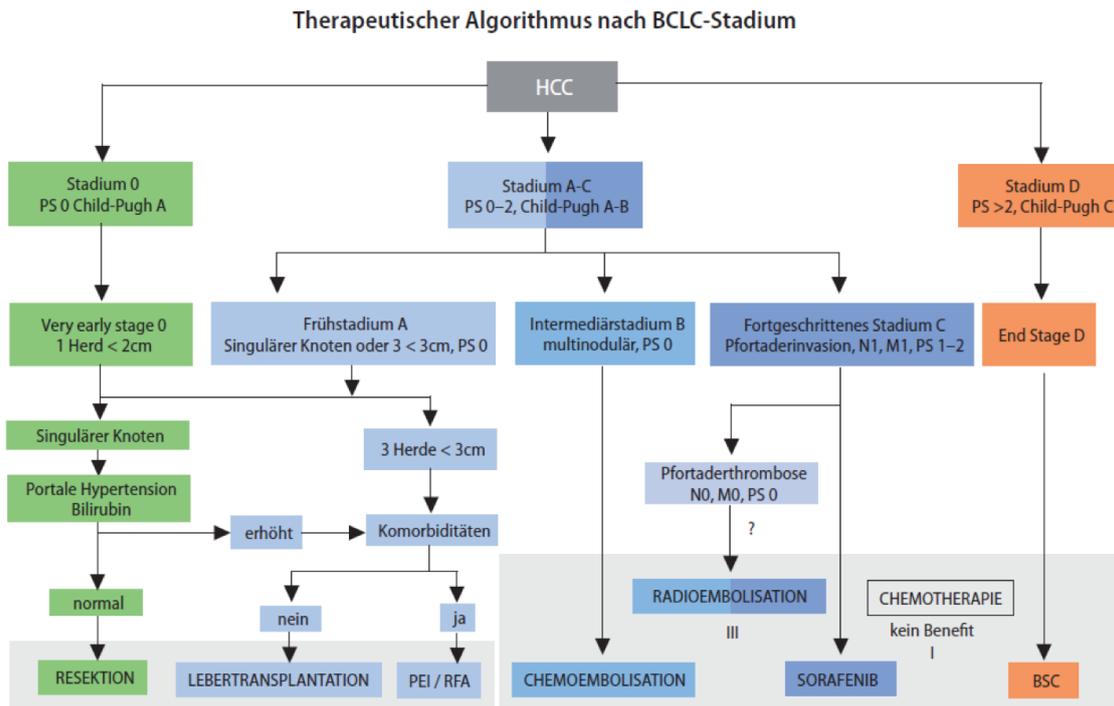


Abb. 3 Therapiealgorithmus nach der BCLC-Klassifikation
Mit freundlicher Erlaubnis des Journal of Gastroenterology [237]

1.2 Die HCC-Therapie mit Sorafenib als Multikinaseinhibitor

Sorafenib ist ein seit wenigen Jahren zugelassenes Medikament, das derzeit als einziges oral verabreichbares Mittel zur Systemtherapie gegen das HCC eingesetzt werden kann. Weitere zugelassene, oral verfügbare Medikamente existieren aktuell noch nicht, zahlreiche Substanzen befinden sich noch in der klinischen Studienphase [238-241]. Dabei ist zu beachten, dass Sorafenib als rein palliatives Therapeutikum eingesetzt wird und dem zu Folge lediglich beim fortgeschrittenen HCC Anwendung findet [242]. Idealerweise wird es bei Patienten mit HCC und einem CPS A eingesetzt, bei dem entweder Fernmetastasen vorliegen oder kein resezierbares bzw. lokal ablativ-behandelbares Therapieverfahren eingesetzt werden kann [243, 244].

Im CPS A kann mittels Sorafenib das Überleben von Patienten mit nicht-kurativen HCC signifikant um mehrere Monate verlängert werden. In der SHARP-Studie zeigte sich ein Überlebensvorteil mit Sorafenib von knapp 3

Monaten gegenüber der Placebo-Gruppe (10,7 vs. 7,9 Monate). Bei der Beurteilung mit herkömmlichen Ansprechkriterien nach RECIST zeigten lediglich 2% der Patienten im Sorafenib-Arm ein partielles Ansprechen. Dies meint ein diametrales Tumorschrumpfen von mind. 30%. Die Mehrheit (71%) der mit Sorafenib behandelten Patienten wiesen hingegen eine stabile Tumorsituation auf (sog. „stable disease“) [245-256].

Im CPS B konnte bislang kein Überlebensvorteil durch die Therapie mit Sorafenib nachgewiesen werden, sodass aktuell in diesem Stadium keine Sorafenib-Therapie empfohlen werden kann [257]. Chiu et al. zeigen jedoch einen Überlebensvorteil bei HCC-Patienten mit CPS B mit einem Score von 7 Punkten gegenüber denjenigen Patienten mit einem CPS B von 8-9 Punkten [258, 259].

Im CPS C ist die Sorafenib-Therapie hingegen explizit kontraindiziert, da die Lebersyntheseleistung hierunter deutlich abnehmen und zu einer höheren Mortalitätsrate führen kann [257, 260].

Eine asiatische Studie („Asia Pacific Trail“) zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die SHARP-Studie im Hinblick auf den Überlebensvorteil von Sorafenib verglichen mit Placebo. Hierbei wurden 271 Probanden akquiriert, bei denen der Sorafenib-Arm im Gegensatz zum Placebo-Arm eine durchschnittliche Überlebensrate von 6,5 vs. 4,2 Monaten aufwies. Die geringere Überlebenszeit im Vergleich zur SHARP-Studie beruht wahrscheinlich auf die HBV-bedingten schwereren HCC-Verläufe in Asien [245].

Die SOFIA-Studie beschäftigte sich mit der Arzneimittelsicherheit des Sorafenibs, sowie mit der Behandlungseffektivität, namentlich als Gesamtüberleben, als frühes, radiologisch nachweisbares Ansprechen und als Zeitfenster des radiologisch nachweisbaren HCC-Progresses. Da die SHARP-Studie aufgrund des Überlebensvorteils in der Verum-Gruppe (im Sorafenib-Arm) vorzeitig abgebrochen wurde, sollten mittels der SOFIA-Studie die Risiken und Vorteile der Sorafenibtherapie beleuchtet werden [261]. Sie wies nach, dass von 91 % der Probanden, die mindestens eine Nebenwirkung erlitten, lediglich 40 % derselben die Studie aufgrund dieser Nebenwirkung vorzeitig

abbrechen mussten. Bei 44 % der Probanden erforderte der Tumorprogress den Studienabbruch und bei 16 % die fortschreitende Funktionseinschränkung der Lebersyntheseleistung [261].

Sorafenib wirkt beim HCC, indem es einerseits die Tumorzellproliferation direkt inhibiert und andererseits mittels Hemmung der Angiogenese das Tumorstadium verzögert und zum apoptotischen Zelltod führt [262, 263]. Die Angiogenese wird dabei über zahlreiche Wachstumsfaktoren induziert. Zu nennen wären beispielsweise der VEGF oder der PDGF Signaltransduktionsweg. Die Rezeptoren beider Wachstumsfaktoren werden von Sorafenib gezielt gehemmt, sodass es zur Apoptose der Endothelzellen kommt [264, 265].

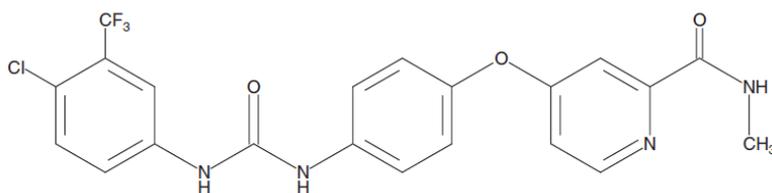


Abb. 4 Strukturformel von Sorafenib

Sorafenib wird zweimal täglich mit einer Einzeldosis von jeweils 400 mg verabreicht. Typische Nebenwirkungen des Sorafenibs sind Folgende (in absteigender Häufigkeit ihres Auftretens aufgelistet) [262, 266-268]:

- Diarrhoe (80%)
- Gewichtsverlust (75%)
- Fatigue-Syndrom (67%)
- Hand-Fuß-Syndrom (49%)
- abdominelle Schmerzen (37%)
- Anorexie
- Alopezie
- arterielle Hypertonie
- Nausea
- Blutungen
- Erbrechen

1.3 Sorafenib und Autophagie

Interessanterweise wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob Sorafenib über eine Stimulation von Autophagie das HCC-Wachstum inhibiert oder ob es dieses über eine Autophagie-Inhibition vermittelt.

Als Multikinaseinhibitor hemmt Sorafenib unter anderem folgende Klasse III Tyrosinkinaserzeptoren: VEGFR, PDGFR, c-Kit etc. Eine These besagt, dass hierüber Autophagie induziert wird, was Dosis abhängig zu einer Zell schützenden oder gar toxischen Autophagie führen könnte [269].

Ursprünglich wurde Sorafenib als Inhibitor von RAF-1 entwickelt; einer Komponente des ERK-1/2-Signalweges. Erst später wurde realisiert, dass es auch inhibitorische Eigenschaften bezüglich Tyrosinkinaserzeptoren der Klasse III innehat. Die antitumoralen Effekte von Sorafenib werden u.a. durch die antiangiogenetischen Faktoren bedingt [270-273].

Shimizu et al. zeigen, dass Sorafenib in HCC-Zellverbänden in vitro zu einer erhöhten Autophagieaktivität führt. Dies kommt der Studie zufolge durch die Sorafenib bedingte Hemmung von mTORC1 zustande [274].

Laut Shi et al. bedingt die therapeutische Wirkung von Sorafenib in HCC bzw. in Hepatomzelllinien die Induktion von Autophagie, die unabhängig vom MEK/ERK-Signalweg abläuft. Stattdessen wird die Autophagie durch erhöhten ER-Stress mittels Kalziumausstrom aus demselben bewerkstelligt [275].

Auch in anderen Zelllinien kann Sorafenib Autophagie induzieren; so auch in Makrophagen [276].

Tai et al. zufolge hindert Sorafenib durch die Überexpression von Autophagie bis hin zum autophagischen Zelltod (auch als programmierter Zelltod Typ II [PCD II] bekannt) das HCC-Gewebe am Proliferieren [277]. Auch Yi sieht einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Sorafenib und der Autophagieinduktion im HCC [278].

Ein weiteres Protein, das Sorafenib vermittelt Autophagie modulieren kann, ist CD95 [273]. Park et al. konnten zeigen, dass mittels Ceramid bedingter CD95-Aktivierung bei der Behandlung von Hepatomzellen mit Sorafenib, sowohl autophagische als auch apoptotische Prozesse induziert werden können [279].

1.4 Die Rolle der Autophagie im menschlichen Körper

Autophagie ist ein eminenter Prozess im menschlichen Körper, welcher der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dient [280]. Dieser Vorgang ist evolutionär konserviert und findet in vielen unterschiedlichen Lebensphasen statt. So beispielsweise in der Embryonalentwicklung, in der Morphogenese, bei Wachstumsprozessen (Proliferation), bei der Immunabwehr (Antigenpräsentation, Phagozytose von Bakterien), beim Abbau toxischer Substrate oder bei Alterungsprozessen (Seneszenz). Es werden drei unterschiedlich regulierte Zellfunktionen der Autophagie zugeordnet; dies sind im Einzelnen die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-induzierte Autophagie [281-287]. Diese Dissertation befasst sich lediglich mit der Makroautophagie, die im folgenden Text nur noch als Autophagie bezeichnet wird.

Die Autophagie wird im erwachsenen Körper vor allem während langen Hungerphasen bzw. Nährstoffmangelzuständen und Stresssituationen wie Hypoxie oder DNA-Schäden im Sinne von DNA-Doppelstrangbrüchen induziert. Dabei meint dieser metabolische/katabolische Prozess den Selbstverdau zelleigener Organellen, der, mangels neuer exogener Substratbereitstellung, zum Recycling endogen vorhandener Nährstoffe verwendet oder den Abbau von fehlaggregierten Proteinen oder anderen Nährstoffen bewerkstelligen soll [288, 289]. Hierbei entwickelt sich im Zytosol eine Doppelmembran, die vor Vollentwicklung eines sphärischen Autophagosoms noch als Phagophore bezeichnet wird [290]. Die Inklusion mehrerer Zellorganellen und von Anteilen des Zytosols sowie die Fusion des Autophagosoms mit sauren Lysosomen, die sich als saure Vesikel mit einem pH-Wert von 5 vom Golgi-Apparat abschnüren, ergeben das Autolysosom, das in der Lage ist, die Zellorganellen mittels sauren Hydrolasen enzymatisch zu degradieren und die unterschiedlichen Substrate zu Aminosäuren, Fettsäuren, Oligosacchariden und Nucleotiden zu katalysieren bzw. aus einigen Produkten mittels des Zitronensäurezyklus erneut ATP zu generieren. Des Weiteren können mittels Autophagie auch Toxine, toxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS), pathologisch veränderte Proteinaggregate,

sowie beschädigte Zellorganellen recycelt bzw. entgiftet werden. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass sich Zellen durch diesen Prozess vor nekrotischem oder apoptotischem Zelltod schützen können [281, 291-296].

Andererseits kann bei einem überschießenden Ausmaß an Autophagie die metabolische Homöostase in Dysbalance geraten und gar zum Tod der Zelle führen, vor dem sie zunächst eigentlich geschützt werden sollte. Dies wird als autophagischer Zelltod oder programmierter Zelltod Typ II bezeichnet [297-301].

Die Fehlregulierung der Autophagie kann an Krankheitsprozessen beteiligt sein. Dazu zählen Malignome, neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer), muskuloskelettale Erkrankungen, Kardiomyopathien, etc. [302-306].

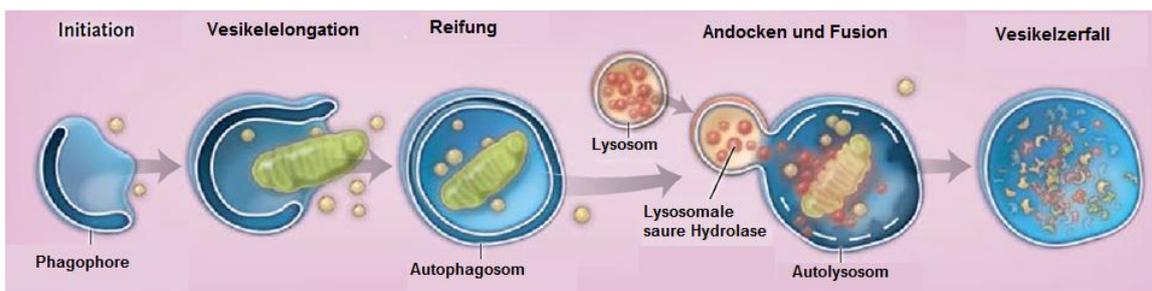


Abb. 5 Phasen des Autophagie-Signalweges

Mit freundlicher Erlaubnis des New England Journal of Medicine [307]

Die Autophagie wird in der gesamten Fauna von den Hefen bis hin zu den Säugern, den Menschen inklusive, ähnlich initiiert und reguliert (s. Abb. 5). Hierbei spielen die sog. „autophagy related genes“ (ATG) eine entscheidende Rolle. Insgesamt gibt es über 30 unterschiedliche ATG und deren Regulation ist hochkomplex und noch nicht in Gänze verstanden [308-311]. Weitere Regulationsmoleküle der Autophagie sind z. B. das „mammalian target of rapamycin“ (mTOR), Beclin1, NF- κ B, LC3, Insulin, ATP, Aminosäuren oder EGF [312-318].

Die Initiierung der Autophagie erfolgt u.a. durch Hemmung des mTOR oder PI3K Signalweges [319]. Wie in Abbildung 7 dargestellt, kann PI3K durch

Wortmannin, 3-MA oder LY294002 inhibiert werden, während mTOR durch Insulin, Nährstoffmangel oder Substanzen wie Rapamycin gehemmt werden kann [320, 321]. mTOR gilt als Hauptsensor des Nährstoffangebots in der Zelle und fungiert als Serin/Threonin-Kinase und wird als einer der zentralen Punkte der Autophagieregulierung angesehen [322]. Die Autophagie-Induktion durch Hemmung von mTOR bewirkt die Aktivierung von ATG1 bzw. die Säugetieranaloga ULK1 und ULK2 mittels Dephosphorylierung von ATG13. Durch Bindung an ATG17 bzw. dem Säugetieranalogon FIP200 entsteht ein Komplex, der die Bildung einer Phagophore und sukzessive eines Autophagosoms bewerkstelligt. Des Weiteren wird ATG101 benötigt, um die Stabilität von ATG13 aufrecht zu erhalten, so dass kein Abbau durch das Proteasom eintritt [314, 323-328].

Für die Weiterentwicklung der Phagophore bedarf es zusätzlich der PI3K-abhängigen Aktivierung von u.a. Beclin1, dem ATG6-Analogon der Hefen sowie ATG14, p150 und Bcl-2. Bcl-2 ist ein antiapoptotisches Protein, das an Beclin1 andockt und so die Autophagie-Induktion inhibiert [329-331]. Dieser PI3K-Komplex benötigt zwei weitere Systemkomplexe, um die Entwicklung der Phagophore zum Autophagosom zu fördern [332].

Zwei Ubiquitin-abhängige Konjugationssysteme (KS) sind für die Elongation der Phagophore zum Autophagosom unentbehrlich. Zum einen ist es das ATG12- und zum anderen das LC3-Konjugationssystem [333]. Beim ersten KS erfolgt die ATG12-Aktivierung enzymatisch durch ATG7. Dabei verbindet sich ATG12 mit ATG7 und wird als Komplex an ATG10 gebunden. Dieser neue trivalente Komplex bindet an ATG5 unter Loslösung von ATG7 und ATG10, so dass ein ATG12-ATG5-Komplex entsteht. Die Verbindung dieses Komplexes mit einem ATG16-Dimer erzeugt ein ATG12-ATG5-ATG16-Tetramer, welches an die Phagophore bindet [334-336] (s. Abb. 6 und Abb. 8).

Das zweite KS besteht aus ATG8, welches bei Säugern dem LC3 entspricht. Dieses wird mittels ATG4 zu LC3-I metabolisiert und anschließend durch ATG7 aktiviert und an ATG3 gebunden [337, 338]. Sodann wird der ATG12-ATG5-ATG16-Komplex benötigt, um das nun entstandene LC3-I durch Anhängen von Phosphatidylethanolamin zu LC3-II zu metabolisieren [339, 340]. LC3-II

befindet sich nach diesem Prozess sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite der Doppelmembran des Autophagosoms und ist dementsprechend membranständig, während LC3-I im Zytoplasma gelöst ist [341, 342].

ATG9 ist ein weiteres Autophagie-relevantes Protein, welches benötigt wird, um das Autophagosom zu bilden und zirkuliert unter Nährstoffmangelzuständen und unter Zuhilfenahme von ULK1 und ATG13 zwischen dem trans-Golgi-Apparat und dem Autophagosom, bei dem es nahe dem LC3-II in die Membran integriert wird [343-345].

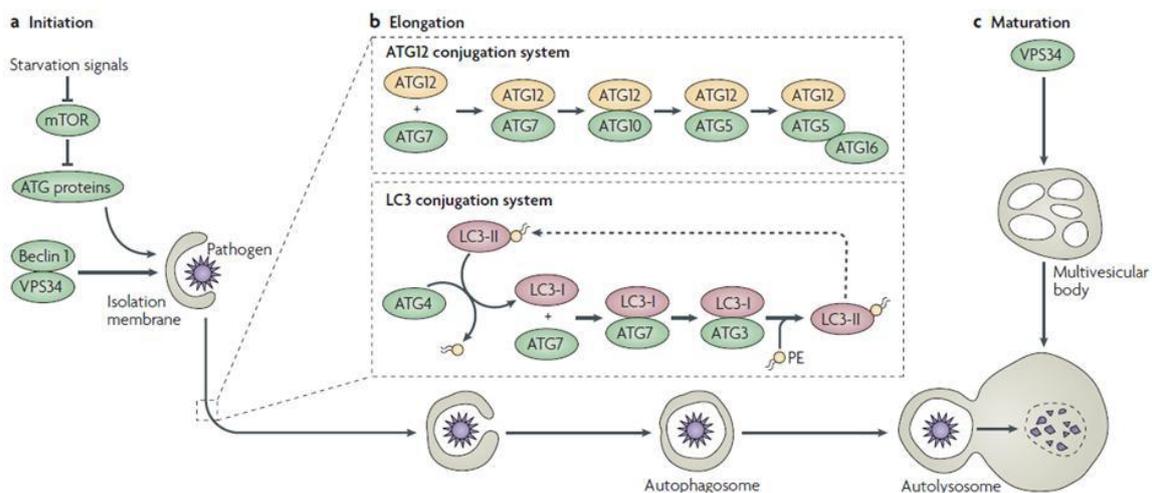


Abb. 6 Autophagosom-Lebenszyklus durch ATG-Konjugationssysteme
Mit freundlicher Erlaubnis des Nature Review Immunology Verlages [333]

Die autophagosomale Doppelmembran beinhaltet das Protein LC3-II, welches durch Konjugation von Phosphatidylethanolamin aus LC3-I (einem zytosolisch vorkommenden ubiquitären Protein) entsteht und zu diagnostischen Zwecken u.a. in Westernblots genutzt werden kann, da es als Autophagiemarkerprotein fungiert und seine quantitative Menge in Korrelation zur Anzahl der Autophagosomen gebracht werden kann [346, 347].

Das LC3, die Grundsubstanz von LC3-I und LC3-II, ist ein Mikrotubulus assoziiertes Protein, das das Säugetierpendant zum ATG8 in Hefen darstellt [341].

Am Ende der Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom zum Autolysosom wird LC3-II mittels ATG4 erneut zu LC3-I metabolisiert, das sich wiederum von der Membran löst und sich im Zytosol löst [338].

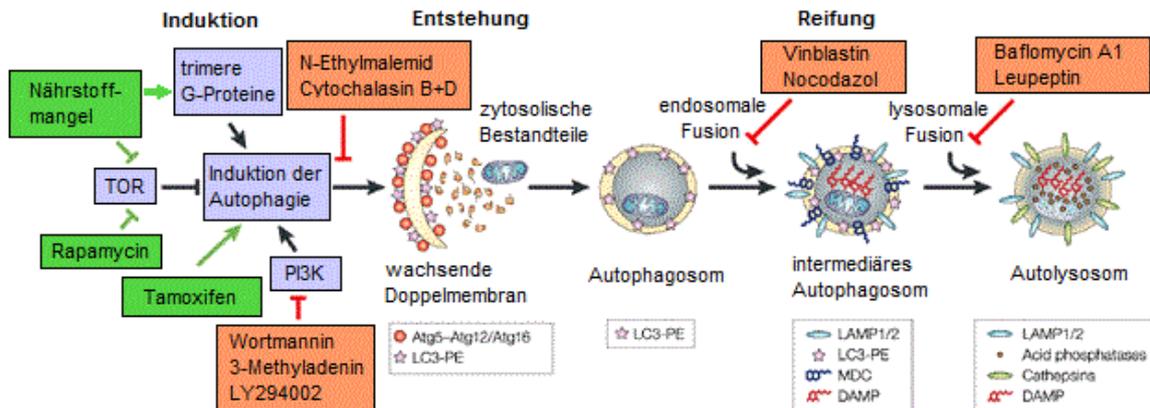


Abb. 7 Signalweg der Autophagie

Mit freundlicher Erlaubnis des Nature Review Microbiology Verlages [348]

Mit p62 kommt ein weiteres Autophagie modulierendes Protein zum Tragen, das vor allem in chronischen Lebererkrankungen wie der ASH, der NASH oder dem HCC akkumuliert, was als Zeichen einer fehlgesteuerten bzw. minderleistenden Autophagie gedeutet werden kann [349]. Die Funktion des p62-Proteins besteht darin, als Rezeptor für fehlgefaltete oder angehäuften Zellproteine zu fungieren und diese zum Autophagosom zu transportieren, um sie so der lytischen Metabolisierung zur Verfügung zu stellen. p62 ist somit ein Autophagieadaptorprotein und dockt an zuvor ubiquitinierte Proteine und Zellorganellen an, die für den autophagischen Verdauungsprozess bestimmt sind. Nach Andocken von p62 an das Autophagosom bindet es an LC3-II und wird anschließend selbst im Autolysosom verdaut [349-353].

Die Autophagie lässt sich physiologisch und pharmakologisch durch diverse Induktoren wie beispielsweise Nährstoffmangel, Rapamycin und Tamoxifen sowie durch Inhibitoren wie z.B. Wortmannin, 3-MA, Baflomycin A1 und Vinblastin modulieren [348], wie der Abb. 7 zu entnehmen ist.

1.5 Die Rolle der Autophagie in Tumoren

Auch in Tumoren spielt die Autophagie eine wesentliche Rolle. Je nach Tumorentität wird die Autophagie gehemmt, um das Tumorstadium nicht zu behindern oder sie wird induziert bzw. verstärkt hochreguliert, um Tumorzellen inmitten hypovaskularisierter und dementsprechend auch hypoperfundierter Tumormasse unter enormen Stressbedingungen und Hungerperioden am Leben zu halten [298, 354, 355].

Beclin1, ein Autophagie regulierendes Gen, das in Hefen als ATG6 bezeichnet wird, fungiert als Tumorsuppressor. In 40-75% der Fälle von Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom ist Beclin1 nur auf einem Allel vorhanden. Hierdurch reduziert sich seine antiproliferative Aktivität und es resultiert eine indirekte Unterstützung der Tumorigenese [356-361]. Eine vollständige Hemmung der Translation und Transkription von Beclin1 wurde in zahlreichen weiteren Tumorentitäten wie dem HCC, Kolonkarzinomen, Hirntumoren oder Zervixkarzinomen mit zum Teil deutlich schlechter Prognose beschrieben [362-366].

Bcl-2 und Bcl-X_L können durch Bindung an Beclin1 dessen Aktivität inhibieren und somit die tumorsuppressive Wirkung der Autophagie außer Kraft setzen [367, 368].

In der Karzinogenese spielt auch p53 eine wesentliche Rolle, welches eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene ist. Neben der Regulierung des Zellwachstums kann p53 nach Stimuli wie beispielsweise ein DNA-Doppelstrangbruch durch Hemmung von mTOR in die Autophagie stimulierend eingreifen [369]. Es werden zwei Signalwege beschrieben, die durch p53 vermittelt zur Autophagie führen: die Hochregulation von DRAM (damage-regulated autophagy modulator), einem lysosomalen Protein, das mTOR inhibieren kann [370] und die Aktivierung von AMPK (AMP-activated kinase), die wiederum durch Phosphorylierung den TSC1/2-Komplex aktiviert. Infolgedessen wird mTOR gehemmt, was zur oben erwähnten Autophagie-Induktion führt [369, 371-373].

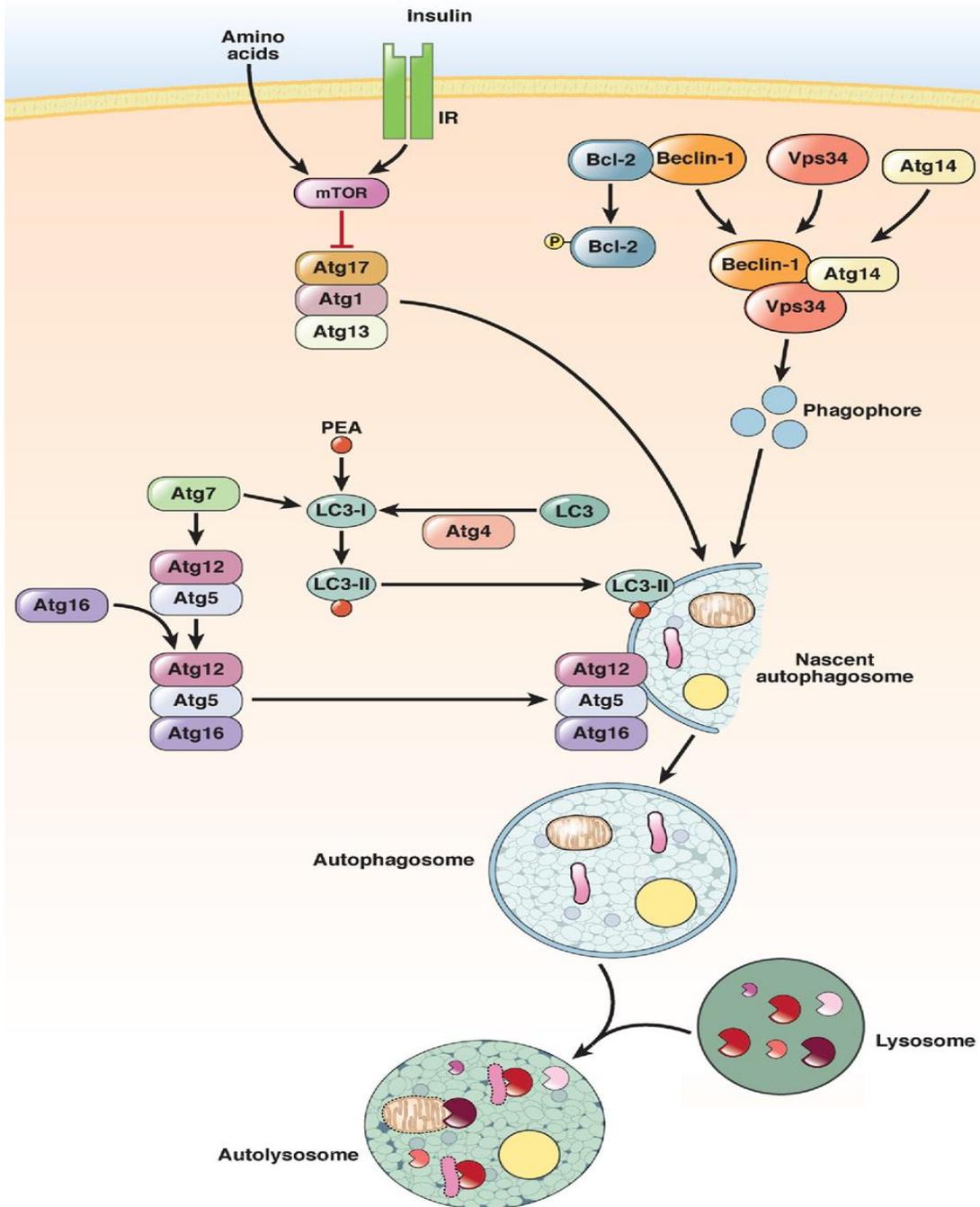


Abb. 8 Signalweg der ATG bei der Regulierung der Autophagie
 Mit freundlicher Erlaubnis des Journal of Gastroenterology [374]

Das Protein p62 scheint auch eine Rolle in der Karzinogenese einiger Tumore zu haben. So zeigen Mathew et al., dass bei nicht zur Autophagie befähigten Zelllinien eine Ansammlung von p62 und aggregierten Proteinen vorlag, die wiederum eine erhöhte Menge an ROS und DNA-Schäden zur Folge hatte.

