

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKMECHANISMEN VON *TARGETED THERAPIES* UND DIE ENTWICKLUNG
NEUER KOMBINATIONSTHERAPIEN ZUR BEHANDLUNG DES HEPATOZELLULÄREN
KARZINOMS

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Patricia-Iuliana Mester-Pavel
2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKMECHANISMEN VON *TARGETED THERAPIES* UND DIE ENTWICKLUNG
NEUER KOMBINATIONSTHERAPIEN ZUR BEHANDLUNG DES HEPATOZELLULÄREN
KARZINOMS

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Patricia-Iuliana Mester-Pavel
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

2. Berichterstatter: PD Dr. Natascha Platz Batista da Silva

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2022

„Es scheint paradox, dass wissenschaftliche Forschung – die menschliche Betätigung, die am meisten in Frage stellt und am skeptischsten ist - von persönlichem Vertrauen abhängen soll. Doch Tatsache ist: Ohne Vertrauen kann das Unternehmen Forschung nicht funktionieren.“

Arnold S. Relman (Herausgeber des *New England Journal of Medicine*, 1983)

Meinen Eltern gewidmet

Danke, dass Ihr stets an mich geglaubt und mich bestärkt habt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Pathogenese.....	6
1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik.....	9
1.1.4 Therapie.....	12
1.2 Die p53-Familie	17
1.2.1 p53.....	18
1.2.2 Funktion von p53.....	20
1.3 Verschiedene Formen des Zelltodes	22
1.3.1 Apoptose	22
1.3.2 Nekroptose – eine neue Zelltodart, programmierte Nekrose.....	29
1.4 Histondeacetylasen und deren Inhibition.....	33
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Geräte und Laborbedarf.....	37
2.1.2 Software	39
2.1.3 Reagenzien.....	40
2.1.4 <i>Targeted therapies</i> , HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika	42
2.1.5 Western Blot	42
2.2 Methoden	44
2.2.1 Zellkultur	44
2.2.2 Behandlung mit <i>targeted therapies</i> , therapeutischen Antikörpern, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika	44
2.2.3 Zelllyse	45
2.2.4 Zelllinie.....	45
2.2.5 Western Blot	45
2.2.6 Viabilitätsassay (MTS-Assay)	47
2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS).....	47
3. Ergebnisse	49
3.1 HCC-Therapeutika induzieren eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Viabilität in HepG2-Zellen	49
3.2 Regulation von p53-Familienmitgliedern und Charakterisierung des Zelltods nach Behandlung mit TKI, neutralisierenden Antikörpern und Chemotherapeutika.....	52

3.2.1 Protein-Expression der p53-Familie in HepG2-Zellen nach TKI- und Bleomycin-Behandlung	52
3.2.2 Die Behandlung mit TKIs und Bleomycin führt zu keiner detektierbaren Caspase-3 Spaltung	53
3.3 Kombination von Panobinostat und Bleomycin als mögliche neue Therapieoption bei HCC	55
3.3.1 Panobinostat induziert Apoptose in HepG2-Zellen	55
3.3.2 Bleomycin und Panobinostat üben eine additive Wirkung auf die Induktion des Zelltods aus.....	58
3.3.3 Die Kombination von Bleomycin und Panobinostat führt zu einer <i>in-vitro</i> Aktivierung von Caspasen in HepG2 Zellen	62
3.3.3.1. Die Kombinations-Behandlung mit Bleomycin und Panobinostat führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität	66
3.3.4 Der Zelltodinhistor zVad-FMK verhindert die Bleomycin-Panobinostat- induzierte Apoptose.....	72
4. Diskussion	76
4.1 <i>Targeted therapies: Apoptose oder Nekroptose?</i>	77
4.2 p53 und Tyrosinkinaseinhibitoren	81
4.3 Kombinationsstrategien als neue Behandlungsoptionen beim HCC	82
4.3.1 Monotherapie mit Panobinostat und Bleomycin	83
4.3.2 Eine neue Kombinationstherapie im HCC - Panobinostat in Kombination mit Bleomycin	84
5. Zusammenfassung.....	86
6. Abkürzungsverzeichnis.....	89
7. Literaturverzeichnis	91
8. Selbstständigkeitserklärung.....	104
9. Danksagung	105
10. Lebenslauf.....	107

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die sechsthäufigste Krebserkrankung mit 905.677 neuen Erkrankungen im Jahr 2020 und die vierthäufigste Ursache für tumorbedingte Todesfälle weltweit (1–7). Die Inzidenz des HCC nahm über die letzten Jahre zu und ist daher als eine globale, stetig wachsende Herausforderung des Gesundheitssystems zu betrachten. Schätzungen zufolge werden bis zum Jahr 2025 jährlich mehr als eine Million Menschen am HCC erkranken. Die geographische Verteilung des Auftretens des HCCs zeigt deutliche regionale Unterschiede. Die höchste Inzidenz wird in Südostasien und in Subsahara- Afrika registriert (4). Die Inzidenzen in den sogenannten entwickelten Industrienationen sind niedriger, zeigen aber insbesondere in den USA und Europa (v.a. Südeuropa) sowie Japan in den letzten Jahren einen signifikanten Anstieg (8,9). Prognosen gehen davon aus, dass bis 2030 das HCC die dritthäufigste Ursache für krebsbedingte Todesfällen sein wird (9–11).

Circa 90% der HCC-Erkrankungen sind auf eine zugrundliegende chronische Lebererkrankung zurückzuführen. Hierbei sind das Hepatitis B Virus- (HBV) und das Hepatitis C Virus- (HCV) für 85 % der Fälle weltweit verantwortlich. Global betrachtet werden die weiteren 15% anderen Ursachen, wie z.B. einem chronischen Alkoholkonsum, einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), einer genetischen Prädisposition (z.B. alpha1-Antitrypsinmangel, Hämochromatose), einer Aflatoxin B1 Exposition oder einer Co-Infektion mit dem Hepatitis D Virus (HDV) zugeschrieben (11–14).

1.1.2 Pathogenese

Das Entstehen des HCC (Hepatokarzinogenese) ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene progressive molekulare Alterationen charakterisiert ist (Abb. 1) (6,15). Wiederholte klonale Entwicklungszyklen können Läsionen mit einem malignen Phänotyp hervorrufen. Das HCC wird in den meisten Fällen infolge einer Leberzirrhose oder - wie im Fall einer NASH – auch ohne eine vorliegende zirrhotische Veränderung induziert (9,16). Die Progression des HCC verläuft bei allen zugrunde liegenden Ursachen nahezu gleich. Initial kommt es zu einer Fibrose, aus der sich nach einem eventuell beschwerdefreien Zeitraum von bis zu 30 Jahren eine Zirrhose entwickeln kann (2,17,18) (Abb.1). Durch weitere Schädigungen, wie epigenetische oder chromosomale Veränderungen, z.B. Telomerverkürzungen, findet ein unkontrollierte Zunahme der Proliferation der Hepatozyten statt und es entsteht ein maligner Phänotyp, der zu Hyperplasie, Dysplasie und weiter zur Entwicklung eines HCC führt (19–21).

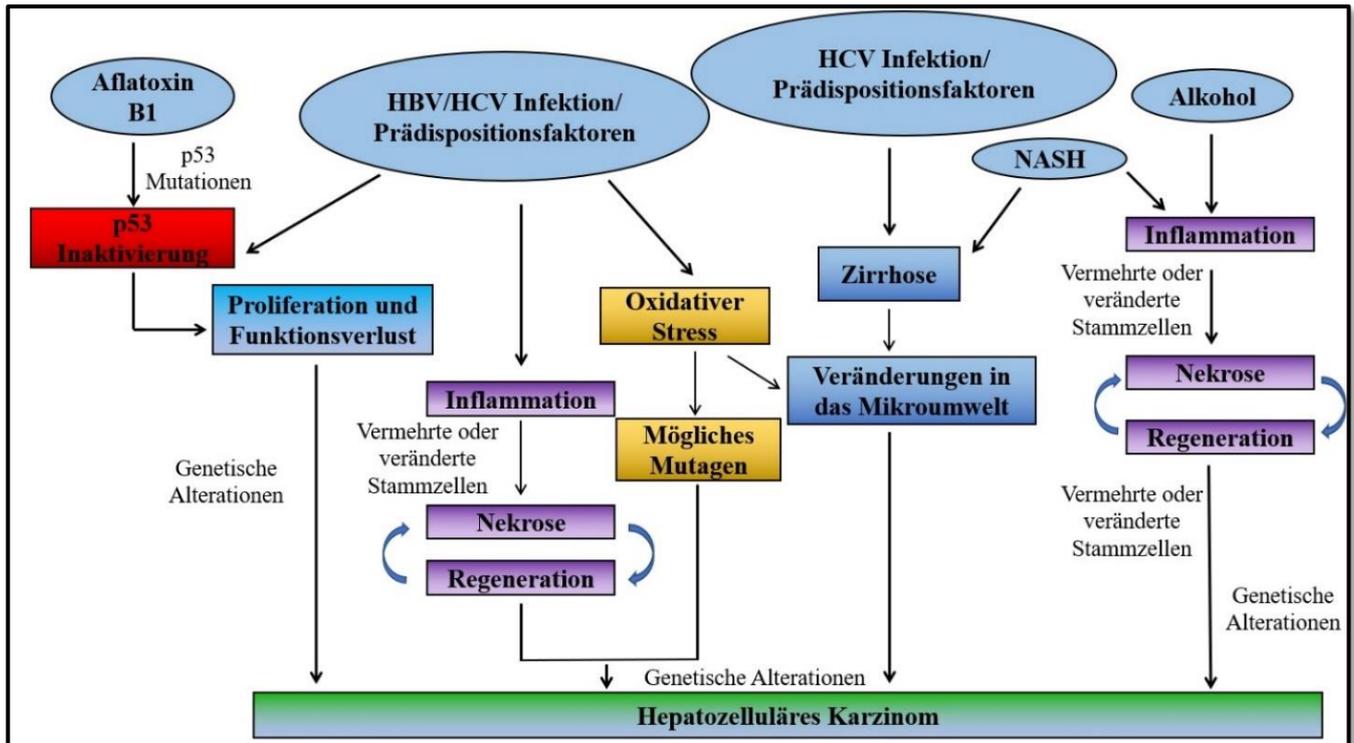


Abbildung 1: Überblick über den Mechanismus der Hepatokarzinogenese. Darstellung der verschiedenen Risikofaktoren einer chronischen Leberschädigung, die zur Leberzirrhose und anschließend zum HCC führen (modifiziert nach ((22)). Gemeinsamkeiten sind in derselben Farbe dargestellt. HBV kann ins Wirtsgenom

Einleitung

integrieren. Aflatoxin B1 ist ein Toxin und wirkt mutagen. NASH: nicht alkoholische Steatohepatitis, HCC: hepatozelluläres Karzinom, HCV: Hepatitis C Virus.

Die größten Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCCs in Europa, Nordamerika und Japan sind mit 50-70% eine Hepatitis C-Virus-Infektion (HCV), gefolgt von chronischem Alkoholabusus in 10-20% der Fälle und in 10-20% eine Hepatitis B-Infektion (HBV) (23). In Ländern der afrikanischen Subsahara-Region zeigt sich jedoch eine deutlich höhere Infektionsrate mit HBV. Die Prävalenz hier ist mit etwa 6% weltweit am höchsten (4).

Über 90 % der HCC-Fälle treten im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung auf. Eine Leber-Zirrhose jeglicher Ätiologie ist der häufigste Risikofaktor für ein HCC. Zu den Hauptrisikofaktoren für eine Leberzirrhose gehören chronischer Alkoholkonsum, nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) im Zusammenhang mit Diabetes oder dem metabolischen Syndrom sowie die chronischen Infektionen mit HBV oder HCV (1,24).

Die HCV-Infektion ist die häufigste viral bedingte Ursache für die Entstehung eines HCC infolge einer Leberzirrhose (7). Nach Angaben der WHO gibt es weltweit etwa 1,75 Millionen Neuinfektionen pro Jahr, was zu einer globalen Inzidenz von HCV von 23,7 Fällen pro 100.000 Einwohner führt (7). Im Gegensatz zu HBV ist HCV ein RNA-Virus, das sich nicht in das Genom integriert. Daher wirkt HCV nicht als pro-onkogen und das HCC-Risiko ist hauptsächlich auf diejenigen beschränkt, die eine Zirrhose oder einen chronischen Leberschaden mit überbrückender Fibrose entwickeln (25). Im Gegensatz zu HBV kommt es bei der HCV-Infektion in 70 bis 80% der Fälle zu einer chronischen Infektion. Die HCV-Infektion scheint im Vergleich zur HBV-Infektion das HCC-Risiko vorwiegend durch die hepatozelluläre Inflammation und Fibrose sowie durch die Induktion einer malignen Transformation der infizierten Hepatozyten zu verstärken (7). Dies führt zu einem bis zu 30fach erhöhten Risiko einer HCC-Entwicklung und ist damit global die zweithäufigste Ursache für ein HCC (6).

Der chronische Alkoholkonsum stellt einen weiteren bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC dar. Dabei ist das Risiko abhängig von der konsumierten Alkoholmenge. Bei einem zehnjährigen Alkoholkonsum von >60 g pro Tag bei Männern bzw. >20 g pro Tag bei Frauen, ist das HCC-Risiko 3- bis 6-fach erhöht (26).

Wenige verbreitete Risikofaktoren für das HCC sind die Leber-Zirrhose durch die primäre biliäre Cholangitis (PBC), Hämochromatose und den α 1-Antitrypsin-Mangel. Besonders hervorzuheben ist, dass Patienten, die aufgrund einer Hämochromatose

eine Zirrhose entwickeln, im Laufe ihres Lebens ein besonders hohes HCC-Risikovo in bis zu 45 % der Fälle aufweisen (7).

Eine besondere ätiologische und pathophysiologische Rolle spielt eine HBV-Infektion, die aufgrund der Integration des Virusgenoms in die Hepatozyten auch ohne Entwicklung einer Leberzirrhose mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines HCCs assoziiert ist. HBV ist ein DNA-Virus, das sich in das menschliche Genom integrieren kann, was zu einer Insertionsmutagenese führt und somit pro-onkogen wirkt (27). Eine HBV-Infektion führt zu einem bis zu 20fach höheren Risiko für die Ausbildung eines HCCs. Weltweit beruhen etwa 50% der HCCs auf einer HBV Infektion (5). Bei Patienten mit einem HCC auf dem Boden einer HBV-Infektion ohne vollständige Zirrhose findet sich meistens eine zugrundeliegende Fibrose mit verstärkten regenerativen Veränderungen. Dies kann auf die Produktion des HBV X Proteins durch das HBV nach Integration der HBV-DNA in das Wirtsgenom und die konsekutive Stimulation der Zellproliferation zurückgeführt werden (27).

In den westlichen Industrieländern zeigt sich außerdem eine Zunahme der HCC-Inzidenz aufgrund der metabolischen Veränderungen im Rahmen des Diabetes mellitus (DM) und des metabolischen Syndroms.

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), welche im Vergleich zu NAFLD durch zusätzliche entzündliche Veränderungen mit oder ohne Fibrose gekennzeichnet ist, können durch die dauerhaften entzündlichen Veränderungen zu einem HCC ohne Zirrhose als Vorstufe führen. Bereits bei Ausbildung einer Leberfibrose besteht dann ein signifikant erhöhtes Risiko ein HCC zu entwickeln (23).

Betrachtet man alle unterschiedlichen Ursachen für ein HCC, ist immer eine inflammatorische Veränderung des zellulären Mikromilieus der Leber zu beobachten. Der primäre Auslöser für diese Entzündung, die mit der Hepatokarzinogenese assoziiert ist, ist der Tod der Hepatozyten. Trotz der hohen Regenerationsfähigkeit der Leber, führt dieser Schaden zu einer deutlich gesteigerten Zellproliferation. Die dauerhafte Inflammation kann direkt zu einem HCC führen. Eine NASH und NAFLD führen in der Regel über die Fibrose zur Zirrhose. Bereits das Vorliegen einer Leberfibrose ist bei diesen Patienten mit einem signifikanten HCC-Risiko assoziiert. Bei chronischem Alkoholkonsum und bei einer HCV Infektion führt die Entzündung in der Regel über die Ausbildung einer Leberzirrhose zum HCC.

1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik

Weltweit werden ca. 1 Million Todesfälle pro Jahr auf Grund eines HCCs beobachtet. Infolge einer meist zufälligen und erst späten Diagnose weist das HCC in fortgeschrittenen Stadien (Barcelona Classification (BCLC) C und D) eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5% auf, wenn dieses als nicht-resektabel diagnostiziert wurde. Dies verdeutlicht die Bedeutung einer frühzeitigen Screening- und Kontrolluntersuchung bei Patienten, die Risikofaktoren aufweisen, nicht nur für die frühe Diagnosestellung und Behandlung, sondern auch für das Überleben der Patienten mit Leberzirrhose verschiedener Ätiologien (28–30).

Am häufigsten (90%) wird die Entstehung eines HCC durch eine Leberzirrhose verursacht. In diesem Fall zeigen die Patienten sowohl entsprechende Symptome einer Leberzirrhose (eingeschränkte Lebersynthese und –exkretion, hepatische Enzephalopathie, Panzytopenie mit einer schweren Gerinnungsstörung, hydropische Dekompensation und dadurch eine spontan bakterielle Peritonitis), als auch laborchemische Veränderungen (Panzytopenie meist mit führender Thrombozytopenie aufgrund des Hypersplenismus, schwere Gerinnungsstörung, Elektrolytentgleisung mit Hyponatriämie). Zudem zeigen sich auch weitere unspezifische Symptome, wie z.B. Druckschmerz im rechten Oberbauch, Müdigkeit, eingeschränkte Leistungsfähigkeit, Kachexie und eventuell tastbare Tumore (24).