Durch diese DNA-Schäden bedingt kommt es bei gentechnischer Ausschaltung des p62-Gens in Tumorzellen zu einem vermehrten Zellwachstum [375]. Da in vielen Tumoren, u.a. in HCC, die p62-Aktivität erheblich hochreguliert ist, mag es eine Verbindung zur Karzinogenese geben. Über die Deregulierung von NF- κ B führt p62 z. B. indirekt zur Induktion der Inflammations-assoziierten Tumorigenese [375-379]. Inami et al. und Komatsu fanden eine Assoziation zwischen p62 und der Tumorigenese in hepatischem Gewebe über das Protein Nrf2 [379, 380]. In NSCLC können die Proteine p62 und Nrf2 als prognostische Marker für das tumorspezifische Überleben angesehen werden und korrelieren antiproportional mit selbigem, sodass sie für einen schlechten klinischen Verlauf stehen [381].

p38, das zusammen mit Abl ein weiteres Tumorigenese modulierendes Protein ist, entfaltet nach einigen Arbeiten eine tumorale Wirkung durch Hemmung der Autophagie. Die pharmakologische Blockade von p38 führt zu einem Zellzyklusarrest und zu einer überschießenden Autophagieaktivität bis hin zum PCD II, was dem Tumorwachstum abträglich ist [382-384]. Das Verhalten des p38 in Malignomen ist ambivalent und je nach Tumorentität kann es proliferierende, metastasierende oder inhibierende Wirkung auf den Tumor haben [385]. In Bezug auf die Rolle des p38 im HCC sind die Literaturangaben zwiespältig. Während Wang et al. behaupten, dass p38 in HCC eine Tumorprogress fördernde Wirkung entfalten könne und ein HCC mit einer hohen p38-Aktivität mit einem schlechten klinischen Verlauf des Patienten assoziiert ist [386], sprechen andere Autoren von einer Tumor supprimierenden Wirkung des p38 in HCC durch Apoptoseinduktion [387]. So soll ihnen zufolge die p38-Konzentration in größeren HCC (> 20 mm) niedriger sein als in kleineren HCC (< 20 mm) [385, 388]. Hsieh et al. korrelieren die p38-Aktivität mit einer erhöhten HCC-Tumorinvasion [389]. Pereira et al. fanden heraus, dass die Inhibition von p38 mittels Erhöhung der ROS zu einer verstärkten Apoptose-Wirkung von Cisplatin im HCC führen kann [390].

In Pankreaskarzinomen konnte gezeigt werden, dass der Knock-out des TG2-Gens zu einem erhöhten autophagischen Zelltod führt (PCD-II). Unter physiologischen Bedingungen reguliert TG2 zusammen mit PKC δ die Autophagie modulierenden Proteine Bcl-2 und NF- κ B, sowie die PI3K. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, der wiederum in der Lage ist die Autophagie zu inhibieren. Die Inaktivierung des TG2-Gens führt somit zum PCD-II durch Überexpression von Autophagie [391].

Shang et al. zeigten, dass die mittels miRNA inhibierte Expression von ATG7 zu einer Reduzierung der Autophagieaktivität in HCC-Gewebe führt und die Malignomzellen unter hypoxischen Bedingungen nicht ungehemmt proliferieren können, da die Expression von ATG7 in HCC-Geweben deutlich gesteigert ist. Sie schlussfolgern, dass Tumorzellen unter hypoxischen pathophysiologischen Verhältnissen ATG7-vermittelt mittels Mitophagie ungestört proliferieren können [392].

Da zahlreiche Malignome im zentralen hypoxischen Bereich des Tumorgewebes die Autophagie-Maschinerie hochregulieren, ist die Autophagieinhibition potentiell eine antikarzinogene Therapieoption. So konnte in Kolon- und Ösophaguskarzinomen nachgewiesen werden, dass die Autophagieinhibition durch 3-MA über die Aktivierung der PI3K zu einer Sensitivierung der Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU geführt hat [393, 394]. Einige Malignomentitäten regulieren die Translation anti-autophagischer Gene wie beispielsweise PI3K, Akt, Ras, Bcl-2 hoch und dem gegenüber pro-autophagische Gene wie z.B. PTEN, p53, Beclin 1, TSC1/2 oder LKB1 herunter. Dies verdeutlicht eine vielfältige und komplexe Regulation von Autophagie in humanen Malignomen [296, 298, 395].

Die schützende Wirkung der Autophagie auf das Tumorwachstum wird u.a. durch Vermeidung von Nekrosen erklärt, die an und für sich über die Entzündungsaktivierung in der Lage sind, sowohl die Angiogenese als auch das Tumorwachstum zu fördern, indem sie die Genominstabilität begünstigt und somit zu einer erhöhten Rate an Mutationen führt, die wiederum gute

Bedingungen schaffen, um kanzerogene Genomsequenzen zu akquirieren [396, 397].

Dalby et al. und Verma et al. konnten zeigen, dass die Induktion des PCD II, und somit des autophagischen Zelltodes, mittels Knockdown der Gene der PKC δ und der TG2 durch siRNA in Pankreaskarzinomen, die als typisches Merkmal die Apoptoseresistenz aufweisen, zum Tumorregress führen bzw. die weitere Tumorpheriferation hemmen. Dieser Effekt konnte in Kombinationen mit Gemcitabin positiv verstärkt werden [398, 399].

Zuletzt bleibt festzustellen, dass einer der am besten beschriebenen genetischen Defekte im Signalweg des mTOR in humanen Malignomen Mutationen des PTEN-Gens sind. PTEN ist im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg verflochten und dient als pro-autophagisches Protein. Dementsprechend führen Mutationen desselben über Aktivierung der Akt zu einer Inhibition der Autophagie [319]. In Malignomen wie z. B. dem Glioblastom, HCC, Endometrium-Ca, Melanom, Bronchial-Ca und Nierenzell-Ca sind PTEN-Genmutationen beschrieben [400-405].

1.6 Fragestellung

Mehrere Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Sorafenib und Autophagiephänomenen zeigen. Die zentrale Fragestellung der Arbeit war daher, ob durch eine Modulation von Autophagie die Wirksamkeit von Sorafenib auf Tumorzellen verbessert werden kann.

In ersten Experimenten erfolgte die Auslösung bzw. Verstärkung von Autophagiephänomenen in Tumorzellen durch Serumentzug. In einem zweiten Schritt sollte der Einfluss von Autophagie induzierenden und von Autophagie hemmenden Substanzen auf die Tumorzellproliferation bzw. auf den Tumorzelltod unter Sorafenib untersucht werden. Als Modell dienten Zelllinien aus hepatozellulären Karzinomen bzw. aus Hepatoblastom-Zelllinie. Als Ausblick sollte auf Basis dieser Experimente diskutiert werden, ob durch eine Autophagie-modulierende Komedikation die Wirksamkeit von Sorafenib bei Tumorpatienten verbessert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborchemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth, Invitrogen, Sigma-Aldrich, Merk, PAA und Biochrom bezogen. Hiervon abweichende Bezugsquellen werden explizit im Text erwähnt. Als Standardmedium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 10% FCS (fetal calf serum). Des Weiteren wurde HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) als ein Aminosäure freies Salzmedium verwendet. PBS (phosphate buffered saline) wurde im Labor frisch und gebrauchsfertig hergestellt und setzt sich für 10 Liter Lösung wie folgt zusammen:

- 80 g NaCl (Natriumchlorid)
- 11,5 g Na₂HPO₄ (Natriumhydrogenphosphat)
- 2 g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)
- 2 g KCl (Kaliumchlorid)

2.1.2 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Sorafenib Tosylate (LC Laboratories, USA)

3-Methyladenin (Sigma-Aldrich, USA)

Wortmannin (Sigma-Aldrich, USA)

Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich, USA)

Rapamycin (Sigma-Aldrich, USA)

Lithiumchlorid (Sigma-Aldrich, USA)

Taxol (Sigma-Aldrich, USA)

Thapsigargin (LC Laboratories, USA)

Tamoxifen (Sigma-Aldrich, USA)

LY294002 (Merck, Deutschland)

Valproatsäure (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- HepG2 (Quelle: ATCC Catalog No. HB-8065™): Diese Hepatomzelllinie leitet sich vom Hepatoblastom eines männlichen, 15-jährigen Patienten ab.
- Hep3B (Quelle: ATCC Catalog No. HB-8084™): Die Zelllinie Hep3B wurde 1976 aus einer Lebertumor-Biopsie eines 8-jährigen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom etabliert.
- PLC/PRF/5 (Quelle: ATCC Catalog No. CRL-8024™): Diese Hepatomzelllinie entstammt einem erwachsenen Mann mit HCC.
- HuH7 (Quelle: JCRB No. 0403): HuH7 ist eine Zelllinie eines gut differenzierten HCC, die ursprünglich aus einem Lebertumor eines 57-jährigen Japaner im Jahr 1982 gewonnen wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeines

Sämtliche Arbeitsschritte und Tätigkeiten, die unter sterilen Bedingungen durchzuführen sind, wurden an der Herasafe-Sicherheitsbank der Firma Heraeus verrichtet. Bei Arbeitsschritten an den Zellkulturen wurden jegliche Medien und Puffer im Voraus in einem Wasserbad mit Zusatz eines antibakteriellen und antimykotischen Mittels der Firma Roth auf 37 °C Arbeitstemperatur erwärmt. Die Medien und Puffer wurden gemäß Herstellerangaben entweder bei Raumtemperatur (23 °C) oder im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Zellkulturen wurden zum Kultivieren zwischen den Arbeitsschritten in Wasser ummantelten Heracell-Inkubatoren der Firma Heraeus bei 37 °C unter atmosphärischen Druckverhältnissen und Insufflation von 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Man wärmt zunächst das FCS-haltige Medium bei 37 °C im Wasserbad auf und füllt 5 ml davon in ein 15 ml Falcon-Röhrchen. Die in Cryotubes bei -80 °C tiefgekühlt gelagerten Zelllinien werden ins 37 °C warme Wasserbad überführt und zügig aufgewärmt. Anschließend setzt man die aufgetauten Zellen dem frischen FCS-haltigen Medium zu und zentrifugiert die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 x g. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Zellsediment wird in einem neuen 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml frischem FCS-haltigen Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C kultiviert.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Das FCS-haltige Medium wird aus der Zellkulturflasche abpipettiert und verworfen. Mit PBS wird der Zellrasen vorsichtig vom restlichen Medium befreit. Nach dem Waschvorgang mit PBS wird der Zellrasen mit 2 ml Trypsin/EDTA benetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Zellkulturflaschenboden ablöst. Durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche lösen sich nach etwa 3-4 Minuten die Zellen vom Boden ab. Nun fügt man 4 ml FCS-haltiges DMEM-Medium zu und pipettiert die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen. Dieses wird für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend wird der Überstand vorsichtig dekantiert. Es werden 8 ml Einfriermedium bestehend aus DMEM + 20% FCS + 10% DMSO zu den Zellen gegeben und zu je 1 ml in Cryotubes aliquotiert. Die Cryotubes werden dann in das mit Isopropanol gefüllte Einfriergerät „Mr. Frosty“ gestellt und auf -80 °C tiefgekühlt. Anschließend werden die Cryotubes für unbestimmte Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4 Zellpassage

Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie wurden die in Zellkulturflaschen gehaltenen Zellen 1-2 mal pro Woche passagiert. Dabei erfolgte die Zellpassage stets bei einer Zellrasenkonzentration von ca. 80%. Nach Abpipettieren des alten FCS-haltigen DMEM-Mediums wäscht man die Zellen zweimalig mit 5 ml PBS und benetzt den Zellrasen mit Trypsin/EDTA, um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden abzulösen und zu vereinzeln. An die 3-4 minütige Inkubation im Brutschrank folgt das leichte Beklopfen der Flasche. Dies ermöglicht das vollständige Ablösen der Zellen vom Flaschenboden. Es werden 10 ml FCS-haltiges DMEM-Medium hinzugefügt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt. Bei 2000 x g zentrifugiert man die Zellen für 5 Minuten und dekantiert dann vorsichtig den Überstand. Mit 10 ml frischem FCS-haltigem DMEM-Medium resuspendiert man das Zellpellet und füllt es wieder in eine Zellkulturflasche. Diese stellt man zum Inkubieren in den 37 °C warmen Brutschrank unter Insufflation von 5% CO₂-Atmosphäre.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Die Zellen werden wie unter „2.2.1.4 Zellpassage“ beschrieben vom Boden gelöst und vereinzelt. Dann werden 15 µl Zellsuspension und 15 µl 0,4% Trypanblau (Sigma) in einem Eppendorfcup pipettiert und mittels Vortex kurz vermischt. Die Neubauer-Zählkammer muss mit einem Deckgläschen versehen werden, sodass die Newtonschen Ringe sichtbar werden. Als nächstes werden 10 µl des Farbstoff-Zellgemischs am Deckgläschenrand mittels Pipettenspitze angesetzt. Durch Kapillarkräfte wird die Suspension zwischen Zählkammer und Deckgläschen angesaugt und auf eine Kammer mit 4 Quadranten (Großfelder) gleichmäßig verteilt. Lebende Zellen nehmen dabei den blauen Farbstoff nicht auf und bleiben auf blauem Hintergrund hell, während tote bzw. lysierte Zellen den blauen Farbstoff aufnehmen und somit ebenfalls wie der Hintergrund blau erscheinen.

Nun werden die intakten Zellen in 2 Großfeldern, bestehend aus 16 gleichgroßen Kleinquadraten, zusammen gezählt und durch zwei geteilt. Ein Großfeld entspricht dabei 10^{-4} cm^3 .

Die Zellzahl-Konzentration der Zellsuspension ergibt sich wie folgt:

Zellzahl/ml = durchschnittliche Zellzahl pro Großfeld x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.2.2 Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Der Laktat-Dehydrogenase-Assay beruht auf der photometrischen Bestimmung der LDH-Aktivität. LDH ist ein in jeder Zelle vorkommendes Enzym, welches bei Zerstörung der Zytoplasmamembran der Zellen als Zeichen des Zelltodes freigesetzt wird. Der LDH-Assay der Firma Analyticon enthält 2 Reagenzien, die miteinander gemischt werden müssen.

Reagenz 1 enthält Tris-Puffer, pH 7,5 [80 mmol/l], NaCl [200 mmol/l] und Pyruvat [1,6 mmol/l]. Reagenz 2 ist eine Trockensubstanz und enthält NADH [0,2 mmol/l], das in Reagenz 1 aufgelöst werden muss und bis auf Raumtemperatur erwärmt wird. Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



Der Umsatz an NADH zu NAD^+ korreliert mit der Konzentration an freigesetzten LDH im Zellmedium und kann photometrisch bestimmt werden.

Pro Kavität der 96-Kavitäten-Platte werden 10 μl Überstand aus den behandelten und inkubierten Zellplatten pipettiert und mit 200 μl des Reagenzgemisches vermischt und sogleich in den Photometer (GeniosPlus, Tecan) zur kinetischen Bestimmung eingeführt. Die photometrische Messung der Extinktionen erfolgt bei einer Wellenlänge von 340 nm.

2.2.3 Sulforhodamin-B-Assay

Der Sulforhodamin-B-Assay (kurz SRB-Assay) ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinmasse einer Zelle respektive einer Zellaussaat, welcher über einen weiten Bereich linear zur Zellzahl ist. Die Messung der Gesamtproteinmasse erfolgt photometrisch nach Anfärben der Zellen [406].

Hierfür benötigte Materialien:

- PBS
- 10%ige Trichloressigsäure (kurz TCA)
- 0,4%ige Sulforhodamin-B-Lösung (Firma Sigma)
- 1%ige Essigsäure
- 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5)

Fixieren der Zellen:

Zunächst wird der Überstand der behandelten Zellen dekantiert, mit 500 µl kaltem PBS gewaschen und das PBS ebenfalls dekantiert. Die Zellen werden nun mit 200 µl kaltem TCA bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Fixiervorgang werden die Kavitätenplatten unter fließendem Leitungswasser vorsichtig viermalig gewaschen und für 12 Stunden oder über Nacht bei 40 °C getrocknet. Nach diesem Trocknungsvorgang ist eine zeitlich unbeschränkte Lagerung möglich.

Anfärben der Zellen:

Zum Anfärben werden zu jeder Proben-Kavität 250 µl der in 1%iger Essigsäure aufgelösten SRB-Lösung gegeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur zum Färben inkubiert. Die farbigen Überstände werden dekantiert, die Kavitäten wäscht man so oft mit 1%iger Essigsäure, bis diese fast farblos erscheint (etwa 3-4 Waschvorgänge). Die rotviolett gefärbten Zellen sind nun sichtbar und können für weitere 3-6 Stunden oder über Nacht bei 40 °C getrocknet werden.

Ab Beginn der Trocknung muss die Extinktion des SRB-Assays spätestens 48 Stunden später gemessen werden.

Messung der Extinktion:

Die getrockneten Kavitätenplatten werden zunächst auf Eis gestellt und pro Kavität mit 500 µl der kalten 10 mM Tris-Lösung gelöst. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis entnimmt man jeder Kavität 80 µl der Lösung und pipettiert sie in Form von Dreifachbestimmung in eine 96-Kavitätenplatte. Diese Platte wird mittels Photometer (GeniosPlus) bei 550 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) gemessen. Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung gebildet.

2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford stellt eine sensitive Methode dar, mit der im Extinktionsbereich bei 595 nm die Extinktionswerte einer Eichreihe mit einer Regressionsgeraden gut beschrieben werden können.[407]

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Dabei ist das Maß der Farbreaktion vom jeweiligen Protein abhängig; deshalb wird zur Konzentrationsbestimmung eines bestimmten Proteins eine Kalibrierung notwendig. Diese Kalibrierung erfolgt mit dem Standardprotein BSA.

Vor der Extinktionsbestimmung werden die Zellen durch 20 sekundige Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Hierbei stoßen die Zellen in der Zellsuspension ständig aneinander und es entstehen sogenannte Kavitationskräfte. Da bei diesem Ultraschall-Aufschluss-Verfahren eine große

Hitze entsteht, wird dieser Arbeitsschritt unter ständiger Kühlung der Proben in 4 °C kaltem Wasser bewerkstelligt. Unmittelbar vor und nach dem Aufschließen werden die Zellen stets auf Eis gelagert.

Zum Herstellen der BSA-Standardkonzentrationsreihe benötigt man folgende Materialien:

- Bradford-DyeReagent (bestehend aus 1 Anteil Bradford-Reagenz [BioRad] und 4 Anteilen Wasser bidest.)
- BSA-Standard (Standardkonzentration 10 mg/ml)

Man stellt eine BSA-Standardreihe mit den Endkonzentrationen 0,05, 0,1, 0,25 und 0,5 mg/ml her, indem jeweils mit DMEM-Medium verdünnt wird. Aus allen Proben werden 10 µl entnommen und in eine Mikrotiterplatte übertragen. Pro Kavität werden dabei Doppelbestimmungen durchgeführt. In jede Kavität füllt man 100 µl DyeReagent und lässt die Mikrotiterplatte 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nun legt man die Mikrotiterplatte in den ELISA-Reader, wo sie zunächst geschüttelt wird, um das Reagenz gleichmäßig in der Kavität zu verteilen. Bei einer Wellenlänge von 595 nm werden schließlich die Extinktionen gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand der erstellten Eichkurve ermittelt.

2.2.5 DNA-Laddering

Das DNA-Laddering ist eine Methode, bei der die internucleosomale DNA-Fragmentierung einer bestimmten Zelllinie im Rahmen einer Apoptoseinduktion im Agarose-Gel als Bandenmuster dargestellt werden und somit die Apoptose nachgewiesen werden kann.[408]

Hierzu wird zunächst eine Zelllinie, die auf Apoptose untersucht werden soll, inkubiert und mit zuvor ausgewählten Apoptose induzierenden Agentien beimpft. Bei vorliegender Zellzahl von $5-10 \times 10^5$ erfolgt nach Waschung mit PBS die vorsichtige Zentrifugation derselben für 5 Minuten bei 500 x g. Nach

Dekantieren oder Abpipettieren des Überstands wird das Zellpellet mit dem Lysepuffer lysiert. Anschließend gibt man nacheinander zwei Enzymkonzentrate mit einer jeweiligen Inkubationszeit hinzu. Danach wird Ammoniumazetat sowie Isopropanol hinzugefügt und man kühlt die Proben bei -20 °C ab.

Nach erneuter Zentrifugation dekantiert oder pipettiert erneut den Überstand ab, wäscht mit 70%igem Ethanol aus und lässt die Probe lufttrocknen. Im nächsten Schritt löst man die Probe in DNA-Suspensionspuffer auf. 15-30 µl der so gewonnenen Fraktion werden in ein 1,2%iges Agarosegel eingebettet, welches zusätzlich Ethidiumbromid enthält. Nach ein- bis zweistündigem Laufen des Gels bei 5 V/cm können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dabei lässt man sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle mitlaufen.

3. Ergebnisse

3.1. Sorafenib-Konzentrationsreihen

Um eine Verbesserung der Wirksamkeit von Sorafenib auf Tumorzellen untersuchen zu können, sollte zunächst die hierfür geeignete Konzentration von Sorafenib bestimmt werden. Bei einer zu geringen Konzentration von Sorafenib könnten unterstützende Effekte übersehen werden, wogegen bei einer zu hohen Konzentration mit Sorafenib kein zusätzlicher Effekt mehr nachweisbar sein würde.

Als erster Schritt wurden daher die Zelllinie Hep3B aus einem hepatozellulären Karzinom und die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 mit Sorafenib-Konzentrationen zwischen 0,625-20,0 μM inkubiert. Der Einfluss von Sorafenib auf die Tumorzellen wurde mit Hilfe eines SRB-Tests (Abb. 9, Frage nach Proliferation der Zellen) und eines LDH-Tests (Abb. 10, Frage nach Toxizität mit Membranpermeabilität und LDH-Freisetzung in den Überstand) untersucht. Als Ergebnis konnte aus beiden Testsystemen abgelesen werden, dass bei einer Konzentration von 5 μM bereits ein Effekt der Sorafenibwirkung vorhanden war, jedoch noch keine ausgeprägte Toxizität mit LDH-Freisetzung beobachtbar war, wie bei höheren Konzentrationen. Abgeleitet aus diesen Untersuchungen wurde eine Sorafenib-Konzentration von 5 μM als Standardkonzentration für die weiteren Versuche festgelegt.

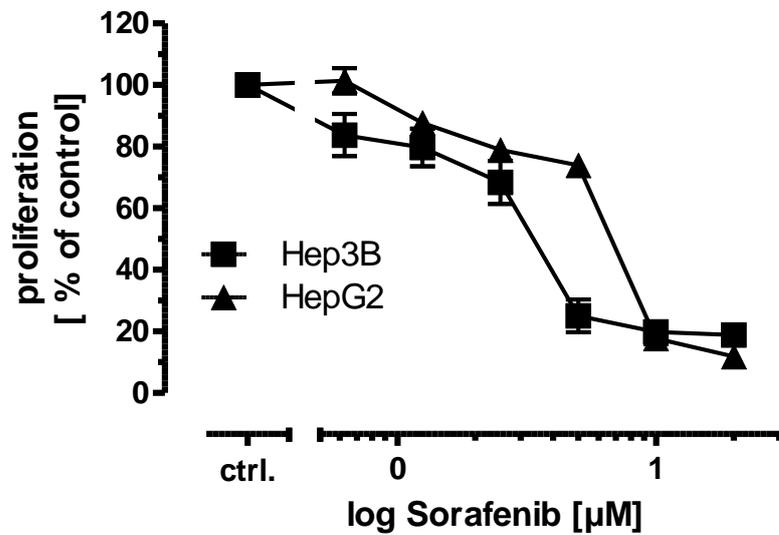


Abb. 9 Sorafenib-Konzentrationsreihe von HepG2 + Hep3B nach 48 h Inkubation in DMEM mit 10% FCS. Als Kontrolle dient DMEM mit 10% FCS ohne Sorafenib. Die Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung (SD).

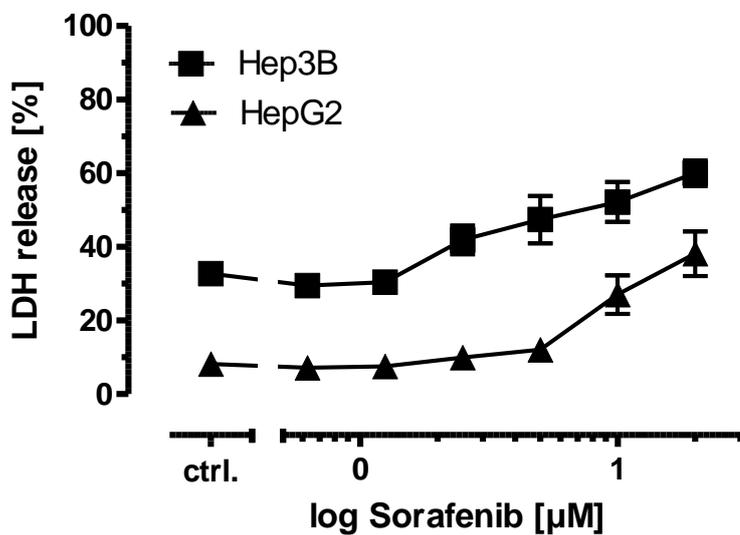


Abb. 10 Sorafenib-Konzentrationsreihe von HepG2 + Hep3B nach 48 h Inkubation in DMEM mit 10% FCS. Als Kontrolle dient DMEM mit 10% FCS ohne Sorafenib. Die Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung (SD).

3.2. Wirkung des Serum-Entzuges auf die Hepatomzelllinien-Proliferation

Eine Möglichkeit Autophagie auszulösen ist der Serumentzug in Überständen von Zellkulturen [409]. Um den Einfluss des üblicherweise im Wachstumsmedium unserer Zelllinien zugesetzten Serums nachweisen zu können, wurden die Auswirkungen einer stufenweisen Reduktion von FCS im Medium auf einen SRB-Test mit HepG2 Zellen untersucht. Als Ergebnis zeigte sich bereits bei einem Ersatz des üblichen Zusatzes von 10% durch 5%-FCS-haltiges Medium eine deutliche Reduktion der Zellproliferation, die bei 1%-haltigem bzw. serumfreiem Medium noch weiter zunahm (Abb. 11). Dabei liegt im Vergleich zwischen der Proliferationsrate der Standard-Konzentration von 10% des FCS im jeweiligen Medium und dem kompletten FCS-Entzug im gleichen Medium eine Reduktion um den Faktor 5 vor. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch für Hep3B Zellen.

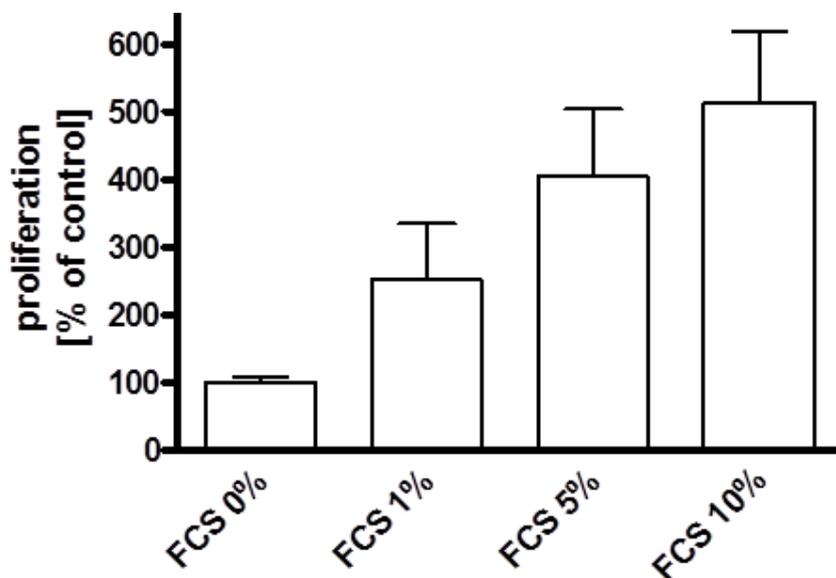


Abb. 11 Verdünnungsreihe des FCS im DMEM bei HepG2 nach 48 h Inkubation. Als 100%-Kontrolle dient die Zellproliferation in DMEM ohne FCS-Zusatz. Angegeben ist die einfache Standardabweichung (SD).

3.3. Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug im LDH-Assay

3.3.1 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in DMEM

Unter der Annahme, dass zunehmende Autophagie in Tumorzellen die Wirkung von Sorafenib verstärken könnte, wurde als nächster Schritt die Auswirkung eines Serumentzugs auf Sorafenib-behandelte Zellen mit einem LDH-Test untersucht. Es zeigten sich dabei signifikant höhere LDH-Freisetzungsraten als unter FCS-haltigen Kulturbedingungen (Abb. 12). Während die LDH-Konzentrationen der Kontrolle ohne Sorafenib und mit 5 μ M Sorafenib in DMEM mit 10% FCS nach 24 h Inkubation beide ähnlich niedrige Werte zwischen 20-30% erreichten, trat ein erheblicher und statistisch signifikanter Unterschied der LDH-Freisetzung bei FCS-freiem DMEM zwischen der Kontrolle und 5 μ M Sorafenib auf. In Abb. 13 wird derselbe Versuchsansatz mit Hep3B gezeigt. Hierbei ist bereits die Basis-LDH-Konzentration bei ca. 40%, sodass der synergistische Effekt aus Sorafenib und dem FCS-Entzug des DMEM geringer, wenngleich ebenfalls signifikant ausfällt. Die Höchstwerte der LDH-Freisetzung liegen mit 5 μ M Sorafenib bei ca. 65%.