Je später die Diagnose gestellt wird desto wahrscheinlicher ist, dass zum Diagnosezeitpunkt bereits ein multifokales HCC vorliegt. 25% der Patienten entwickeln eine makrovaskuläre Invasion und eine Pfortaderthrombose mit nachfolgenden Komplikationen wie z.B. der Bildung von Ösophagus– und Fundusvarizen mit einer konsekutiven oberen gastrointestinalen Blutung oder Verstärkung der hepatischen Enzephalopathie (Wernicke-Enzephalopathie). In 10% der Fälle kommt es zu einer Infiltration von Lebervenen und der *Vena cava inferior*. Die paraneoplastischen Syndrome beschreiben ein fortgeschrittenes Stadium. Diese bestehen aus einer Symptomkombination von Fieber, Polyglobulie, Hypoglykämie oder Hyperkalzämie und können auch von einer B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust >10 kg in den letzten 6 Monaten) begleitet werden. Patienten mit diesen Symptomen haben eine deutlich schlechtere Prognose (31,32).

Da in den letzten Jahren eine steigende HCC-Inzidenz registriert wurde, wurde von den nationalen und internationalen Gesellschaften für Gastroenterologie ein Screening- und Diagnostikprotokoll vorgeschlagen:

- Alle Patienten, die an einer Leberzirrhose leiden, sollten alle 6 Monate eine Ultraschalluntersuchung bekommen, mit oder ohne AFP (Alpha-1-Fetoprotein) -Bestimmung. In einer Metaanalyse wurde gezeigt, dass die zusätzliche Bestimmung von AFP die Sensivität der HCC- Früherkennung erhöht (33).
- Eine alleinige AFP-Messung (ohne Ultraschalluntersuchung) ist hingegen nicht empfehlenswert, da Patienten mit Leberzirrhose und v.a. mit einer erhöhten Regenerationsrate von Hepatozyten (z.B. HCV-Infektion) ein erhöhtes AFP-Serumniveau haben können (10).
- Bei Patienten mit Risikoprofil oder bereits bestehender Leberfibrose sollte das Fibrorestadium wiederholt bestimmt werden, um das HCC-Risiko bei Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung besser einzuschätzen (34).
- Bei einem Verdacht auf das Vorliegen eines HCCs müssen entsprechend der „American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)“, der „European Association for the Study of the Liver (EASL)“ und der „Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)“ weitere bildgebende und je nach Einzelfall auch histologische Verfahren angewendet werden (24).

Die nicht-invasive bildgebende Diagnostik ist ein essenzieller Schritt für die Erkennung des Tumors. Hier werden Sonographie und Kontrastmittel-unterstützte Bildgebungen (CT/MRT) komplementär eingesetzt. In Abhängigkeit von der sonographischen Größe eines Knotens wird bei einer Größe <1 cm eine Wiederholung des Ultraschalls empfohlen. Stellt sich kein eindeutiger Befund nach einer viermonatigen Wiederholung der Sonographie dar, wird eine frühzeitige Biopsie empfohlen. Hat der Tumor eine Größe von >1 cm Durchmesser, sollte eine Computertomographie oder Magnetresonanztomographie durchgeführt werden. Das typische Kennzeichen in der Bildgebung ist die Kombination aus Hypervaskularisation (vermehrte Durchblutung

des Tumors) in der sparteriellen Phase und ein Wash-out Phänomen (verminderte Durchblutung des Tumors in der portalvenösen Phase). Diese beiden Effekte zeigen die aberrante Vaskularisation, die in der Hepatokarzinogenese stattfindet. Sind diese zwei Kennzeichen nachweisbar, kann die Diagnose HCC bei Läsionen >2 cm mit einer Spezifität von 100%, bei Läsionen zwischen 1 und 2 cm mit einer Spezifität von 90% gestellt werden und erfordert keine weiterführenden diagnostischen Maßnahmen. Zeigt sich bei beiden diagnostischen Verfahren des HCC ein positiver Befund, gilt die Diagnose als gesichert und muss formal histologisch nicht gesichert werden. Bei bildgebend nicht eindeutigen Befunden muss die Raumforderung biopsiert und histologisch analysiert werden (Abb. 2) (1,24).

Nach der Diagnose wird der Tumor durch das „Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging System“ in Untergruppen eingeordnet und stadien-abhängigen Therapiealgorithmen zugewiesen (35). Die BCLC-Einteilung wird sowohl von der EASL als auch von der AASLD empfohlen. Sie umfasst 5 Stadien (0-D), welche durch den Tumorstatus (Größe, Anzahl, vaskuläre Infiltration, N1, M1), die Leberfunktion (Child-Pugh Score zur Beurteilung des Schweregrades der Leberzirrhose: Bilirubin, portale Hypertension) und den Performance Status (ECOG) charakterisiert sind (24).

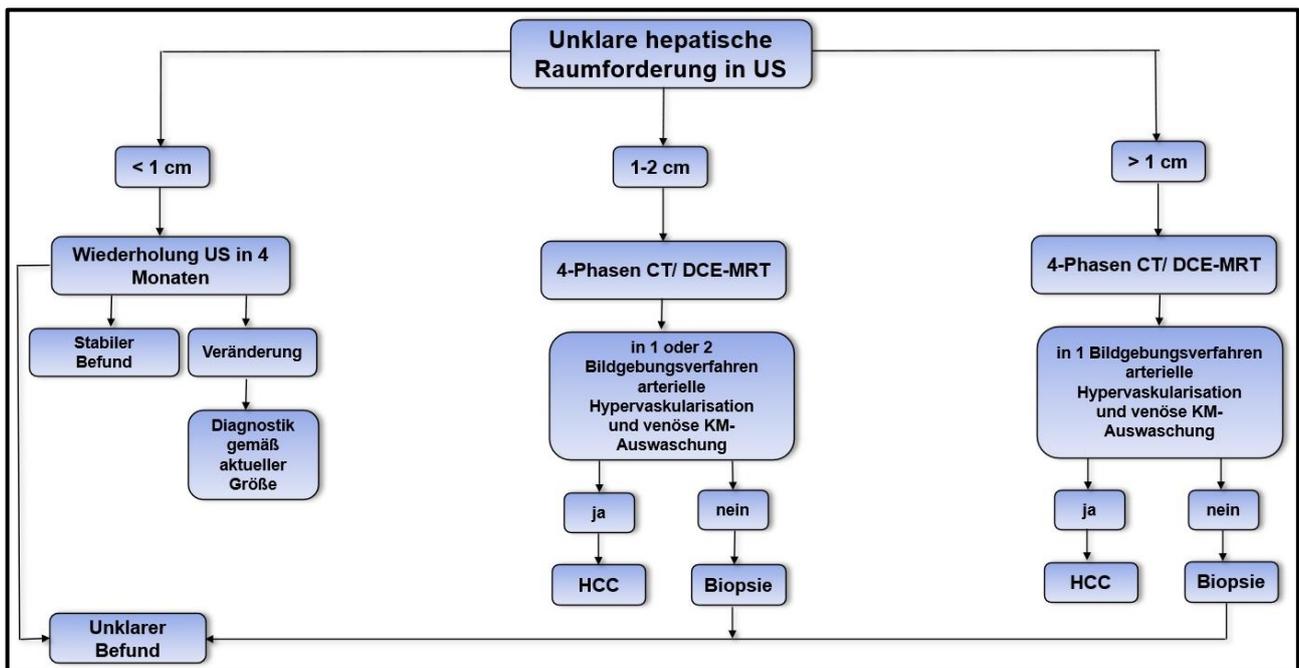


Abbildung 2: Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf HCC gemäß den Leitlinien der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) und der European Association for the Study of the Liver (EASL) (modifiziert nach (1). Abkürzungen: US: Ultraschall; CT: Computertomographie; DCE-MRT: Dynamische kontrastmittelverstärkte (= dynamic contrast enhanced) Magnetresonanztomographie; KM: Kontrastmittel.

1.1.4 Therapie

Abhängig vom BCLC-Stadium teilt sich die HCC-Therapie in kurative und palliative Behandlungen (Abb. 3). Bei den kurativen Verfahren können chirurgische Verfahren Eingriffe (Lebertransplantation, chirurgische Resektion bei nicht-zirrhotoser Leber) von lokalablativen Verfahren wie der RFA (Radiofrequenzablation), der PEI (perkutane Ethanolinjektion) und der MWA (Mikrowellenablation) unterschieden werden. Als palliative Therapie stehen transarterielle Verfahren (TACE (transarterielle Chemoembolisation), SIRT (selektive interne Radiotherapie) und systemische Therapien zur Verfügung (36,37). Bei fortgeschrittener Leberfunktionseinschränkung überwiegen palliative Ansätze und supportive Therapiekonzepte stehen im Vordergrund des Behandlungskonzeptes.

Im sehr frühen Stadium (**BCLC Stadium 0**) kann dem Patienten neben der Resektion, der der Lebertransplantation eine RFA angeboten werden, um eine komplette Nekrose des Tumors mit einem sicheren Ablationsrand zu erreichen. Es wurde gezeigt, dass die RFA und das operative Verfahren vergleichbare Erfolge erzielen. Die operative Resektion in einer nicht-zirrhotosen Leber gilt als Option bei Vorliegen einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) oder eines metabolischen Syndroms, aus denen ein HCC ohne eine zugrundeliegende Zirrhose oder schwere Fibrose entstehen kann. Bei einer zirrhotosen Leber sollte die chirurgische Behandlung nur unter Berücksichtigung von Indikationen und Kontraindikationen stattfinden. Auch Patienten in einem frühen Stadium (**BCLC Stadium A**) profitieren sowohl von einer RFA als auch von einer operativen Resektion.

Die Milan-Kriterien als Diagnosekriterien zur Evaluation einer Lebertransplantationslistung im Behandlungskonzept des HCCs sind durch folgende Charakteristika definiert:

- a) ein Herd kleiner als 5 cm,
- b) maximal drei Läsionen unter 3 cm,
- c) keine extrahepatische Metastasierung
- d) und keine vaskuläre Beteiligung.

Falls sich der Tumor durch die Milan-Kriterien charakterisieren lässt und „innerhalb“ der Milan Kriterien ist, kommt eine Lebertransplantation als Therapieoption in Frage. Sind beide Verfahren (Resektion und Transplantation) keine Option bei der Behandlung des HCC, wird eine RFA bevorzugt (37).

Für das intermediäre Stadium (**BCLC Stadium B**) ist die TACE bei einer Leberzirrhose im Child-Pugh Stadium A oder B die therapeutische Option der ersten Wahl. Eine besondere und mittlerweile verbreitete Form der TACE ist die DEB-TACE (drug eluted bead) unter Einsatz von mit Doxorubicin-beladenen Beads. Die DEB-TACE zeigte nicht nur eine bessere lokale Wirkung, sondern durch den kontinuierlichen Medikamenteneinstrom eine geringeres Nebenwirkungsspektrum. In Einzelfällen kann durch diese lokalen Therapien die Tumorgröße so reduziert werden, dass die Milan-Kriterien wieder erfüllt sind und dem Patienten gegebenenfalls eine Lebertransplantation angeboten werden kann (Überbrücken (Bridging) der Wartezeit). Patienten mit HCC auf der Warteliste müssen alle 3 Monate mit einem schnittbildgebenden Verfahren bezüglich des Tumorprogresses kontrolliert werden. Hierbei wird zum einen die Wirksamkeit der Bridging Verfahren und zum anderen ein Progress des Tumors untersucht. Wenn der nicht kontrollierbare Tumorprogress einen Drop-out aus den Milan-Kriterien bedingt, muss der Patient von der Warteliste genommen werden. Somit werden Patienten mit einem aggressiveren Tumorwachstum, die nach einer Transplantation auch ein deutlich schlechteres Überleben als die anderen Patienten hätten, alternativen Therapieoptionen zugeführt (1,38,39). Bei Patienten mit Okklusion der Vena portae empfiehlt die S3-Leitlinie der DGVS eine selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) (34). Der Stellenwert der SIRT kann aufgrund fehlender Daten und adäquater Vergleichsstudien derzeit nicht abschliessend beurteilt werden (40,41), sodass die TACE derzeit die Standard- bzw. Erstlinientherapie beim HCC im BCLC-Stadium B ist (34).

Im **BCLC Stadium B (wenn eine lokoregionale Behandlung nicht möglich ist) und im Stadium C** profitieren die Patienten von einer systemischen Therapie, die als Ziel eine langsame(re) Progression der Krankheit und ein verlängertes Überleben hat. Bis 2018 war Sorafenib die einzige zugelassene systemische Therapie. Formal ist diese auch nur für Patienten mit einer guten Leberfunktion (Child-Pugh A) empfohlen. In den letzten Jahren wurden erfreulicherweise weitere neue Wirkstoffe sowohl für die Erstlinientherapie als auch für die fortgeschrittenen Therapielinien zugelassen (1,34).

Als Systemtherapien bei erhaltener Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium A) werden folgende Substanzen empfohlen:

- a) Für die Erstlinientherapie
 - die Kombinationstherapie mit den Antikörpern Atezolizumab (gegen PD-L1) und Bevacizumab (gegen VEGF)
 - Tyrosinkinase-Inhibitoren: Sorafenib und Lenvatinib (42).

- b) Für fortgeschrittene Therapielinien
 - Regorafenib und Cabozantinib (nach einer Vortherapie mit Sorafenib),
 - der VEGF-R2 Antikörper Ramucirumab für Patienten nach Sorafenib-Therapie und einem AFP-Wert von ≥ 400 ng/ml.

Bei erhaltener Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium A) und in den Stadien BCLC B oder C mit Fernmetastasen oder einer Tumorlokalisation, die lokoregionär nicht kontrolliert oder reseziert werden kann, ist eine Erstlinientherapie mit einer Kombination von Atezolizumab und Bevacizumab nach der Phase-III IMBrave-150-Studie empfohlen (43), falls keine Kontraindikationen, wie Ösophagusvarizen, vorliegen. Basierend auf den Daten der IMBrave-150-Studie wurde die Kombination Atezolizumab-Bevacizumab in der Erstlinientherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC in den USA bereits im Mai 2020 zugelassen. Im September 2020 empfahl auch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) die Zulassung von Atezolizumab in Kombination mit Bevacizumab für die Erstlinientherapie bei Patienten mit HCC im BCLC-Stadium B-C und Leberzirrhose Child A. Die Patienten, bei denen eine Kontraindikation für die Kombination Atezolizumab/Bevacizumab besteht, können von einer Erstlinientherapie mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Lenvatinib (Phase 3-REFLECT-Studie) (42) oder Sorafenib (Phase 3-SHARP-Studie) (44) profitieren (34).

Als Systemtherapie bei einer Leberfunktion im Stadium Child-Pugh B (bis max. 8 Punkte) kann bei einem ECOG-Status von 0 – 1 eine Systemtherapie in ausgewiesenen onkologischen Zentren erwogen werden. Der limitierende Faktor sowohl für die Effektivität als auch das Auftreten von Nebenwirkungen ist die Leberfunktion. Die Effektivität einer Systemtherapie ist bereits bei einem Child Pugh

Score mit 8 Punkten deutlich eingeschränkt, sodass bei diesen Patienten die Therapiefähigkeit exakt evaluiert werden muss (45).

Bei einem Stadium Child-Pugh C sollte keine Systemtherapie durchgeführt werden (34). Das **BCLC Stadium D** ist gekennzeichnet durch eine schlechte Prognose aufgrund einer fortgeschrittenen Leberinsuffizienz und umfasst Patienten mit körperlichen Einschränkungen. In diesem Stadium sollte der Patient palliativ mit symptomatischer Therapie sowie psychologischer Behandlung nach den Prinzipien der Best Supportive Care unterstützt werden (1,34,37).

Sorafenib und Lenvatinib sind sogenannte *targeted therapies* aus der Klasse der Multikinase-Inhibitoren. Sorafenib hemmt die Angiogenese durch Blockade der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des VEGF-Rezeptors (v.a. Vascular Endothelial Growth Factor 2 (VEGF2)-Rezeptor-) und des PDGF β Rezeptors (Platelet Derived Growth Factor Rezeptor β) (42). Außerdem wirkt Sorafenib antiproliferativ, da es den RAF/MEK/ERK Signalweg inhibiert. Lenvatinib wirkt spezifischer und inhibiert die Kinasedomäne von VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3, die Kinasedomäne des Rezeptors FGF1-4 (Fibroblast Growth Factor 1-4 Rezeptor) und die Kinaseaktivität des PDGF α Rezeptors (Platelet derived Growth Factor Rezeptor α) sowie den RET und KIT Signalweg (1,46,47). Patienten, die auf diese Therapien nicht ansprechen bzw. progredient sind, sollen für eine Zweitlinien-Therapien in Betracht gezogen werden (44). Regorafenib blockiert den VEGF1-3 Rezeptor-, sowie den PDGF PDGF β und FGF1 Rezeptorsignalweg und die Kinasen KIT, RET und B-RAF (48). Cabozantinib ist ein Inhibitor von MET, VEGFR2 und RET (49,50).

Mit Ramucirumab ist ein monoklonaler gegen VEGFR2 gerichteter Antikörper für die Therapie des HCCs zugelassen. Er ist ein vollhumaner rekombinanter monoklonaler IgG1 Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne von VEGFR2 bindet und so dessen Aktivierung inhibiert. Seinen anti-tumoralen Effekt hat dieser therapeutische Antikörper in einer Phase 3- Studie belegt (51–53).

Vor kurzem wurde eine neue Kombination aus 2 monoklonalen Antikörpern - Atezolizumab und Bevacizumab- in einer multizentrischen Phase 3-Studie bei nicht resektablem HCC für die Erstlinientherapie des HCCs untersucht und infolgedessen zugelassen (43). Atezolizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, der selektiv an PD-L1 bindet, um eine Interaktion mit den Rezeptoren PD-1 und B7-1 zu verhindern. Dadurch wird eine tumorabhängige T-Zell-Suppression aufgehoben.

Bevacizumab ist ein humaner rekombinanter monoklonaler IgG1 Antikörper gegen VEGF. Er hemmt die Angiogenese und das Tumorwachstum. Zusammengefasst hemmt Bevacizumab nicht nur das Tumorwachstum, indem es die Angiogenese hemmt, sondern verstärkt auch die immunagonistischen Wirkungen von Atezolizumab (Augmentation der Antigenpräsentation), indem es die immunsuppressiven Mechanismen der VEGF-Signalwege umkehrt. Durch diese neue Kombination zeigen sich insgesamt bessere und progressionsfreie Überlebensergebnisse im Vergleich zu Sorafenib (43,54).