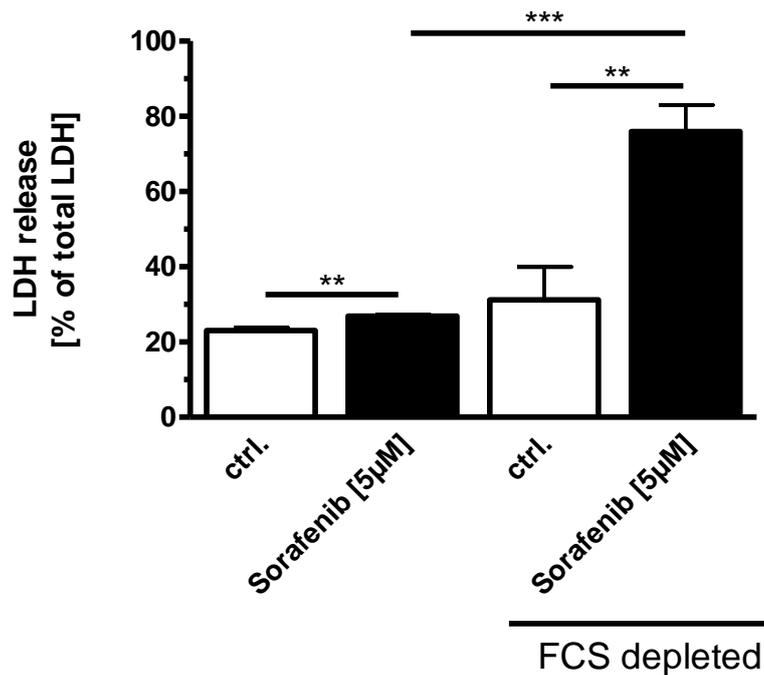


Abb. 12 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 +/- FCS
 Die Kontrollen enthalten DMEM ohne Sorafenib (mit oder ohne FCS). Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

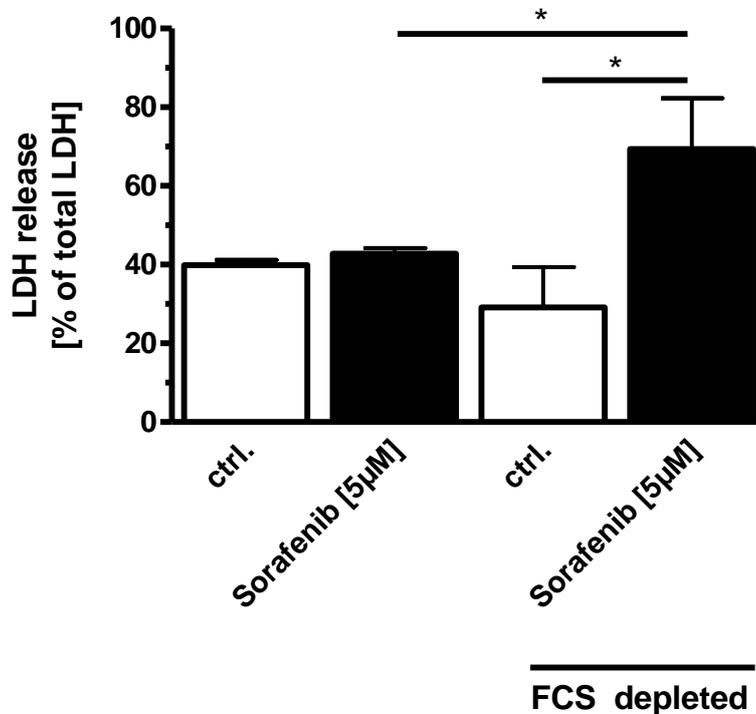


Abb. 13 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

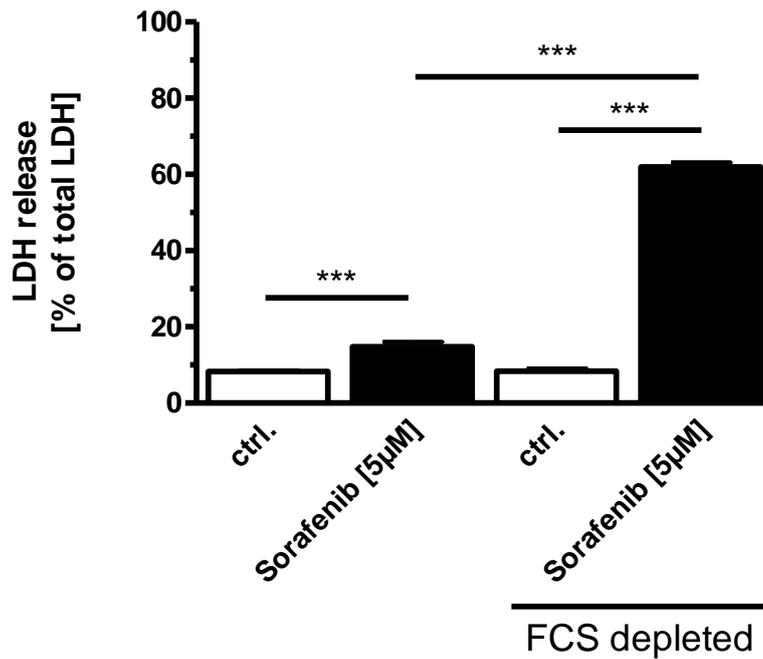


Abb. 14 24-stündige Sorafenibwirkung auf PLC/PRF/5 +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studenten-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Das bereits beobachtete Muster der Verstärkung einer Sorafenibwirkung konnte in einer dritten und vierten Zelllinie, PLC/PRF/5- und HuH7-Zellen, bestätigt werden. Die LDH-Freisetzungsraten für PLC/PRF/5 liegen in Abb. 14 für die Kombination aus 5 µM Sorafenib und dem FCS-Entzug bei ca. 50%. Die alleinige Sorafenibbehandlung ohne FCS-Entzug weist dabei keinen signifikanten Unterschied zur Sorafenib nativen Kontrolle auf. Bei HuH7 Zellen liegt die LDH-Freisetzungsraten bei ca. 55% bei der Kombinationsbehandlung, während Sorafenib mit 10% FCS in DMEM lediglich 20 Prozentpunkte darunter liegt. Dieser Unterschied ist somit geringer als in den anderen Zelllinien, jedoch weiterhin signifikant (Abb. 15).

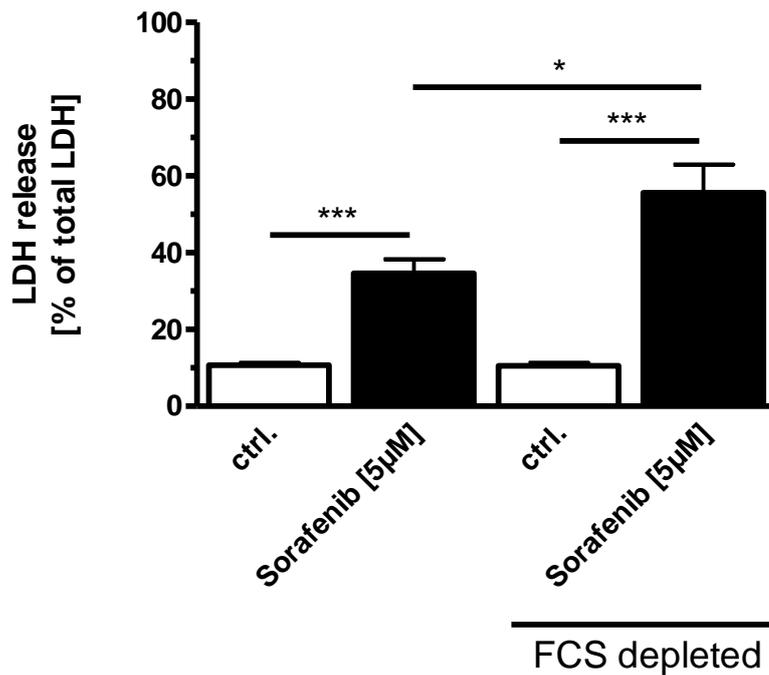


Abb. 15 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studenten-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Die gleiche Versuchsreihe wie in den Abbildungen 12-15 wurde mit einer 48-stündigen statt 24-stündigen Sorafenib-Einwirkungszeit wiederholt. Hierbei resultierten in allen vier Hepatom- bzw. HCC-Zelllinien (HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5 und HuH7) vergleichbare LDH-Reaktionsmuster wie in den 24-stündigen Inkubationszeiten. Dies kann den folgenden Abbildungen 16-19 entnommen werden. Auch hier hat die Zelllinie HepG2 das höchste Signifikanzniveau mit einer absoluten Differenz in der LDH-Freisetzungsrate von knapp 50 Prozentpunkten im direkten Vergleich zwischen 5 µM Sorafenib mit und ohne 10-prozentigem FCS-Zusatz in DMEM. Und erneut ist bei HuH7 und PLC/PRF/5 eine deutlich geringere, wenngleich signifikante und relevante LDH-Freisetzung zu verzeichnen als bei Hep3B und HepG2.

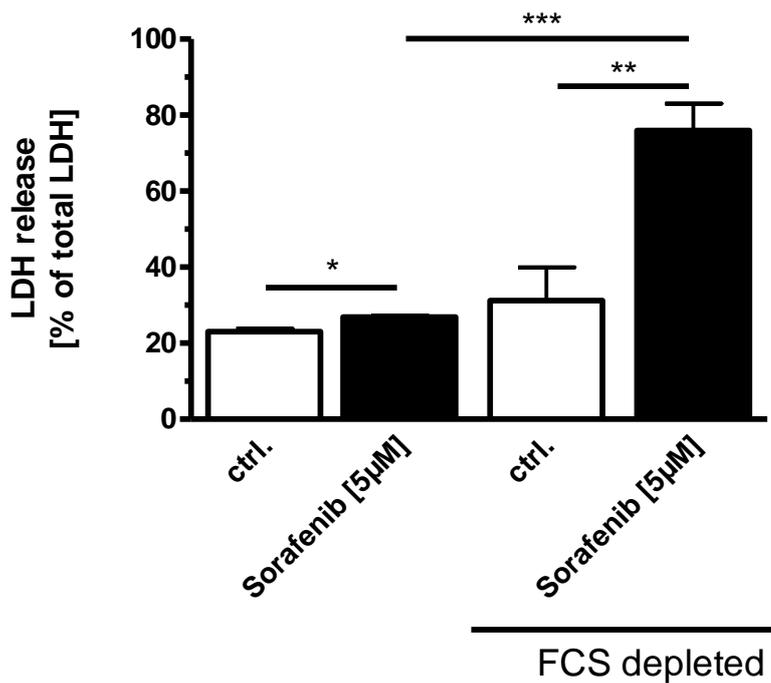


Abb. 16 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studenten-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

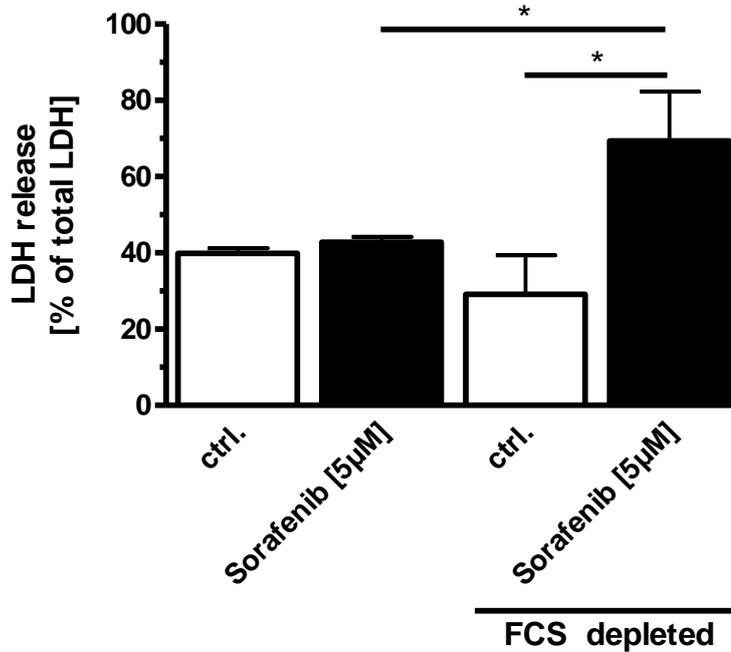


Abb. 17 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studenten-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

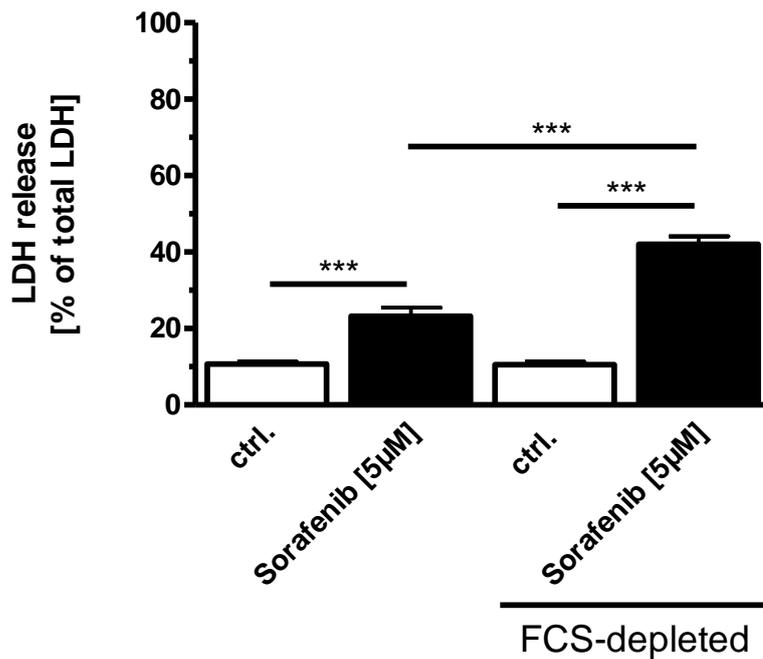


Abb. 18 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

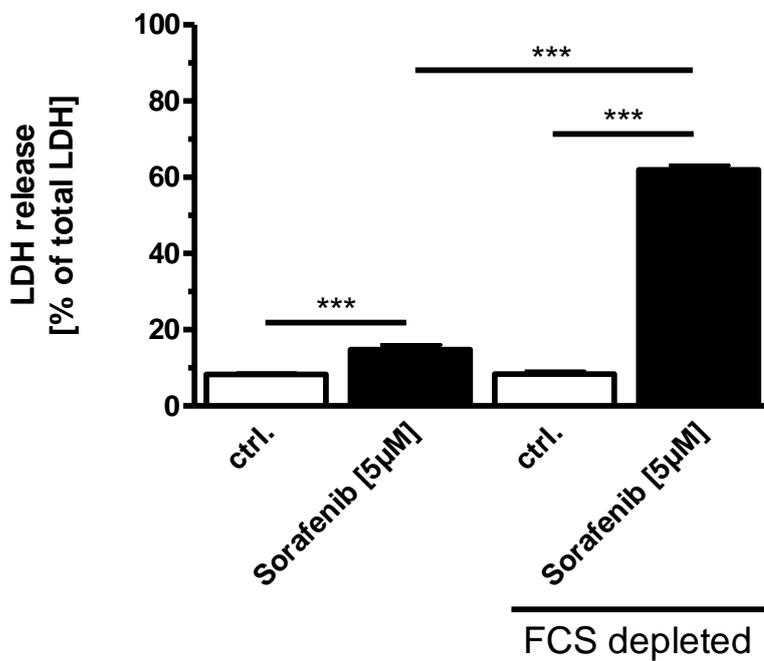


Abb. 19 48-stündige Sorafenibeinwirkung auf PLC/PRF/5 +/- FCS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

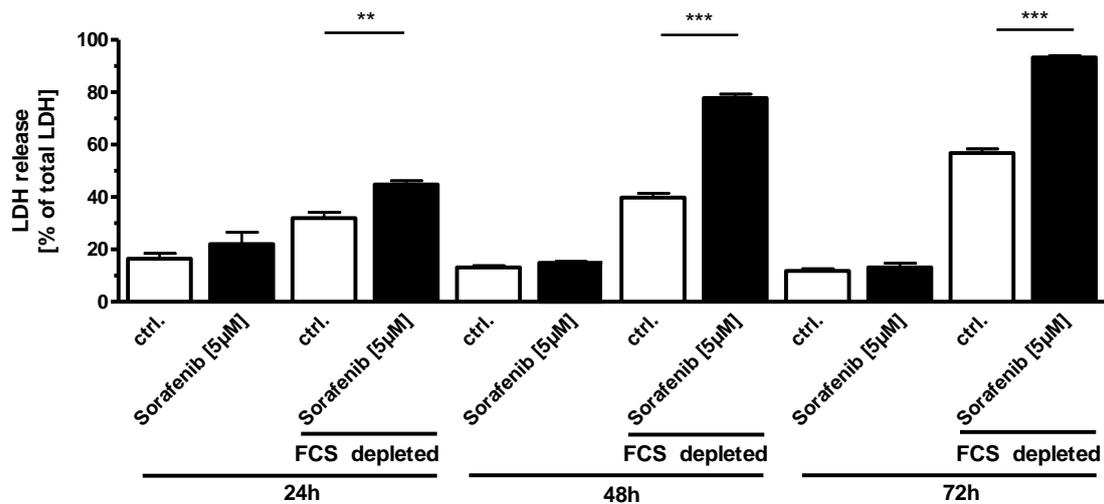


Abb. 20 Kinetik der LDH-Freisetzung von HepG2 mit Sorafenib in DMEM mit 10% FCS und DMEM ohne FCS (FCS depleted). Als Kontrolle wurden jeweils Zellen ohne Inkubation mit Sorafenib eingesetzt (ctrl.). Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Als weitere Untersuchung wurden im zeitlichen Verlauf die dynamischen LDH-Freisetzungsraten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Sorafenib mit HepG2 Zellen untersucht. Der Effekt einer verstärkten Zellschädigung durch Sorafenib bei Serumentzug zeigte sich dabei bei allen untersuchten Inkubationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h (Abb. 20). Diese Beobachtung konnte in vergleichbarer Weise auch für die weiteren Zelllinien Hep3B, HuH7 und PLC/PRF/5 beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in diesen ersten Versuchen gezeigt werden, dass durch Serumentzug die Wirkung von Sorafenib verstärkt werden kann. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Maßnahmen die zu einer erhöhten Autophagie in Tumorzellen führen, die medikamentöse Therapie mit Sorafenib verbessern könnten.

3.3.2 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in HBSS Medium

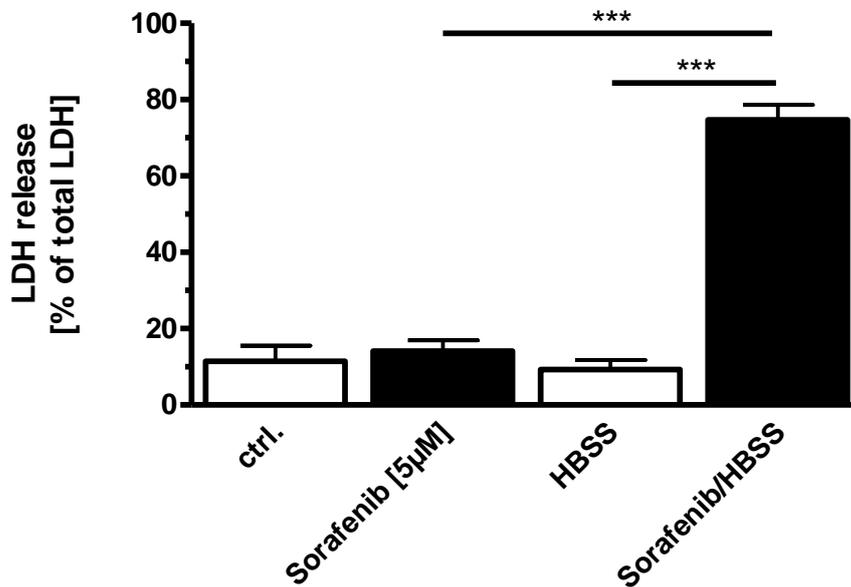


Abb. 21 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HepG2 in DMEM oder HBSS (+ 10% FCS, links) und HBSS ohne FCS (rechts). Als Kontrolle wurden jeweils Zellen ohne Sorafenib in den entsprechenden Medien inkubiert. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Analog zu den Versuchsreihen mit Sorafenib in DMEM mit und ohne FCS-Entzug, wurden weitere Untersuchungen in dem Aminosäure freien Salzmedium HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) durchgeführt. Wie aus Abb. 21 deutlich und mit hohem Signifikanzniveau hervorgeht, verzehnfacht sich die Toxizität, gemessen an der LDH-Freisetzungsrates ins jeweilige Medium (DMEM oder HBSS), wenn Sorafenib in HBSS über 24 Stunden inkubiert wird im Gegensatz zu den jeweiligen Kontrollen (Sorafenib in DMEM mit 10% FCS oder HBSS ohne FCS und ohne Sorafenib). Dies ist die höchste relative Zelltoxizität, gemessen am Vielfachen der LDH-Freisetzung im Gegensatz zu Sorafenib in DMEM mit 10% FCS.

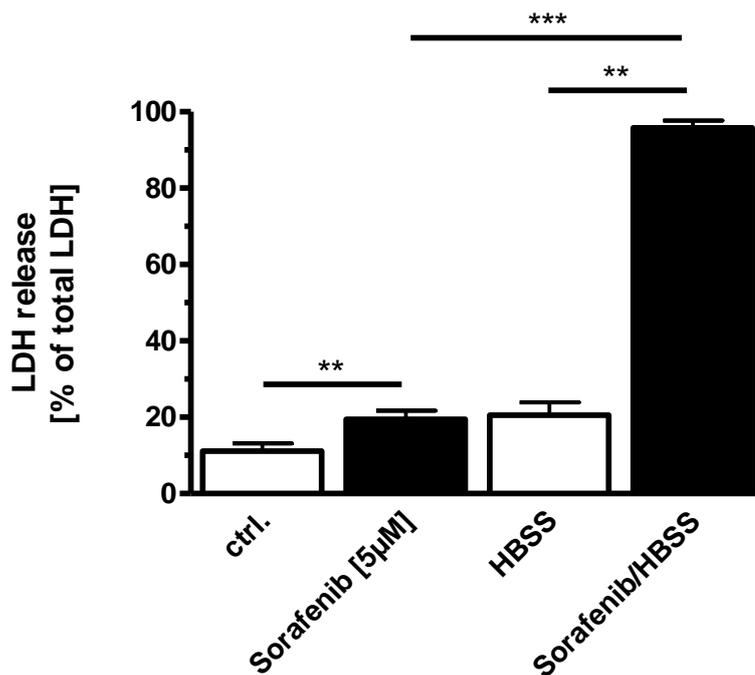


Abb. 22 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf HuH7 in DMEM + HBSS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Die höchste Zelltoxizität in absoluten Prozentzahlen in dieser Versuchsreihe mit HBSS und Sorafenib findet sich in der Versuchsreihe mit HuH7 (Abb. 22). Hierbei liegt die maximale LDH-Freisetzungsrates bei über 90% in der Kombination aus Sorafenib und HBSS nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib, während sowohl Sorafenib in DMEM (+ 10% FCS) als auch HBSS ohne Sorafenib auf gleich niedrigen LDH-Spiegeln bei ca. 20% liegen. Damit ist die Toxizität von Sorafenib in HBSS interessanterweise deutlich höher als in DMEM, während das nährstoffarme Milieu in HBSS alleine noch keine Toxizität per se darstellt.

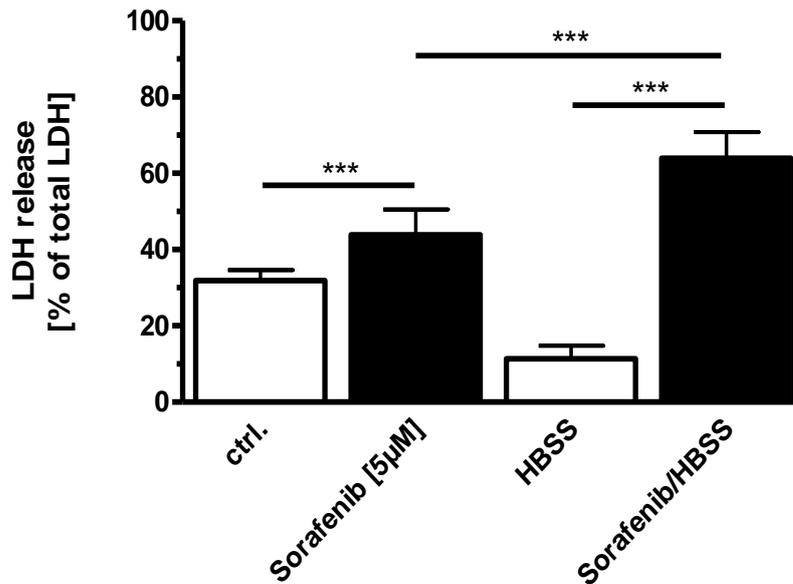


Abb. 23 24-stündige Sorafenibeinwirkung auf Hep3B in DMEM + HBSS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Hep3B hat zwar die niedrigste Differenz bei der LDH-Freisetzungsrates zwischen der Sorafenib-Kontrolle in FCS-haltigem DMEM und der Kombination aus Sorafenib in HBSS, die gerade mal 20% beträgt, jedoch immer noch hoch signifikant ist (Abb. 23). Vergleicht man allerdings die Änderung der LDH-Freisetzungsrates zwischen der HBSS-Kontrolle in FCS-freiem Milieu und die Sorafenib-Wirkung in HBSS, so stellt sich eine Differenz von immerhin ca. 50 Prozentpunkten dar. Zu bedenken ist hierbei, dass sämtliche Versuchsreihen mit Hep3B eine höhere LDH-Freisetzung in der Kontrolle in DMEM mit 10% FCS-Zusatz aufweisen. Dem gegenüber ist die LDH-Freisetzung in HBSS als Kontrolle mit lediglich 12% beträchtlich geringer. Es lässt sich folglich festhalten, dass HBSS ohne Sorafenib weniger toxisch ist als DMEM ohne Sorafenib, bei der Kombination mit Sorafenib jedoch HBSS toxischer wirkt als DMEM.

Wie aus Abb. 24 ersichtlich ist, verhält es sich mit der LDH-Freisetzungsrates bei der PLC/PRF/5-Kultur hinsichtlich der relativen Verhältnisse zwischen den beiden Medien (DMEM vs. HBSS) unter Zugabe von Sorafenib und in der

Kontrolle ohne Sorafenib etwas anders. So gibt es zwischen der HBSS-Kontrolle und Sorafenib in DMEM keinen signifikanten Unterschied bezüglich der LDH-Freisetzungsrates; beide kommen auf knapp 20%, während die DMEM-Kontrolle bei etwa 10% darunter liegt. Erst die Kombination aus HBSS und Sorafenib 5 μ M erzeugt einen signifikanten und relevanten Zelluntergang im Sinne einer massiven LDH-Freisetzung von \sim 75%. Diese liegt zwar verhältnismäßig unter der maximal reproduzierbaren Toxizität mit der HuH7-Zelllinie. Sie ist jedoch im Vergleich zur Sorafenib-Kontrolle in DMEM (Abb. 24) knapp vierfach erhöht.

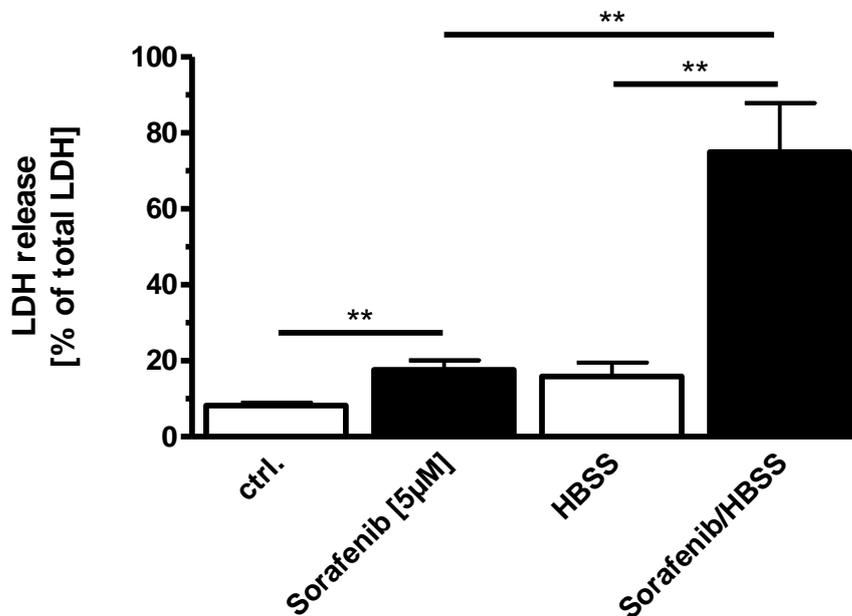


Abb. 24 48-stündige Sorafenibwirkung auf PLC/PRF/5 in DMEM + HBSS
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

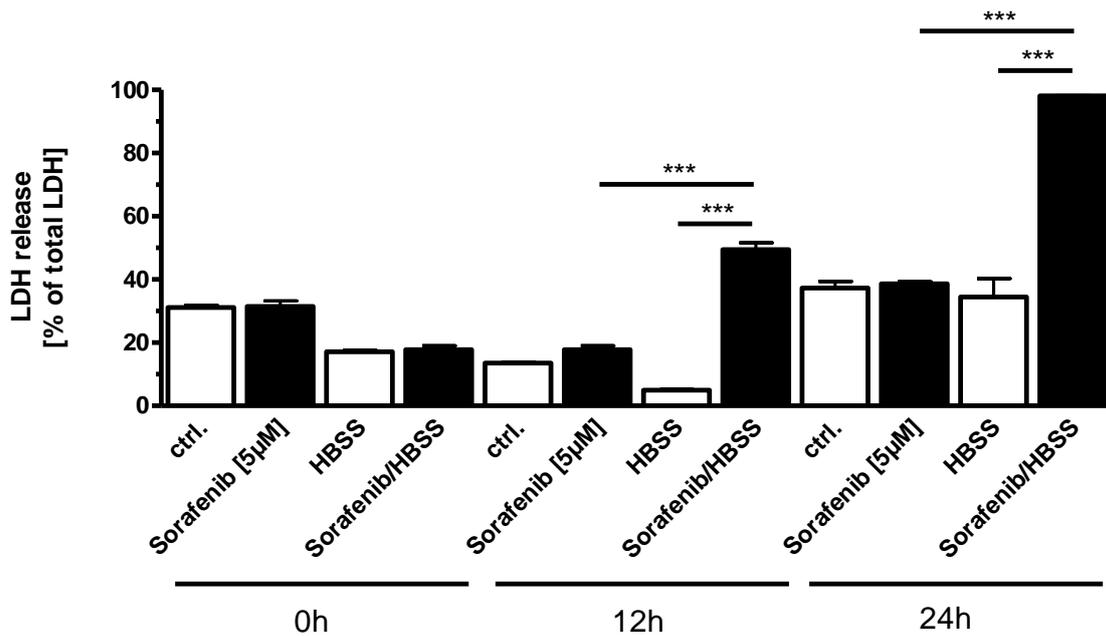


Abb. 25 Kinetik der LDH-Freisetzung von HepG2 mit Sorafenib in DMEM (+10% FCS) und in HBSS (ohne FCS). Als Kontrolle wurden jeweils Zellen ohne Inkubation mit Sorafenib eingesetzt (ctrl.)
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [$*$ \triangleq ($p \leq 0,05$); $**$ \triangleq ($p \leq 0,01$); $***$ \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Die Variation der Inkubationszeiten mit HepG2-Zellen in HBSS ohne FCS-Zusatz wurde auf eine maximale Inkubationszeit von 24 Stunden begrenzt, da zu diesem Zeitpunkt bereits in der unbehandelten Kontrolle eine erhebliche Zytotoxizität in HBSS beobachtet werden konnte. Interessanterweise kommt es bei 12 h und 24 h zu einem signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung zwischen Sorafenib behandelten Zellen in Aminosäure freiem HBSS und DMEM mit FCS (Abb. 25).

In der folgenden Versuchsgrafik in Abb. 26 wird deutlich, dass HBSS mit FCS-Zusatz (10%) keinen Unterschied im Hinblick auf die LDH-Freisetzung unter Sorafenib bei HepG2-Zellen zeigt.

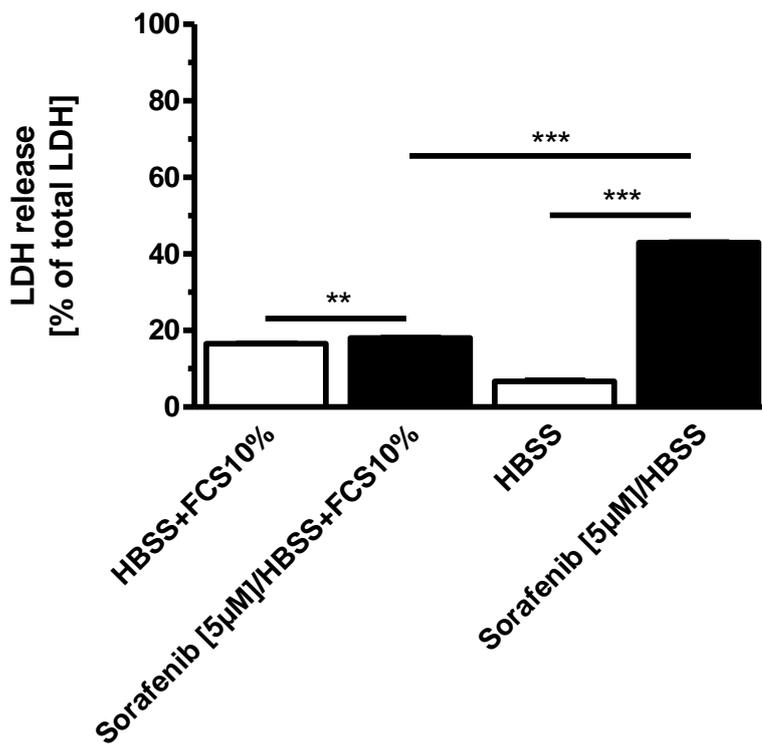


Abb. 26 Unterschiede der HBSS-Wirkung +/- FCS bei HepG2
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studenten-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass unter Verwendung eines Aminosäure freien Salzmediums ebenfalls die Toxizität von Sorafenib in Tumorzellen erhöht werden kann. Interessanterweise ist das Niveau der LDH-Freisetzung in der HBSS-Kontrolle ohne Sorafenib niedriger als im vergleichsweise nährstoffreicheren DMEM. Daraus ergibt sich eine ausgeprägtere Toxizität zwischen der HBSS-Kontrolle und Sorafenib in HBSS im Vergleich zu Versuchen unter Verwendung von DMEM.

3.4 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug im SRB-Assay

3.4.1 Sorafenibwirkung bei FCS-Entzug in DMEM

Zusätzlich zu den LDH-Versuchen der Abbildungen 12-19 erfolgten auch Versuchsreihen mit denselben Inkubationszeiten, jedoch als SRB-Test. Mittels SRB-Assays konnten an folgenden Beispielen von HepG2 und Hep3B die Hypothese der vermehrten bzw. der verstärkten Toxizität bei der Kombination aus 5 μ M Sorafenib und FCS-Entzug des DMEM über eine verminderte Proliferationsrate bestätigt werden. Eine Signifikanz zeigt sich beim Versuch mit den HepG2-Zellen sowohl zwischen 5 μ M Sorafenib mit und ohne FCS-Zusatz in DMEM als auch zwischen der unbehandelten Kontrolle in FCS-freiem DMEM und 5 μ M Sorafenib unter FCS-Entzug. Während im SRB-Test bei FCS-haltigem DMEM in Kombination mit 5 μ M Sorafenib ein Wert von 95% bestimmt werden konnte (Abb. 27), ergab die FCS-freie Kontrolle ca. 12% und die FCS-freie Inkubation mit DMEM und Sorafenib lediglich noch etwa 3% der unbehandelten Kontrolle (ctrl.).

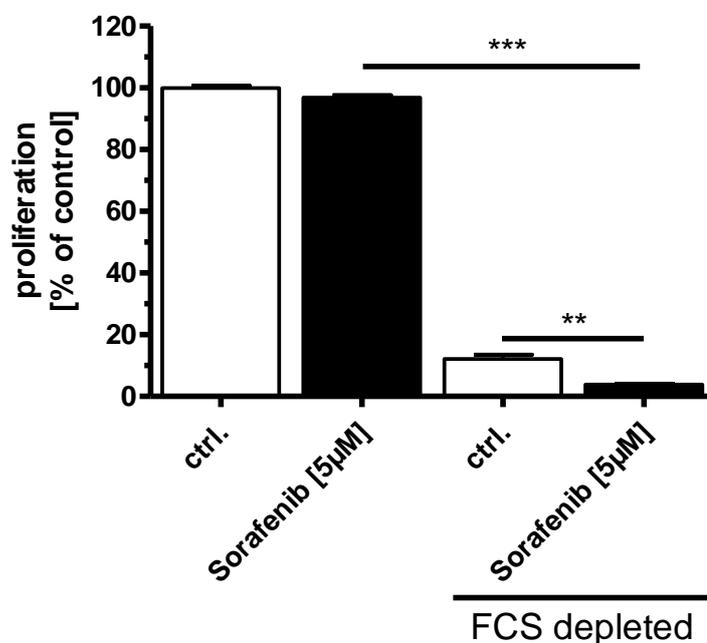


Abb. 27 Proliferation von HepG2 bei Sorafenib +/- FCS nach 48 h
Alle Werte sind relativ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle in FCS-haltigem Medium (10%). Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Die Hep3B-Zelllinie zeigte im SRB-Assay ebenfalls die größte Hemmung unter der Kombination aus Serumentzug und Inkubation mit Sorafenib (Abb. 28). Im Gegensatz zum Versuch mit HepG2-Zellen zeigten Hep3B Zellen jedoch keine so stark ausgeprägte Proliferationshemmung von Kontrollzellen ohne Sorafenibbehandlung in serumfreiem DMEM.

Ergänzend zu einer erhöhten Toxizität bei den durchgeführten LDH-Tests fanden sich somit bei den SRB-Assays eine mit Abstand am stärksten ausgeprägte Proliferationshemmung bei der Kombination von Serumentzug und Behandlung mit Sorafenib.

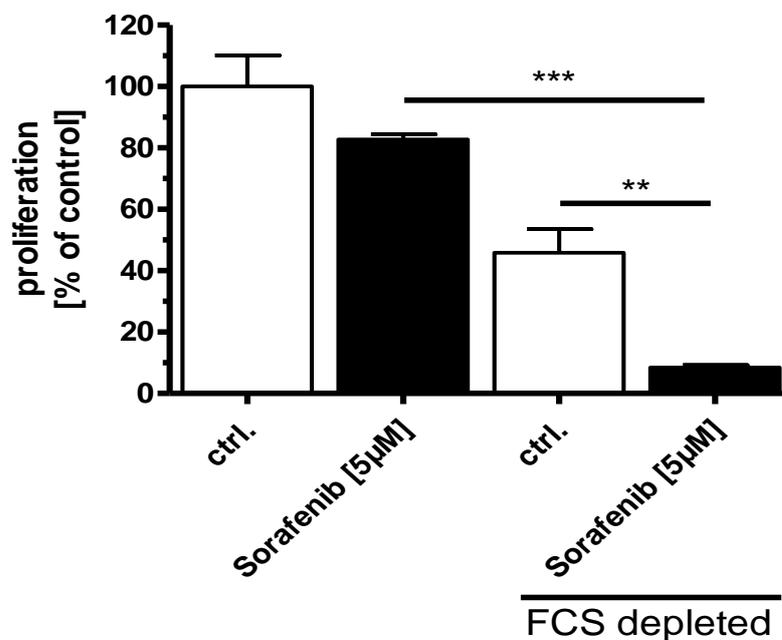


Abb. 28 Proliferation von Hep3B bei Sorafenib +/- FCS nach 48 h
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

3.4.2 Sorafenibwirkung in FCS-freiem HBSS-Medium

Die oben bereits beschriebenen SRB-Tests wurden zusätzlich auch unter Verwendung des Aminosäure freien Salzmediums HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) durchgeführt.

Abb. 29 und Abb. 30 illustrieren die Auswirkung des Sorafenibs nach 24-stündiger Inkubation auf die Zelllinien HepG2 und Hep3B.

Hierbei zeigte sich, dass in Bezug zu unbehandelten Zellen in DMEM (+10% FCS) bereits bei Zusatz von Sorafenib eine verminderte Proliferation gemessen werden konnte. Unter Verwendung von HBSS als Zellmedium konnte bei der unbehandelten Kontrolle bereits eine Reduktion der gemessenen relativen Proliferationsrate detektiert werden, wogegen die zusätzliche Inkubation mit Sorafenib zu einer erheblich höheren Proliferationshemmung führte (Abb. 29 für HepG2 und Abb. 30 für Hep3B).

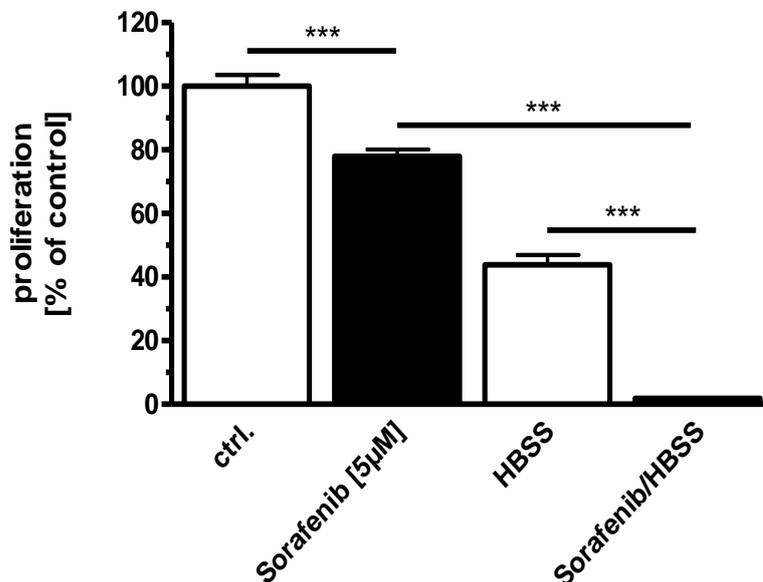


Abb. 29 Proliferation von HepG2 bei Sorafenib in DMEM/HBSS nach 24 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

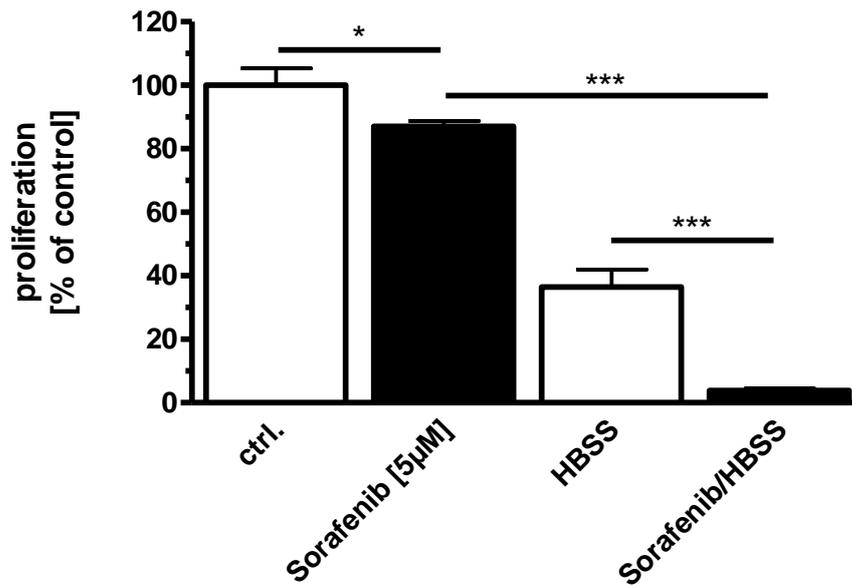


Abb. 30 Proliferation von Hep3B bei Sorafenib in DMEM/HBSS nach 24 h
 Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der
 Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Zusammenfassend konnte somit unter allen Situationen mit einer vermuteten erhöhten Autophagierate (Serumentzug bei DMEM oder Aminosäure freies Salzmedium HBSS) eine erheblich stärkere Toxizität bzw. Proliferationshemmung durch Sorafenib erreicht werden.

3.5 Die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin im LDH-Assay

3-Methyladenin (3-MA) ist ein bekannter Autophagie-Inhibitor. 3-MA wurde zur Überprüfung der Hypothese, dass die durch ein Mangelmedium verstärkte Autophagie zur erhöhten Toxizität von Sorafenib beiträgt, eingesetzt. Bekanntermaßen ist die Toxizität von 3-MA in FCS-haltigem DMEM in den hier eingesetzten Zelllinien ab einer Konzentration von 10 mM toxisch, so dass für die weiteren Versuchsreihen stets eine 3-MA-Konzentration von 5 mM gewählt wurde.

Im Zytotoxizitätsversuch zeigten dabei HepG2-Zellen unter Inkubation mit 3-MA keine erhöhte LDH-Freisetzung sowohl in FCS-haltigem als auch FCS-freiem DMEM (Abb. 31). Interessanterweise konnte der Einsatz von 3-MA die erhöhte Toxizität von Sorafenib in FCS-freiem DMEM signifikant reduzieren (Abb. 31). Dieser Versuch bestätigt somit zumindest zum Teil einen deutlichen Einfluss von Autophagie auf die beobachtete erhöhte Toxizität von Sorafenib unter Serumentzug.

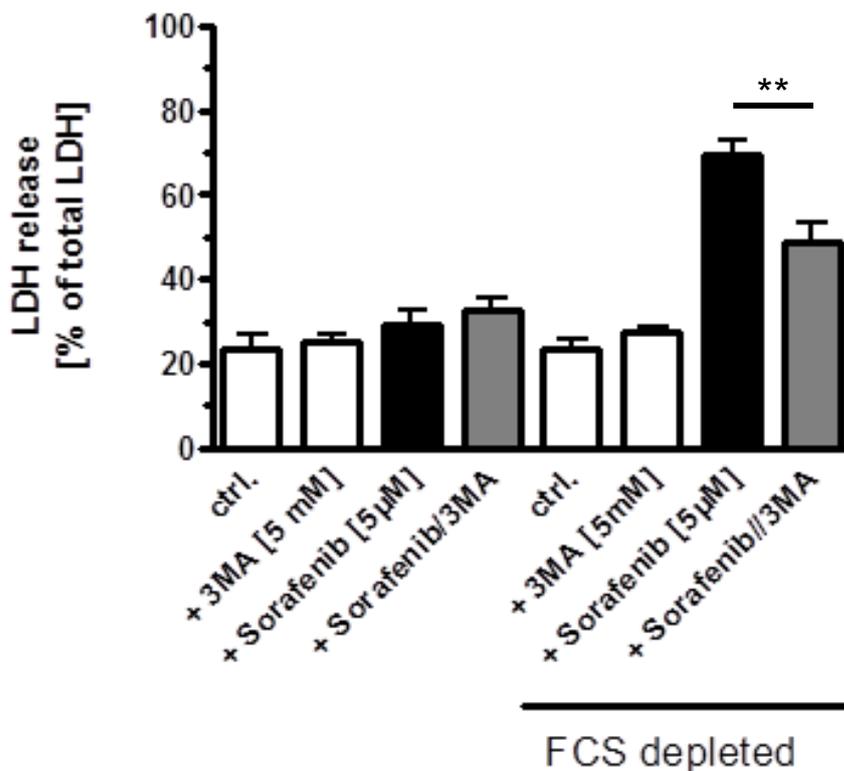


Abb. 31 24-stündige Inkubation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA mit und ohne FCS. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Wird analog zu der Versuchsreihe aus Abb. 31 anstatt DMEM als Medium HBSS eingesetzt, so ergibt sich ein vergleichbares Bild mit fehlender Toxizität von 3-MA alleine und signifikanter Reduktion der Toxizität unter Inkubation von Sorafenib in HBSS (Abb. 32). Zusammenfassend weisen diese Versuche

darauf hin, dass ein erhöhtes Ausmaß an Autophagie erheblich zur gesteigerten Wirkung von Sorafenib auf Tumorzellen beitragen dürfte.

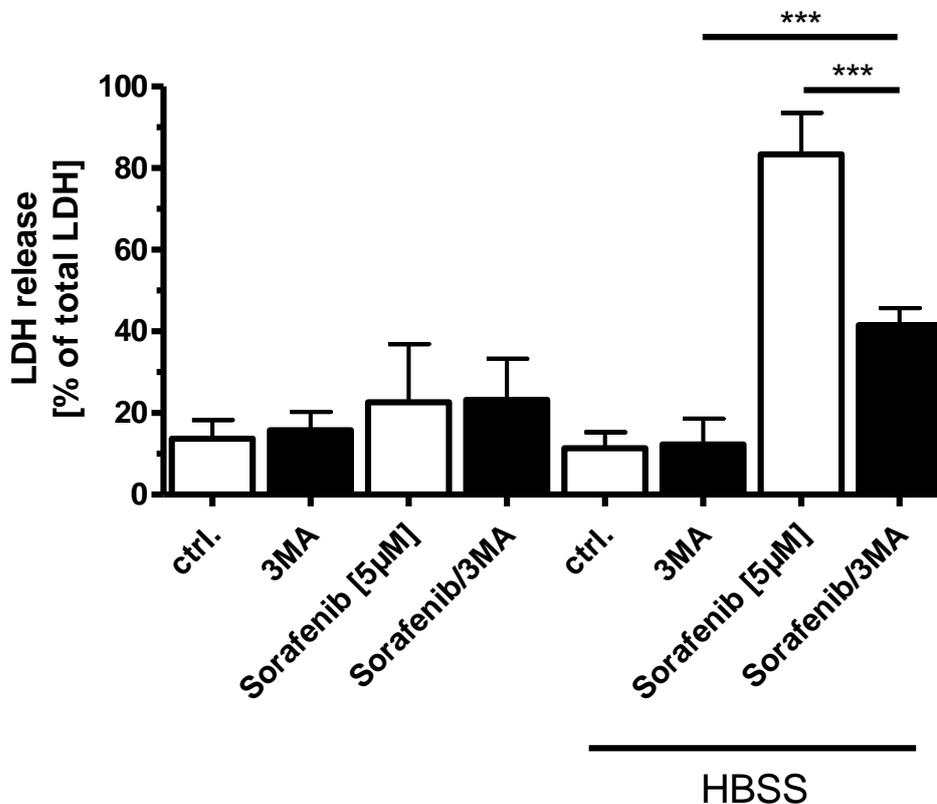


Abb. 32 24-stündige Inkubation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM/HBSS. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

3.6 Die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin im SRB-Assay

Nach der Beobachtung, dass 3-MA die Freisetzung von LDH unter Serumentzug und Sorafenib signifikant vermindern kann, sollte nun die Frage untersucht werden, ob 3-MA auch Einfluss auf die Zellproliferation aufweist. Hierzu wurden SRB-Tests an der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 durchgeführt.

Entgegen den Erwartungen nach den Ergebnissen unter Punkt 3.5 (*Die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin im LDH-Assay*) zeigte die alleinige Zugabe von 3-MA zu serumfreiem Medium ohne zusätzliche Inkubation mit Sorafenib bereits eine erhebliche Hemmung der Proliferationsaktivität (Abb. 33). Da Zellen unter Serumentzug zur Kompensation des Nährstoffmangels ihre Autophagieaktivität erhöhen, könnte somit die Hemmung autophagischer Aktivität durch 3-MA für diese Beobachtung verantwortlich sein. Interessanterweise konnte für die Kombination von Sorafenib, 3-MA und Serumentzug die stärkste Hemmung der Proliferation beobachtet werden.

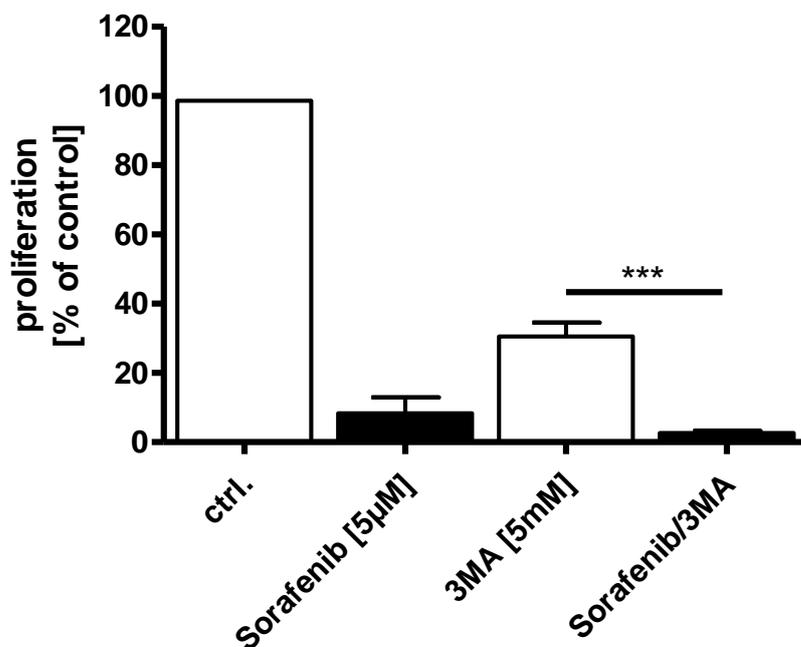


Abb. 33 Proliferation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM ohne FCS nach 24 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Um den Effekt von Serumentzug zu umgehen, wurde der identische Versuch wiederholt, allerdings mit dem Unterschied, dass in diesem Fall 10% FCS zum DMEM zugesetzt wurde (Abb. 34). Die Proliferationsrate, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, zeigt dabei ein ähnliches Reaktionsmuster. Auffällig ist

jedoch, dass die Proliferationshemmung unter 3-MA ähnlich hoch verläuft als in serumfreiem Medium, während der Einfluss von Sorafenib alleine geringer ausfällt. Erneut wurde bei der Kombination aus 3-MA und Sorafenib die stärkste Proliferationshemmung detektiert. Zusammenfassend scheint die Hemmung der Autophagie durch 3-MA unabhängig vom Serumentzug zu sein.

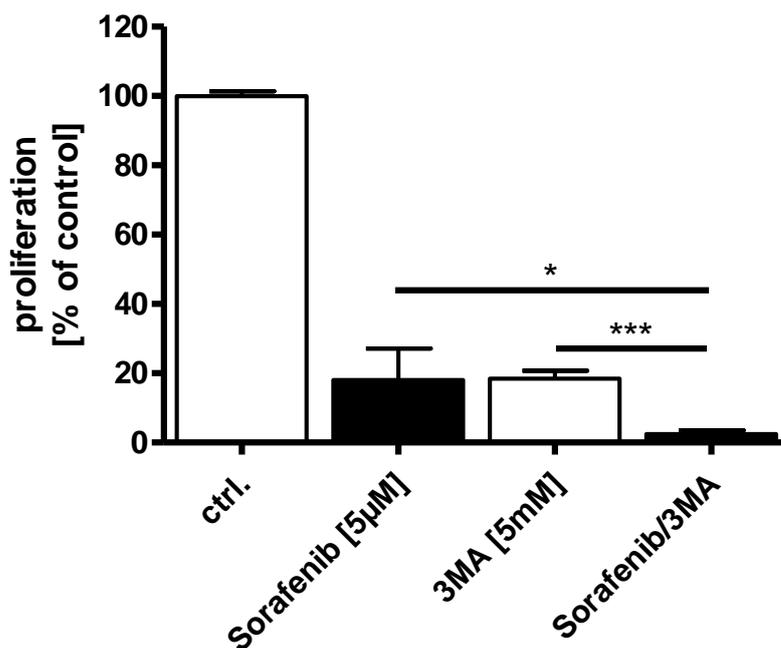


Abb. 34 Proliferation von HepG2 mit Sorafenib + 3-MA in DMEM + FCS nach 24 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

3.7 Mikroskopische Morphologie (Phasenkontrast und Hoechst-Färbung)

In den vorausgehenden LDH-Tests konnte eine deutliche Störung der Membranintegrität durch Sorafenib und Serumentzug nachgewiesen werden. Diese Beobachtung war durch Koinkubation mit 3-MA zum Teil reversibel, allerdings zeigte die 3-MA Inkubation keinen vergleichbaren Effekt in den nachfolgenden SRB-Tests. Zur weiteren Einordnung wie tiefgreifend der unter einer Kombination von Sorafenib und Serumentzug auftretende Zellschaden ist,

wurde die Veränderung der Zellmorphologie mikroskopisch untersucht. Die Morphologie der Zellen der oben genannten Versuchsreihen (Abb. 12) bezogen auf HepG2 zeigen in Abb. 35 und Abb. 36 bei den mikroskopischen Aufnahmen mit der Hoechst-Färbung die nucleären Alterationen im Sinne einer Nucleus-Pyknose bei Sorafenib-Behandlung im FCS-freien DMEM. Erneut wurden HepG2-Zellrasen für 24 Stunden mit dem Kontrollmedium DMEM jeweils mit und ohne 10% FCS-Zusatz und zusätzlich jeweils mit und ohne Sorafenib behandelt.

Das mikroskopische Phasenkontrastbild bei 200-facher Vergrößerung bildet die morphologischen Zellmembranveränderungen ab. Hierbei kommt im FCS-haltigen Kontrollmedium mit und ohne Sorafenib-Behandlung eine regelrechte Zell- und Nucleusmorphologie der HepG2-Zellverbände zur Darstellung.

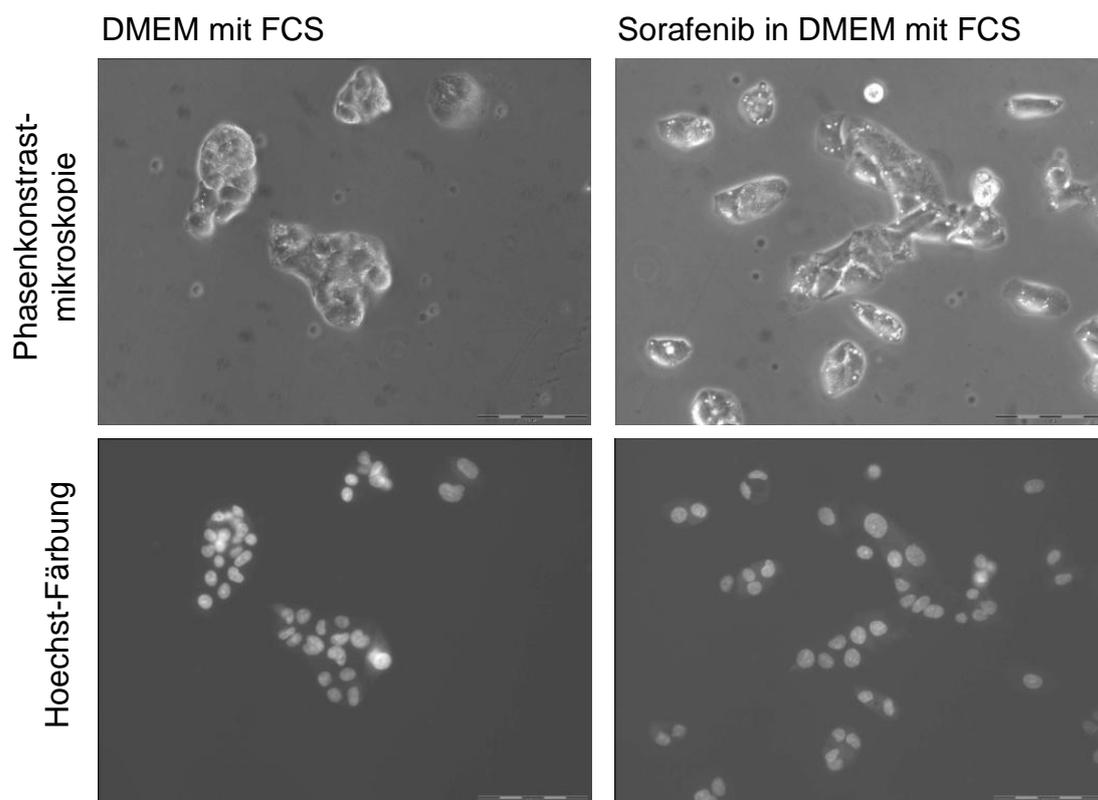


Abb. 35 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in DMEM + FCS 10%
Abgelichtet unter dem Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung bei 200-facher Vergrößerung. Die Skala im Bild entspricht jeweils 200 µm.

Bei den FCS-freien Zellpopulationen erkennt man in den mikroskopischen Aufnahmen sowohl im Phasenkontrastmikroskop als auch bei der Hoechst-Färbung der Zellkerne einen relevanten morphologischen Unterschied, der durch die roten Markierungen hervorgehoben wird (Abb. 36). Die Zellen sowie die Nuclei werden pyknotisch und weisen ein verdichtetes, kompaktes Zellkernchromatin auf. Dieses Abrunden bzw. diese Schrumpfung der Zellen in toto und der Zellkerne kombiniert mit einer Kugelumgebung ist z. B. aus apoptotischen Zellvorgängen und Zelluntergängen bekannt. Diese Aufnahmen wurden mit einem Olympus IX50 Mikroskop angefertigt und bei 200-facher Vergrößerung abgebildet.

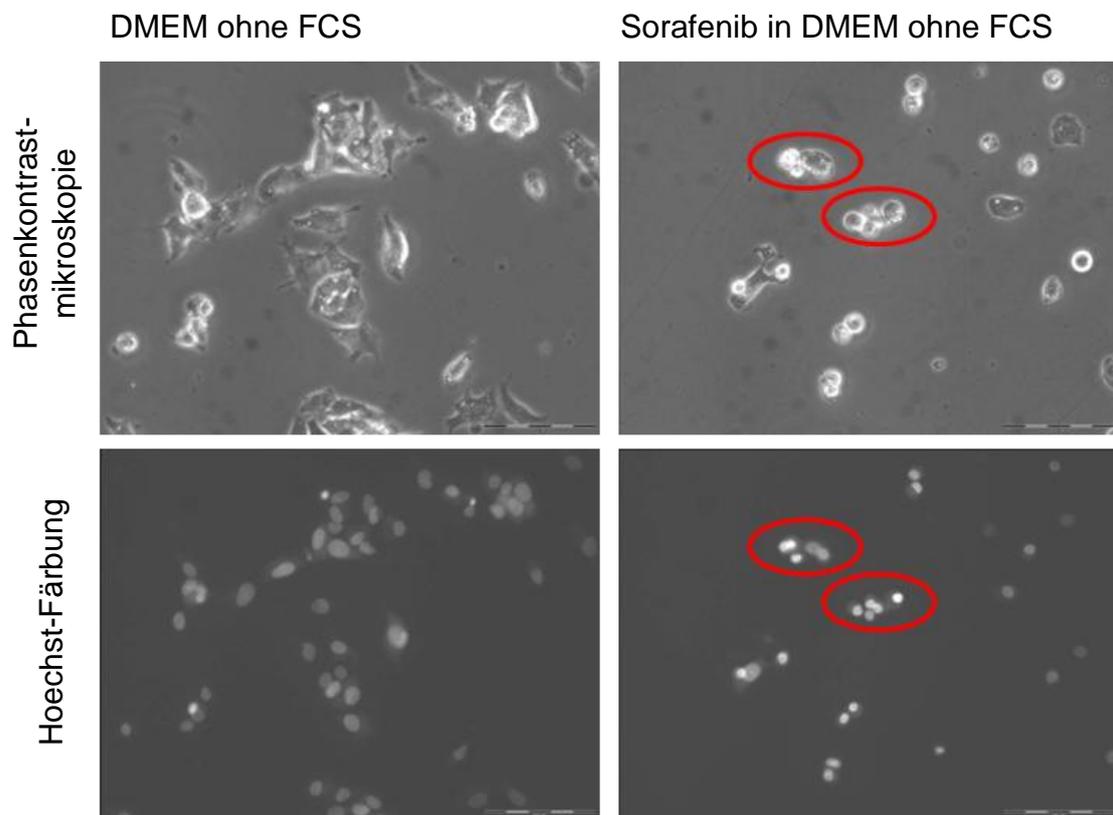


Abb. 36 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib ohne FCS
Abgelichtet unter dem Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung bei 200-facher Vergrößerung. Die Skala im Bild entspricht jeweils 200 µm.