Zusammengefasst ist die Therapie und Prognose des HCC abhängig von der Tumorgröße und Ausdehnung sowie von der Leberfunktion. Auch wenn in letzter Zeit Fortschritte im Bereich des klinischen und medikamentösen Managements erzielt wurden, ist die Prognose des HCCs weiterhin eingeschränkt. Wie für andere Tumorentitäten bestehen für das HCC stadienabhängige Überlebenszeiten. Im BCLC Stadium 0 werden die Patienten kurativ behandelt bei einem sehr guten Gesamtüberleben. Ab BCLC Stadium A sinkt die Überlebenszeit von > 5 Jahren für Patienten in Stadium A auf eine Lebenserwartung von 3-4 Monaten im BCLC Stadium D (37,39,55).

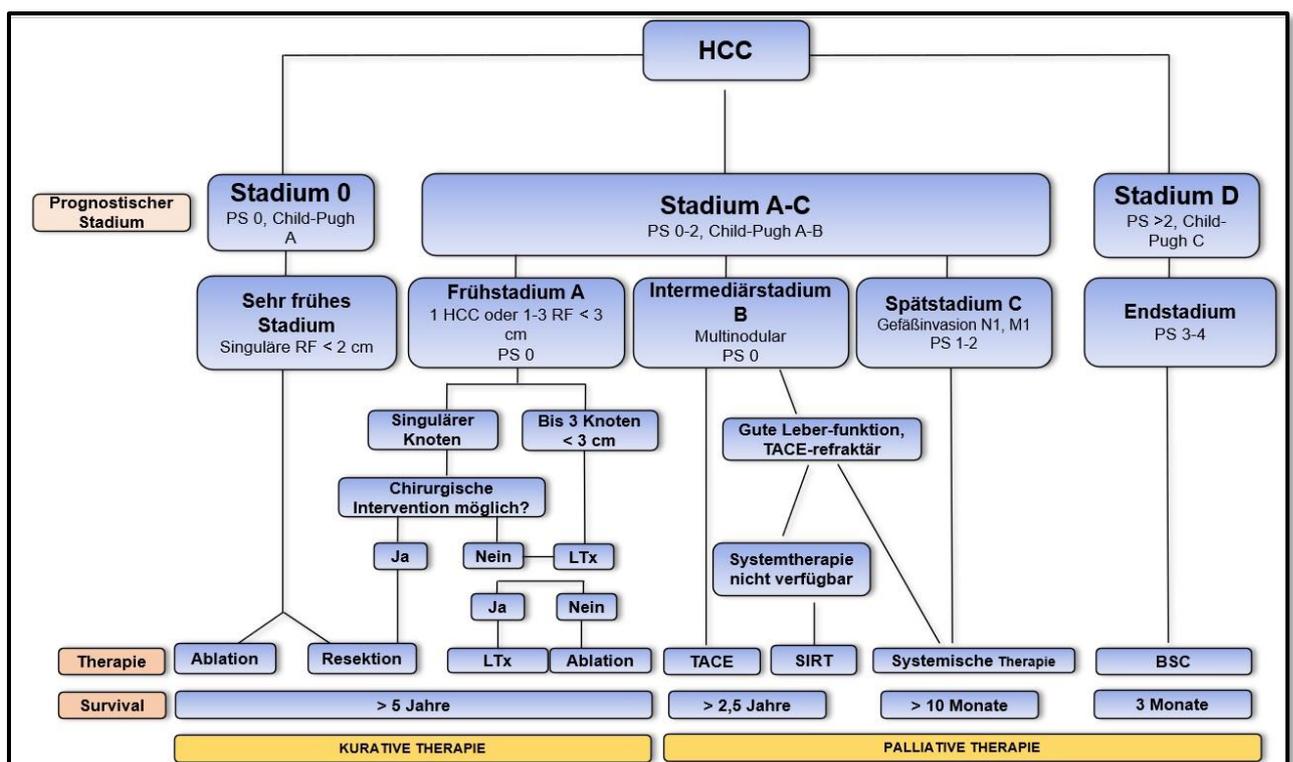


Abbildung 3: Staging und stadiengerechte Therapie des HCC nach den Leitlinien der EASL gemäß BCLC-Klassifikation (modifiziert nach ((1)); PS (Performance Status); RF (Raumforderung(en)); RFA

Einleitung

(Radiofrequenzablation); TACE (Transarterielle Chemoembolisation); LTx (Lebertransplantation), BSC (Best Supportive Care).

Die Prognose ist nicht nur vom Tumorstadium, sondern auch von der Leberfunktion, vom körperlichen Leistungszustand des Patienten (ECOG Stadium= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (56)) und von der zugrundeliegenden Ätiologie (z.B. alkohol- induzierte Leberzirrhose vs. HCC auf dem Boden einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung) abhängig.

Um die Prognose dieser Krankheit langfristig zu verbessern ist die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und das bessere Verständnis der zugrundeliegenden Wirkmechanismen der bestehenden Therapien von großer Bedeutung.

1.2 Die p53-Familie

Die p53 Familie besteht aus dem Protein p53 und den strukturell zu p53 homologen Proteinen p63 und p73. Der Namensgeber der Proteinfamilie, p53 wurde 1979 beschrieben (57). Erst 1997 wurden p63 und p73 charakterisiert (58–60). Die Mitglieder der p53-Familie sind an einer Vielzahl von essenziellen zellulären Prozessen, unter anderem der Zelldifferenzierung, Zellproliferation, der Regulation des Zellmetabolismus und der Apoptoseinduktion, beteiligt (57,61,62).

Die besondere Rolle von p53 wird dadurch verdeutlicht, dass es das am häufigsten mutierte Gen in humanen Tumoren ist. p53 und seine Familienmitglieder p63 und p73 als wirken u.a. als Transkriptionsfaktoren. Sowohl die Struktur als auch die Bindung an verschiedene Promotoren von Ziel-Genen der p53-Familie wurden intensiv untersucht und so hat sich das Bild vom „*guardian of the genome*“ seit 1979 ständig erweitert. Man weiß heute, dass eine Vielzahl zellulärer Prozesse von dieser Proteinfamilie kontrolliert werden, z.B. die metabolische Aktivität der Zellen, der Zellzyklus, die Proliferation und auch die Produktion von Zytokinen sowie weiterer entzündlicher Proteine. Dadurch wirkt die p53-Familie nicht nur als Tumorsuppressoren, sondern beeinflusst u.a. Entwicklung, Neurodegeneration, Altern, Zelltod, Autophagie und Fertilität (57,62–65).

1.2.1 p53

Das Gen des humanen Tumorsuppressorproteins p53 (**TP53**) ist auf dem kurzen Arm des **Chromosoms 17** (17p13.1) lokalisiert. Das **TP53** Gen enthält 11 Exons. Das p53-volllängen Protein besteht aus 393 Aminosäuren bei einer Größe von 53 kDa. Neben dem volllängen Protein und es gibt 11 weitere p53-Isoformen (66).

p53 hat den typischen Aufbau eines Transkriptionsfaktors bestehend aus aus zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), einer zentralen DNA-Bindungs-Domäne (DBD) und einer Oligomerisierungs-Domäne. Zusätzlich zu der zentralen DBD enthält es eine Carboxy-terminale Domäne (CTD), die ebenfalls DNA binden kann. Außerdem weist p53 eine Prolin-reiche Domäne (PRD), ein Kernlokalisations-Signal und zwei Kernexport-Signale auf (Abbildung 4).

Beschreibung der verschiedenen Domänen von p53:

1) **2 Transaktivierungsdomänen:** TAD I und TAD II, N-terminale Lokalisation

- **Struktur:** Bestehend aus den Aminosäuren 1-40 bzw. 40-61;
- **Funktion:** TAD ist eine *scaffold* Domäne des Transkriptionsfaktors p53, die Bindungsstellen für andere Proteine wie Transkriptions-Coregulatoren enthält.
- Die TADs regulieren die Transkription von Zielgenen, indem sie Chromatin-Remodeling-Faktoren rekrutieren, die den Zugang von p53 und der basalen Transkriptionsmaschinerie zur DNA erleichtern. Daneben regulieren sie auch durch die Rekrutierung von E3-Ubiquitinligasen die Stabilität von p53;
- **Interaktionspartner:** Transkriptionsfaktor II D und II A (TFIID, TFIIA), TATA Box Binding Protein (TBP), die E3-Ubiquitinligase Maus Double Minute 2 Homolog (MDM2) und die Histonacetyltransferase p300-CREB-binding Protein Coactivator Family (CBP/p300);

2) **Proline-reiche Domäne (PRD)**

- **Struktur:** Bestehend aus den Aminosäuren 61-94
- **Funktion:** Die PRD verbindet TAD mit DBD. Die PRD dient in erster Linie der innermolekularen Stabilisierung des p53-Monomers und der p53-Tetramere. Sie ist essenziell für die Induktion der p53-abhängigen Apoptose und der Hemmung der Proliferation;
- **Interaktionspartner:** Durch die fünf PXXP-Motive (P = Prolin, X = jede andere Aminosäure) werden Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht;

3) DNA-bindende Domäne (DBD, auch Kerndomäne genannt)

- **Struktur:** Bestehend aus den Aminosäuren 94-292
- **Funktion:** Diese Domäne stellt die Grundlage für die sequenzspezifische Bindung von p53 an ein DNA-Konsensusmotiv dar, das als „Antwortelement“ (response element= RE) bezeichnet wird und dekamere Motive Pu-Pu-Pu-C-(A/T)|(T/A)-G -Py-Py Py (Pu: Purin, Py: Pyrimidin) enthält.
- **Interaktionspartner:** Interaktion mit der Oligomerisierungsdomäne (OD)

4) Oligomerisierungsdomäne (OD)

- **Struktur:** Bestehend aus den Aminosäuren 325–356
- **Funktion:** Oligomerisierung von p53. Tetramerbildung aus zwei p52 Dimeren.
- Die OD hilft, die gebundene DNA zu modulieren und erleichtert dadurch eine stabile DNA-Bindung der DBD.
- **Interaktionspartner:** p53, DNA

5) Carboxyterminale regulatorische Domäne (CTD)

- **Struktur:** Bestehend aus den Aminosäuren 353–393
- **Funktion:** Die CTD steuert die Erkennung von DNA-Schäden
- **Interaktionspartner:** bindet über eine unspezifische Bindungsstelle an beschädigte DNA (62,67,68).

Neben der ursprünglichen Form des p53-Proteins, sind noch elf weitere p53-Isoformen beschrieben (p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ), die durch alternatives Spleißen (α , β , γ) und Aktivierung unterschiedlicher Promotorregionen entstehen, und deren atypische Expression auch zur Entartung von Zellen beitragen kann (69).

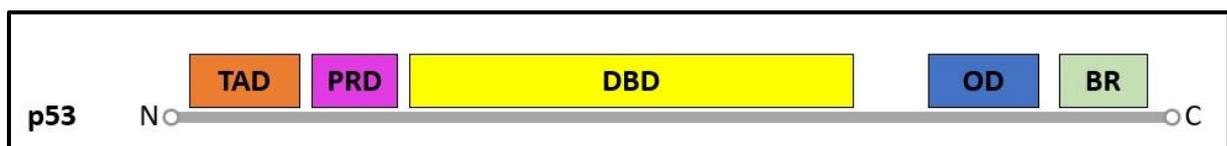


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von p53 (modifiziert nach (70)). Die Struktur von p53 besteht aus einer amino-(N)-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), einer zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD) einer Oligomerisierungsdomäne (OD) und einer Basic Region (BR). Über die prolinreiche Domäne (PRD) können prolinreiche Bereiche interagierender Proteine erkannt werden.

1.2.2 Funktion von p53

Das Funktionsspektrum der p53-Familie umfasst unter anderem die Regulation eines transienten und permanenten Zellzyklusarrests und verhindert Zellwachstum und die Proliferation der DNA-geschädigten Zellen, was anschließend zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt. (Abb. 5).

In der Zelle fungiert **p53** als sogenannter „**Wächter des Genoms**“ und überwacht die genomischen Integrität und Zellhomöostase. Ausgelöst durch verschiedene Stresssignale wie Hypoxie, Onkogene, DNA-Schäden oder ribosomalen Stress werden Proteinkinasen aktiviert, die p53 induzieren. Die Entscheidung über Zelltod oder Zellüberleben ist von der Intensität des stressauslösenden Signals abhängig. Bei geringem oder moderatem Stress verlangsamt p53 den Zellzyklus. Somit wird Zeit geschaffen, die zellulären Schäden zu reparieren. Gelingt dies, wird die Zelle nach Beenden der Schadensantwort wieder in den Normalzustand versetzt.

Im Gegensatz dazu, wenn die Stresssignale und die zellulären Schäden zu groß sind, werden pro-apoptische Gene aktiviert, sodass Seneszenz oder Zelltod induziert wird (71). Werden irreparabel geschädigte Zellen nicht eliminiert oder erfolgt die Reparatur nur unvollständig oder fehlerhaft, manifestieren sich Mutationen und chromosomale Aberrationen im Genom, die zu einer malignen Transformation und Krebs führen können.

Der Transkriptionsfaktor p53 liegt im Normalzustand gebunden mit dem Protein Mdm2 (*murine double minute 2*), einem negativen Regulator des Proteins p53, vor. Über die direkte Bindung der E3-Ubiquitinligase (Mdm2), leitet Mdm2 eine Ubiquitinierung von p53 ein, was zum proteosomalen Abbau von p53 führt. Liegt Mdm2 inaktiviert vor, wird die Degradation von p53 verlangsamt. Die p53-Halbwertszeit ist kurz. Je nach Intensität des Stresssignals erhöht sich die Halbwertszeit des Proteins als Reaktion auf Stresssignale auf mehrere Stunden, sodass p53 in der Zelle akkumuliert (72,73).

Die Aktivierung von p53 kann in Abhängigkeit des Zellstadiums folgende Schritte induzieren:

- a) **DNA-Reparatur und/oder Zellzyklusarrest** durch Bindung an den humanen Promotor des *PCNA* Gens (*proliferating-cell-nuclear-antigen*). Dadurch wird die PCNA Produktion verstärkt.

- b) **G1-Wachstumsstopp** durch Induktion des CdK (Cyclin-abhängige Kinase) – Inhibitors p21^{WAF1}, welcher an PCNA binden kann. Dadurch wird die Replikation blockiert.
- c) **Aktivierung von intrinsischen oder extrinsischen Signalwegen zur Induktion von Apoptose** (durch Induktion spezifischer Zielgene, wie z.B. des Bcl-2 Antagonisten Bax sowie durch Repression anti-apoptotischer Gene)

Zusammengefasst ist p53 als Transkriptionsfaktor ein Schlüssel zur Aktivierung von DNA Reparaturenzymen, die das Überleben der Zelle ermöglichen können, andererseits zur Initiierung von Apoptose bei irreperablen Zellschäden (74–77).

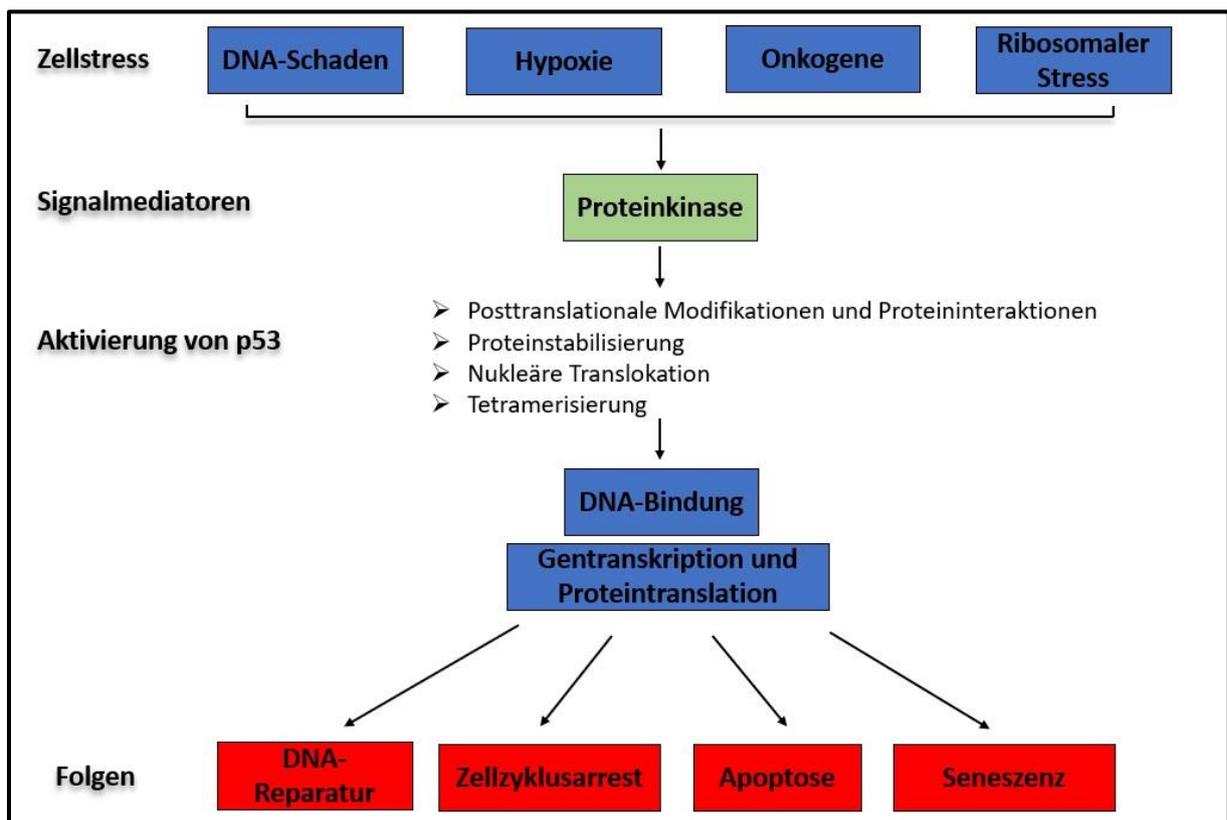


Abbildung 5: Funktionen und Regulationsebenen von p53. Dargestellt sind Ebenen der p53-Aktivierung durch extrinsische und intrinsische Stresssignale und deren Signalweiterleitung über posttranslationale Modifikationen und Proteininteraktionen. Diese führen zur Proteinstabilisierung von p53. Die Folge ist eine Transkription von p53-Zielgenen, deren Proteinprodukte reversible (DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest) oder irreversible Effekte (Apoptose) vermitteln können.

1.3 Verschiedene Formen des Zelltodes

Zelltod ist ein Prozess der wichtig ist für die Erhaltung der Gewebshomöostase und die Entsorgung beschädigter Zellen. Je nach Auslöser, Mechanismus oder Phänotyp unterscheidet man folgende Zelltodformen: Apoptose, Nekrose, Nekroptose, Parthanatose, Entose, Autophagie und Ferroptose (78,79).

1.3.1 Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ (griechisch *ἀπόπτωσης* (apoptōsis) - das Abfallen, der Niedergang; *apo*, *απο*: von- weg, *ptosis*, *πτωσις*: das Fallen) wurde erstmals 1972 in einer Arbeit von Kerr, Wyllie und Currie benutzt um einen morphologisch diversen Zelltod zu beschreiben (80). Unter „Apoptose“ versteht man einen programmierten Zelltod, der streng nach einem biochemisch-zytogenetisch Programms zur Entsorgung überflüssiger oder unerwünschter Zellen abläuft (81,82).

Apoptose als physiologischer Prozess findet sowohl während der Entwicklung als auch zum Erhalt der Gewebshomöostase in mehrzelligen Organismen statt. Mit der Elimination geschädigter Zellen wird die Gewebshomöostase und damit das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten. Es wird geschätzt, dass zur Aufrechterhaltung der Homöostase im erwachsenen menschlichen Körper täglich etwa 10 Milliarden Zellen gebildet werden, um die durch Apoptose sterbenden Zellen auszugleichen (83). Diese Zahl kann signifikant ansteigen, wenn während der normalen Entwicklung, des Alterns oder während einer Krankheit erhöhte Apoptoseraten auftreten (83).

Apoptose sorgt auch für die Eliminierung von genetisch krankhaft veränderten Zellen und verhindert dadurch die Weitergabe des Defekts an die nächste Zellgeneration. Auch wenn die Apoptose eine zentrale Bedeutung für die Integrität des Genoms hat, gibt es nicht wenige Situationen in denen verschiedene Erkrankungen wie neurodegenerative Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson) oder die erworbene Immunschwäche AIDS (wo zu viel Apoptose auftritt) mit einer Fehlregulation assoziiert sind (84).

1.3.1.1 Morphologie der Apoptose

Mittels Licht- und Elektronmikroskopie können verschiedene morphologische Veränderungen während der Apoptose beobachtet werden. In den frühen Phasen der Apoptose sind Zellschrumpfen und Pyknose mittels Lichtmikroskopie sichtbar. Die Zellen werden kleiner, das Zytoplasma wird dichter und die Organellen akkumulieren. Pyknose findet in Folge der Chromatinkondensation als pathognomischer Hinweis auf Apoptose statt (85,86). Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung können apoptotische Zellen als rund oder oval mit einem schwarzen eosinophilischen Zytoplasma und mit dichten und lilafarbenen Chromatinfragmenten dargestellt werden. In der Elektronmikroskopie können die subzellulären Veränderungen besser definiert werden. In der frühen Phase während der Chromatinkondensation sammelt sich das unklare Material peripher unter der Nuklearmembran, wobei dieses dort auch dichte Kerne aufbauen kann. Die extensive „Bläschenbildung“ der Membran führt zu einer Karyorrhesis und Separation von Zellfragmenten in apoptotischen Körpern (87,88). Die apoptotischen Körper besitzen ein dichtes Zytoplasma mit dicht organisierten Organellen, deren Integrität erhalten bleibt und die ganze Struktur von einer intakten Membran geschützt ist. Diese apoptotischen Körper werden von Makrophagen, Parenchymzellen oder neoplastischen Zellen phagozytiert und in Phagolysosomen degradiert. Die Makrophagen, die für die Digestion von apoptotischen Zellen sorgen, werden „anfärbbare Makrophagen“ genannt (Abb.6). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass während der Apoptose oder der Entfernung von apoptotischen Zellen kein inflammatorischer Prozess im Körper besteht, weil:

- a) apoptotische Zellen keine zellulären Komponenten in das umgebende Gewebe freisetzen;
- b) die Zellen schnell von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert werden und dadurch eine sekundäre Nekrose verhindert wird;
- c) während der Phagozytose keine pro-inflammatorischen Zytokine produziert werden (89).

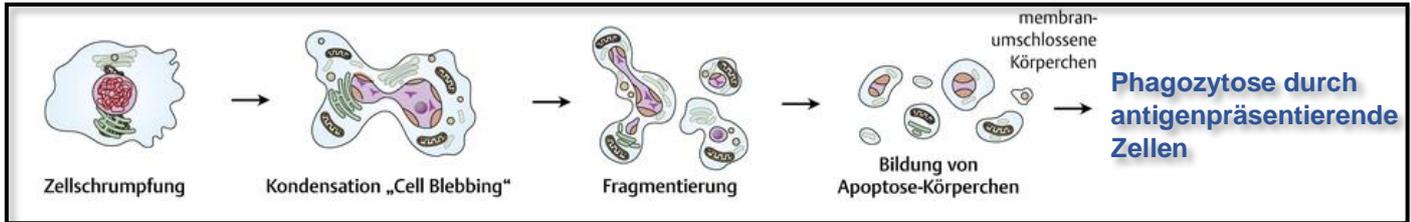


Abbildung 6: Morphologie der Apoptose (modifiziert nach (90)). Dargestellt ist der Beginn der Apoptose mit der Zellschrumpfung, gefolgt von der Verkleinerung der Zellen mit einem dichten Zytoplasma, sowie eine dichte Organisation der Organellen (*Cell Blebbing*). Anschließend findet eine Fragmentierung der Zelle statt und danach die Separation der Zellfragmente in apoptotische Körper. Zuletzt werden diese apoptotischen Körper von Makrophagen, Parenchymzellen oder neoplastischen Zellen phagozytiert und in Phagolysosomen degradiert, ohne dass dabei eine Entzündungsreaktion stattfindet.

1.3.1.2 Der molekulare Ablauf in der Apoptose

Der molekulare Mechanismus der Apoptose ist hochkomplex. Es werden zwei getrennte Wege der Apoptoseinitiierung unterschieden: der extrinsische Signalweg, der über Todesrezeptoren vermittelt wird und der intrinsische Signalweg, an dem die Mitochondrien beteiligt sind (81,91–93).

a) Extrinsischer (todesrezeptorabhängiger) Signalweg

Der extrinsische oder todesrezeptorabhängige Signalweg wird durch Oligomerisierung von spezifischen Transmembranrezeptoren ausgelöst. Die Aktivierung wird durch Bindung von hochspezifischen Liganden an die Rezeptoren induziert.

Es gibt 8 Todesrezeptoren: DR2 (Fas), DR4 (TRAILR1), DR5 (TRAILR2) sowie DR1 (TNFR1), DR3 (TRAMP), DR6, EDAR (ectodysplasin A receptor) und NGFR (nerve growth factor receptor) (94–96). Nach Bildung einer Todesplattform am Rezeptor (*Death Inducing Signalling Plattform*; DISC) wird Caspase-8 durch autokatalytische Spaltung in ihre aktive Form überführt (prozessierte Caspase-8). Diese führt anschließend zur Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, sodass Apoptose eingeleitet wird (97).

b) Intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg

Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg ist rezeptorunabhängig und wird durch **internen zellulären Stress** ausgelöst. Er ist gekennzeichnet durch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/Diablo in das Zytoplasma.

Die Stressfaktoren, die diesen Signalweg aktivieren, sind meistens UV-Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren sowie zytotoxische Therapeutika (98). Diese Signale induzieren die Aktivierung von apoptotischen Bcl-2-Proteinen und durch die Inhibition anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder. Die Bcl-2-Proteinfamilie wird entsprechend ihrer BH-Domänen (BCL-2 Homology), in drei Gruppen unterteilt (Abb. 7):

1. anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Gruppe: BCL-2, BCL-X_L, BCL-w, MCL-1; diese besitzen 4 BH-Domänen (BH1-4);
2. pro-apoptotische Proteinen der Bax/Bak-Gruppe: BAX, BAK, BOK; diese besitzen 3 BH-Domänen (BH1-3);
3. pro-apoptotische Proteinen der BH3-*only*-Gruppe (auch BH3-*only*-Proteine genannt, weil sie nur eine BH3- Domäne enthalten) (99–102).

Von allen Mitgliedern der Bcl-2-Familie sind Mcl-1 und Bcl-X_L konstitutiv in der Leber exprimiert. Mcl-1 und Bcl-X_L sind entscheidende Proteine, die für die Hemmung von Apoptose in der Leber verantwortlich sind. Beide Moleküle sind sehr wichtige **anti-apoptotische** Proteine, die eine große Rolle für die hepatische Integrität und die Leberhomöostase während der Leberentwicklung spielen (99–101).

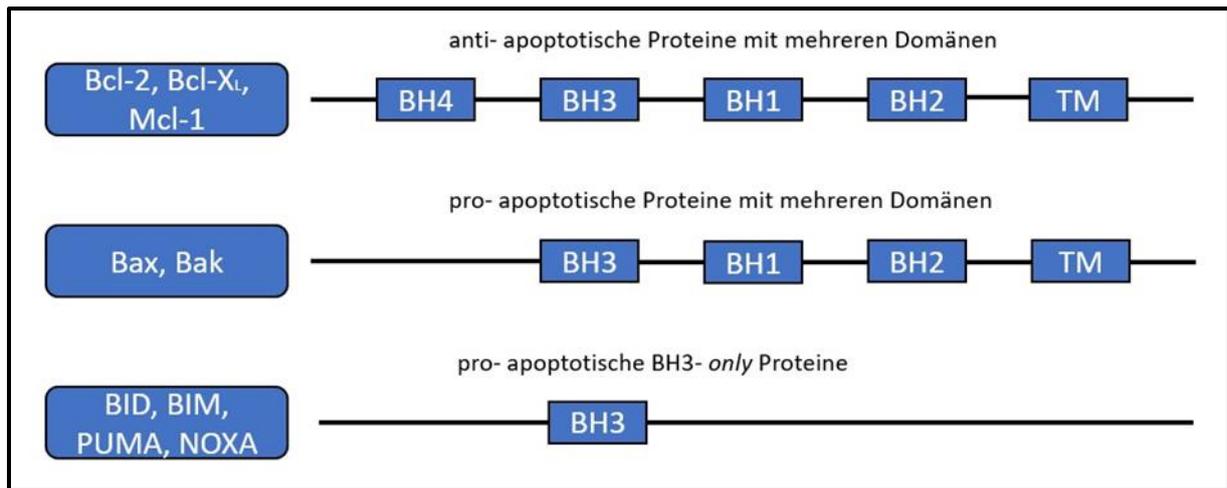


Abbildung 7: Aufbau verschiedener Proteine der Bcl-2 Familie (modifiziert nach (89)). Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau mehrerer Proteine der Bcl-2 Familie. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-X_L (B-cell lymphoma extra-large) und Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) bestehen aus vier verschiedenen Bcl-2-homology-Domänen (BH1, BH2, BH3, BH4) und einer Transmembrandomäne (TM). Bax (Bcl-2-associated X Protein) und Bak (Bcl-2- antagonistic killer) sind aus drei verschiedenen BH-Domänen (BH1, BH2, BH3) und einer TM-Domäne aufgebaut. Die pro-apoptotischen BH3-only Proteine Bim (Bcl-2-like protein 11; BCL2L11), Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) und NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) enthalten nur die BH3 Domäne.

Die oben genannten Auslöser der Apoptose aktivieren transkriptionell oder posttranskriptionell einen oder mehrere Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, die pro- oder anti-apoptotische Prozesse einleiten können. Somit kann die Kaskade des apoptotischen Zelltodes entweder unterbrochen oder fortgesetzt werden. Im Fall der Fortsetzung des Zelltodes führt die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOMP= *mitochondrial outer membrane permeabilization*), die als *point of no return* angesehen wird. Aufgrund der Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran werden Proteine freigesetzt, die an der Aktivierung von Caspasen im Zytoplasma beteiligt sind. Diese Proteinfreisetzung wird von der allmählichen Ansäuerung der Umgebung um die Mitochondrien begleitet. Unter den freigesetzten Proteinen befinden sich unter anderem **Cytochrom c** und **das pro-apoptotische Protein Smac/DIABLO**. Cytochrom c ist an der Bildung des Apoptosoms beteiligt und das pro-apoptotische Protein Smac/DIABLO interagiert mit Proteinen, die Caspasen-3 und -7 hemmen und beschleunigt damit die Caspaseaktivierung. (103–105).

Das ins Zytoplasma freigesetzte Cytochrom c bildet zusammen mit dem Adapter Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*), der Caspase-9 und ATP eine Todesplattform,

die als **Apoptosom** bezeichnet wird. Der erste Schritt in der Entstehung des Apoptosoms ist die Bindung von Cytochrom c an die monomere Struktur des zytoplasmatischen Proteins Apaf-1. Danach bindet Procaspase 9 an die Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD= *caspase recruitment domain*) des Apoptosoms. Diese wird dann durch Spaltung aktiviert.(103,106,107). Dann spaltet und aktiviert die prozessierte Initiator-Caspase- 9 die Effektor-Caspasen 3 und 7 und Apoptose tritt ein. (104,108).

Wie oben erwähnt spielen Caspasen eine wichtige Rolle beim Apoptoseprozess. Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) sind eine Gruppe von Cysteinproteasen (proteolytische Enzyme), die Zielproteine an einer Peptidbindung C-terminal von Aspartat schneiden. Caspasen liegen initial als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor (Procaspasen) und werden von anderen Caspasen oder während der Bindung an den DISC oder das Apoptosom aktiviert (prozessierte Caspasen) (85). Die Caspasen werden in zwei Untergruppen eingeteilt: **Initiator-Caspasen**-8,-9 und -10, die nach Rekrutierung in einen Proteinkomplex durch Autokatalyse aktiviert werden und **Effektor-Caspasen**-3, -6 und -7, die durch die Initiator-Caspasen aktiviert werden (Abb. 8) (85–87). Die Caspasen-4,-5,-11 und -12 spielen bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle.

Eine besondere Rolle in der **intrinsischen Apoptose** spielt der Tumorsuppressor **p53**. p53 ist an der Regulation der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran beteiligt, indem es durch Protein-Protein-Interaktionen anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibiert und somit zu einer Freisetzung der proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak führt. Diese können dann eine Pore in der äußeren mitochondrialen Membran bilden und zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials, sowie der Freisetzung von Cytochrom c führen. Dadurch bildet sich das Apoptosom und Apoptose wird induziert (42,93–95).

1 und 3) reguliert. Dieser Zelltod kann auch dann noch stattfinden, wenn zentrale Bestandteile des apoptotischen Signalwegs deletiert sind (117,118).

Die Nekroptose kann über 2 Wege induziert werden:

- (1) Extrinsische Nekroptose, über TNF und das Nekrosom vermittelt
- (2) Intrinsische Nekroptose, direkt über das Ripoptosom vermittelt

1. Extrinsische Nekroptose, über TNF vermittelt

Die Regulation der extrinsichen Nekroptose erfolgt über Zelltodrezeptoren, im Allgemeinen TNFR1. Bindet ein Ligand an TNFR1, wird der pro-Überlebens **Komplex I** gebildet, der aus TNFR1, TRADD, RIP1 sowie verschiedenen Ubiquitin E3-Ligasen besteht. Die Bildung des Komplexes I ermöglicht die Poliubiquitinierung von RIP1. Folgt jedoch eine Deubiquitinierung von RIP1, führt diese zur Entstehung von **Komplex IIa oder IIb (Nekrosom)**. **Komplex IIa** aktiviert Caspase-8 und führt zu Apoptose. Wird die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert, entsteht der **Komplex IIb**, welcher Nekroptose induziert. Hierzu müssen RIP1 und RIP3 rekrutiert werden, sodass eine auto- und trans-Phosphorylierung mit konsekutiver Oligomerisierung von phosphoryliertem RIP3 induziert werden kann. Ein weiteres essenzielles Molekül ist MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), eine Pseudokinase, die von RIP3 rekrutiert wird. Diese wird von RIP3 phosphoryliert und induziert eine Porenbildung in der Plasmamembran und leitet so Nekroptose ein (Abb. 10) (110,119–121).

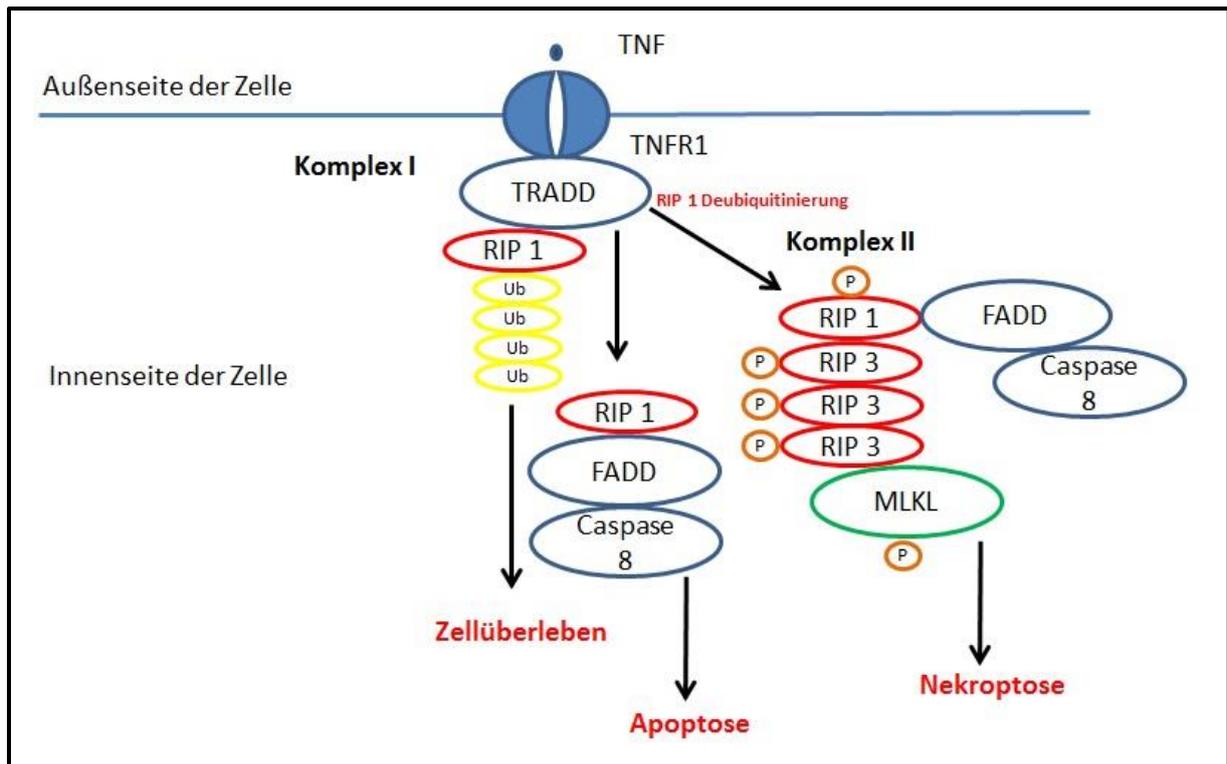


Abbildung 10: Nekroptosesignalweg (modifiziert nach (122)). Der Signalweg der Nekroptose verläuft über den TNFR1 und die anschließende Deubiquitinierung von RIP1, Phosphorylierung von RIP1 und RIP3, Caspase-8-Inaktivierung und Phosphorylierung von MLKL. FADD, FADD. MLKL: *Mixed lineage kinase domain like pseudokinase*. RIP: *receptor-interacting protein*; TNF: *tumour necrosis factor*; TNFR1: *TNF receptor 1*; TRADD: *tumour necrosis factor receptor-associated death domain*; Ub: Ubiquitin E3-Ligasen; P: Phosphorylierung.