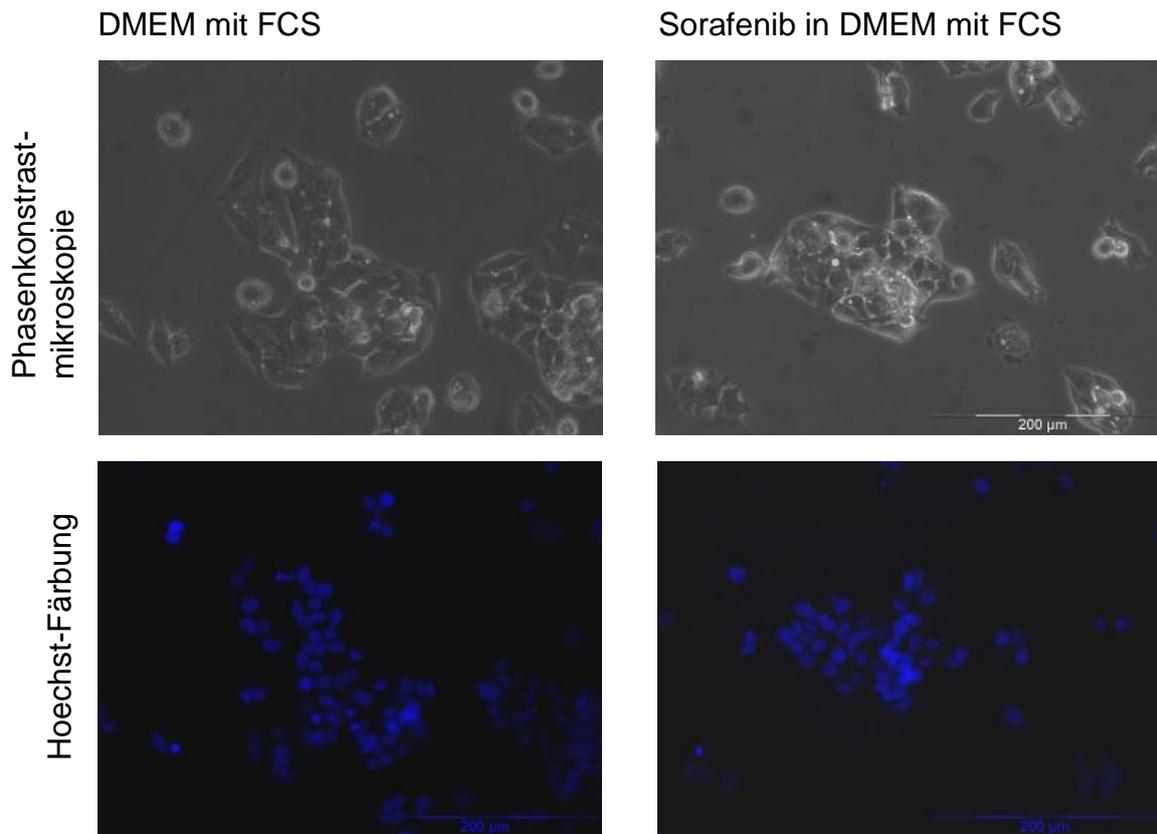


Abb. 37 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in DMEM + 10% FCS Abgelichtet unter dem Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung bei 200-facher Vergrößerung. Die Skala im Bild entspricht jeweils 200 µm.

Abb. 37 und Abb. 38 zeigen ebenfalls HepG2-Zellkulturen nach 24-stündiger Inkubation in DMEM mit und ohne FCS-Zusatz und jeweils mit und ohne Sorafenib. Nun ist die Hoechst-Färbung jedoch mit einem Blaufilter aufgenommen worden. Wiederum sieht man die unauffällige Chromatindichte bei der DMEM-Leerkontrolle mit FCS-Zusatz. In der Phasenkontrastmikroskopie und auch in der Hoechst-Färbung mit Blaufilter kann man morphologisch keinen Unterschied zwischen der FCS-haltigen DMEM-Leerkontrolle, der FCS-freien DMEM-Kontrolle und der Sorafenib behandelten Zellkultur mit FCS-Zusatz sehen. Dagegen zeigt die Sorafenib behandelte und FCS-freie Zellkultur in der Phasenkontrastmikroskopie die bereits in Abb. 36 dargestellte Kugelung und Schrumpfung der gesamten Zelle. Diese pyknotisch aussehende Schrumpfung kommt auch in der Hoechst-Färbung mit Blaufilter zur Darstellung, welche man

an der heller erscheinenden Anfärbung der runden Zellkerne mit verdichtetem nucleärem Chromatin erkennen kann.

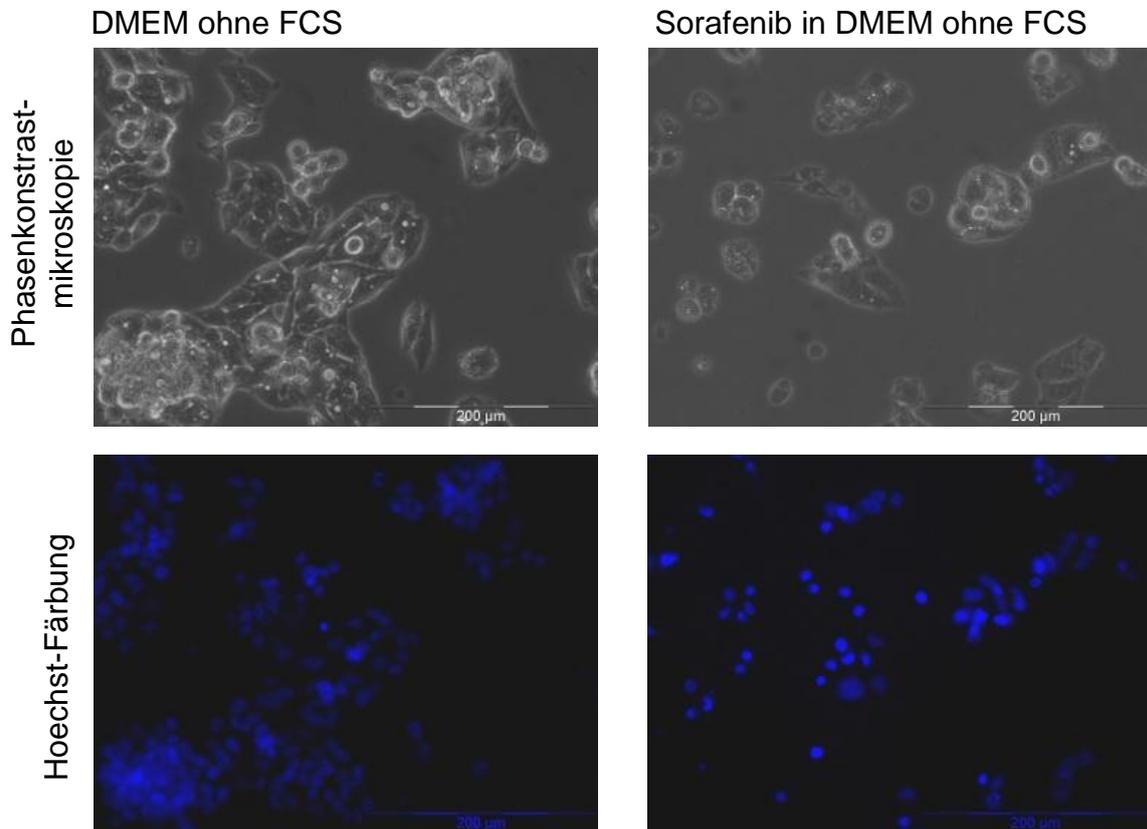


Abb. 38 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 in DMEM +/- Sorafenib ohne FCS Abgelichtet unter dem Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung bei 200-facher Vergrößerung. Die Skala im Bild entspricht jeweils 200 µm.

Tauscht man gemäß Abb. 39 das Medium von DMEM auf HBSS um und lässt dabei den 10%igen FCS-Zusatz aus, so ist morphologisch sowohl in der Phasenkontrastmikroskopie als auch in der Hoechst-Färbung bei Blaufilter in der Sorafenib freien Kontrolle kein signifikanter Unterschied zu den DMEM-Versuchen aus Abb. 36 zu erkennen. Erst die Behandlung mit Sorafenib in HBSS ohne FCS-Zusatz führt zu der aus Abb. 36 und 38 bekannten Kugelung und Schrumpfung sowohl der Zelle als auch des Zellkerns bzw. des Zellkernchromatins (Abb. 39). Es zeigt sich dabei in der Hoechst-Färbung ohne

Sorafenib das Zellchromatin unscharf und diffus dargestellt, was bei Sorafenib-Behandlung durch die Schrumpfung der Zellkerne und der Zellkernchromatinverdichtung als hellere und scharf abgrenzbare, jedoch deutlich verkleinerte, rundliche Struktur in eben gleicher Färbung zum Vorschein tritt. Die Morphologie der Nuclei wandelt sich ergo von oval bis elliptisch hin zur sphärischen Form. Zusammenfassend zeigen diese morphologischen Untersuchungen eindeutig eine tiefgreifende Schädigung der Tumorzellen durch die Kombination von Sorafenib und Serumentzug.

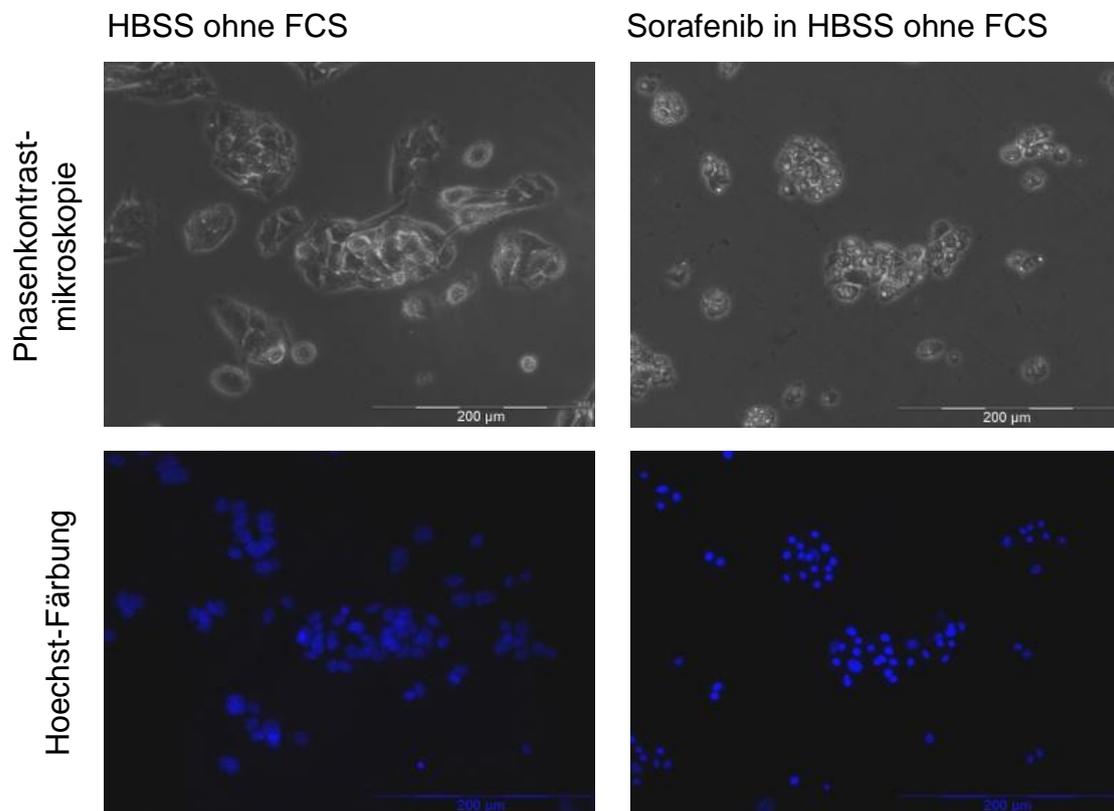


Abb. 39 Morphologische Unterschiede bei 24-stündiger Inkubation von HepG2 +/- Sorafenib in HBSS ohne FCS Abgelichtet unter dem Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung bei 200-facher Vergrößerung. Die Skala im Bild entspricht jeweils 200 μm.

3.8 „DNA-Laddering“ zum Nachweis von Apoptose

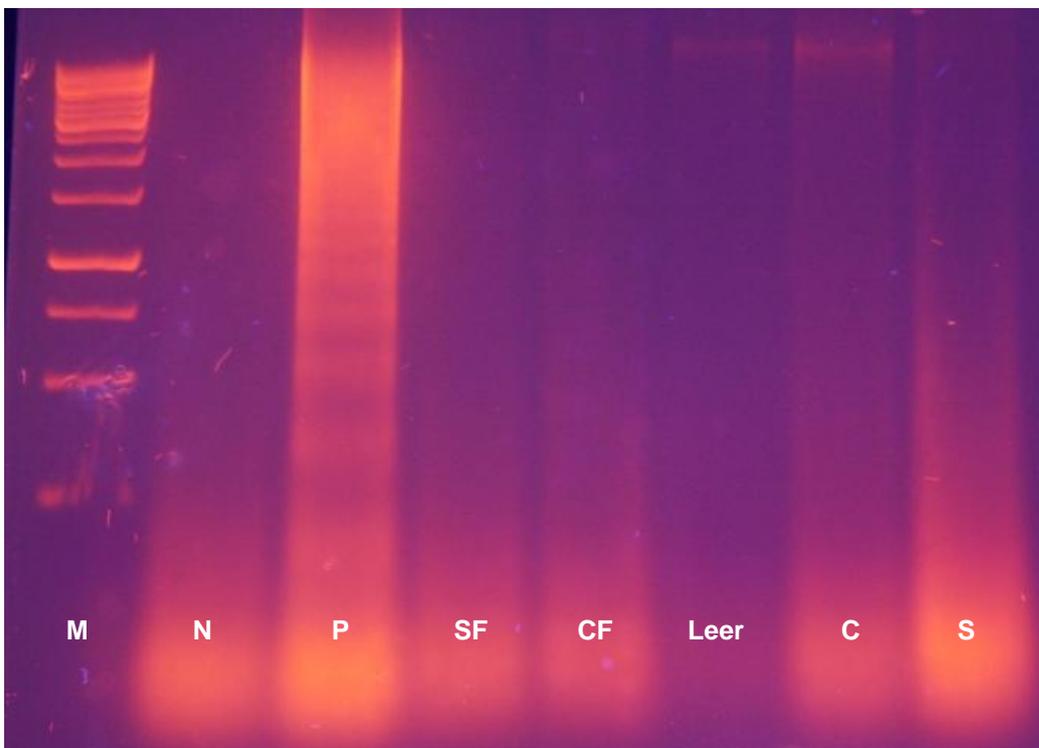


Abb. 40 DNA-Laddering von HepG2 mit Sorafenib + DMEM nach 48 h
M: Marker; N: Negativkontrolle; P: Positivkontrolle; SF: Sorafenib (DMEM+FCS);
CF: Kontrolle (DMEM+FCS); Leer: keine Probe; C: Kontrolle (DMEM); S:
Sorafenib (DMEM)

Mittels dem sog. „DNA-Laddering“ kann eine klassische Apoptose-typische Aufteilung der DNA-Fragmente entsprechend der jeweiligen relativen Nucleinsäuregrößen entlang eines Stromgradienten wiedergegeben werden. Dabei wandern die kleineren Nucleinsäurefragmente am weitesten im Agarosegelkissen.

Wie in Abb. 40 zu sehen ist, zeigen nur der Marker (M) und die Positivkontrolle (P) das typische Apoptose-typische Laddering. In keiner der in DMEM inkubierten Proben und mit Sorafenib behandelten HepG2-Zellen kann das DNA-Laddering-Muster im Agarosegel dargestellt werden. Das DNA-Laddering ist somit in FCS-haltigem und FCS-freiem DMEM bei der Leerkontrolle und bei der Sorafenib-Behandlung ausgeblieben, so dass aus dieser Untersuchungs-

technik keine klassische Apoptose bei der Kombinationsbehandlung aus Sorafenib und Serumentzug nachgewiesen werden konnte.

3.9 Wirkung von Autophagieinduktoren auf die Toxizität von Sorafenib

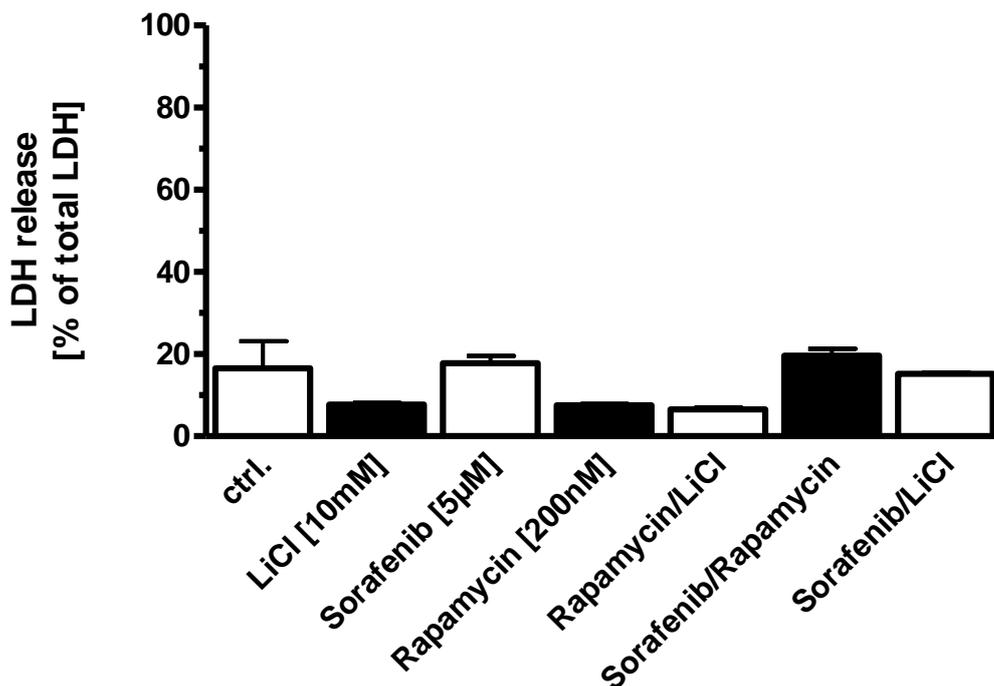


Abb. 41 Wirkung von Sorafenib, Lithiumchlorid und Rapamycin auf HepG2 nach 48 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Aus den bisherigen Experimenten kann die Hypothese abgeleitet werden, dass eine verstärkte Autophagieaktivität durch Serumentzug die Wirkung von Sorafenib auf Tumorzellen verbessern kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde bei den Versuchen in Abb. 41 die Wirkung zweier bekannter Autophagie-Induktoren Lithiumchlorid und Rapamycin auf HepG2-Zellkulturen mit und ohne Sorafenib untersucht. Hierbei erfolgte eine 48-stündige Inkubation mit den jeweiligen Substanzen unter jeweiliger Gabe von 10%igem FCS in DMEM.

Während Lithiumchlorid und Rapamycin alleine jeweils keine erhöhte LDH-Freisetzung auslösen konnten, zeigte die Koinkubation mit Sorafenib jeweils ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bei der LDH-Freisetzung. Nach diesen Ergebnissen kann eine durch die Substanzen postulierte Autophagieinduktion die Sorafenib Wirkung auf Tumorzellen nicht verbessern.

3.10 Wirkung von Autophagieinhibitoren auf die Toxizität von Sorafenib

Wortmannin (WT) ist ein weiterer Autophagie-Inhibitor und weist in DMEM ohne FCS im Gegensatz zu 3-MA keinen Proliferationsarrest auf, wie aus Abb. 42 ersichtlich wird. Allerdings präsentiert sich bei dieser Versuchsreihe eine signifikante Verstärkung der Proliferationshemmung von Sorafenib durch WT in serumfreiem DMEM. Hierbei wird lediglich weniger als 10% der Kontroll-Proliferation gemessen.

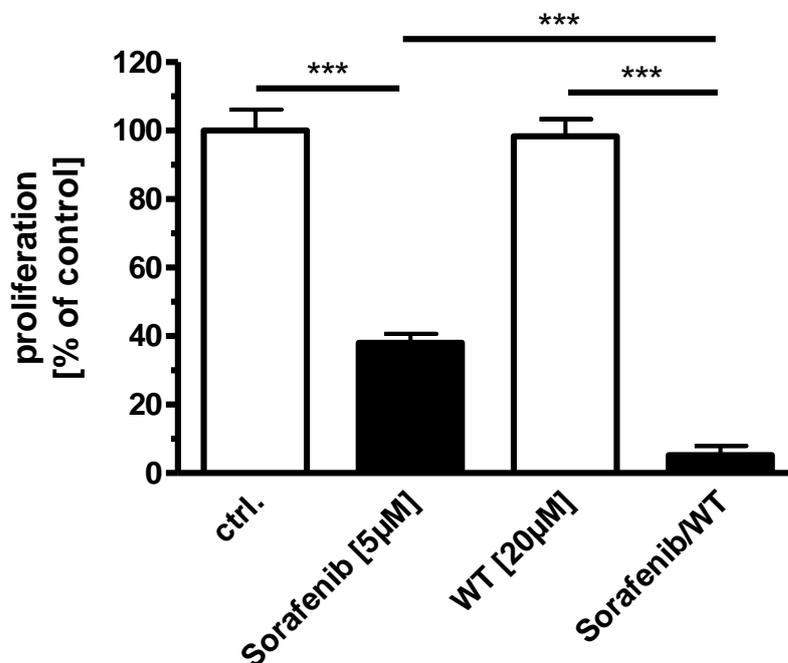


Abb. 42 Proliferation von HepG2 in DMEM mit Sorafenib + Wortmannin nach 72 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Der Versuchsaufbau aus Abb. 42 lässt sich analog auf die HuH7-Zelllinie in Abb. 43 übertragen. Selbst wenn die Abschwächung der Proliferationsrate nicht so eindeutig verläuft wie bei HepG2, so ist dennoch ersichtlich, dass die Reduktion der Proliferation in der Kombination aus Wortmannin und Sorafenib mit 25% beträchtlich ist.

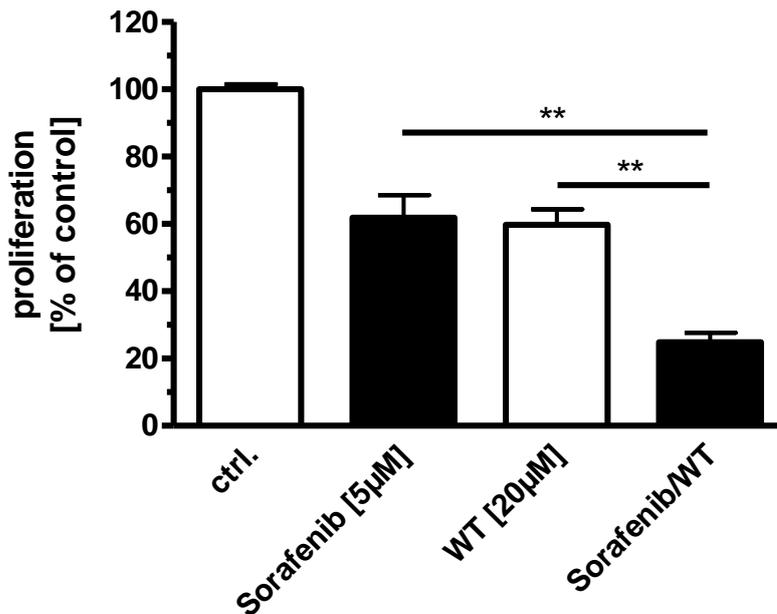


Abb. 43 Proliferation von HuH7 in DMEM mit Sorafenib + Wortmannin nach 72 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Zusätzlich zu 3-MA und WT wurde noch ein dritter Autophagie-Inhibitor, Chloroquin, untersucht. Hierbei zeigten sich nach 72-stündiger Inkubation in HepG2 Proliferationsraten von jeweils ca. 40 % bei den Monotherapien mit Sorafenib und Chloroquin, verglichen mit der Kontrolle in DMEM ohne FCS. Erst die Kombination aus beiden Substanzen erzeugte eine deutliche und signifikante Hemmung der Proliferationsrate auf ca. 5% (Abb. 44).

Führt man den gleichen Versuchsansatz wie in Abb. 44 mit HuH7-Zelllinien durch, so entsteht, ein vergleichbares Ergebnis wie bei HepG2 Tumorzellen. Während Sorafenib und Chloroquin Monotherapien bei HuH7 Zellen jeweils Proliferationsraten um 40% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

hervorrufen, konnte bei der Kombination aus Sorafenib und Chloroquin eine weitere Hemmung auf bis zu auf 20% der Kontrolle erreicht werden (Abb. 45).

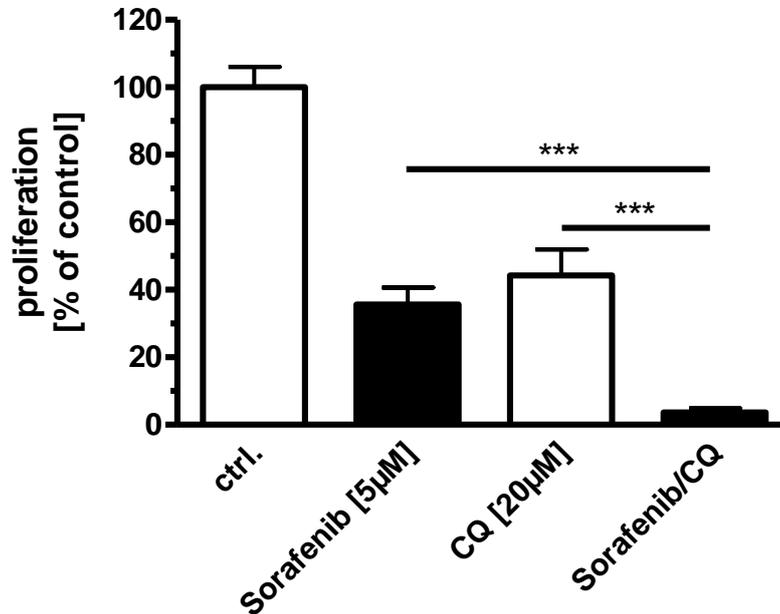


Abb. 44 Proliferation von HepG2 in DMEM mit Sorafenib + Chloroquin nach 72 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

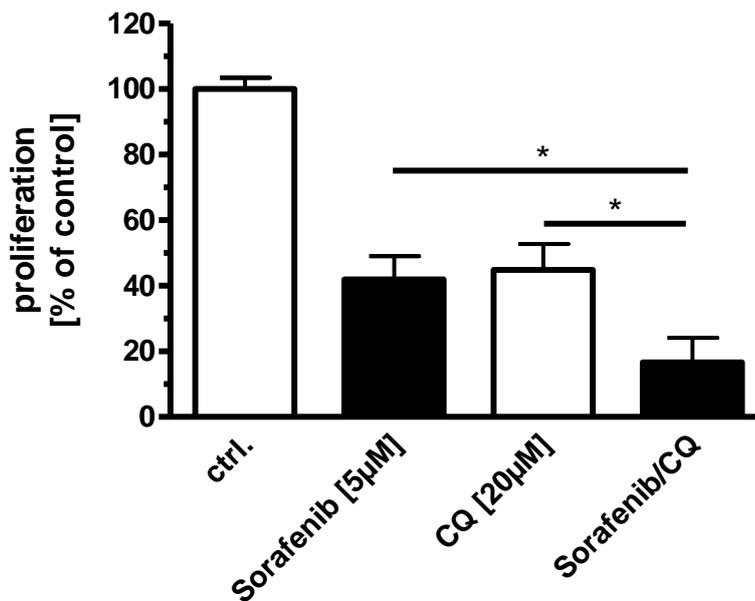


Abb. 45 Proliferation von HuH7 in DMEM mit Sorafenib + Chloroquin nach 72 h. Angegeben ist die einfache SD. Als Signifikanz-Test wurde der Studentent-t-Test verwendet. [* \triangleq ($p \leq 0,05$); ** \triangleq ($p \leq 0,01$); *** \triangleq ($p \leq 0,001$)]

Zusammenfassend konnte somit für drei unterschiedliche, pharmakologisch wirksame Substanzen (3-MA, WT und CQ), die als Hemmstoffe von Autophagie bekannt sind, eine Verstärkung der Proliferationshemmung von Hepatomzelllinien durch die Wirkung von Sorafenib unter Serumentzug gezeigt werden. Auf HepG2 haben die Autophagie inhibierenden Substanzen WT und CQ einen größeren Toxizitätseffekt als auf HuH7. Des Weiteren wirkt sich WT mit Sorafenib stärker auf die Proliferationshemmung aus verglichen mit WT ohne Sorafenib. Diese relative Proliferationshemmung ist bei CQ weniger intensiv ausgeprägt, da bereits CQ ohne Sorafenib allein betrachtet zu einer mäßig starken Proliferationshemmung führt.

4. Diskussion

Das HCC ist hinsichtlich der Mortalität und Inzidenz einer der führenden soliden Malignome des 21. Jahrhunderts [410, 411].

Bei den meisten Patienten mit HCC handelt es sich bei Diagnosestellung um eine palliative Situation, sodass die kurativen Therapieansätze wie die Transplantation oder die Leberteilresektion nur wenigen Patienten vorbehalten bleiben [200].

Die Therapieoptionen der palliativen Situation bei HCC sind im konservativ-medikamentösen Bereich sehr eingeschränkt. Abgesehen von Sorafenib als Monotherapie ist diesbezüglich aktuell weltweit keine Therapiekombination etabliert und dementsprechend auch nicht in den Leitlinien empfohlen. Selbst bei der ASCO-Jahrestagung 2014 ergaben sich keine relevanten, signifikanten und neuen Ergebnisse sowie Publikationen bei der palliativen Therapieoption des HCC als Alternative zu Sorafenib oder als additive Therapiemodalität [412, 413].

Aus diesem Grunde beschäftigt sich diese Arbeit mit neuen In-vitro-Kombinationen aus Sorafenib und verschiedenen Substanzen zur Optimierung des antiproliferativen Effektes auf HCC-Zelllinien bzw. zur Erforschung von Substanzen mit synergistischen Effekten im Hinblick auf den antitumorösen Effekt auf HCC-Zelllinien.

4.1 Die Wirkung von FCS-Entzug auf Hepatomzelllinien

Der Zusatz von zehn Volumenprozent FCS zu den handelsüblichen Medien (DMEM und HBSS) ermöglicht ein physiologisches Wachstum von humanen Zelllinien, in diesem Fall von Hepatomzelllinien (HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, HuH7).

Die beiden Medien unterscheiden sich in der molekularen Zusammensetzung: HBSS enthält lediglich Glucose und acht anorganische Salze wie beispielsweise Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumhydrogencarbonat u.a. [414].