2. Intrinsische über das Ripoptosom vermittelte Nekroptose

Das Ripoptosom ist ein zytoplasmatischer Komplex, der auch Nekroptose induzieren kann. Dieser Komplex bildet sich unabhängig von dem nach TNFR1-Stimulation induzierten Komplex II.

Smac/DIABLO oder kurz Smac (*second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI*) ist ein Protein, welches im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Als Reaktion auf pro-apoptotische Stimuli wird Smac von Mitochondrien freigesetzt. Im Zytosol interagiert Smac mit den *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs) und blockiert diese. Durch die Inhibition von IAPs wird dann eine Oligomerisierung von FADD, Caspase-8 und RIP1 ermöglicht. Wenn Caspase-8 aktiv ist wird RIP1 gespalten und Apoptose induziert. Ist Caspase-8, ähnlich wie beim Nekrosom, inhibiert oder herunterreguliert, kommt es zur Induktion von Nekroptose. Interessanterweise tritt die Ripoptosomenbildung hauptsächlich in malignen Zellen auf (123).

Zusammengefasst können programmierte Zelltodarten über ähnliche Wege (Todesrezeptoren und intrazelluläre Rezeptoren) initiiert werden. Die molekularen Mechanismen und physiologischen Konsequenzen bei Apoptose und Nekroptose unterscheiden sich jedoch deutlich. Die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekroptose kann hinsichtlich immunologischer Implikationen sowie genetischer und pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten von großer Bedeutung sein. In Tab. 1 sind die wichtigsten Unterschiede zwischen Apoptose und Nekroptose zusammengestellt:

Zelltod	Morphologische Aspekte	Biochemische Aspekte	immunologische Aspekte	Regulatoren
Apoptose	<p>Zellmembran: Vesikelbildung und abrunden der Zellen</p> <p>Zytoplasma: Reduktion des zellulären Volumens</p> <p>Nukleus: Reduktion des Volumens, nukleare Fragmentierung und Chromatinkondensation</p>	<p>Aktivierung von Caspasen</p> <p>DNA-Fragmentierung</p> <p>Phosphatidyl-exposition nach außen auf der Plasmamembran</p>	Anti-inflammatorischer Zelltod.	<ul style="list-style-type: none"> • Positive: p53 Bax Bak Andere pro-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie • Negative: Bcl-2 Bcl-_{xL} Andere anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie
Nekroptose	<p>Zellmembran: Ruptur der Plasmamembran</p> <p>Zytoplasma: zytoplasmatische Schwellung (Onkose): Schwellung der zytoplasmatischen Organellen</p> <p>Nukleus: moderate Chromatinkondensation</p>	<p>Aktivierung von RIP1, RIP3 und MLKL</p> <p>Freisetzung von DAMPs</p> <p>PARP1 Hyperaktivierung</p>	Meistens pro-inflammatorisch aufgrund der Freisetzung von DAMPs.	<ul style="list-style-type: none"> • Positive: Smac/Diablo RIP1 RIP3 MLKL • Negativ IAP 1 IAP 2 XIAP

Tabelle 1: Morphologische, biochemische und immunologische Eigenschaften sowie die Regulatoren der Apoptose und Nekroptose (modifiziert nach (124)). In dieser Tabelle werden die wichtigsten morphologischen, biochemischen, immunologischen und regulatorischen Aspekte der Zelltodformen Apoptose und Nekroptose im Vergleich dargestellt. Bax: *Bcl-2-associated-X-Protein*; Bak: *Bcl-2 homologous antagonist killer*; Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*; Bcl-X_L: *B-cell lymphoma-extra-large*; ATP: *Adenosine triphosphate*; RIP1 und RIP3: *Receptor Interacting Protein*; MLKL: *Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*; DAMP: *Damage-associated molecular patterns*; PARP: *Poly (ADP-ribose) polymerase*.

1.4 Histondeacetylasen und deren Inhibition

Histone spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivität. Es handelt sich bei den Histonen überwiegend um basische Proteine, die die DNA in strukturelle Einheiten, die Nukleosomen, im Zellkern von Eukaryoten verpacken. Histone können acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden. Die Acetylierung ist die wichtigste posttranslationale Modifikation, weil durch diese Modifikation epigenetische Regulationen eingeleitet werden können, die oftmals Proteine der Gentranskription, Replikation und DNA-Reparatur betreffen. Das Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und –Deacetylierung wird durch zwei Enzymgruppen gesteuert: die **Histon-Acetyltransferasen (HAT)** und die **Histondeacetylasen (HDAC)**. Es gibt 18 verschiedene HDAC-Subtypen, die sich auf Grundlage der Homologie in vier verschiedene Klassen einteilen lassen (Tab. 2) (125).

Klasse	Zelluläre Lokalisation	Eigenschaften
I HDAC 1 HDAC 2 HDAC 3 HDAC 8	Nukleus	HDAC 1 Überexpression: <ul style="list-style-type: none"> • Prostata-, Magen-, Kolon-, Brusttumoren HDAC 2 Überexpression: <ul style="list-style-type: none"> • Kolorektal-, Gebärmutterhals-, Magenkarzinom HDAC 8: <ul style="list-style-type: none"> • Parasitäre Erkrankungen Alle HDAC der Klasse I: Rolle im Immunsystem
II a) HDAC 4 HDAC 5 HDAC 7 HDAC 9	Nukleus und Zytoplasma	Gewebespezifisch: <ul style="list-style-type: none"> • 4, 5, 9: Herzen, Skelettmuskulatur, Gehirn • 7: Herz- und Lungengewebe • 6: Hoden • 10: Leber, Nieren, Milz HDAC 6 Überexpression: <ul style="list-style-type: none"> • Brusttumoren
II b) HDAC 6 HDAC 10	Nukleus und Zytoplasma	
IV HDAC 11		<ul style="list-style-type: none"> • reguliert die Proteinestabilität des DNA und die Expression von Interleukin 10
III (Sirtuine)		

Tabelle 2: Klassifikation, zelluläre Lokalisation und Eigenschaften der HDAC-Klassen, modifiziert nach (125,126). Die Einteilung jeweiliger HDAC Klassen (I, II a), b), IV Zn⁺ abhängig und III NAD⁺ abhängig).

Eine Reihe von wirksamen, strukturell vielfältigen HDAC-Inhibitoren wurde identifiziert. Diese sind natürliche Produkte oder wurden synthetisch hergestellt und enthalten Pan-HDAC-Inhibitoren und klassenselektive oder isoformselektive Inhibitoren. Obwohl die Wirkmechanismen von HDAC-Inhibitoren noch nicht vollständig aufgeklärt sind,

handelt es sich um neuartige Therapeutika, die bei Tumorpatienten ein großes Potenzial besitzen (127,128). Weil HDACi in die Gentranskription eingreifen, hat deren Anwendung Einfluss auf Zellproliferation, Zellzyklusregulierung und Apoptose. Hierbei sind HDAC-Inhibitoren in der Lage, Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg auszulösen (129).

Da HDACi die Sensitivität gegenüber Zytostatika verbessern konnten, werden sie häufig in Kombinationstherapien eingesetzt. Die Kombination von HDAC-Inhibitoren mit DNA-schädigenden Substanzen, wie z.B. alkylierenden Substanzen, zeigte synergistische Effekte, da die HDAC-Inhibitoren durch die gelockerte Chromatinstruktur die Angreifbarkeit der DNA-schädigenden Substanzen erleichtern (130).

Panobinostat (LBH589) ist ein wirksamer oraler Pan-HDAC-Inhibitor und weist durch die Hemmung einer breiten Palette an HDACs einschließlich der Klassen I, II und IV bei nanomolaren Konzentrationen ein hohes therapeutisches Potenzial auf. Es wurde im Jahr 2015 für das multiple Myelom (MM) zugelassen und wird seitdem auch als Therapiemöglichkeit für das HCC untersucht. In Panobinostat-behandelten HCC-Zellen wurden Apoptose und ein autophagiebedingter Zelltod *in vitro* und *in vivo* beobachtet (131,132). Zudem zeigte sich eine Unterdrückung der Expression onkogener miRNAs und eine Induktion tumorsuppressiver miRNAs in HCC-Zellen (133). Panobinostat kann die HCC-Proliferation und Metastasierung hemmen und die angiogenen Eigenschaften des HCC durch Veränderung des *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF)-Signalwegs blockieren. Die Kombination von Panobinostat mit Sorafenib resultierte in einer Abnahme der Gefäßdichte, verringerte das Tumolvolumen und erhöhte das Überleben von Mäusen mit HCC-Xenotransplantaten (127,134,135).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit über 800.000 Todesfällen pro Jahr ist das HCC das häufigste primäre Malignom der Leber und stellt eine der Hauptursachen für krebsbedingte Todesfälle weltweit dar. Auch wenn die Diagnose des HCCs nach einem definierten Algorithmus und dessen Therapie gemäß den Leitlinien erfolgt, bleiben die therapeutischen Optionen zur Behandlung fortgeschrittener Stadien begrenzt. Trotz neuer medikamentöser Therapien ist die Prognose von HCC-Patienten häufig ungünstig., Daher liegt die Zukunft der HCC-Therapie in der Entwicklung von Therapien, die multiple Signalwege in malignen Zellen angreifen. Das Targeting mehrerer, für den Tumor überlebenswichtiger Signalwege kann man durch die Kombination verschiedener, sich in ihrer Wirkweise ergänzender Therapeutika erreichen. Um solche Therapien zu entwickeln, ist ein genaues Verständnis der molekularen Wirkmechanismen der Therapeutika erforderlich.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, welche molekularen Wirkmechanismen der Induktion von Zelltod durch *targeted therapies*, therapeutische Antikörper, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika zugrunde liegen. Hierbei standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- Um welche Art von Zelltod handelt es sich? Sterben die Zellen apoptotisch oder nekrotisch?
- Welche Proteine sind an der Induktion des Zelltodes beteiligt. Sowohl bei Apoptose und programmierter Nekrose, der Nekroptose, können extrinsische Todes-Rezeptor vermittelte, sowie intrinsische mitochondriale Signalwege genutzt werden.
- Kann man Therapeutika so kombinieren, dass sich ergänzende und additive Todessignalwege induziert werden?

Tumorzellen und besonders das HCC weisen oftmals Resistenzen gegenüber den etablierten systemischen Therapien auf. Dies ist u.a. auf Mutationen in den Signalwegen, die für die Induktion des Zelltods verantwortlich sind, zurückzuführen. Ein Tumor-Therapeutikum induziert im Allgemeinen eine klar definierte Form des Zelltodes. Liegt aber genau in diesem Zelltod-Signalweg eine Mutation vor, kann die Therapie nicht mehr wirken. Durch Kombination verschiedener Therapeutika können mehrere Signalwege gleichzeitig induziert werden. Aber es ist wichtig, dass

diese Signalwege sich auch gegenseitig unterstützen und die Wirkstoffe synergistisch arbeiten können. Dazu müssen erst die molekularen Wirkmechanismen der einzelnen Therapeutika analysiert und dann die optimale Kombination aus den Wirksubstanzen getestet werden. So können dann Ansätze für mögliche neue systemische Behandlungsoptionen erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	Biomol GmbH, Hamburg
Cell culture Flask, T-75	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
Certomat R	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ChemiDoc XRS Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Clear Microplate	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
CO ₂ Incubator	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Combitips advanced 1/2,5/5/10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips plus 1/2,5/5/10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Corning™ 6 Well Cell culture Cluster	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Corning™ 96 Well Cell culture Plate	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Corning™ Stripette™ 5/10/25/50 ml	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices GmbH, Biberach
Entsorgungsbeutel 10	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S Standard 0,5-20/50-1000 EV261	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon ® 2 ml Aspirating Pipet	Consort Medical, Hemel Hempsted, UK
	Corning, Wiesbaden

Material und Methoden

Test Tube with Cell Strainer Snap Cap	Thermo Fisher Scientific
Falcon ® Conical Tube 50 ml, 15 ml L'2200	GENEART GmbH, Regensburg Stemcell Technologies, Köln Sartorius Lab Instruments GmbH & Co KG, Göttingen
Laminair HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Latex protective gloves Manu L	Berner International GmbH, Elmshorn
Light Cycler 480	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
Light Cycler 480 Multiwell Plate 384	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Microlance 3	BD Biosciences, Heidelberg
Microstar 17	VWR, Darmstadt
Mini-Spin Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multigel	Biometra GmbH, Göttingen
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
MyFuge mini	Benchmark Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Nanophotometer	Implen GmbH, München
NeoTouch Premium disposable neoprene gloves	Ansell, Richmond, Melbourne
Olympus CK2micro optic nosch	Günter Wasmer eK, Freiburg
Plastipak 1ml luer	BD Biosciences, Heidelberg
PVDF Transfer Membrane	Thermo Fisher Scientific GENEART Regensburg
Quali-PCR-Tube-Streifen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Safe lock Tubes 1,5 ml, amber	Eppendorf AG, Hamburg
Skim Milk Powder	Fluka Analytical, Seelze

Material und Methoden

Spritzenfilter 0,22 µM	TPP, Trasadingen, Schweiz
Stripette 5/10/25/50 ml	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Sorvall RC6 Plus Zentrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
TC20 automated cell counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TC Schale 60/100, Standard TE77XP	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht Hofer Inc., Holliston, MA, USA
Thermo Herasafe HSP9	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
TUS 80-100	Fryka Kältetechnik, Esslingen
Vakuumfilter Rapid Filtermax 500	TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman 3mm Chr Blottingpaper WT 16	Biometra GmbH, Göttingen
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Zoe fluorescent cell imager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.2 Software

Bio-1D	Vilber Lourmat, Deutschland
ImageJ	National Institute of Health, USA
Image Lab	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SigmaPlot 14.0	Systat, Deutschland

2.1.3 Reagenzien

2.1.3.1 Zellkulturreagenzien, Chemikalien

Standardreagenzien wurden von laborüblichen Herstellern bezogen. Weitere Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

Brilliant III Ultrafast SBYR	Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn
Buffer TE	QIAGEN GmbH, Hilden
Cell proliferation Staining Reagent – Flourescence Cyto Painter	Abcam, Cambridge, UK Green
Complete Tablets, Mini EDTA free	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
EASY Pack4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	BioLegend, USA
DL-Dithiothreitol	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
DMSO	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
FCS	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Necrostatin-1	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Page Ruler Plus Prestained Protein	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
Panobinostat	Selleckchem Absource Diagnostics GmbH, München
PhosSTOP easypack	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
Reblot Plus Strong Solution (10x)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
RIPA Buffer	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

Material und Methoden

RPMI	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Staining Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Trypsin Lösung 10X	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
TEMED	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Z-VAD-FMK 2 mg	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

2.1.3.2 Puffer

5% BSA: 2,5 g/5 g BSA, 50 ml/100 ml Waschpuffer

5% Milchpulver: 2,5 g/5 g Milchpulver, 50 ml/100 ml Waschpuffer

10x SDS Page Puffer: 250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1% SDS

Anodenpuffer A (pH 10,6): 18,2 g Tris, 100 ml MeOH, 400 ml H₂O

Anodenpuffer B (pH 10,4): 1,5 g Tris, 100 ml MeOH, 400 ml H₂O

ECL Mix: 2 ml 250 mM Luminol in DMSO, 890 µl 90 mM p-Coumarin in DMSO, 20 ml Tris (pH 8,5), 177 ml H₂O

Kathodenpuffer C (pH: 9,4): 1,5 g Tris, 2,6 g Amino-Hexansäure, 400 ml H₂O

Reagenz A: Bichinchoninsäure

Reagenz B: 4% Kupfersulfat

RIPA Puffer: RIPA Buffer, 1 Tablette PHOSstop easypack, 1 Tablette Complete

Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20

2.1.3.3 Proteinquantifizierungs-Assay

Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
---	--

2.1.4 Targeted therapies, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika

Substanzklasse	Wirkstoff	Serum-Konzentration	Hersteller	Wirkungsweise
Tyrosinkinaseinhibitor	Cabozantinib	1 μ M	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA	Tyrosinkinaseinhibitor (inhibiert c-Met und den VEGF Rezeptor 2)
	Sorafenib	4,5 μ M	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA	Tyrosinkinaseinhibitor (inhibiert multiple Tyrosinkinasen)
	Regorafenib	5 μ M	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA	Tyrosinkinaseinhibitor (inhibiert multiple Tyrosinkinasen)
Therapeutische Antikörper	Ramucirumab	25 ng/ml	Apotheke Universitätsklinikum Regensburg	Monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1 (gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des VEGF Rezeptors 2)
HDAC-Inhibitor	Panobinostat	0,1- 5 μ M	Selleckchem Absource Diagnostics GmbH, München	Nicht-selektiver Histon Deacetylase Inhibitor (pan-HDAC inhibitor)
Chemotherapeutika	Bleomycin	2 μ M	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA	Chemoterapeutikum (induziert Dopplestrangbrüche der DNA)

2.1.5 Western Blot

2.1.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Molekular Gewicht des detektierten Antigens	Verwendete Verdünnung im Western Blot	Hersteller
Anti-TP53 (DO-1) (Mouse, IgG _{2a} , monoklonal)	53 kDa	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-PARP (Rabbit, polyklonal)	116 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-cleaved PARP (Rabbit IgG, monoklonal)	89 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-Caspase-3 (Rabbit, polyklonal)	17, 19, 35 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-cleaved Caspase 3 (Rabbit, polyklonal)	17, 19 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-Caspase-8 (1C12), (Mouse IgG1, monoklonal)	18, 43, 57 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-cleaved Caspase-8 (Rabbit IgG, monoklonal)	18, 41, 43 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-Caspase-9 (C9), (Mouse IgG1, monoklonal)	49, 39, 37 kDa (M)	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-cleaved Caspase-9 (D2D4) , (Rabbit IgG, monoklonal)	37 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-Bcl-X_L (Rabbit IgG, monoklonal)	30 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-Mcl1 (RC13) , (Mouse IgG1, monoklonal)	45 kDa	1:1000	Abcam, Cambridge
Anti-β-Aktin HRP gekoppelt (A3854)	1:10000	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen	Anti-β-Aktin (A3854)

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit IgG (A0545)	1:10000	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Mouse (A9044)	1:5000	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

HepG2 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert. Um die Zellen zu passagieren, wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt und weiter kultiviert.

Für die Experimente wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm sowie Kulturplatten im 6- und 96-Well Format verwendet und folgenden Zelldichten ausgesät:

	Wachstumsfläche (cm ²)	Arbeitsvolumen (ml)	Zellen
100 mm	78,5	8	1 x 10 ⁶
60 mm	28,2	4	5 x 10 ⁵
6 Well	9,5	2	2 x 10 ⁵
96 Well	0,32	0,1	7,5 x 10 ³

2.2.2 Behandlung mit *targeted therapies*, therapeutischen Antikörpern, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika

HepG2 Zellen wurden ausgesät und 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen (potenziellen) HCC-Therapeutika, wie *targeted therapies*, therapeutischen Antikörpern, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika (siehe 2.1.4) behandelt. Sowohl unbehandelte als auch mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen dienten als Kontrolle. 48 h nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert.

2.2.3 Zellyse

Für die Protein- oder RNA-Extraktion wurden zunächst das Zellkulturmedium und die Zellen in ein Probengefäß überführt und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert.

Nach Resuspension der Zellpellets mit 900 µl PBS wurden die Zellen auf Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet für die RNA Extraktion in RLT Puffer und für die Proteinisolation in RIPA Puffer für 1 h lysiert. Danach wurden die Proben für 1 h bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.4 Zelllinie

2.2.4.1 HepG2-Hepatokarzinomzellen

Die HepG2-Zelllinie wurde von einem 15-jährigen kaukasischen Jungen gewonnen und exprimiert im Vergleich zu anderen Hepatomzelllinien die Wildtyp-Formen von p53-, p63- und p73. Die Zelllinie wächst adhärent bei 37°C und 5% CO₂ in Monoschichten (136).

2.2.4.2 HepG2 Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der HepG2 Zellen wurde RPMI Medium, das mit 10% FCS supplementiert wurde, verwendet.

2.2.5 Western Blot

- **Proteinmengenbestimmung und Probenvorbereitung**

Die Proteinmengen wurden mittels eines BCA Assays mit Hilfe des Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kits bestimmt. Hierfür wurden die Proteinlysate mit RIPA in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt und in Duplikaten auf eine 96 Well Mikrotiter Platte aufgetragen. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit 200 µg/ml - 2000 µg/ml

BSA ebenfalls in Duplikaten verwendet. Anschließend wurden 200 µl einer 1:50 Mischung der Reagenzien A (Bichinchoninsäure) und B (4% Kupfersulfat) des Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kits hinzugefügt und die Platte für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben erfolgte photometrisch bei 492 nm und mit Hilfe der EMAX Plus Software.

Anschließend wurden 10 µg bis 25 µg Protein in einem Volumen von 15-30 µl RIPA aufgenommen und 4 µl 6x Laemmlipuffer + Dithiothreitol hinzugefügt. Die Proben wurden dann bei 95°C aufgekocht.

- **SDS-PAGE und Western Blot**

Für die SDS-PAGE wurden 12 % und 15 % Gele hergestellt (Tab. 3). Die Taschen der Gele wurden mit 15-30 µl der Probe, sowie 7 µl eines Proteinstandards beladen und mittels Gelelektrophorese für 1 h bei 500 Volt (V) nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine im Semi-Dry Verfahren bei 80 V auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blockade freier Bindestellen erfolgte für 1 h in 5% BSA oder 5% Milchpulver. Anschließend wurde die Membran mit den Primärantikörpern für 24h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper zugegeben und die Membran für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurden die Membranen mit einer Chemilumineszenzlösung behandelt und ein Signal in der Chemilumineszenzmessung detektiert. Dann wurden die Membranen in Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Antikörper mittels Reblot Plus Strong Lösung für 10-15 min entfernt. Im Anschluss wurde der nächste Primär-Antikörper zugegeben.

	15% Laufgel	12 % Laufgel	8% Sammelgel
	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Volumen (ml)
H₂O	2,3	3,3	5,5
30% Acrylamid	5	4	1,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5	1,0
10% SDS	0,1	0,1	0,08
10% Ammoniumpersulfat	0,1	0,1	0,08
TEMED	0,004	0,004	0,008
Gesamtvolumen	10	10	8

Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE

2.2.6 Viabilitätsassay (MTS-Assay)

Der MTS-Assay ist ein kolorimetrischer Assay zur Beurteilung der Zellstoffwechselaktivität und somit auch der Vitalität der Zellen. Der Farbstoff MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) wird in Gegenwart von PMS (Phenazin Methosulfat) durch intrazelluläre Dehydrogenasen lebender Zellen zu Formazan reduziert. Es entstehen Kristalle, die nicht mehr membrangängig sind und in proliferierenden, unbeschädigten Zellen akkumulieren. Nach Lyse der Zellen kann Formazan durch eine kolorimetrische Messung bei 490nm in einem Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader) quantifiziert werden.

2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

2.2.7.1 Zelltod

Zelltod wurde durchflusszytometrisch mittels DAPI/Annexin V Färbung bestimmt. Dafür wurden zuerst $3-5 \times 10^5$ HepG2-Zellen /Well in 6-Well Platten ausgesät und in 2 ml Zellkulturmedium für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau behandelt und für weitere 24 h oder 48 h kultiviert. Zunächst erfolgte die Färbung mit 25 µl Annexin V-FITC und 10 µl DAPI

bei Raumtemperatur für mindestens 15 min. Danach konnte der Zelltod in eine FACS-Analyse untersucht werden.

2.2.7.2 Tetramethylrhodaminethylester (TMRE)-Färbung – mitochondriales Membranpotential

Adenosintriphosphat (ATP) ist die Hauptenergiequelle für den Stoffwechsel. Mitochondrien liefern den größten Teil des ATP durch einen Prozess, der als oxidative Phosphorylierung bekannt ist. Dieser Prozess beinhaltet den aktiven Transfer positiv geladener Protonen durch die mitochondriale Innenmembran, wodurch es zum Aufbau eines mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) kommt. Die negative Nettoladung für ein intaktes Mitochondrium liegt bei etwa -180 mV; dies kann durch Färben von Zellen mit positiv geladenen Farbstoffen wie TMRE nachgewiesen werden. Die Färbung der Mitochondrien mit TMRE ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential. Ist das mitochondriale Membranpotential hoch, so akkumuliert viel TMRE in den Mitochondrien. Ist das Potential gering oder zerstört, lagert sich wenig TMRE in den Mitochondrien an (137).

Für den Nachweis depolarisierter Mitochondrien mittels TMRE wurden 1 Millionen (Mio) HepG2 Zellen in Petrischalen ausgesät. Nach Zugabe von TMRE wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und zweimal mit PBS und FCS 10% gewaschen, in 500µl PBS+FCS aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowLogic.

3. Ergebnisse

3.1 HCC-Therapeutika induzieren eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Viabilität in HepG2-Zellen

In den neuen Leitlinien für das HCC (1) werden verschiedene Therapiemöglichkeiten, von der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern bis zu der Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), empfohlen. In dieser Dissertationsschrift wurden die Auswirkungen von TKIs, die Effekte neutralisierender Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren, die Wirkung von HDAC Inhibitoren und die Wirkungsweise von Bleomycin, einem Agens das DNA-Doppelstrangbrüche induziert, auf die Zellviabilität der Zelllinie HepG2 untersucht.

Um den Effekt von TKIs, neutralisierenden Antikörpern, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika auf die metabolische Aktivität bzw. auf die Zellviabilität von HepG2-Zellen zu untersuchen, wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Für den MTS-Assay wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 h bis 72 h mit verschiedenen HCC-Therapeutika-Konzentrationen behandelt. In der Untersuchung wurden die TKI-Inhibitoren Sorafenib (4,5- 22,5 μM), Regorafenib (5- 25 μM), Cabozantinib (1- 5 μM), Lenvatinib (1,17- 5,85 μM), sowie der therapeutische VEGF-R2 Ramucirumab (25 ng/ml) und Bleomycin (2-10 μM) verwendet.

Für diese Versuche wurden jeweils die einfache Serumkonzentration, die nach Behandlung in Patienten nachgewiesen werden konnte, sowie die 2-fache und die 5-fache Serumkonzentration verwendet (Tabelle 4). Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Alle ermittelten Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert.

Konzentration		2-fache	5-fache
Substanz	Serumkonzentration	Serumkonzentration	Serumkonzentration
Sorafenib	4,5 μM	9 μM	22,5 μM
Regorafenib	5 μM	10 μM	25 μM
Cabozantinib	1 μM	2 μM	5 μM
Lenvatinib	1,17 μM	2,34 μM	5,85 μM
Ramucirumab	25 ng/ml	50 ng/ml	100 μM
Bleomycin	2 μM	4 μM	10 μM

Tabelle 4: Die untersuchten Konzentrationen von TKI und Chemotherapeutika nach (138–144).

Nach 24 h zeigte sich die stärkste Reduktion der Zellviabilität (31%) bei einer Behandlung mit 22,5 μM Sorafenib, was einer 5-fachen Serumkonzentration entspricht. Regorafenib induzierte in einer Konzentration von 25 μM (5-fache Serumkonzentration) ebenfalls eine Reduktion der Zellviabilität von 23%. Alle anderen Therapeutika lagen, auch bei einer Applikation der 5-fachen Serumkonzentrationen, unter 20% Reduktion der Zellviabilität. (Abb. 11A).

Nach einer Inkubationszeit von 48 h zeigte sich eine noch deutlichere Abnahme der Zellviabilität. So zeigte Sorafenib eine Reduktion der Zellviabilität von 13% bei der einfachen Serumkonzentration und von 41% bei einer Applikation der 5-fachen Serumkonzentration. Eine Inkubation mit der Serumkonzentration von Regorafenib führte zu einer Reduktion von 19% und die 5-fache Serumkonzentration zu einer Reduktion der Zellviabilität von 27% im Vergleich zu DMSO. Die anderen Therapeutika führten nur zu einer geringen Abnahme der Zellviabilität (Abb. 11B).

Nach 72 h Inkubation zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei einer Behandlung der Zellen mit Sorafenib wurde eine Abnahme der Zellviabilität um 24% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Bei der 5-fachen Sorafenib-Serumkonzentration war sogar eine Reduktion von 65% im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Bei Regorafenib zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Hier wurde für die Serumkonzentration eine Abnahme der Zellviabilität von bis zu 32% und für die 5-fache Serumkonzentration eine Reduktion der Zellviabilität von 50% relativ zur Kontrolle gemessen. Die anderen Therapeutika zeigten mit Ausnahme von Bleomycin auch nach 72 h nur geringe Effekte auf die Zellviabilität. Nur Applikation von Bleomycin konnte eine Reduktion der Zellviabilität

Ergebnisse

von bis zu 25% mit der einfachen Serumkonzentration und bis zu 30% mit der 5-fachen Serumkonzentration nach 72 h induzieren (Abb. 11C).

Alle verwendeten Therapeutika führten zu einer Reduktion der Zellviabilität. Sorafenib und Regorafenib zeigten schon nach 24 h deutliche Effekte, Bleomycin erst nach 72 h.

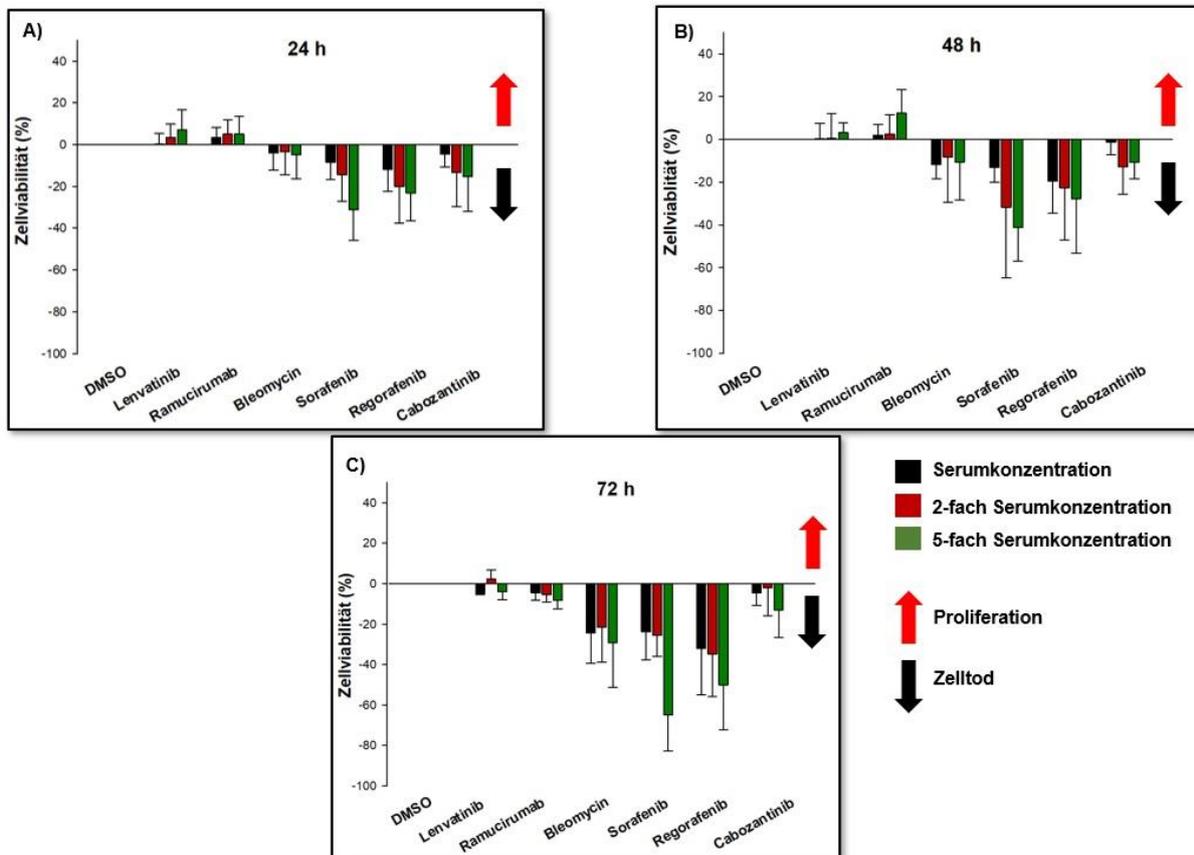


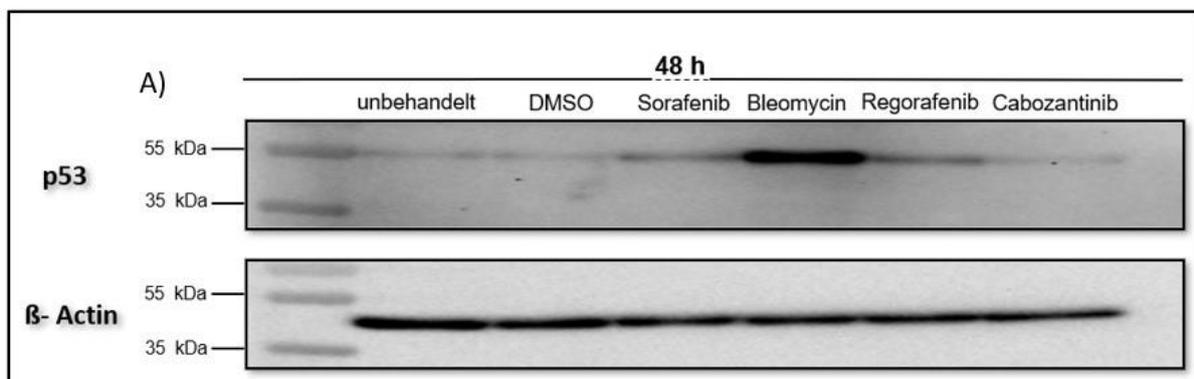
Abbildung 11: Effekte von HCC-Therapeutika auf die Viabilität von HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen HCC-Therapeutika über einen Zeitraum von 24-72 h behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels eines MTS-Assay bestimmt (n=4).

3.2 Regulation von p53-Familienmitgliedern und Charakterisierung des Zelltods nach Behandlung mit TKI, neutralisierenden Antikörpern und Chemotherapeutika

3.2.1 Protein-Expression der p53-Familie in HepG2-Zellen nach TKI- und Bleomycin-Behandlung

Die genauen molekularen Wirkmechanismen von TKI sind noch nicht völlig aufgeklärt, aber durch Inhibition multipler Signalwege führen diese nicht nur zur Inhibition der Proliferation von Tumorzellen und zur Inhibition der Angiogenese sondern auch zur Induktion von Apoptose (145–147).