DMEM enthält ebenfalls Glucose in derselben Konzentration und ähnliche anorganische Salze, jedoch beinhaltet DMEM zudem 15 Aminosäuren, teilweise essenzielle, des Weiteren zahlreiche Vitamine wie z.B. Thiamin, Niacinamid, Riboflavin und Folsäure [415, 416].

Unsere Versuchsreihe mit der Hepatomzelllinie HepG2 in Abb. 11 stellt den Bezug der Konzentrationsreihe von FCS in DMEM mit der jeweiligen Proliferationsrate im SRB-Assay her. Hierbei erkennt man, wie die Proliferationsrate in DMEM bei FCS-Entzug (als 100% Referenz genommen) auf bis zu ca. 500% unter 10% FCS-Zusatz ansteigt. Dies spiegelt die besseren In-vitro-Bedingungen bzw. physiologischeren Verhältnisse durch den Zusatz von FCS wider.

Auch im LDH-Assay mit HepG2 in Abb. 12 zeigt sich in der Zellschale mit der physiologischen FCS-Konzentration (10%) eine niedrigere Rate an im Medium gelöster LDH der zugrunde gegangenen Hepatomzellen, verglichen mit der FCS-freien Zellschale in DMEM, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant ist. Konkret sind dies eine 22%ige gegenüber einer 28%igen LDH-Freisetzungsrates.

Bei der Zelllinie PLC/PRF/5 kommt es bei dem FCS-freien DMEM ebenfalls zu einer höheren LDH-Rate als bei dem FCS-haltigen DMEM; dies zeigt sich in den Abb. 14 und 19 und verhält sich bei den Relationen der Kontrollen zueinander als auch bei den absoluten Werten der LDH-Ausschüttung ins Medium.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den international üblichen Zubereitungen von Medien, die physiologische Verhältnisse imitieren [417, 418].

In anderen Hepatomzelllinien ist der Effekt auf die LDH-Rate im gelösten Überstand des Mediums teilweise paradox. So liegt bei kulturierten Hep3B-Zellen in Abb. 13 die LDH-Rate der FCS-haltigen Leerkontrolle (DMEM) nach 24 Stunden schon bei ca. 40%, während die FCS-freie Kontrolle lediglich 30% derselben aufweist. Diese hohe LDH-Rate in der Kontrolle konnte bei allen Hep3B-Versuchen nachgewiesen werden und könnte auf den höheren Grundumsatz der Zelllinie zurückzuführen sein.

Ein ähnlicher Effekt mit jedoch geringeren LDH-Raten (30% vs. 18%) lässt sich mit HuH7 in Abb. 15 erzeugen.

Bei diesen Versuchsreihen wurde des Weiteren festgestellt, dass bei sämtlichen Versuchen beim Austausch des DMEM durch HBSS weitaus höhere LDH-Konzentrationen gemessen werden konnten als bei dem üblicherweise gebräuchlichen DMEM. Dies zeigt sich in Abb. 21. Das hängt mit der Zusammensetzung des HBSS zusammen, das im Vergleich zu DMEM weitaus weniger Aminosäuren enthält und dementsprechend das verhältnismäßig weniger physiologische Medium für das Zellwachstum darstellt. Es ist an dieser Stelle anzunehmen, dass bei der Inkubation von Hepatomzelllinien in HBSS eine Situation imitiert bzw. erzeugt wird, wie sie sonst in vivo bei katabolen Hungerzuständen zu erwarten ist und oftmals mit einer Verstärkung der Autophagieauslösung vergesellschaftet ist [419, 420].

4.2 Die Wirkung von Sorafenib auf Hepatomzelllinien

Die Behandlung mit Sorafenib zeigt in keiner Versuchsreihe und in keiner der untersuchten vier Hepatomzelllinien (HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5 und HuH7) einen signifikanten Unterschied der zellulären Überlebensrate im Vergleich zur Leerkontrolle, gemessen am LDH-Assay. Anders sieht es im SRB-Assay aus, bei der jede der vier Hepatomzelllinien, gemäß Abb. 27-30 und 41-45 eine unterschiedlich starke Inhibition der Proliferationsrate auszulösen vermag, was zusätzlich bei unterschiedlicher Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h sich entsprechend der fortschreitenden Kinetik stärker hinsichtlich der inhibierten Proliferation ausprägt. Sorafenib reduziert somit in DMEM mit FCS-Zusatz die Zellproliferation, ohne aber einen Zellschaden mit LDH-Freisetzung zu bewerkstelligen. Diese Ergebnisse der Zellproliferationsinhibition durch Sorafenib werden in der Literatur einmütig beschrieben [246], wenngleich mit unterschiedlicher Interpretation der Mechanismen der inhibierenden Zellproliferation und der zytotoxischen Wirkung von Sorafenib. Park et al. gehen von einer Autophagieinduktion bedingt durch Sorafenib aus [273]. Dagegen

beschreiben Liu et al., dass es zu einer Sorafenib bedingten Apoptoseinduktion von Hepatomzellen (hier in PLC/PRF/5 und in HepG2) durch die Herunterregulierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 kommt [265]. Auch Huynh et al. misst Sorafenib eine apoptische Wirkung bei [421], wobei selbige nach Godin et al. durch Sorafenib allein nur in geringem Maße induziert werden kann [422]. Louandre et al. hingegen postulieren, dass durch Sorafenib eine neue Art des Zelltodes getriggert wird, die sich Ferroptose nennt und anders als bei der Nekrose, der Autophagie oder der Apoptose den Zelltod durch eine Eisen-abhängige Akkumulation von letalen Lipid-Sauerstoffspezies bedingt [423, 424].

Andere Autoren dagegen schreiben Sorafenib lediglich in Kombination mit einer weiteren Substanz eine triggernde Funktion bei der Induktion von Apoptose zu [425, 426].

Im Phasenkontrastmikroskop kann bei 200-facher Vergrößerung festgestellt werden, dass Sorafenib in FCS-haltigem DMEM bei allen vier Hepatomzelllinien morphologisch keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Leerkontrolle ohne Sorafenib erzeugt. Der Zellverbund weist sowohl in der Kontrolle ohne Behandlung als auch mit Sorafenib-Behandlung einen unauffälligen Zellrasen mit polygonalem Zellmuster auf. Auch in der Hoechst-Färbung, bei der die Zellkerne angefärbt werden, ergeben sich keine signifikanten, mikroskopischen Veränderungen in FCS-haltigem DMEM mit und ohne Sorafenib-Behandlung; so zeigen sich oval bis elliptisch geformte Nuclei. Dies ist aus den Abb. 35 und 36 ersichtlich.

Zusammenschauend lassen sich somit in unseren Experimenten in vitro in FCS-haltigem Medium (DMEM) auf mikroskopisch-morphologischer Ebene und im Hinblick auf die LDH-Spiegel im Medium keine zelltoxischen Wirkungen durch Sorafenib auslösen, sondern es lassen sich lediglich die Zellproliferationsraten reduzieren bzw. hemmen, wie aus den SRB-Assays hervorgeht.

4.3 Die Wirkung von Sorafenib unter FCS-Entzug in DMEM

Die Inkubation der Hepatomzelllinien in FCS-freiem DMEM in Kombination mit Sorafenib bewirkt eine deutliche Steigerung der Toxizität durch Sorafenib. Dies zeigt sich im LDH-Assay der Abb. 12-19 durch eine signifikante Zunahme der LDH-Freisetzungsrates. Aus Abb. 20 wird in der kinetischen Versuchsreihe nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h deutlich, wie sich die Sorafenib-Toxizität bei HepG2-Zellen im Laufe der Zeit verstärkt, wenn DMEM ohne FCS-Zusatz verwendet wird. Mit den anderen drei Hepatomzelllinien lässt sich dieser Effekt reproduzieren, wie aus den Abb. 12-19 hervorgeht.

Der FCS-Entzug, mit dem daraus resultierenden Mangel an essenziellen, gar lebensnotwendigen Substraten für die Zellkultur verstärkt somit den Zelltod und die LDH-Ausschüttung in das soluble DMEM.

Phasenkontrastmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung sieht man mittels Hoechst-Färbung eine Kugelung sowie eine Volumenabnahme der Zellen (Pyknose), sodass das polygonale Zellmembranmuster verschwindet und ein Zusammenschrumpfen (Shrinking) der Zellnuclei zustande kommt, was bei apoptotischem Zelltod vorkommt und bekannt ist. Hierbei kommt es zu einer Fragmentierung und zugleich zu einer Kondensierung der Nucleoli, das als Karyorhexis bezeichnet wird [427, 428].

4.4 Die Wirkung von Sorafenib unter FCS-Entzug in HBSS

Die verstärkte Zelltoxizität in Hepatomzellrasen von Sorafenib in FCS-freiem Medium wird weiter verstärkt, wenn man anstelle des DMEM das vitaminfreie und substratarme HBSS ohne Hinzugabe von FCS verwendet. Die Substratarmut von HBSS hat kombiniert mit Sorafenib eine größere toxische Triggerwirkung auf Hepatomzellen als das physiologischere DMEM.

Auch bei diesen Versuchen kann unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 200-facher Vergrößerung ein Schrumpfen der Hepatomzellen verzeichnet werden.

Somit ist das Ziel, eine pharmakologische Substanz zu detektieren, die diese ausgeprägten katabolen „Hungerzustände“ des HBSS oder DMEM ohne FCS-Zusatz in vitro imitieren kann, um durch den Zellstress, der dadurch erzeugt wird die Zytotoxizität des Sorafenibs zu erhöhen.

4.5 Zellschutz durch Kombination von Sorafenib und 3-Methyladenin

Die Hinzunahme von 3-Methyladenin (3-MA) zur Versuchsreihe mit Sorafenib in DMEM mit 10%igem FCS und ohne FCS bewirkt eine geringere Zelltoxizität, was sich am niedrigeren LDH-Outcome in Lösung der Hepatomzelllinien gemäß Abb. 31 abzeichnet. Dieser Schutz vor Zelltod im Sinne einer verminderten LDH-Ausschüttung ins Medium wird durch Ersetzen des DMEM durch HBSS deutlicher und signifikanter. So halbiert sich die LDH-Freisetzung von ca. 80% auf 40% wenn zu den Sorafenib behandelten HepG2-Zellrasen synchron für 24 Stunden 3-MA dem Medium, sprich HBSS, zugesetzt wird.

3-MA ist ein bekannter Autophagieinhibitor und wird oftmals in vitro bei zahlreichen karzinomatösen Zelllinien verwendet, um die Zelltodphänomene zu eruieren [320]. Der Umstand, dass durch 3-MA eine geringere, durch Sorafenib verursachte, Freisetzungsrates an LDH bedingt wird, legt die Hypothese nahe, dass der durch Sorafenib bewerkstelligte Zelltod der vier Hepatomzellen unter anderem durch einen überbordenden Autophagie-Effekt ausgelöst werden muss.

Normalerweise schützt der Autophagieprozess eine Zelle vor dem Zelltod der Nekrose oder der Apoptose bei enormen Zellstress, sei es intrazellulär oder extrazellulär durch Zytokine, Hormone oder andere Botenstoffe bedingt [429, 430]. Wird jedoch die Induktion der Autophagie in Form eines Schneeballsystems massiv ins Rollen gebracht, kann die Autophagie selbst zum Zelltod auslösenden Prozess ausarten, was als autophagischer Zelltod bezeichnet wird [431, 432].

4.6 Modulation der Wirkung von Sorafenib durch Autophagieinhibitoren

Werden HepG2-Zellen für 72 h mit Sorafenib und dem Autophagie induzierenden Substrat Wortmannin versetzt, so wird die Proliferationsrate durch die Kombination der beiden Substanzen signifikant stärker gehemmt als durch Sorafenib alleine, wie aus Abb. 42 und Abb. 43 ersichtlich wird. Dabei wirkt Wortmannin als Monotherapie kaum proliferationshemmend. Diese Ergebnisse sind mit denen von 3-MA vergleichbar, das ebenfalls die Autophagie hemmt.

Auch Chloroquin, ein weiteres Autophagie inhibierendes Substrat, reduziert die durch Sorafenib bewerkstelligte Proliferationshemmung in Kombination mit selbigem nach 72-stündiger Inkubation signifikant stärker als es durch eine Sorafenib-Monotherapie der Fall ist (Abb. 44+45). Dieser Effekt gilt für HuH7 und HepG2 gleichermaßen.

Möglicherweise wird bei Wortmannin und Chloroquin durch die Autophagie-Inhibition ein proliferationshemmender Effekt erzielt, der durch Zellzyklusarrest schützend auf die Sorafenib-Wirkung Einfluss nimmt.

4.7 Modulation der Wirkung von Sorafenib durch Autophagieinduktoren

In Abb. 41 wird die Versuchsreihe mit Lithiumchlorid und Rapamycin bei HepG2 in Zusammenwirkung mit Sorafenib im LDH-Assay demonstriert. Hierbei sind die LDH-Raten in Lösung bei allen Kombinationen der Substanzen nach 48 h jeweils unter 20%, somit stellt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den LDH-Raten der unterschiedlichen Substanzen ein.

Zwei für in-vitro-Versuche bekannte Autophagie modulierende Agenzien, genauer Autophagie induzierende Substanzen, sind Rapamycin und Lithiumchlorid (LiCl) [433-436]. Lithiumchlorid bzw. auch Lithium können in vitro und auch in vivo neben der Autophagieinduktion auch die Apotoserate herunter regulieren [433]. Rapamycin dagegen inhibiert mTOR und führt damit zur Autophagieinduktion [437].

Unter physiologischen Medium-Bedingungen, das heißt mit DMEM und 10% FCS-Zusatz, wirkte sich die Autophagie induzierende Wirkung von Rapamycin und Lithiumchlorid nicht signifikant auf die Hepatotoxizität von Sorafenib aus.

4.8 Schlussfolgerung

Die zytotoxische Wirkung von Sorafenib ist unter FCS-Entzug in DMEM stärker ausgeprägt als unter physiologischen, Medium bedingten, Zellkulturverhältnissen. Diese Zytotoxizität lässt sich in allen vier untersuchten Hepatomzelllinien nachweisen und reproduzieren, wenngleich in unterschiedlicher Ausprägung der LDH-Freisetzung.

Tauscht man bei den Versuchen mit Sorafenib DMEM mit HBSS aus, das weit weniger Mikronährstoffe enthält, so kann die zellschädigende Wirkung von Sorafenib auf HepG2, Hep3B, HuH7 und PLC/PRF/5 nochmals gesteigert werden.

Das Substrat 3-Methyladenin mit Autophagie inhibierender Wirkung vermag den zytotoxischen Wirkmechanismus von Sorafenib abzuschwächen. Da in der Literatur beschrieben ist, dass Sorafenib in HCC-Gewebe durch Autophagie vermittelt, also als autophagischen Zelltod, die Zytotoxizität bewerkstelligt, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Kombination aus Sorafenib und 3-Methyladenin dieser metabolische Signalweg des autophagischen Zelltods (teilweise) inhibiert wird. Dies wird dadurch belegt, dass im Versuch mit dem DNA-Laddering keine Apoptose typische DNA-Fragmentierung, ergo kein typisches Bandenmuster des DNA-Laddering sich manifestiert hat, was die Apoptose als möglichen Signalweg der Zytotoxizität unwahrscheinlich macht.

Im Phasenkontrastmikroskop und mittels Hoechst-Färbung sieht man hingegen Apoptose typische Phänomene wie die Karyorhexis und die Pyknose. Die Sorafenib-Wirkung in Hepatomzellverbänden konnte unter physiologischem FCS-Zusatz in DMEM nicht durch klassische Autophagie-Induktoren wie Lithiumchlorid oder Rapamycin verstärkt bzw. potenziert werden. Dies hätte

man im Umkehrschluss annehmen können, da durch eine Autophagieinduktion ein zytoprotektiver Effekt hervor getreten ist.

Ein weiterer Signalweg, der gelegentlich in Tumorgewebe eine Rolle spielt, ist die vorbeschriebene Necroptose. In den Versuchsreihen mit dem Necroptose-Inhibitor Necrostatin-1 konnte, ähnlich wie mit 3-MA, die Zytotoxizität von Sorafenib in HBSS ebenfalls herabgesetzt werden. Der Proliferationsarrest von Sorafenib unter HBSS in HepG2 wurde mittels Necrostatin-1 signifikant gedrosselt. Dies lässt die Hypothese zu, dass entweder durch Sorafenib als alternative Signalkaskade zur Autophagie stattdessen die Necroptoseinduktion oder ggf. die Kombination aus Autophagie und Necroptose in humanen Hepatomzellverbänden eine Rolle spielen kann. Dies wird durch die morphologischen Aspekte der Karyorhexis und Pyknose im Phasenkontrastmikroskop und in der Hoechst-Färbung gestützt.

Somit bleibt festzustellen, dass die toxische Wirkung von Sorafenib auf Hepatomzellen bzw. -gewebe durch Nährstoffmangel potenziert werden kann, was jedoch in dieser Form durch die unphysiologischen Lebensverhältnisse nicht in vivo umgesetzt werden kann. Auf der Suche nach einer pharmakologisch aktiven Substanz, die diesen Nährstoffmangel im Mikromilieu imitieren kann, sind wir auf oben genannte Substanzen gestoßen.

Weitere Substanzen wie Verapamil, Valproat, Thapsigargin, Taxol, Tamoxifen oder LY294002 vermochten nicht die Zytotoxizität von Sorafenib, weder potenzierend noch inhibierend, zu beeinflussen. Ergo bleiben pharmakologische Substanzen mit durchschlagender Effektivität bei der hepatotoxischen Wirkungspotenzierung des Sorafenibs weiterhin unentdeckt und werden künftighin Bestandteil weiterer wissenschaftlicher Versuchsreihen bleiben.

5. Zusammenfassung

Sorafenib gilt in der medikamentösen Therapie des HCC nach aktuellem Stand als einziges Pharmakon, das das Gesamtüberleben um knapp 3 Monate in der palliativen Situation verlängern kann. Aus diesem Grund ist es von grundsätzlicher Bedeutung neue Kombinationen an Medikamenten mit zytotoxischen bzw. bestenfalls selektiv (hepato)kanzerotoxischen pharmakodynamischen Eigenschaften zu finden, die sich gegenseitig additiv oder besser noch synergistisch im Kampf gegen das HCC ergänzen oder potenzieren.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Dissertation mit der Erforschung neuer Substanzkombinationen, um die bekannten Sorafenib-Resistenzen in HCC-Geweben zu durchbrechen und die Effektivität signifikant und relevant zu erhöhen bzw. zu potenzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Sorafenib-Toxizität auf die Hepatomzelllinien (PLC/PRF/5, HuH7, HepG2 und Hep3B) in FCS-freiem Nährmedium (DMEM oder HBSS) im Vergleich zu physiologischen Nährmedien (DMEM mit FCS-Zusatz) signifikant und relevant höher war. Dieser zytotoxische Effekt ließ sich durch 3-Methyladenin, einem Autophagieinhibitor, abschwächen. Setzte man hingegen andere Autophagieinhibitoren wie Wortmannin oder Chloroquin als Kombinationspräparat mit Sorafenib ein, verstärkte sich die proliferationshemmende Wirkung von Sorafenib, ohne dass es zu einer signifikanten Änderung des zytotoxischen Effekts im LDH-Assay kam.

Durch Autophagie induzierende Substanzen wie Lithiumchlorid oder Rapamycin konnte im Umkehrschluss der Wirkung von Autophagie-Inhibitoren keine Toxizitätssteigerung des Sorafenibs, verglichen mit der Monotherapie, erzielt werden.

Zudem konnte mittels DNA-Laddering-Assay gezeigt werden, dass es bei Einwirkung von Sorafenib in FCS-freiem DMEM nicht zu einer Apoptose kommt.

Im Phasenkontrastmikroskop und in der Hoechst-Färbung konnten Apoptose typische Zellkernveränderungen wie die Karyorhexis und Zellveränderungen wie die Pyknose verzeichnet werden, sodass nicht ausschließlich vom autophagischen Zelltod als Signalweg des Sorafenibs abgezielt werden kann.

In weiteren Versuchen und wissenschaftlichen Arbeiten sollte jedoch die Wirkungsweise des Sorafenibs im Hinblick auf eine synergistische hepatische Zelltoxizität in malignem Tumorgewebe untersucht und nach weiteren Substanzen geforscht werden, die in Kombination mit Sorafenib einen Durchbruch in der Therapie und Prognose des HCC erbringen.

6. Literaturverzeichnis

1. Uchino K, Tateishi R, Shiina S, Kanda M, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K: **Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: clinical features and prognostic factors.** *Cancer* 2011, **117**(19):4475-4483.
2. Katyal S, Oliver JH, 3rd, Peterson MS, Ferris JV, Carr BS, Baron RL: **Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma.** *Radiology* 2000, **216**(3):698-703.
3. Natsuizaka M, Omura T, Akaike T, Kuwata Y, Yamazaki K, Sato T, Karino Y, Toyota J, Suga T, Asaka M: **Clinical features of hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastases.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2005, **20**(11):1781-1787.
4. Kaczynski J, Hansson G, Wallerstedt S: **Metastases in cases with hepatocellular carcinoma in relation to clinicopathologic features of the tumor. An autopsy study from a low endemic area.** *Acta Oncol* 1995, **34**(1):43-48.
5. Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, Jimi A, Yamaguchi R, Sakamoto K, Ikari T: **Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. 232 Consecutive cases autopsied in ten years.** *Cancer* 1983, **51**(5):863-877.
6. Fukutomi M, Yokota M, Chuman H, Harada H, Zaitso Y, Funakoshi A, Wakasugi H, Iguchi H: **Increased incidence of bone metastases in hepatocellular carcinoma.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 2001, **13**(9):1083-1088.
7. Choi HJ, Cho BC, Sohn JH, Shin SJ, Kim SH, Kim JH, Yoo NC: **Brain metastases from hepatocellular carcinoma: prognostic factors and outcome: brain metastasis from HCC.** *Journal of neuro-oncology* 2009, **91**(3):307-313.
8. Terada T, Maruo H: **Unusual extrahepatic metastatic sites from hepatocellular carcinoma.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2013, **6**(5):816-820.
9. Kanda M, Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Imamura J, Goto T, Hamamura K, Obi S *et al*: **Extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma: incidence and risk factors.** *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2008, **28**(9):1256-1263.
10. Nizze H, Hebecker R, Stropahl G, Putzke HP, Barten M, Kackenmeister A: **[primary and secondary malignant liver tumors at autopsy, biopsy and cytology: frequency and problems of differential diagnosis].** *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 1995, **79**:137-143.
11. Cervello M, McCubrey JA, Cusimano A, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G: **Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon.** *Oncotarget* 2012, **3**(3):236-260.

12. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J: **Hepatocellular carcinoma.** *Lancet* 2003, **362**(9399):1907-1917.
13. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA: **Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002, **963**:13-20.
14. Hussain K, El-Serag HB: **Epidemiology, screening, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.** *Minerva gastroenterologica e dietologica* 2009, **55**(2):123-138.
15. Tandon P, Garcia-Tsao G: **Prognostic indicators in hepatocellular carcinoma: a systematic review of 72 studies.** *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2009, **29**(4):502-510.
16. Caldwell S, Park SH: **The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology.** *Journal of gastroenterology* 2009, **44 Suppl 19**:96-101.
17. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB: **The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma.** *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2010, **42 Suppl 3**:S206-214.
18. Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M: **Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2002, **17**(10):1049-1055.
19. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M: **Strategies for the management of hepatocellular carcinoma.** *Nature clinical practice Oncology* 2007, **4**(7):424-432.
20. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F: **Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors.** *Gastroenterology* 2004, **127**(5 Suppl 1):S35-50.
21. Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L: **Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors.** *Digestive diseases and sciences* 1991, **36**(7):962-972.
22. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Global cancer statistics, 2002.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2005, **55**(2):74-108.
23. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
24. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2011, **61**(2):69-90.
25. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME: **Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, **27**(9):1485-1491.
26. Kew MC: **Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma.** *Pathologie-biologie* 2010, **58**(4):273-277.

27. **EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.** *Journal of hepatology* 2012, **56**(4):908-943.
28. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E: **Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.** *Eur J Cancer* 2010, **46**(4):765-781.
29. Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD: **Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics.** *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2009, **3**(4):353-367.
30. El-Serag HB, Rudolph KL: **Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.** *Gastroenterology* 2007, **132**(7):2557-2576.
31. Flemming P, Wilkens L, Kreipe HH: **[Histopathological diagnosis of primary liver tumors].** *Der Pathologe* 2001, **22**(3):184-190.
32. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS: **Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group.** *The New England journal of medicine* 1997, **336**(26):1855-1859.
33. Yu SZ: **Primary prevention of hepatocellular carcinoma.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 1995, **10**(6):674-682.
34. McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr.: **International trends and patterns of primary liver cancer.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001, **94**(2):290-296.
35. Blumberg BS: **Primary and secondary prevention of liver cancer caused by HBV.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2010, **2**:756-763.
36. Hsu HM, Chen DS, Chuang CH, Lu JC, Jwo DM, Lee CC, Lu HC, Cheng SH, Wang YF, Wang CY *et al.*: **Efficacy of a mass hepatitis B vaccination program in Taiwan. Studies on 3464 infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1988, **260**(15):2231-2235.
37. Beasley RP: **Rocks along the road to the control of HBV and HCC.** *Annals of epidemiology* 2009, **19**(4):231-234.
38. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM: **NAFLD, NASH and liver cancer.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013, **10**(11):656-665.
39. Duan XY, Zhang L, Fan JG, Qiao L: **NAFLD leads to liver cancer: do we have sufficient evidence?** *Cancer letters* 2014, **345**(2):230-234.
40. Hashimoto E, Tokushige K: **Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic?** *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2012, **42**(1):1-14.
41. Kikuchi L, Oliveira CP, Carrilho FJ: **Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma.** *BioMed research international* 2014, **2014**:106247.
42. El-Serag HB: **Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2012, **142**(6):1264-1273 e1261.

43. Lau WY, Lai EC: **Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances.** *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2008, **7**(3):237-257.
44. Corey KE, Pratt DS: **Current status of therapy for hepatocellular carcinoma.** *Therapeutic advances in gastroenterology* 2009, **2**(1):45-57.
45. Thein HH, Walter SR, Gidding HF, Amin J, Law MG, George J, Dore GJ: **Survival after diagnosis of hepatocellular carcinoma and potential impact of treatment in a hepatitis B or C infected cohort.** *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2012.
46. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP: **The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.** *Journal of hepatology* 2006, **45**(4):529-538.
47. Hertl M, Cosimi AB: **Liver transplantation for malignancy.** *The oncologist* 2005, **10**(4):269-281.
48. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxi A, Camma C: **A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2010, **51**(4):1274-1283.
49. Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A: **Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2012.
50. Pichlmayr R, Weimann A, Tusch G, Schlitt HJ: **Indications and Role of Liver Transplantation for Malignant Tumors.** *The oncologist* 1997, **2**(3):164-170.
51. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, Settmacher U, Neuhaus P: **Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis.** *Hepatology* 2001, **33**(5):1080-1086.
52. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP: **Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival.** *Hepatology* 2001, **33**(6):1394-1403.
53. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L: **Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis.** *The New England journal of medicine* 1996, **334**(11):693-699.
54. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V: **Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma.** *Seminars in liver disease* 2005, **25**(2):181-200.
55. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB: **Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study.** *Gastroenterology* 2004, **127**(5):1372-1380.
56. Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A: **Hepatic fibrosis and cirrhosis: the**

- (myo)fibroblastic cell subpopulations involved.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006, **38**(2):135-151.
57. Minguez B, Tovar V, Chiang D, Villanueva A, Llovet JM: **Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies.** *Current opinion in gastroenterology* 2009, **25**(3):186-194.
58. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H *et al*: **Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease.** *The New England journal of medicine* 1993, **328**(25):1797-1801.
59. Roncalli M, Park YN, Di Tommaso L: **Histopathological classification of hepatocellular carcinoma.** *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2010, **42 Suppl 3**:S228-234.
60. Kumar M, Kumar R, Hissar SS, Saraswat MK, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK: **Risk factors analysis for hepatocellular carcinoma in patients with and without cirrhosis: a case-control study of 213 hepatocellular carcinoma patients from India.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2007, **22**(7):1104-1111.
61. Seitz HK, Stickel F: **Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress.** *Biological chemistry* 2006, **387**(4):349-360.
62. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R: **Primary liver cancer: worldwide incidence and trends.** *Gastroenterology* 2004, **127**(5 Suppl 1):S5-S16.
63. Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P: **Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors.** *Dig Dis* 2009, **27**(2):80-92.
64. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C *et al*: **Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women.** *American journal of epidemiology* 2002, **155**(4):323-331.
65. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F: **The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2006, **4**(3):369-380.
66. Donato F, Boffetta P, Puoti M: **A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1998, **75**(3):347-354.
67. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH: **Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2006, **295**(1):65-73.
68. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan.** *Lancet* 1981, **2**(8256):1129-1133.

69. Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, Wu MH, Chen CJ: **Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan.** *American journal of epidemiology* 2003, **157**(8):674-682.
70. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, de Knegt RJ, Zeuzem S, Manns MP, Hansen BE *et al*: **Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus.** *Hepatology* 2008, **47**(6):1856-1862.
71. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, Morabito A, De Franchis R, Colombo M: **Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance.** *Gastroenterology* 2004, **126**(4):1005-1014.
72. Ganem D, Prince AM: **Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.** *The New England journal of medicine* 2004, **350**(11):1118-1129.
73. Bosch FX, Ribes J, Borrás J: **Epidemiology of primary liver cancer.** *Seminars in liver disease* 1999, **19**(3):271-285.
74. Chang MH: **Hepatitis B virus and cancer prevention.** *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2011, **188**:75-84.
75. Tan YJ: **Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2011, **17**(44):4853-4857.
76. Bowen DG, Walker CM: **Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection.** *Nature* 2005, **436**(7053):946-952.
77. Bruix J, Sherman M: **Management of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2005, **42**(5):1208-1236.
78. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM: **Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection.** *Hepatology* 2001, **34**(4 Pt 1):809-816.
79. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP: **Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2007, **5**(8):938-945, 945 e931-934.
80. Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, Heathcote J, Piratsivuth T, Kew M, Otegbayo JA *et al*: **World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective.** *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* 2010, **19**(3):311-317.
81. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, Fargion S: **Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease.** *Hepatology* 2001, **33**(3):647-651.
82. Walshe JM, Waldenstrom E, Sams V, Nordlinder H, Westermark K: **Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease.** *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2003, **96**(9):657-662.

83. Ryder SD, Koskinas J, Rizzi PM, McFarlane IG, Portmann BC, Naoumov NV, Williams R: **Hepatocellular carcinoma complicating autoimmune hepatitis: role of hepatitis C virus.** *Hepatology* 1995, **22**(3):718-722.
84. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM: **Alcohol and hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2004, **127**(5 Suppl 1):S87-96.
85. Becker U, Deis A, Sorensen TI, Gronbaek M, Borch-Johnsen K, Muller CF, Schnohr P, Jensen G: **Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study.** *Hepatology* 1996, **23**(5):1025-1029.
86. Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, El-Deeb AS, Glover KY, Nguyen NT, Chan W, Kaseb A, Curley SA, Vauthey JN *et al*: **Effect of different types of smoking and synergism with hepatitis C virus on risk of hepatocellular carcinoma in American men and women: case-control study.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008, **123**(8):1883-1891.
87. Franceschi S, Montella M, Polesel J, La Vecchia C, Crispo A, Dal Maso L, Casarin P, Izzo F, Tommasi LG, Chemin I *et al*: **Hepatitis viruses, alcohol, and tobacco in the etiology of hepatocellular carcinoma in Italy.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006, **15**(4):683-689.
88. Takuma Y, Nouse K: **Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2010, **16**(12):1436-1441.
89. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN: **The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2010, **51**(6):1972-1978.
90. Guzman G, Brunt EM, Petrovic LM, Chejfec G, Layden TJ, Cotler SJ: **Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis?** *Archives of pathology & laboratory medicine* 2008, **132**(11):1761-1766.
91. Ichikawa T, Yanagi K, Motoyoshi Y, Hamasaki K, Nakao K, Toriyama K, Eguchi K: **Two cases of non-alcoholic steatohepatitis with development of hepatocellular carcinoma without cirrhosis.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2006, **21**(12):1865-1866.
92. Neuveut C, Wei Y, Buendia MA: **Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis.** *Journal of hepatology* 2010, **52**(4):594-604.
93. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD: **A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 1994, **3**(1):3-10.
94. Wang LY, You SL, Lu SN, Ho HC, Wu MH, Sun CA, Yang HI, Chien-Jen C: **Risk of hepatocellular carcinoma and habits of alcohol drinking, betel quid chewing and cigarette smoking: a cohort of 2416 HBsAg-**

- seropositive and 9421 HBsAg-seronegative male residents in Taiwan. *Cancer causes & control : CCC* 2003, **14**(3):241-250.
95. Zhang W, Gao YT, Wang XL, Zhang YL, Yuan JM: **[Cigarette smoking and primary liver cancer risk: a nested case-control study in Shanghai]**. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 2009, **31**(1):20-23.
 96. Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS: **Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma**. *Journal of hepatology* 2005, **42**(2):218-224.
 97. Siegel AB, Conner K, Wang S, Jacobson JS, Hershman DL, Hidalgo R, Verna EC, Halazun K, Brubaker W, Zaretsky J *et al*: **Smoking and hepatocellular carcinoma mortality**. *Experimental and therapeutic medicine* 2012, **3**(1):124-128.
 98. Wen CP, Tsai MK, Chung WS, Hsu HL, Chang YC, Chan HT, Chiang PH, Cheng TY, Tsai SP: **Cancer risks from betel quid chewing beyond oral cancer: a multiple-site carcinogen when acting with smoking**. *Cancer causes & control : CCC* 2010, **21**(9):1427-1435.
 99. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Ho MS, Ko YC, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY *et al*: **Habitual betel quid chewing and risk for hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis**. *Medicine* 2004, **83**(3):176-187.
 100. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Ho MS, Ko YC, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY *et al*: **Habitual betel quid chewing as a risk factor for cirrhosis: a case-control study**. *Medicine* 2003, **82**(5):365-372.
 101. Tsai JF, Chuang LY, Jeng JE, Ho MS, Hsieh MY, Lin ZY, Wang LY: **Betel quid chewing as a risk factor for hepatocellular carcinoma: a case-control study**. *British journal of cancer* 2001, **84**(5):709-713.
 102. Russo A, Autelitano M, Bisanti L: **Metabolic syndrome and cancer risk**. *Eur J Cancer* 2008, **44**(2):293-297.
 103. Turati F, Talamini R, Pelucchi C, Polesel J, Franceschi S, Crispo A, Izzo F, La Vecchia C, Boffetta P, Montella M: **Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma risk**. *British journal of cancer* 2013, **108**(1):222-228.
 104. Inoue M, Kurahashi N, Iwasaki M, Tanaka Y, Mizokami M, Noda M, Tsugane S: **Metabolic factors and subsequent risk of hepatocellular carcinoma by hepatitis virus infection status: a large-scale population-based cohort study of Japanese men and women (JPHC Study Cohort II)**. *Cancer causes & control : CCC* 2009, **20**(5):741-750.
 105. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R: **The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment**. *The oncologist* 2010, **15** Suppl 4:14-22.
 106. Bugianesi E, Vanni E, Marchesini G: **NASH and the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in type 2 diabetes**. *Current diabetes reports* 2007, **7**(3):175-180.
 107. Farrell GC, Larter CZ: **Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis**. *Hepatology* 2006, **43**(2 Suppl 1):S99-S112.

108. Ertle J, Dechene A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, Schlaak JF, Gerken G, Syn WK, Canbay A: **Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2011, **128**(10):2436-2443.
109. Alswat KA, Sanai FM, Altuwaijri M, Albenmoussa A, Almadi M, Al-Hamoudi WK, Abdo AA: **Clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma in a middle eastern population.** *Hepatitis monthly* 2013, **13**(5):e7612.
110. Kew MC, Dos Santos HA, Sherlock S: **Diagnosis of primary cancer of the liver.** *British medical journal* 1971, **4**(5784):408-411.
111. Gervain J: **[Symptoms of hepatocellular carcinoma. Laboratory tests used for its diagnosis and screening].** *Orvosi hetilap* 2010, **151**(35):1415-1417.
112. Pancoska P, Lu SN, Carr BI: **Phenotypic Categorization and Profiles of Small and Large Hepatocellular Carcinomas.** *Journal of gastrointestinal & digestive system* 2013, **Suppl 12**.
113. Abbasi A, Butt N, Bhutto AR, Gulzar K, Munir SM: **Hepatocellular carcinoma: a clinicopathological study.** *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 2010, **20**(8):510-513.
114. Trevisani F, D'Intino PE, Caraceni P, Pizzo M, Stefanini GF, Mazziotti A, Grazi GL, Gozzetti G, Gasbarrini G, Bernardi M: **Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients.** *Cancer* 1995, **75**(9):2220-2232.
115. Paul SB, Gulati MS, Sreenivas V, Madan K, Gupta AK, Mukhopadhyay S, Acharya SK: **Evaluating patients with cirrhosis for hepatocellular carcinoma: value of clinical symptomatology, imaging and alpha-fetoprotein.** *Oncology* 2007, **72** Suppl 1:117-123.
116. Di Bisceglie AM: **Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma.** *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 2002, **13**(9 Pt 2):S169-171.
117. Lin MH, Wu PY, Tsai ST, Lin CL, Chen TW, Hwang SJ: **Hospice palliative care for patients with hepatocellular carcinoma in Taiwan.** *Palliative medicine* 2004, **18**(2):93-99.
118. Han ML, Chen CC, Kuo SH, Hsu WF, Liou JM, Wu MS, Wang HP: **Predictors of in-hospital mortality after acute variceal bleeding in patients with hepatocellular carcinoma and concurrent main portal vein thrombosis.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2013.
119. Woo HY, Youn JM, Bae SH, Jang JW, Cha JH, Kim HL, Chun HJ, Choi BG, Choi JY, Yoon SK: **Efficacy and safety of metronomic chemotherapy for patients with advanced primary hepatocellular carcinoma with major portal vein tumor thrombosis.** *The Korean journal of hepatology* 2012, **18**(1):32-40.
120. Leerapun A, Thaikruea L, Pisespongsa P, Chitapanarux T, Praisontarangkul OA, Thongsawat S: **Clinical features and prognostic factors for liver cancer from a referral center in northern Thailand.**

- Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 2013, **96**(5):531-537.
121. Jia L, Kiryu S, Watadani T, Akai H, Yamashita H, Akahane M, Ohtomo K: **Prognosis of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus:assessment based on clinical and computer tomography characteristics.** *Acta medica Okayama* 2012, **66**(2):131-141.
 122. Kubicka S MM: **Hepatozelluläres Karzinom.** In., vol. 3. *Der Gastroenterologe: Springer Medizin Verlag*; 2008: 147-157.
 123. Steel JL, Kim KH, Dew MA, Unruh ML, Antoni MH, Olek MC, Geller DA, Carr BI, Butterfield LH, Gamblin TC: **Cancer-related symptom clusters, eosinophils, and survival in hepatobiliary cancer: an exploratory study.** *Journal of pain and symptom management* 2010, **39**(5):859-871.
 124. Cho MS, Kwon IG, Kim HS, Kim K, Ryu E: **[Identification and validation of symptom clusters in patients with hepatocellular carcinoma].** *Journal of Korean Academy of Nursing* 2009, **39**(5):683-692.
 125. Cao W, Li J, Hu C, Shen J, Liu X, Xu Y, Ye Z: **Symptom clusters and symptom interference of HCC patients undergoing TACE: a cross-sectional study in China.** *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 2013, **21**(2):475-483.
 126. Trevisani F, D'Intino PE, Grazi GL, Caraceni P, Gasbarrini A, Colantoni A, Stefanini GF, Mazziotti A, Gozzetti G, Gasbarrini G *et al*: **Clinical and pathologic features of hepatocellular carcinoma in young and older Italian patients.** *Cancer* 1996, **77**(11):2223-2232.
 127. Collier J, Sherman M: **Screening for hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 1998, **27**(1):273-278.
 128. Kew MC: **Hepatocellular carcinoma in developing countries: Prevention, diagnosis and treatment.** *World journal of hepatology* 2012, **4**(3):99-104.
 129. Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, Wright EC, Hoefs JC, Di Bisceglie AM, Morgan TR, Kim HY, Lee WM, Bonkovsky HL *et al*: **Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2010, **138**(2):493-502.
 130. Befeler AS, Di Bisceglie AM: **Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment.** *Gastroenterology* 2002, **122**(6):1609-1619.
 131. Johnson PJ: **The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma.** *Clinics in liver disease* 2001, **5**(1):145-159.
 132. N'Kontchou G, Mahamoudi A, Aout M, Ganne-Carrie N, Grando V, Coderc E, Vicaut E, Trinchet JC, Sellier N, Beaugrand M *et al*: **Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis.** *Hepatology* 2009, **50**(5):1475-1483.
 133. Kobayashi M, Hosaka T, Ikeda K, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S *et al*: **Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after**

- curative treatment pre- and postoperatively.** *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2011, **41**(11):1036-1045.
134. Sherman M: **Alphafetoprotein: an obituary.** *Journal of hepatology* 2001, **34**(4):603-605.
135. **EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(5):599-641.
136. Ghanaati H, Alavian SM, Jafarian A, Ebrahimi Daryani N, Nassiri-Toosi M, Jalali AH, Shakiba M: **Imaging and Imaging-Guided Interventions in the Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma (HCC)-Review of Evidence.** *Iranian journal of radiology : a quarterly journal published by the Iranian Radiological Society* 2012, **9**(4):167-177.
137. Yu NC, Chaudhari V, Raman SS, Lassman C, Tong MJ, Busuttill RW, Lu DS: **CT and MRI improve detection of hepatocellular carcinoma, compared with ultrasound alone, in patients with cirrhosis.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2011, **9**(2):161-167.
138. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, Massironi S, Della Corte C, Ronchi G, Rumi MG *et al*: **The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis.** *Gut* 2010, **59**(5):638-644.
139. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, Boix L, Sala M, Varela M, Llovet JM *et al*: **Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2008, **47**(1):97-104.
140. Kim JE, Kim SH, Lee SJ, Rhim H: **Hypervascular hepatocellular carcinoma 1 cm or smaller in patients with chronic liver disease: characterization with gadoxetic acid-enhanced MRI that includes diffusion-weighted imaging.** *AJR American journal of roentgenology* 2011, **196**(6):W758-765.
141. Khalili K, Kim TK, Jang HJ, Haider MA, Khan L, Guindi M, Sherman M: **Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization.** *Journal of hepatology* 2011, **54**(4):723-728.
142. Roncalli M, Borzio M, Di Tommaso L: **Hepatocellular dysplastic nodules.** *Annali italiani di chirurgia* 2008, **79**(2):81-89.
143. Shinmura R, Matsui O, Kadoya M, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Demachi H, Gabata T: **Detection of hypervascular malignant foci in borderline lesions of hepatocellular carcinoma: comparison of dynamic multi-detector row CT, dynamic MR imaging and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging.** *European radiology* 2008, **18**(9):1918-1924.
144. Kitamura T, Ichikawa T, Erturk SM, Nakajima H, Sou H, Araki T, Okada S, Enomoto N: **Detection of hypervascular hepatocellular carcinoma with multidetector-row CT: single arterial-phase imaging with computer-assisted automatic bolus-tracking technique compared**

- with double arterial-phase imaging. *Journal of computer assisted tomography* 2008, **32**(5):724-729.
145. Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A: **Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological parameters.** *Journal of surgical oncology* 2008, **98**(3):190-196.
146. Yamaguchi R, Yano H, Nakashima O, Akiba J, Nishida N, Kurogi M, Kojiro M: **Expression of vascular endothelial growth factor-C in human hepatocellular carcinoma.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2006, **21**(1 Pt 1):152-160.
147. Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, Oka T, Machinami R, Kodama T, Shibuya M, Makuuchi M, Yazaki Y, Ohnishi S: **Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma.** *Journal of hepatology* 1997, **27**(5):854-861.
148. Hu J, Xu Y, Shen ZZ, Wang Z, Lu Q, Yang GH, Ding ZB, Fan J, Zhou J: **High expressions of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor predict poor prognosis in alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma patients after curative resection.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2009, **135**(10):1359-1367.
149. Serste T, Barrau V, Ozenne V, Vullierme MP, Bedossa P, Farges O, Valla DC, Vilgrain V, Paradis V, Degos F: **Accuracy and disagreement of computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules: role of biopsy.** *Hepatology* 2012, **55**(3):800-806.
150. Baek CK, Choi JY, Kim KA, Park MS, Lim JS, Chung YE, Kim MJ, Kim KW: **Hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: a comparison of gadoxetic acid-enhanced MRI and multiphase MDCT.** *Clinical radiology* 2012, **67**(2):148-156.
151. Addley HC, Griffin N, Shaw AS, Mannelli L, Parker RA, Aitken S, Wood H, Davies S, Alexander GJ, Lomas DJ: **Accuracy of hepatocellular carcinoma detection on multidetector CT in a transplant liver population with explant liver correlation.** *Clinical radiology* 2011, **66**(4):349-356.
152. Luca A, Caruso S, Milazzo M, Mamone G, Marrone G, Miraglia R, Maruzzelli L, Carollo V, Minervini MI, Vizzini G *et al*: **Multidetector-row computed tomography (MDCT) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhotic candidates for liver transplantation: prevalence of radiological vascular patterns and histological correlation with liver explants.** *European radiology* 2010, **20**(4):898-907.
153. Maetani YS, Ueda M, Haga H, Isoda H, Takada Y, Arizono S, Hirokawa Y, Shimada K, Shibata T, Kaori T: **Hepatocellular carcinoma in patients undergoing living-donor liver transplantation. Accuracy of multidetector computed tomography by viewing images on digital monitors.** *Intervirolgy* 2008, **51** Suppl 1:46-51.

154. Marin D, Catalano C, De Filippis G, Di Martino M, Guerrisi A, Rossi M, Passariello R: **Detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: added value of coronal reformations from isotropic voxels with 64-MDCT**. *AJR American journal of roentgenology* 2009, **192**(1):180-187.
155. Seitz K, Strobel D, Bernatik T, Blank W, Friedrich-Rust M, Herbay A, Dietrich CF, Strunk H, Kratzer W, Schuler A: **Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) for the characterization of focal liver lesions - prospective comparison in clinical practice: CEUS vs. CT (DEGUM multicenter trial)**. Parts of this manuscript were presented at the **Ultrasound Dreiländertreffen 2008, Davos**. *Ultraschall Med* 2009, **30**(4):383-389.
156. Park MJ, Kim YS, Lee WJ, Lim HK, Rhim H, Lee J: **Outcomes of follow-up CT for small (5-10-mm) arterially enhancing nodules in the liver and risk factors for developing hepatocellular carcinoma in a surveillance population**. *European radiology* 2010, **20**(10):2397-2404.
157. Seitz K, Bernatik T, Strobel D, Blank W, Friedrich-Rust M, Strunk H, Greis C, Kratzer W, Schuler A: **Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) for the characterization of focal liver lesions in clinical practice (DEGUM Multicenter Trial): CEUS vs. MRI--a prospective comparison in 269 patients**. *Ultraschall Med* 2010, **31**(5):492-499.
158. Torzilli G, Minagawa M, Takayama T, Inoue K, Hui AM, Kubota K, Ohtomo K, Makuuchi M: **Accurate preoperative evaluation of liver mass lesions without fine-needle biopsy**. *Hepatology* 1999, **30**(4):889-893.
159. Levy I, Greig PD, Gallinger S, Langer B, Sherman M: **Resection of hepatocellular carcinoma without preoperative tumor biopsy**. *Annals of surgery* 2001, **234**(2):206-209.
160. Bruix J, Sherman M: **Management of hepatocellular carcinoma: an update**. *Hepatology* 2011, **53**(3):1020-1022.
161. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J: **Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver**. *Journal of hepatology* 2001, **35**(3):421-430.
162. Bundesärztekammer: **Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation**. In., vol. Dtsch Arztebl 2012; 109: A60 [Heft 1-2].
<http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/RiliOrgaLeber20130308.pdf>; 2012.
163. Ye F, Liu J, Ouyang H: **Gadolinium Ethoxybenzyl Diethylenetriamine Pentaacetic Acid (Gd-EOB-DTPA)-Enhanced Magnetic Resonance Imaging and Multidetector-Row Computed Tomography for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis**. *Medicine (Baltimore)* 2015, **94**(32):e1157.
164. European Association for Study of L, European Organisation for R, Treatment of C: **EASL-EORTC clinical practice guidelines:**

- management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2012, **48**(5):599-641.
165. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF DKeVuDKeV: **Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms**. In.; 2013.
 166. Greten TF, Malek NP, Schmidt S, Arends J, Bartenstein P, Bechstein W, Bernatik T, Bitzer M, Chavan A, Dollinger M *et al*: **[Diagnosis of and therapy for hepatocellular carcinoma]**. *Z Gastroenterol* 2013, **51**(11):1269-1326.
 167. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, Duca P: **Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review**. *The American journal of gastroenterology* 2006, **101**(3):513-523.
 168. op den Winkel M, Nagel D, Sappl J, op den Winkel P, Lamerz R, Zech CJ, Straub G, Nickel T, Rentsch M, Stieber P *et al*: **Prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. Validation and ranking of established staging-systems in a large western HCC-cohort**. *PloS one* 2012, **7**(10):e45066.
 169. Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, Lau JT, Yu SC, Johnson PJ: **Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients**. *Cancer* 2002, **94**(6):1760-1769.
 170. Chan SL, Mo FK, Johnson PJ, Liem GS, Chan TC, Poon MC, Ma BB, Leung TW, Lai PB, Chan AT *et al*: **Prospective validation of the Chinese University Prognostic Index and comparison with other staging systems for hepatocellular carcinoma in an Asian population**. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2011, **26**(2):340-347.
 171. Kudo M, Chung H, Osaki Y: **Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score)**. *Journal of gastroenterology* 2003, **38**(3):207-215.
 172. Nanashima A, Sumida Y, Morino S, Yamaguchi H, Tanaka K, Shibasaki S, Ide N, Sawai T, Yasutake T, Nakagoe T *et al*: **The Japanese integrated staging score using liver damage grade for hepatocellular carcinoma in patients after hepatectomy**. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2004, **30**(7):765-770.
 173. Child CG, Turcotte JG: **Surgery and portal hypertension**. *Major problems in clinical surgery* 1964, **1**:1-85.
 174. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R: **Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices**. *The British journal of surgery* 1973, **60**(8):646-649.

175. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K: **Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients.** *Cancer* 1985, **56**(4):918-928.
176. Llovet JM, Bru C, Bruix J: **Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification.** *Seminars in liver disease* 1999, **19**(3):329-338.
177. Yi NJ, Suh KS, Kim T, Kim J, Shin WY, Lee KU: **Current role of surgery in treatment of early stage hepatocellular carcinoma: resection versus liver transplantation.** *Oncology* 2008, **75 Suppl 1**:124-128.
178. Martin AP, Bartels M, Hauss J, Fangmann J: **Overview of the MELD score and the UNOS adult liver allocation system.** *Transplantation proceedings* 2007, **39**(10):3169-3174.
179. Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, Franca A, Bru C, Navasa M, Ayuso MC *et al*: **Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power.** *Hepatology* 1998, **27**(6):1572-1577.
180. Bruix J, Fuster J, Llovet JM: **Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Foucault pendulum versus evidence-based decision.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2003, **9**(7):700-702.
181. Figueras J, Ibanez L, Ramos E, Jaurrieta E, Ortiz-de-Urbina J, Pardo F, Mir J, Loinaz C, Herrera L, Lopez-Cillero P *et al*: **Selection criteria for liver transplantation in early-stage hepatocellular carcinoma with cirrhosis: results of a multicenter study.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2001, **7**(10):877-883.
182. Bismuth H, Farges O, Castaing D, Samuel D, Adam R, Johann M, Azoulay D, Feray C, Astarcioglu I, Saliba F: **Assessment of the results of liver transplantation and definition of criteria for the evaluation of transplant centers.** *Transplantation proceedings* 1997, **29**(1-2):456-458.
183. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM *et al*: **Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers.** *Gastroenterology* 2003, **124**(1):91-96.
184. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, Krom RA, Kim WR: **MELD and PELD: application of survival models to liver allocation.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2001, **7**(7):567-580.
185. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR: **A model to predict survival in patients with end-stage liver disease.** *Hepatology* 2001, **33**(2):464-470.
186. **The Eurotransplant Manual - Eurotransplant Liver Allocation System (ELAS).** 2013.

187. Pons F, Varela M, Llovet JM: **Staging systems in hepatocellular carcinoma.** *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2005, **7**(1):35-41.
188. Cillo U, Bassanello M, Vitale A, Grigoletto FA, Burra P, Faggioli S, D'Amico F, Ciarleglio FA, Boccagni P, Brolese A *et al*: **The critical issue of hepatocellular carcinoma prognostic classification: which is the best tool available?** *Journal of hepatology* 2004, **40**(1):124-131.
189. McCormack L, Petrowsky H, Clavien PA: **Surgical therapy of hepatocellular carcinoma.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 2005, **17**(5):497-503.
190. Lee KK, Kim DG, Moon IS, Lee MD, Park JH: **Liver transplantation versus liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma.** *Journal of surgical oncology* 2010, **101**(1):47-53.
191. Deshpande R, O'Reilly D, Sherlock D: **Improving Outcomes with Surgical Resection and Other Ablative Therapies in HCC.** *International journal of hepatology* 2011, **2011**:686074.
192. Zhong JH, Xiang BD, Gong WF, Ke Y, Mo QG, Ma L, Liu X, Li LQ: **Comparison of Long-Term Survival of Patients with BCLC Stage B Hepatocellular Carcinoma after Liver Resection or Transarterial Chemoembolization.** *PloS one* 2013, **8**(7):e68193.
193. Thomas MB, Jaffe D, Choti MM, Belghiti J, Curley S, Fong Y, Gores G, Kerlan R, Merle P, O'Neil B *et al*: **Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(25):3994-4005.
194. Lang H, Sotiropoulos GC, Brokalaki EI, Schmitz KJ, Bertona C, Meyer G, Frilling A, Paul A, Malago M, Broelsch CE: **Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers.** *Journal of the American College of Surgeons* 2007, **205**(1):27-36.
195. Laurent C, Blanc JF, Nobili S, Sa Cunha A, le Bail B, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Capdepon M, Saric J: **Prognostic factors and longterm survival after hepatic resection for hepatocellular carcinoma originating from noncirrhotic liver.** *Journal of the American College of Surgeons* 2005, **201**(5):656-662.
196. Dupont-Bierre E, Compagnon P, Raoul JL, Fayet G, de Lajarte-Thirouard AS, Boudjema K: **Resection of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: analysis of risk factors for survival.** *Journal of the American College of Surgeons* 2005, **201**(5):663-670.
197. Nishikawa H, Inuzuka T, Takeda H, Nakajima J, Matsuda F, Sakamoto A, Henmi S, Hatamaru K, Ishikawa T, Saito S *et al*: **Comparison of percutaneous radiofrequency thermal ablation and surgical resection for small hepatocellular carcinoma.** *BMC gastroenterology* 2011, **11**:143.
198. Merchant N, David CS, Cunningham SC: **Early Hepatocellular Carcinoma: Transplantation versus Resection: The Case for Liver Resection.** *International journal of hepatology* 2011, **2011**:142085.

199. Bartlett A, Heaton N: **Hepatocellular carcinoma: defining the place of surgery in an era of organ shortage.** *World journal of gastroenterology* : *WJG* 2008, **14**(28):4445-4453.
200. Hao K, Lamb J, Zhang C, Xie T, Wang K, Zhang B, Chudin E, Lee NP, Mao M, Zhong H *et al*: **Clinicopathologic and gene expression parameters predict liver cancer prognosis.** *BMC Cancer* 2011, **11**:481.
201. Goldberg SN, Stein MC, Gazelle GS, Sheiman RG, Kruskal JB, Clouse ME: **Percutaneous radiofrequency tissue ablation: optimization of pulsed-radiofrequency technique to increase coagulation necrosis.** *Journal of vascular and interventional radiology* : *JVIR* 1999, **10**(7):907-916.
202. Yamasaki T, Kurokawa F, Shirahashi H, Kusano N, Hironaka K, Okita K: **Percutaneous radiofrequency ablation therapy with combined angiography and computed tomography assistance for patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 2001, **91**(7):1342-1348.
203. Trubenbach J, Konig CW, Duda SH, Schick F, Huppert PE, Claussen CD, Pereira PL: **[Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic neoplasms using a "cluster" electrode--first clinical results].** *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2000, **172**(11):905-910.
204. Mahnken AH, Tacke J, Bucker A, Gunther RW: **[Percutaneous radiofrequency ablation of liver malignancies: first experience with a 200-W radiofrequency generator].** *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2002, **174**(2):216-223.
205. Pitton MB, Herber S, Raab P, Monch C, Wunsch M, Schneider J, Schweden F, Otto G, Thelen M: **[Percutaneous radiofrequency ablation of liver tumors using the LeVeen 4 cm array probe].** *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2003, **175**(11):1525-1531.
206. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS: **Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection.** *Radiology* 1999, **210**(3):655-661.
207. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE *et al*: **Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection.** *Radiology* 2003, **228**(1):235-240.
208. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC: **Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less.** *Gut* 2005, **54**(8):1151-1156.
209. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, Ishikawa T, Koike Y, Yoshida H, Kawabe T *et al*: **A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2005, **129**(1):122-130.

210. Galandi D, Antes G: **Radiofrequency thermal ablation versus other interventions for hepatocellular carcinoma.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2004(2):CD003046.
211. Nicoli N, Casaril A, Marchiori L, Mangiante G, Marini G, Colombari R, Portuese A, Hasheminia AR: **Intraoperative and percutaneous radiofrequency thermal ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma.** *Chirurgia italiana* 2000, **52**(1):29-40.
212. Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, Rossi S: **Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice?** *Hepatology* 2008, **47**(1):82-89.
213. Montorsi M, Santambrogio R, Bianchi P, Donadon M, Moroni E, Spinelli A, Costa M: **Survival and recurrences after hepatic resection or radiofrequency for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a multivariate analysis.** *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2005, **9**(1):62-67; discussion 67-68.
214. Lupo L, Panzera P, Giannelli G, Memeo M, Gentile A, Memeo V: **Single hepatocellular carcinoma ranging from 3 to 5 cm: radiofrequency ablation or resection?** *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2007, **9**(6):429-434.
215. Abu-Hilal M, Primrose JN, Casaril A, McPhail MJ, Pearce NW, Nicoli N: **Surgical resection versus radiofrequency ablation in the treatment of small unifocal hepatocellular carcinoma.** *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2008, **12**(9):1521-1526.
216. Santambrogio R, Opocher E, Zuin M, Selmi C, Bertolini E, Costa M, Conti M, Montorsi M: **Surgical resection versus laparoscopic radiofrequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and Child-Pugh class a liver cirrhosis.** *Annals of surgical oncology* 2009, **16**(12):3289-3298.
217. Livraghi T, Meloni F, Morabito A, Vettori C: **Multimodal image-guided tailored therapy of early and intermediate hepatocellular carcinoma: long-term survival in the experience of a single radiologic referral center.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2004, **10**(2 Suppl 1):S98-106.
218. Choi D, Lim HK, Rhim H, Kim YS, Lee WJ, Paik SW, Koh KC, Lee JH, Choi MS, Yoo BC: **Percutaneous radiofrequency ablation for early-stage hepatocellular carcinoma as a first-line treatment: long-term results and prognostic factors in a large single-institution series.** *European radiology* 2007, **17**(3):684-692.
219. Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S: **Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation.** *Gastroenterology* 2004, **127**(5 Suppl 1):S159-166.

220. Cabrera R, Nelson DR: **Review article: the management of hepatocellular carcinoma.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2010, **31**(4):461-476.
221. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC: **Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm.** *Gastroenterology* 2004, **127**(6):1714-1723.
222. Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, Sacchetto P, Gandini G, Rizzetto M: **Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial.** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2008, **43**(6):727-735.
223. Ikeda M, Okada S, Ueno H, Okusaka T, Kuriyama H: **Radiofrequency ablation and percutaneous ethanol injection in patients with small hepatocellular carcinoma: a comparative study.** *Japanese journal of clinical oncology* 2001, **31**(7):322-326.
224. Pitton MB, Kloeckner R, Ruckes C, Wirth GM, Eichhorn W, Worns MA, Weinmann A, Schreckenberger M, Galle PR, Otto G *et al*: **Randomized comparison of selective internal radiotherapy (SIRT) versus drug-eluting bead transarterial chemoembolization (DEB-TACE) for the treatment of hepatocellular carcinoma.** *Cardiovasc Intervent Radiol* 2015, **38**(2):352-360.
225. Ricke J, Bulla K, Kolligs F, Peck-Radosavljevic M, Reimer P, Sangro B, Schott E, Schutte K, Verslype C, Walecki J *et al*: **Safety and toxicity of radioembolization plus Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: analysis of the European multicentre trial SORAMIC.** *Liver Int* 2015, **35**(2):620-626.
226. Vilgrain V, Abdel-Rehim M, Sibert A, Ronot M, Lebtahi R, Castera L, Chatellier G, Group ST: **Radioembolisation with yttrium90 microspheres versus sorafenib for treatment of advanced hepatocellular carcinoma (SARAH): study protocol for a randomised controlled trial.** *Trials* 2014, **15**:474.
227. Mazzaferro V, Battiston C, Perrone S, Pulvirenti A, Regalia E, Romito R, Sarli D, Schiavo M, Garbagnati F, Marchiano A *et al*: **Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a prospective study.** *Annals of surgery* 2004, **240**(5):900-909.
228. Pompili M, Mirante VG, Rondinara G, Fassati LR, Piscaglia F, Agnes S, Covino M, Ravaioli M, Fagiuoli S, Gasbarrini G *et al*: **Percutaneous ablation procedures in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma submitted to liver transplantation: Assessment of efficacy at explant analysis and of safety for tumor recurrence.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2005, **11**(9):1117-1126.
229. Wong LL, Tanaka K, Lau L, Komura S: **Pre-transplant treatment of hepatocellular carcinoma: assessment of tumor necrosis in explanted livers.** *Clinical transplantation* 2004, **18**(3):227-234.

230. Yao FY, Kerlan RK, Jr., Hirose R, Davern TJ, 3rd, Bass NM, Feng S, Peters M, Terrault N, Freise CE, Ascher NL *et al*: **Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: an intention-to-treat analysis.** *Hepatology* 2008, **48**(3):819-827.
231. Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, Koenigsrainer A, Nachbaur K, Jaschke W, Margreiter R, Vogel W: **Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2003, **9**(6):557-563.
232. Millonig G, Graziadei IW, Freund MC, Jaschke W, Stadlmann S, Ladurner R, Margreiter R, Vogel W: **Response to preoperative chemoembolization correlates with outcome after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2007, **13**(2):272-279.
233. Chapman WC, Majella Doyle MB, Stuart JE, Vachharajani N, Crippin JS, Anderson CD, Lowell JA, Shenoy S, Darcy MD, Brown DB: **Outcomes of neoadjuvant transarterial chemoembolization to downstage hepatocellular carcinoma before liver transplantation.** *Annals of surgery* 2008, **248**(4):617-625.
234. Hayashi PH, Ludkowski M, Forman LM, Osgood M, Johnson S, Kugelmas M, Trotter JF, Bak T, Wachs M, Kam I *et al*: **Hepatic artery chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients listed for liver transplantation.** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004, **4**(5):782-787.
235. Otto G, Herber S, Heise M, Lohse AW, Monch C, Bittinger F, Hoppe-Lotichius M, Schuchmann M, Victor A, Pitton M: **Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2006, **12**(8):1260-1267.
236. Fontana RJ, Hamidullah H, Nghiem H, Greenson JK, Hussain H, Marrero J, Rudich S, McClure LA, Arenas J: **Percutaneous radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma: a safe and effective bridge to liver transplantation.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2002, **8**(12):1165-1174.
237. Bruix J, Reig M, Sherman M: **Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma.** *Gastroenterology* 2016.
238. Bruix J, Tak WY, Gasbarrini A, Santoro A, Colombo M, Lim HY, Mazzaferro V, Wiest R, Reig M, Wagner A *et al*: **Regorafenib as**

- second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: Multicentre, open-label, phase II safety study.** *Eur J Cancer* 2013.
239. Finn RS, Poon RT, Yau T, Klumpen HJ, Chen LT, Kang YK, Kim TY, Gomez-Martin C, Rodriguez-Lopez C, Kunz T *et al*: **Phase I Study Investigating Everolimus Combined With Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma.** *Journal of hepatology* 2013.
240. Colombo M, Raoul JL, Lencioni R, Galle PR, Zucman-Rossi J, Banares R, Seehofer D, Neuhaus P, Johnson P: **Multidisciplinary strategies to improve treatment outcomes in hepatocellular carcinoma: a European perspective.** *European journal of gastroenterology & hepatology* 2013, **25**(6):639-651.
241. Kelley RK, Venook AP: **Novel therapeutics in hepatocellular carcinoma.** *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting* 2013, **2013**:137-142.
242. Palmer DH, Hussain SA, Smith AJ, Hargreaves S, Ma YT, Hull D, Johnson PJ, Ross PJ: **Sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma (HCC): impact of rationing in the United Kingdom.** *British journal of cancer* 2013, **109**(4):888-890.
243. Czaja AJ: **Current management strategies for hepatocellular carcinoma.** *Minerva gastroenterologica e dietologica* 2013, **59**(2):143-159.
244. Di Marco V, De Vita F, Koskinas J, Semela D, Toniutto P, Verslype C: **Sorafenib: from literature to clinical practice.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013, **24 Suppl 2**:ii30-37.
245. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS *et al*: **Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *The lancet oncology* 2009, **10**(1):25-34.
246. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A *et al*: **Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma.** *The New England journal of medicine* 2008, **359**(4):378-390.
247. Bruix J, Raoul JL, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, Galle PR, Santoro A, Beaugrand M, Sangiovanni A *et al*: **Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial.** *Journal of hepatology* 2012, **57**(4):821-829.
248. Zhang X, Yang XR, Huang XW, Wang WM, Shi RY, Xu Y, Wang Z, Qiu SJ, Fan J, Zhou J: **Sorafenib in treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review.** *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPDI* 2012, **11**(5):458-466.
249. Rimassa L, Santoro A: **Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial.** *Expert review of anticancer therapy* 2009, **9**(6):739-745.

250. Kane RC, Farrell AT, Madabushi R, Booth B, Chattopadhyay S, Sridhara R, Justice R, Pazdur R: **Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma.** *The oncologist* 2009, **14**(1):95-100.
251. Keating GM, Santoro A: **Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma.** *Drugs* 2009, **69**(2):223-240.
252. Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Nakajima K: **Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer science* 2008, **99**(1):159-165.
253. Benson AB, 3rd, Abrams TA, Ben-Josef E, Bloomston PM, Botha JF, Clary BM, Covey A, Curley SA, D'Angelica MI, Davila R *et al*: **NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers.** *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2009, **7**(4):350-391.
254. Skelton MR, O'Neil B: **Targeted therapies for hepatocellular carcinoma.** *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 2008, **6**(3):209-218.
255. Kim HY, Park JW: **Molecularly targeted therapies for hepatocellular carcinoma: sorafenib as a stepping stone.** *Dig Dis* 2011, **29**(3):303-309.
256. Zhang T, Ding X, Wei D, Cheng P, Su X, Liu H, Wang D, Gao H: **Sorafenib improves the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials.** *Anti-cancer drugs* 2010, **21**(3):326-332.
257. Pinter M, Sieghart W, Graziadei I, Vogel W, Maieron A, Konigsberg R, Weissmann A, Kornek G, Plank C, Peck-Radosavljevic M: **Sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma from mild to advanced stage liver cirrhosis.** *The oncologist* 2009, **14**(1):70-76.
258. Chiu J, Tang YF, Yao TJ, Wong A, Wong H, Leung R, Chan P, Cheung TT, Chan AC, Pang R *et al*: **The use of single-agent sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma patients with underlying Child-Pugh B liver cirrhosis: a retrospective analysis of efficacy, safety, and survival benefits.** *Cancer* 2012, **118**(21):5293-5301.
259. Kim HY, Park JW, Joo J, Kim H, Woo SM, Lee WJ, Kim CM: **Worse Outcome of Sorafenib Therapy Associated with Ascites and Child-Pugh Score in Advanced Hepatocellular Carcinoma.** *Journal of gastroenterology and hepatology* 2013.
260. Worns MA, Weinmann A, Pfingst K, Schulte-Sasse C, Messow CM, Schulze-Bergkamen H, Teufel A, Schuchmann M, Kanzler S, Duber C *et al*: **Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma in consideration of concomitant stage of liver cirrhosis.** *Journal of clinical gastroenterology* 2009, **43**(5):489-495.
261. Iavarone M, Cabibbo G, Piscaglia F, Zavaglia C, Grieco A, Villa E, Camma C, Colombo M: **Field-practice study of sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma: a prospective multicenter study in Italy.** *Hepatology* 2011, **54**(6):2055-2063.
262. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B *et al*: **Phase II study of**

- sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006, **24**(26):4293-4300.
263. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M: **Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(10):3129-3140.
264. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P: **Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, **18**(2):338-340.
265. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C: **Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.** *Cancer Res* 2006, **66**(24):11851-11858.
266. Simpson D, Keating GM: **Sorafenib: in hepatocellular carcinoma.** *Drugs* 2008, **68**(2):251-258.
267. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, Faghih M, Brendel E, Voliotis D, Haase CG *et al*: **Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(5):965-972.
268. Rimassa L, Pressiani T, Boni C, Carnaghi C, Rota Caremoli E, Faggiuoli S, Foa P, Salvagni S, Cortesi E, Chiara Tronconi M *et al*: **A phase II randomized dose escalation trial of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma.** *The oncologist* 2013, **18**(4):379-380.
269. Bareford MD, Hamed HA, Tang Y, Cruickshanks N, Burow ME, Fisher PB, Moran RG, Nephew KP, Grant S, Dent P: **Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells.** *Autophagy* 2011, **7**(10):1261-1262.
270. Walker T, Mitchell C, Park MA, Yacoub A, Graf M, Rahmani M, Houghton PJ, Voelkel-Johnson C, Grant S, Dent P: **Sorafenib and vorinostat kill colon cancer cells by CD95-dependent and -independent mechanisms.** *Molecular pharmacology* 2009, **76**(2):342-355.
271. Martin AP, Park MA, Mitchell C, Walker T, Rahmani M, Thorburn A, Haussinger D, Reinehr R, Grant S, Dent P: **BCL-2 family inhibitors enhance histone deacetylase inhibitor and sorafenib lethality via autophagy and overcome blockade of the extrinsic pathway to facilitate killing.** *Molecular pharmacology* 2009, **76**(2):327-341.
272. Flaherty KT: **Sorafenib: delivering a targeted drug to the right targets.** *Expert review of anticancer therapy* 2007, **7**(5):617-626.

273. Park MA, Reinehr R, Haussinger D, Voelkel-Johnson C, Ogretmen B, Yacoub A, Grant S, Dent P: **Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(8):2220-2231.
274. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T *et al*: **Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2012, **131**(3):548-557.
275. Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Hui B, Shi GM, Ke AW, Wang XY, Dai Z, Peng YF, Gu CY *et al*: **Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis.** *Autophagy* 2011, **7**(10):1159-1172.
276. Lin JC, Liu CL, Lee JJ, Liu TP, Ko WC, Huang YC, Wu CH, Chen YJ: **Sorafenib induces autophagy and suppresses activation of human macrophage.** *International immunopharmacology* 2013, **15**(2):333-339.
277. Tai WT, Shiau CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, Chen PJ, Chen KF: **Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells.** *Cell death & disease* 2013, **4**:e485.
278. Yi P, Higa A, Taouji S, Bexiga MG, Marza E, Arma D, Castain C, Le Bail B, Simpson JC, Rosenbaum J *et al*: **Sorafenib-mediated targeting of the AAA(+) ATPase p97/VCP leads to disruption of the secretory pathway, endoplasmic reticulum stress, and hepatocellular cancer cell death.** *Molecular cancer therapeutics* 2012, **11**(12):2610-2620.
279. Park MA, Zhang G, Martin AP, Hamed H, Mitchell C, Hylemon PB, Graf M, Rahmani M, Ryan K, Liu X *et al*: **Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation.** *Cancer biology & therapy* 2008, **7**(10):1648-1662.
280. Ashford TP, Porter KR: **Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes.** *The Journal of cell biology* 1962, **12**:198-202.
281. Levine B, Kroemer G: **Autophagy in the pathogenesis of disease.** *Cell* 2008, **132**(1):27-42.
282. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: **Autophagy fights disease through cellular self-digestion.** *Nature* 2008, **451**(7182):1069-1075.
283. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S *et al*: **Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology.** *Physiological reviews* 2010, **90**(4):1383-1435.
284. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N: **The role of autophagy during the early neonatal starvation period.** *Nature* 2004, **432**(7020):1032-1036.
285. De Duve C: **The lysosome.** *Scientific American* 1963, **208**:64-72.
286. Levine B, Klionsky DJ: **Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.** *Developmental cell* 2004, **6**(4):463-477.

287. Klionsky DJ, Emr SD: **Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.** *Science* 2000, **290**(5497):1717-1721.
288. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB: **Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis.** *Cell* 2005, **120**(2):237-248.
289. Shintani T, Klionsky DJ: **Autophagy in health and disease: a double-edged sword.** *Science* 2004, **306**(5698):990-995.
290. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y: **Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(7):458-467.
291. He C, Klionsky DJ: **Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy.** *Annual review of genetics* 2009, **43**:67-93.
292. Chen Y, Klionsky DJ: **The regulation of autophagy - unanswered questions.** *Journal of cell science* 2011, **124**(Pt 2):161-170.
293. Yin XM, Ding WX, Gao W: **Autophagy in the liver.** *Hepatology* 2008, **47**(5):1773-1785.
294. Thorburn A: **Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes.** *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2008, **13**(1):1-9.
295. Klionsky DJ, Ohsumi Y: **Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm.** *Annual review of cell and developmental biology* 1999, **15**:1-32.
296. Kroemer G, Jaattela M: **Lysosomes and autophagy in cell death control.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(11):886-897.
297. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ: **Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8.** *Science* 2004, **304**(5676):1500-1502.
298. Gozuacik D, Kimchi A: **Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism.** *Oncogene* 2004, **23**(16):2891-2906.
299. Tsujimoto Y, Shimizu S: **Another way to die: autophagic programmed cell death.** *Cell death and differentiation* 2005, **12 Suppl 2**:1528-1534.
300. Levine B, Yuan J: **Autophagy in cell death: an innocent convict?** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(10):2679-2688.
301. Bursch W: **The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death.** *Cell death and differentiation* 2001, **8**(6):569-581.
302. Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A: **Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair.** *Autophagy* 2005, **1**(1):11-22.
303. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P: **Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice.** *Nature* 2000, **406**(6798):902-906.
304. Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM: **Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure.** *Cardiovascular research* 2001, **51**(2):304-312.
305. Nishino I: **Autophagic vacuolar myopathy.** *Seminars in pediatric neurology* 2006, **13**(2):90-95.

306. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I: **Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2008, **18**(7):521-529.
307. Choi AM, Ryter SW, Levine B: **Autophagy in human health and disease.** *The New England journal of medicine* 2013, **368**(7):651-662.
308. Tsukada M, Ohsumi Y: **Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS letters* 1993, **333**(1-2):169-174.
309. Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y: **Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene* 1997, **192**(2):245-250.
310. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M *et al*: **A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.** *Developmental cell* 2003, **5**(4):539-545.
311. Xie Z, Klionsky DJ: **Autophagosome formation: core machinery and adaptations.** *Nature cell biology* 2007, **9**(10):1102-1109.
312. Pattingre S, Bauvy C, Codogno P: **Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(19):16667-16674.
313. Noda T, Ohsumi Y: **Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(7):3963-3966.
314. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y: **Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex.** *The Journal of cell biology* 2000, **150**(6):1507-1513.
315. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM: **The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1.** *Science* 2008, **320**(5882):1496-1501.
316. Chang CP, Su YC, Lee PH, Lei HY: **Targeting NFkB by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation.** *Autophagy* 2013, **9**(4):619-621.
317. Zeng M, Wei X, Wu Z, Li W, Li B, Zhen Y, Chen J, Wang P, Fei Y: **NF-kappaB-mediated induction of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury.** *Biochemical and biophysical research communications* 2013, **436**(2):180-185.
318. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G: **Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor.** *Science* 2001, **294**(5544):1102-1105.
319. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E: **The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(38):35243-35246.

320. Seglen PO, Gordon PB: **3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(6):1889-1892.
321. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ: **The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes.** *European journal of biochemistry / FEBS* 1997, **243**(1-2):240-246.
322. Fingar DC, Blenis J: **Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression.** *Oncogene* 2004, **23**(18):3151-3171.
323. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH: **ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery.** *Molecular biology of the cell* 2009, **20**(7):1992-2003.
324. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N: **FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells.** *The Journal of cell biology* 2008, **181**(3):497-510.
325. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X: **ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(18):12297-12305.
326. Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL: **The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals.** *Autophagy* 2008, **4**(7):851-865.
327. Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB: **A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy.** *Autophagy* 2009, **5**(5):649-662.
328. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N: **Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13.** *Autophagy* 2009, **5**(7):973-979.
329. Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y: **Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The Journal of cell biology* 2001, **152**(3):519-530.
330. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N: **Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG.** *Molecular biology of the cell* 2008, **19**(12):5360-5372.
331. Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q: **Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(49):19211-19216.
332. Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y: **Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization.** *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2007, **12**(2):209-218.
333. Levine B, Deretic V: **Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity.** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(10):767-777.

334. Geng J, Klionsky DJ: **The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series.** *EMBO reports* 2008, **9**(9):859-864.
335. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y: **Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway.** *The EMBO journal* 1999, **18**(14):3888-3896.
336. Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y: **Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(21):18619-18625.
337. Ichimura Y, Imamura Y, Emoto K, Umeda M, Noda T, Ohsumi Y: **In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(39):40584-40592.
338. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y: **The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway.** *The Journal of cell biology* 2000, **151**(2):263-276.
339. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y: **The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation.** *The EMBO journal* 2001, **20**(21):5971-5981.
340. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T: **The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy.** *Molecular biology of the cell* 2008, **19**(5):2092-2100.
341. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T: **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.** *The EMBO journal* 2000, **19**(21):5720-5728.
342. Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y: **Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast.** *The Journal of cell biology* 1999, **147**(2):435-446.
343. Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA: **Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes.** *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 18):3888-3900.
344. Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer SW: **Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(18):18283-18290.
345. Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA: **Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism.** *Molecular and cellular biology* 2009, **29**(1):157-171.

346. Mizushima N, Yoshimori T: **How to interpret LC3 immunoblotting.** *Autophagy* 2007, **3**(6):542-545.
347. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA *et al*: **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.** *Autophagy* 2012, **8**(4):445-544.
348. Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT: **Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms.** *Nature reviews Microbiology* 2004, **2**(4):301-314.
349. Komatsu M, Ichimura Y: **Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy.** *FEBS letters* 2010, **584**(7):1374-1378.
350. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T: **p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(33):24131-24145.
351. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M: **Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(33):22847-22857.
352. Moscat J, Diaz-Meco MT: **p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer.** *Cell* 2009, **137**(6):1001-1004.
353. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J: **Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(52):20567-20574.
354. Ogier-Denis E, Codogno P: **Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer.** *Biochimica et biophysica acta* 2003, **1603**(2):113-128.
355. Rouschop KM, Wouters BG: **Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways.** *Current molecular medicine* 2009, **9**(4):417-424.
356. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B: **Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1.** *Nature* 1999, **402**(6762):672-676.
357. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B: **Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21.** *Genomics* 1999, **59**(1):59-65.
358. Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson RJ: **Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer.** *Oncogene* 1990, **5**(10):1581-1583.
359. Eccles DM, Russell SE, Haites NE, Atkinson R, Bell DW, Gruber L, Hickey I, Kelly K, Kitchener H, Leonard R *et al*: **Early loss of heterozygosity on 17q in ovarian cancer. The Abe Ovarian Cancer Genetics Group.** *Oncogene* 1992, **7**(10):2069-2072.

360. Gao X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV: **Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer.** *Cancer research* 1995, **55**(5):1002-1005.
361. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y *et al*: **Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene.** *The Journal of clinical investigation* 2003, **112**(12):1809-1820.
362. Koneri K, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A: **Beclin 1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines.** *Anticancer research* 2007, **27**(3B):1453-1457.
363. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V *et al*: **Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours.** *International journal of oncology* 2007, **30**(2):429-436.
364. Daniel F, Legrand A, Pessayre D, Borrega-Pires F, Mbida L, Lardeux B, Degott C, van Nhieu JT, Bernuau D: **Beclin 1 mRNA strongly correlates with Bcl-XLmRNA expression in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer investigation* 2007, **25**(4):226-231.
365. Wang ZH, Peng ZL, Duan ZL, Liu H: **[Expression and clinical significance of autophagy gene Beclin 1 in cervical squamous cell carcinoma].** *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Sichuan University Medical science edition* 2006, **37**(6):860-863.
366. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B *et al*: **Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Cancer research* 2008, **68**(22):9167-9175.
367. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B: **Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.** *Cell* 2005, **122**(6):927-939.
368. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N *et al*: **Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1.** *The EMBO journal* 2007, **26**(10):2527-2539.
369. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S: **The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(23):8204-8209.
370. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM: **DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis.** *Cell* 2006, **126**(1):121-134.
371. Inoki K, Zhu T, Guan KL: **TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.** *Cell* 2003, **115**(5):577-590.
372. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ: **The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene**

- products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways.** *Cancer research* 2007, **67**(7):3043-3053.
373. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC: **The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling.** *Cancer cell* 2004, **6**(1):91-99.
374. Czaja MJ: **Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease.** *Gastroenterology* 2011, **140**(7):1895-1908.
375. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C *et al*: **Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62.** *Cell* 2009, **137**(6):1062-1075.
376. Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB: **From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why?** *Experimental cell research* 2007, **313**(10):2033-2049.
377. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S *et al*: **Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.** *Cell* 2007, **131**(6):1149-1163.
378. Moscat J, Diaz-Meco MT: **p62: a versatile multitasker takes on cancer.** *Trends in biochemical sciences* 2012, **37**(6):230-236.
379. Komatsu M: **Potential role of p62 in tumor development.** *Autophagy* 2011, **7**(9):1088-1090.
380. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M *et al*: **Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells.** *The Journal of cell biology* 2011, **193**(2):275-284.
381. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A *et al*: **Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma.** *Cancer science* 2012, **103**(4):760-766.
382. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, Ingravallo G, Modica S, Lo Sasso G, Moschetta A *et al*: **A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells.** *Cell death and differentiation* 2007, **14**(4):693-702.
383. Simone C: **Signal-dependent control of autophagy and cell death in colorectal cancer cell: the role of the p38 pathway.** *Autophagy* 2007, **3**(5):468-471.
384. Obata T, Brown GE, Yaffe MB: **MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway.** *Critical care medicine* 2000, **28**(4 Suppl):N67-77.
385. Wagner EF, Nebreda AR: **Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development.** *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(8):537-549.
386. Wang SN, Lee KT, Tsai CJ, Chen YJ, Yeh YT: **Phosphorylated p38 and JNK MAPK proteins in hepatocellular carcinoma.** *European journal of clinical investigation* 2012, **42**(12):1295-1301.

387. Kim KY, Kim BC, Xu Z, Kim SJ: **Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(28):29478-29484.
388. Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J: **A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity.** *Oncogene* 2007, **26**(8):1178-1187.
389. Hsieh YH, Wu TT, Huang CY, Hsieh YS, Hwang JM, Liu JY: **p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells.** *Cancer research* 2007, **67**(9):4320-4327.
390. Pereira L, Igea A, Canovas B, Dolado I, Nebreda AR: **Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK.** *EMBO molecular medicine* 2013.
391. Ozpolat B, Akar U, Mehta K, Lopez-Berestein G: **PKC delta and tissue transglutaminase are novel inhibitors of autophagy in pancreatic cancer cells.** *Autophagy* 2007, **3**(5):480-483.
392. Chang Y, Yan W, He X, Zhang L, Li C, Huang H, Nace G, Geller DA, Lin J, Tsung A: **miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions.** *Gastroenterology* 2012, **143**(1):177-187 e178.
393. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H: **Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells.** *Annals of surgical oncology* 2009, **16**(3):761-771.
394. Liu D, Yang Y, Liu Q, Wang J: **Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells.** *Med Oncol* 2011, **28**(1):105-111.
395. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E: **Role of autophagy in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2007, **7**(12):961-967.
396. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y *et al*: **Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis.** *Cancer cell* 2006, **10**(1):51-64.
397. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E: **Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis.** *Genes & development* 2007, **21**(13):1621-1635.
398. Verma A, Guha S, Diagaradjane P, Kunnumakkara AB, Sanguino AM, Lopez-Berestein G, Sood AK, Aggarwal BB, Krishnan S, Gelovani JG *et al*: **Therapeutic significance of elevated tissue transglutaminase expression in pancreatic cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, **14**(8):2476-2483.
399. Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B: **Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer.** *Autophagy* 2010, **6**(3):322-329.

400. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(7):489-501.
401. Kawamura N, Nagai H, Bando K, Koyama M, Matsumoto S, Tajiri T, Onda M, Fujimoto J, Ueki T, Konishi N *et al*: **PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas: somatic inactivation of both alleles in tumors.** *Japanese journal of cancer research : Gann* 1999, **90**(4):413-418.
402. Celebi JT, Shendrik I, Silvers DN, Peacocke M: **Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens.** *Journal of medical genetics* 2000, **37**(9):653-657.
403. Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, Wistuba, II, Milchgrub S, Brezinschek R, Virmani A, Gazdar AF *et al*: **Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer.** *Oncogene* 1998, **17**(12):1557-1565.
404. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R: **Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme.** *Cancer research* 1997, **57**(19):4183-4186.
405. Alimov A, Li C, Gizatullin R, Fredriksson V, Sundelin B, Klein G, Zabarovsky E, Bergerheim U: **Somatic mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 gene of 10q23 in renal cell carcinoma.** *Anticancer research* 1999, **19**(5B):3841-3846.
406. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR: **New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.** *J Natl Cancer Inst* 1990, **82**(13):1107-1112.
407. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 1976, **72**:248-254.
408. Wyllie AH: **Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.** *Nature* 1980, **284**(5756):555-556.
409. Li W, Yang Y, Hou X, Zhuang H, Wu Z, Li Z, Guo R, Chen H, Lin C, Zhong W *et al*: **MicroRNA-495 regulates starvation-induced autophagy by targeting ATG3.** *FEBS Lett* 2016.
410. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: **Global cancer statistics, 2012.** *CA Cancer J Clin* 2015, **65**(2):87-108.
411. Forman D BF, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-, Foucher E SR, Ferlay J: **Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. IARC Scientific Publication No 164 Lyon: International Agency for Research on Cancer** 2014.
412. Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattan S, Kang YK, Lim HY, Poon RT, Blanc JF, Vogel A, Chen CL *et al*: **Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial.** *JAMA* 2014, **312**(1):57-67.
413. Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, Kanogawa N, Motoyama T, Suzuki E, Tawada A, Kanai F, Yokosuka AO: **A phase I/II trial of capecitabine combined with peginterferon alpha-2a in Patients with sorafenib-**

- refractory advanced hepatocellular carcinoma.** *Invest New Drugs* 2014, **32**(4):762-768.
414. Hanks JH, Wallace RE: **Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1949, **71**(2):196-200.
415. Dulbecco R, Vogt M: **Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.** *J Exp Med* 1954, **99**(2):167-182.
416. Eagle H: **The growth requirements of two mammalian cell lines in tissue culture.** *Trans Assoc Am Physicians* 1955, **68**:78-81.
417. Bagul M, Kakumanu S, Wilson TA: **Crude Garlic Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Cancer Cells In Vitro.** *J Med Food* 2015.
418. Liu YS, Tsai YL, Yeh YL, Chung LC, Wen SY, Kuo CH, Lin YM, Padma VV, Kumar VB, Huang CY: **Cell Cycle Regulation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2)-Overexpressing Hep3B Hepatocellular Carcinoma Cell Line.** *Chin J Physiol* 2015, **58**(2):134-140.
419. Tang Y, Li M, Wang YL, Threadgill MD, Xiao M, Mou CF, Song GL, Kuang J, Yang X, Yang L *et al*: **ART1 promotes starvation-induced autophagy: a possible protective role in the development of colon carcinoma.** *Am J Cancer Res* 2015, **5**(2):498-513.
420. Wei Y, An Z, Zou Z, Sumpter R, Su M, Zang X, Sinha S, Gaestel M, Levine B: **The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation.** *Elife* 2015, **4**.
421. Huynh H, Ngo VC, Koong HN, Poon D, Choo SP, Toh HC, Thng CH, Chow P, Ong HS, Chung A *et al*: **AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC).** *J Hepatol* 2010, **52**(1):79-87.
422. Godin C, Louandre C, Bodeau S, Diouf M, Saidak Z, Conte MA, Chauffert B, Barbare JC, Barget N, Trinchet JC *et al*: **Biomarkers of apoptosis and necrosis in patients with hepatocellular carcinoma treated with sorafenib.** *Anticancer Res* 2015, **35**(3):1803-1808.
423. Louandre C, Ezzoukhry Z, Godin C, Barbare JC, Maziere JC, Chauffert B, Galmiche A: **Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib.** *Int J Cancer* 2013, **133**(7):1732-1742.
424. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS *et al*: **Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death.** *Cell* 2012, **149**(5):1060-1072.
425. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H *et al*: **The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib.** *Hepatology* 2010, **52**(4):1310-1321.
426. Fernando J, Sancho P, Fernandez-Rodriguez CM, Lledo JL, Caja L, Campbell JS, Fausto N, Fabregat I: **Sorafenib sensitizes**

- hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 2012, **227**(4):1319-1325.
427. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G: **Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.** *Cell Death Differ* 2007, **14**(7):1237-1243.
428. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**(4):239-257.
429. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR *et al*: **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(1):3-11.
430. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA *et al*: **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.** *Autophagy* 2012, **8**(4):445-544.
431. Fulda S, Kogel D: **Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy.** *Oncogene* 2015.
432. Chen YJ, Chi CW, Su WC, Huang HL: **Lapatinib induces autophagic cell death and inhibits growth of human hepatocellular carcinoma.** *Oncotarget* 2014, **5**(13):4845-4854.
433. Liu A, Fang H, Dahmen U, Dirsch O: **Chronic lithium treatment protects against liver ischemia/reperfusion injury in rats.** *Liver Transpl* 2013, **19**(7):762-772.
434. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC: **Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase.** *J Cell Biol* 2005, **170**(7):1101-1111.
435. Zhu J, Lu T, Yue S, Shen X, Gao F, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, Xia Q, Zhai Y: **Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation.** *Transplantation* 2015, **99**(1):48-55.
436. Fouraschen SM, de Ruiten PE, Kwekkeboom J, de Bruin RW, Kazemier G, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ, de Jonge J: **mTOR signaling in liver regeneration: Rapamycin combined with growth factor treatment.** *World J Transplant* 2013, **3**(3):36-47.
437. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Younes AB, Maiuri MC, Kroemer G: **Evaluation of rapamycin-induced cell death.** *Methods Mol Biol* 2012, **821**:125-169.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Dissertationsschrift wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lauer und Herrn Prof. Dr. Bitzer in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Bitzer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Timo Weiland aus derselben Arbeitsgruppe. Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Herrn Dr. T. Weiland) von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte (ebenfalls nach Einarbeitung durch Herrn Dr. T. Weiland) eigenständig durch mich. Herr Prof. Dr. Bitzer war an der Konzeption der Studie beteiligt, er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen universitären Prüfungsverfahren vorgelegt.

Tübingen, den 15.09.2016

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Michael Bitzer als Doktorvater und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Lauer danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und das Ermöglichen dieser Dissertation. Die experimentelle Phase der Promotionsarbeit wäre ohne das gesamte Team der Arbeitsgruppe Lauer/Bitzer nicht möglich gewesen. Dafür gebührt allen mein persönlicher Dank, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Timo Weiland als wissenschaftlichen Betreuer dieser Dissertation.

Meinen Eltern sowie meiner Großmutter danke ich von Herzen, da sie mich stets tatkräftig in jedweder Hinsicht und Lebenssituation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Ehefrau Christina für die unglaubliche Geduld und seelische sowie moralische Unterstützung während der Fertigstellung der Dissertation.

Meinen Schwiegereltern Walter und Marion möchte ich für die redaktionelle Korrektur danken und meinem besten Freund Axel gebührt der Dank für die Formatierungsarbeiten.

9. Curriculum vitae

Name: Stefano Fusco

Geburtsdatum: 28.05.1982

Schulbildung:

1988-1992 Grundschule Waldenbuch und Steinenbronn

1992-2001 Immanuel-Kant-Gymnasium Leinfelden

Zivildienst:

01-10/2002 Zivildienst beim DRK als Rettungssanitäter

Ausbildung und Beruf:

2002-2004 Ausbildung zum Rettungsassistenten

2004-2005 Tätigkeit als Rettungsassistent beim DRK

Studium:

2005-2012 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

29.08.2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2009 Promotionsstipendiat im Graduiertenkolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen (AG Lauer/Bitzer)

02/2011-01/2012 Praktisches Jahr in Tübingen und Bern

04.05.2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

15.05.2012 Erlangung der Ärztlichen Approbation

Akademische Laufbahn:

seit 07/2012 Arzt in Weiterbildung und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Tübingen