HepG2-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Therapeutika inkubiert (Bleomycin 2 μ M, Sorafenib 4,5 μ M, Regorafenib 5 μ M, Cabozantinib 2 μ M; dies entspricht jeweils der 1-fachen Serumkonzentration, die bei Patienten nachgewiesen wurde). Nach 48 h erfolgte die Analyse der Proteinspiegel der p53-Familie im Western Blot (Abb. 12). Wie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt (139), führte die Behandlung mit Bleomycin zu einer Induktion von p53. In dieser Promotionsarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Sorafenib und Regorafenib ebenfalls zu einer Induktion von p53 führen. Cabozantinib hatte hingegen keinen Einfluss auf das Expressionsniveau der von p53. (Abb. 12A, B).



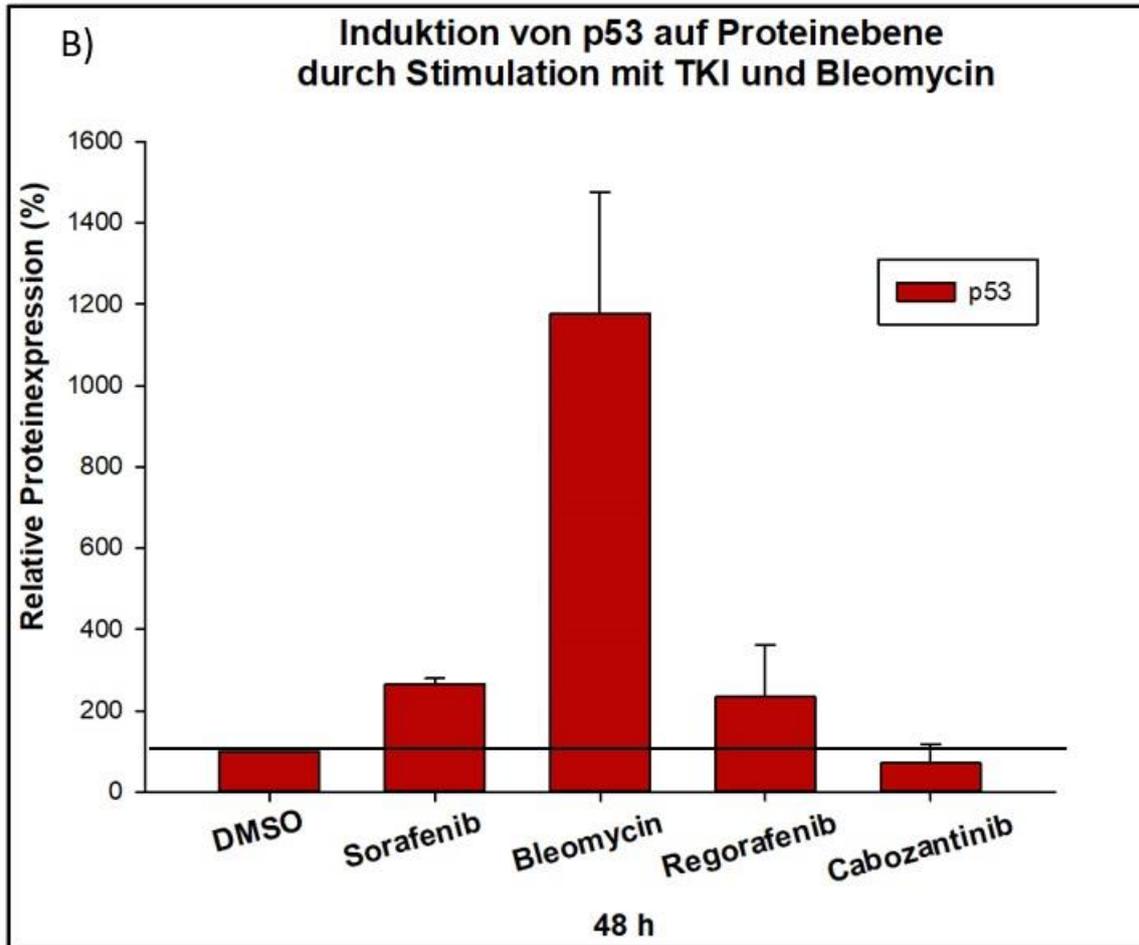


Abbildung 12: Analyse der TKI- und Bleomycin-abhängigen Regulation von p53 auf Proteinebene. HepG2-Zellen wurden für 24 h kultiviert und anschließend mit Chemotherapeutika stimuliert. Nach 48 h erfolgte die Analyse der Proben. A) Nachweis von p53 mittels Western Blot; B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Daten (n= 3).

Bleomycin, das DNA-Schäden hervorruft aber auch die TKI Sorafenib und Regorafenib induzieren p53.

3.2.2 Die Behandlung mit TKIs und Bleomycin führt zu keiner detektierbaren Caspase-3 Spaltung

Um den Zelltod auf molekularer Ebene zu charakterisieren wurde die Spaltung von Caspase-3 im Western Blot untersucht (Abb. 13). Als Positivkontrolle für Caspasespaltung und Apoptose wurden Zellen verwendet, die mit Panobinostat behandelt wurden (148).

Die Menge an Procaspase-3 (**35kDa-Bande**) war nach Behandlung mit allen untersuchten HCC-Therapeutika vergleichbar mit dem Signal der unbehandelten

Kontrollen. Nach Panobinostat-Behandlung wurde Caspase-3 gespalten die aktive Form (**19kDa-Bande**) war deutlich im Western Blot detektierbar. In den TKI-behandelten Zellen war keine Caspasespaltung detektierbar (Abb. 13). Diese Daten weisen darauf hin, dass der durch die TKI -Regorafenib und Cabozantinib induzierte Zelltod Caspase-3-unabhängig ist.

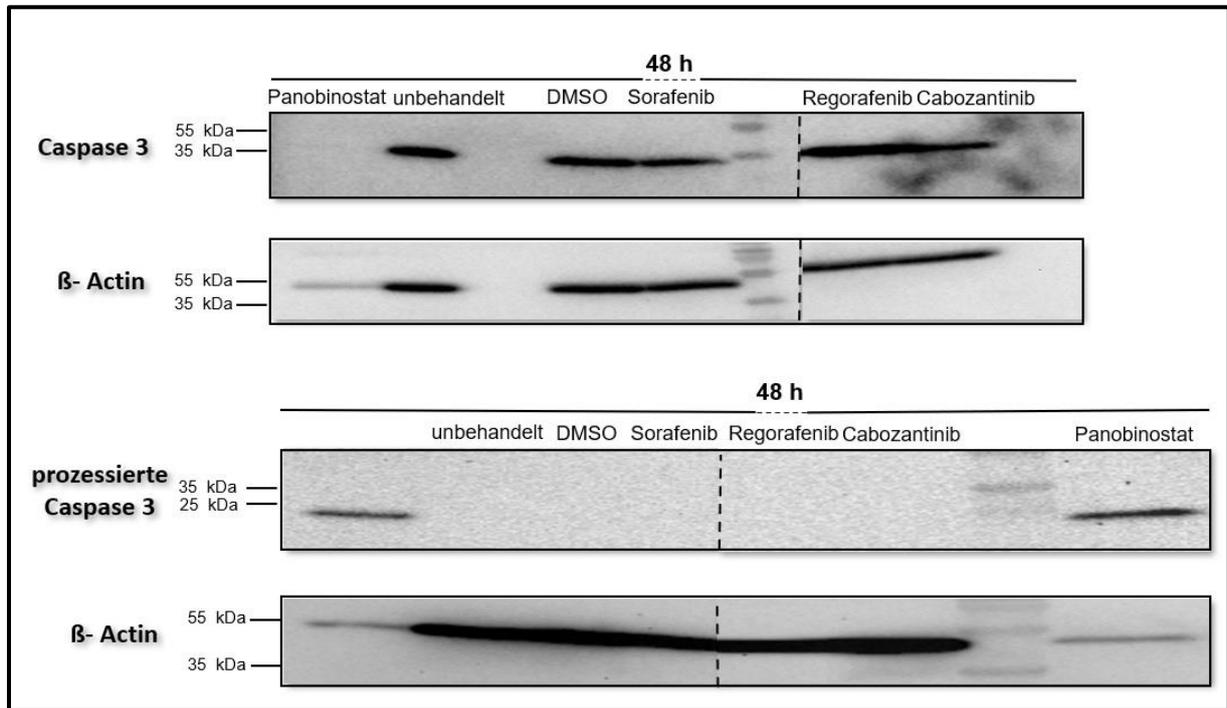


Abbildung 13: Fehlen der prozessierten Caspase-3 nach Behandlung mit TKI und Bleomycin. HepG2-Zellen wurden kultiviert, stimuliert und anschließend nach 48 h lysiert. Die Mengen an (un-) prozessierter Caspase-3 wurden mittels Western Blot bestimmt (n=2). Dargestellt ist die Analyse einer Western Blot Membran, die geschnitten wurde (angezeigt durch gestrichelte Linie).

Zwar zeigten Sorafenib- und Regorafenib-behandelte HepG2-Zellen eine leichte Induktion von p53, jedoch war keine Caspase-3-Aktivierung nachweisbar. Da aber von einer Apoptoseinduktion auszugehen ist, müssen andere Effektor-Caspasen, wie Caspase-6 und Caspase-7 für den Zelltod verantwortlich sein. Diese Caspasen und deren Aktivierung muss in weiteren Studien noch genauer untersucht werden.

3.3 Kombination von Panobinostat und Bleomycin als mögliche neue Therapieoption bei HCC

HCC ist ein chemorefraktärer Tumor. Eine Kombination von Substanzen mit verschiedenen molekularen Wirkmechanismen kann durch Targeting mehrerer Zielstrukturen zu einer besseren Therapie des HCCs führen. Eine besonders interessante Zielstruktur sind HDAC. Panobinostat ist ein Pan-HDAC-Inhibitor (HDACi) und zeigt eine hohe Wirksamkeit in mehreren präklinischen Tumormodellen, sowie synergistische Aktivität bei Kombination mit Chemotherapeutika oder anderen *targeted therapies* (127,135,148).

3.3.1 Panobinostat induziert Apoptose in HepG2-Zellen

Um den Panobinostat-induzierten Zelltod zu analysieren, wurden HepG2-Zellen in einem FACS-basierten Assay untersucht. Wird Apoptose eingeleitet, kommt es zu einer Veränderung der Plasmamembran. Phosphatidylserin ist ein Lipid, das bei vitalen Zellen auf der intrazellulären Seite der Membran lokalisiert ist. Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Translokation zur extrazellulären Seite der Membran. Daher dient die Detektion von extrazellulärem Phosphatidylserin mittels Annexin V als Nachweis von Apoptose. Um Apoptose und späte Apoptose/Nekroptose zu unterscheiden, wird ein zweiter Farbstoff (DAPI), der in die DNA interkaliert, benötigt. In den Stadien der Nekroptose und der späten Apoptose kommt es zum Verlust der Membranintegrität, wodurch ein Eindringen von DAPI in die Zelle und somit eine Interaktion mit der DNA möglich ist. Weiterhin werden in der FACS-Analyse sowohl Größe als auch Granularität der Zelle gemessen. Anhand dieser beiden Faktoren kann ebenfalls die Induktion von Zelltod analysiert werden.

HepG2-Zellen wurden mit 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM Panobinostat für 12 h und 24 h behandelt. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Es wurde der spezifische Zelltod berechnet (Abb. 14).

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass HepG2-Zellen nach 12 h mit den jeweiligen Panobinostat-Konzentrationen vorwiegend Annexin V positiv waren (Quadrant 3; Q3) (Abb. 14A). Dies ist ein klares Zeichen dafür, dass diese Zellen über

Ergebnisse

die Induktion von Apoptose sterben. Nach 24 h war der Anteil der Zellen in Q3 gegenüber dem 12 h-Wert deutlich erhöht und zeigte einen dosisabhängigen Anstieg mit zunehmender Panobinostat-Konzentration (Abb. 14B). Der Anteil spät-apototischer/nekrotischer Zellen (Q4, DAPI/Annexin V-positive Zellen) war nach 24 h ebenfalls erhöht, zeigte jedoch keine Dosisabhängigkeit.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Panobinostat Zelltod (Apoptose) in HepG2-Zellen induziert werden kann. Eine 24 h Behandlung mit 1 μ M Panabionstat stellte die optimale Versuchsbedingung zur Induktion von Apoptose dar.

Ergebnisse

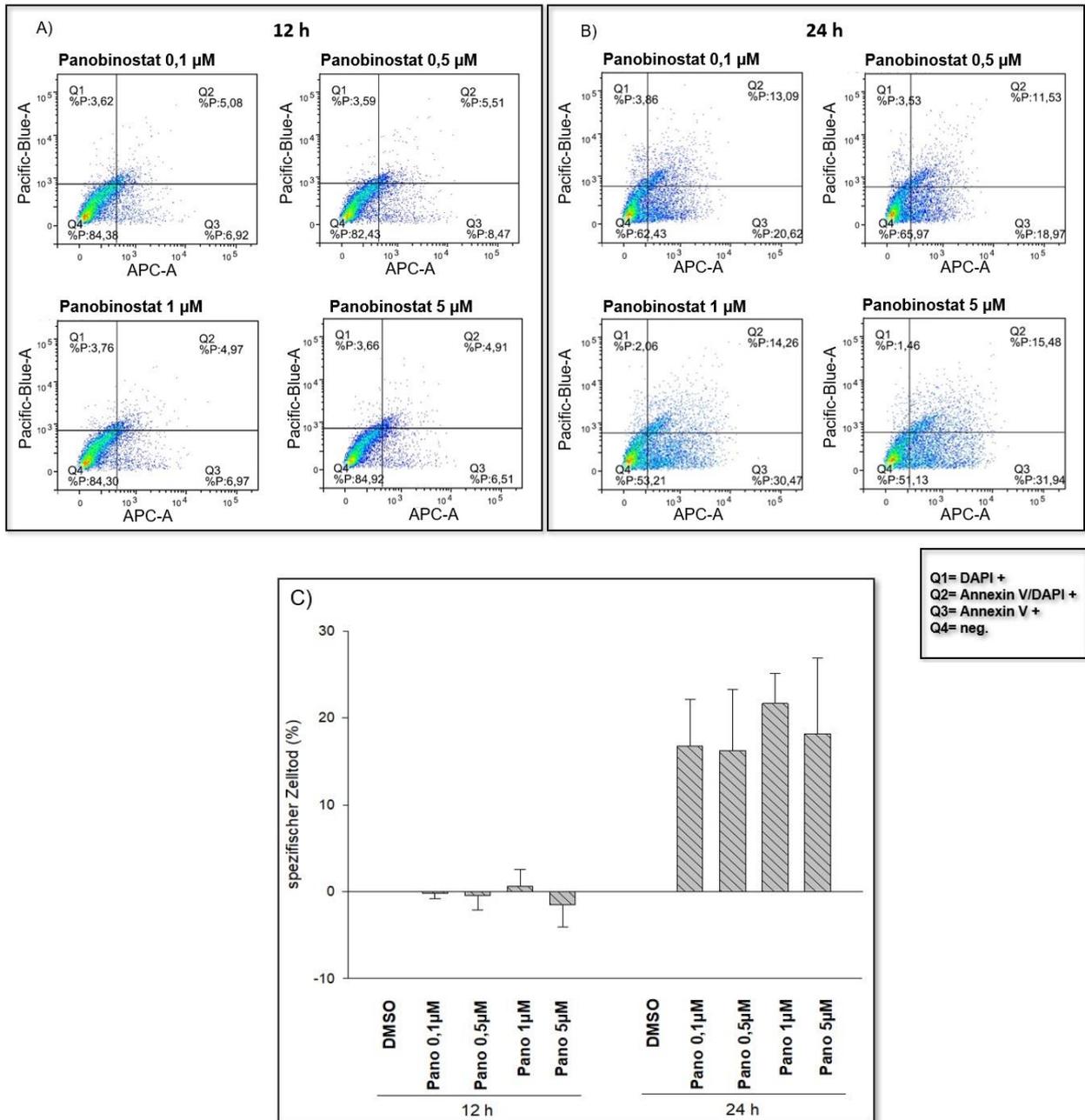


Abbildung 14: Apoptose-Induktion durch Panobinostat in HepG2-Zellen. A) und B) Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels DAPI- Annexin V Färbung. C) Spezifischer Zelltod (%) von HepG2 nach Panobinostat-Behandlung. Die Zelllinien wurden mit 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M Panobinostat für 12 h und 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen nach der Behandlung mit Annexin V FITC und DAPI gefärbt und anschließend gemessen. Der spezifische Zelltod wurde wie folgt berechnet: $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ (149); Q= Quadrant (n=3).

3.3.2 Bleomycin und Panobinostat üben eine additive Wirkung auf die Induktion des Zelltods aus

Weiterhin sollten die Effekte der Kombination von Bleomycin und Panobinostat auf Zelltod analysiert werden.

Für diese Analyse wurde das Zelltodverhalten mittels DAPI-Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. In dem vorherigen Experiment (Kap. 3.3.1.) wurde die optimale Panobinostat-Dosis zur Induktion von Zelltod ermittelt (1 μM). Alle weiteren Experimente wurden mit dieser Konzentration durchgeführt. Wie bereits gezeigt, führte die Behandlung mit Bleomycin zur Induktion von p53. Da p53 eine wichtige Rolle bei der Einleitung von Apoptose spielt und die Wirkung von Bleomycin auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen beruht, wurde untersucht, ob die gleichzeitige Anwendung von Bleomycin und Panobinostat additive Effekte induziert. Bleomycin wurde in einer Dosis von 2 μM (Serumkonzentration) und 10 μM (doppelte Serumkonzentration) eingesetzt und die Zellen wurden jeweils 24 h mit beiden Wirkstoffen inkubiert.

In der durchgeführten Durchflusszytometrie (Abb. 15A) wurde gezeigt, dass sich der größte Anteil an Bleomycin-behandelten Zellen (19,6%) in Q3 (Annexin V-positiv) befand. Dies weist einen apoptotischen Zelltod nach. 11,05% der Zellen waren in Q2 (DAPI- Annexin V-positiv) lokalisiert. Dies ist ein Indiz dafür, dass in diesen Zellen späte-Apoptose/Nekrose stattfindet.

Durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors zVad-FMK wurde nur der Bleomycin-induzierte Zelltod inhibiert: statt 19,6% der Zellen starben nur noch 3,8% der Zellen apoptotisch. Nec-1, ein Necroptose Inhibitor, zeigte keine Wirkung (Abb. 15A). Es lag also klassische Apoptose vor.

Durch die Kombinationsbehandlung- Bleomycin 2 μM und Panobinostat 1 μM - kam es im Vergleich zur Bleomycin-Monobehandlung zu einem höheren Anteil an Apoptose (30,9% vs. 19,6%) (Abb. 15B und C). Um den Bleomycin-Panobinostat induzierten Zelltod weiter zu charakterisieren, wurde auch hier der Zelltod mit zVad-FMK und Nec-1 geblockt.

Durch die Zugabe von zVad-FMK wurde der Zelltod in Richtung späte Apoptose/Nekrose (Q2) verlagert. Das ist ein sehr wichtiger Befund, da er darauf

Ergebnisse

hindeutet, dass zVad-FMK den Zelltod von Apoptose zu der Caspase-unabhängigen Nekroptose verschiebt. (Abb. 15C).

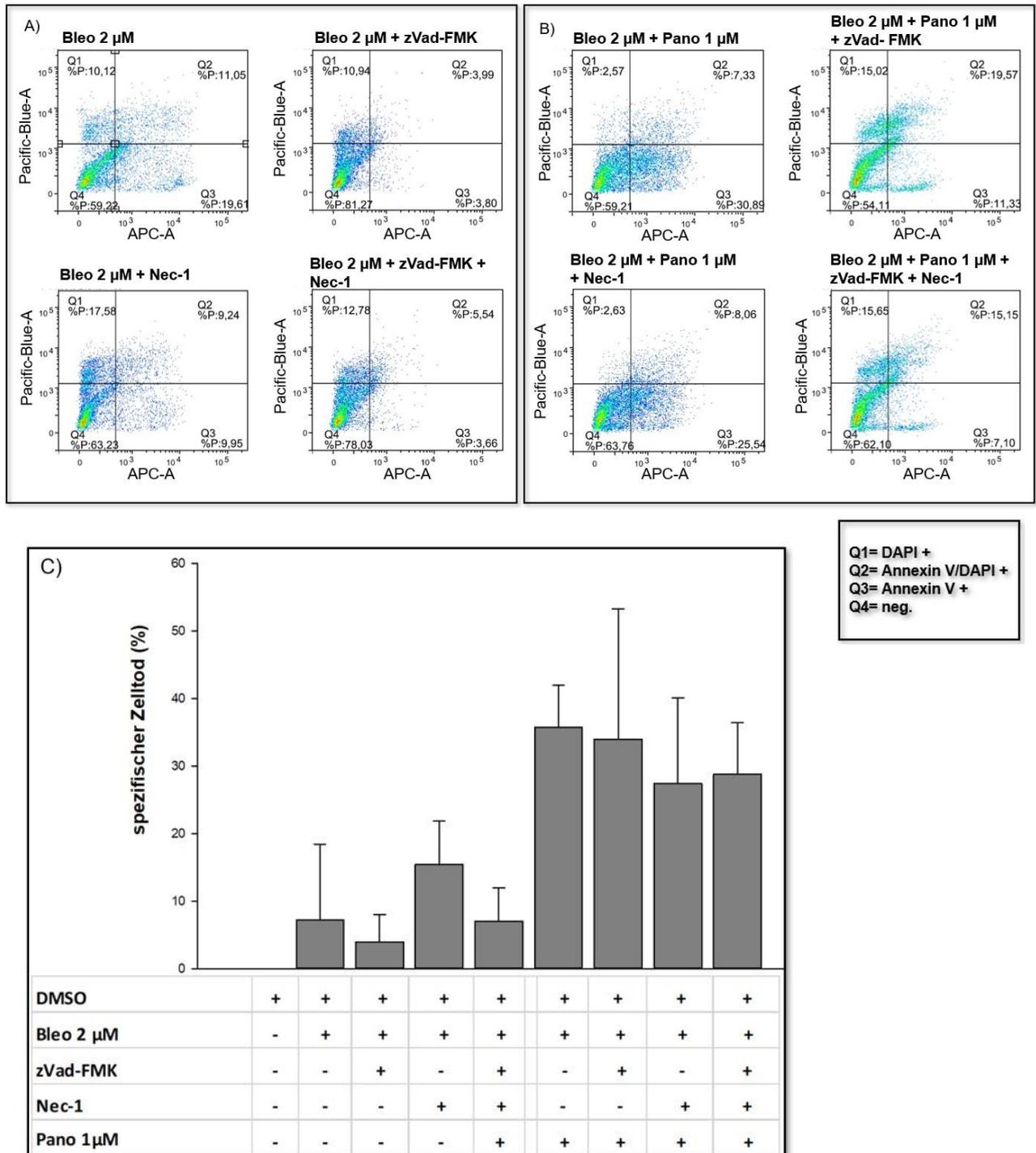


Abbildung 15: Induktion eines spät-apoptotischen/nekroptotischen Zelltodes in HepG2-Zellen durch Bleomycin/Panobinostat. A) und B) Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels DAPI-Annexin V Färbung. C) Spezifischer Zelltod (%) von HepG2 nach Behandlung mit Bleomycin bzw. einer Kombination von Bleomycin und Panobinostat. HepG2-Zellen wurden mit Bleomycin 2 μ M und mit der Kombination von Bleomycin 2 μ M und Panobinostat 1 μ M für 24 h behandelt. Zudem wurden zVad-FMK und Nec-1 in einer Konzentration von

Ergebnisse

je 50 mM zugegeben. Als Kontrolle diente DMSO. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen nach der Behandlung mit Annexin V FITC und DAPI gefärbt und anschließend gemessen. Der spezifische Zelltod wurde wie folgt berechnet: $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ (149). n= 3.

Identische Effekte wurden auch bei einer höheren Bleomycinkonzentration von 10 μM beobachtet. Hierbei induzierte die Kombination von 1 μM Panobinostat und 10 μM Bleomycin einen Zelltod von bis zu 50% (Abb. 16A). Auch hier konnte der spezifische Zelltod nicht mit zVAD-FMK inhibiert werden. Die Zellen wurden nach der Zugabe von zVAD aber positiv für Annexin V und DAPI, was die Induktion von Apoptose über das Ripoptosom bestätigt (Abb. 16A, B).

Ergebnisse

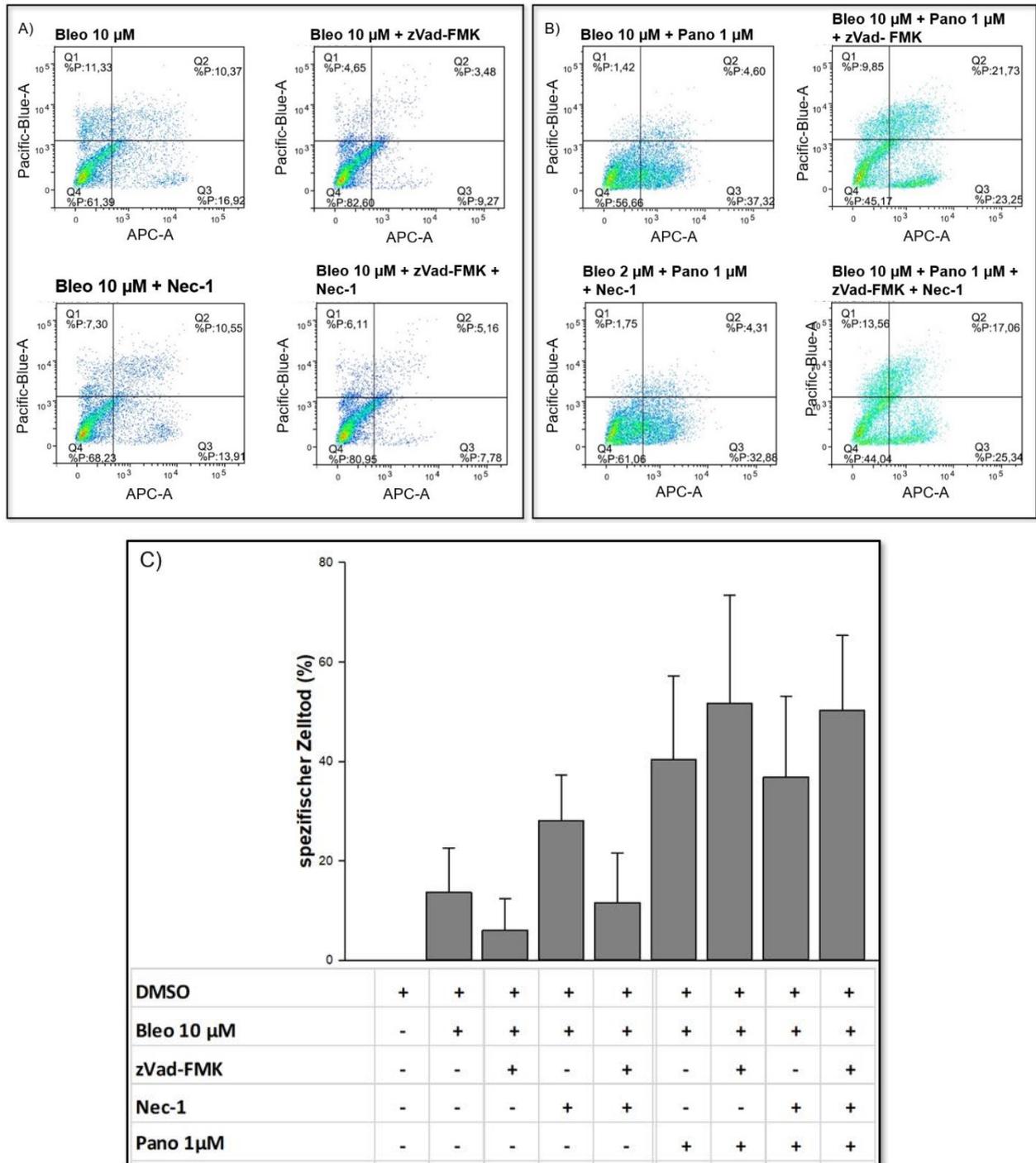


Abbildung 16: Induktion der späten Apoptose durch die Kombination von Bleomycin 10 μM und Panobinostat 1 μM in HepG2-Zellen. A) und B) Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels DAPI-Annexin V Färbung. C) Spezifischer Zelltod (%) von HepG2-Zellen nach Behandlung mit Bleomycin und einer Kombination von Bleomycin und Panobinostat. Die HepG2-Zellen wurde mit Bleomycin 10 μM und mit der Kombination von Bleomycin 10 μM und Panobinostat 1 μM für 24 h behandelt. Zudem wurden zVad-FMK und Nec-1 in einer Konzentration von je 50 mM zugegeben. Als Kontrolle diente DMSO. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen nach der Behandlung mit Annexin V-FITC und DAPI gefärbt und anschließend gemessen. Der spezifische Zelltod wurden wie folgt berechnet: $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ (149), n=3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombinationstherapie einen additiven Effekt auf die Induktion von Zelltod hat und dass die Zellen zunächst apoptotisch sterben. Inhibiert man die Caspasen kann der durch die Kombinationstherapie induzierte Zelltod sich in Richtung Nekroptose verschieben. Dies ist von klinischer Relevanz, da die Kombination von Bleomycin und Panobinostat hier einen alternativen Weg der Induktion von Zelltod beschreitet. Dies ist insbesondere für Therapie-resistente Tumore wie das HCC von großer Relevanz.

3.3.3 Die Kombination von Bleomycin und Panobinostat führt zu einer *in-vitro* Aktivierung von Caspasen in HepG2 Zellen

Um den Zelltod weiter zu charakterisieren, wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen die Induktion der Caspase-Kaskade untersucht. Da sich in den vorangegangenen durchflusszytometrischen Untersuchungen gezeigt hatte, dass 1 μM Panobinostat nach 24 h Zelltod in HepG2-Zellen auslöst (Abb. 14) und die Kombination von 10 μM Bleomycin und 1 μM Panobinostat diesen Zelltod deutlich verstärkt (Abb. 16), wurde diese Kombination auch auf Proteinebene untersucht.

Apoptose kann über die Initiator-Caspase-8, die dann ihrerseits die Effektor-Caspase-3 spaltet und somit Zelltod auslöst, eingeleitet werden. Caspase 8 wird hierbei am *Death inducing Signaling Complex* (DISC) oder am Ripoptosom induziert (Abb. 17).

Nach Behandlung mit Panobinostat zeigte sich eine deutlich Caspase-8-Prozessierung. Wie wir aus Vorarbeiten wissen (138,139,150) induziert Bleomycin p53-abhängige Apoptose über den CD95-Rezeptor und den DISC. Die Kombination von Bleomycin und Panobinostat führte daher zu einer ausgeprägten Aktivierung von Caspase 8.

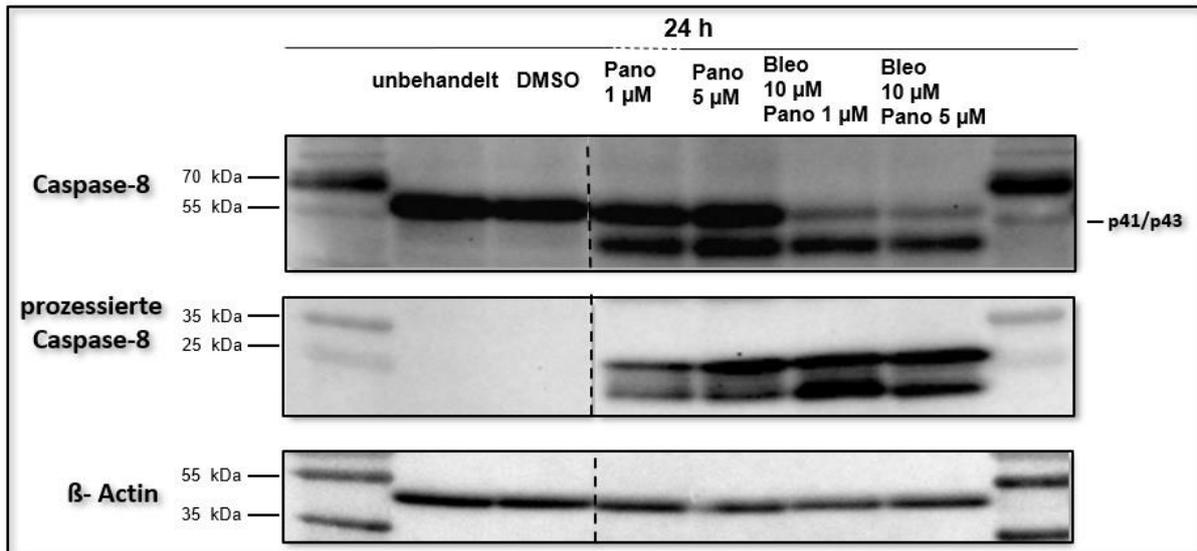


Abbildung 17: Analyse der Caspase-8-Spiegel nach Behandlung mit Bleomycin-Panobinostat in HepG2-Zellen. Induktion der extrinsischen Apoptose via Caspase-8-Prozessierung durch die Therapeutika-Kombination. HepG2-Zellen wurden kultiviert, stimuliert und nach 24 h wurden die Spiegel unprozessierter und prozessierter Caspase-8 mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist die Analyse einer Western Blot Membran, die geschnitten wurde (angezeigt durch gestrichelte Linie).

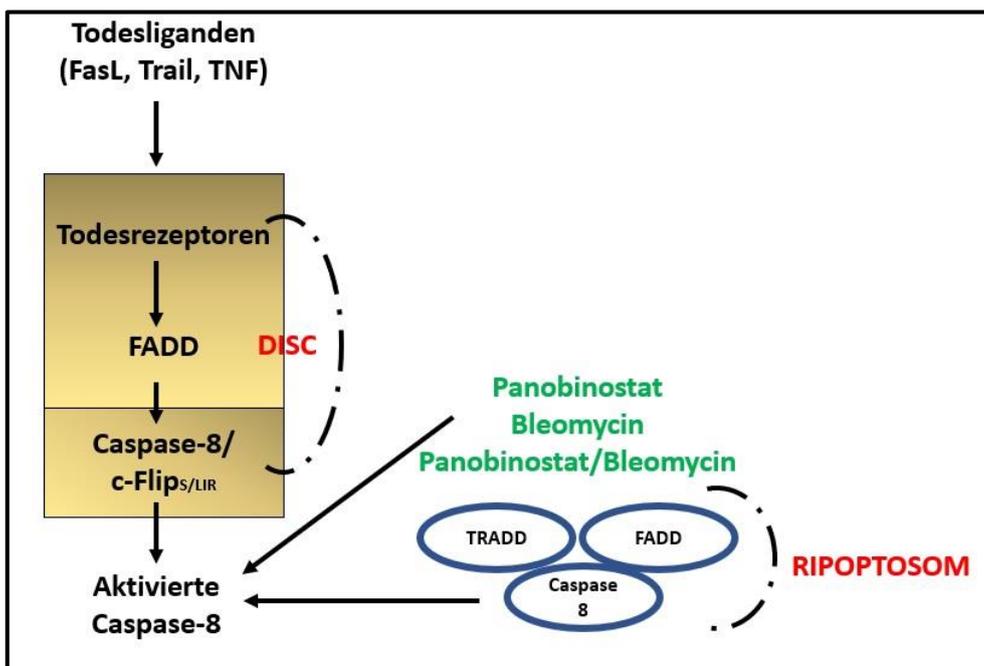


Abbildung 18: Schematische Darstellung des extrinsischen Apoptosewegs.

Um die Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalwegs durch eine Kombinationsbehandlung von Bleomycin und Panobinostat genauer zu untersuchen

Ergebnisse

wurden Bcl-X_L und Mcl-1, zwei wichtige anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder, untersucht. Panobinostat führte zu einer Herunterregulation von Bcl-X_L um 57% (1 µM Panobinostat) bzw. 50% (5 µM Panobinostat). Die Kombination Bleomycin-Panobinostat führte zu einer Herunterregulation von Bcl-X_L um 42% mit 1 µM Panobinostat bzw. um 50% in der Kombination mit 5 µM Panobinostat (Abb. 19).

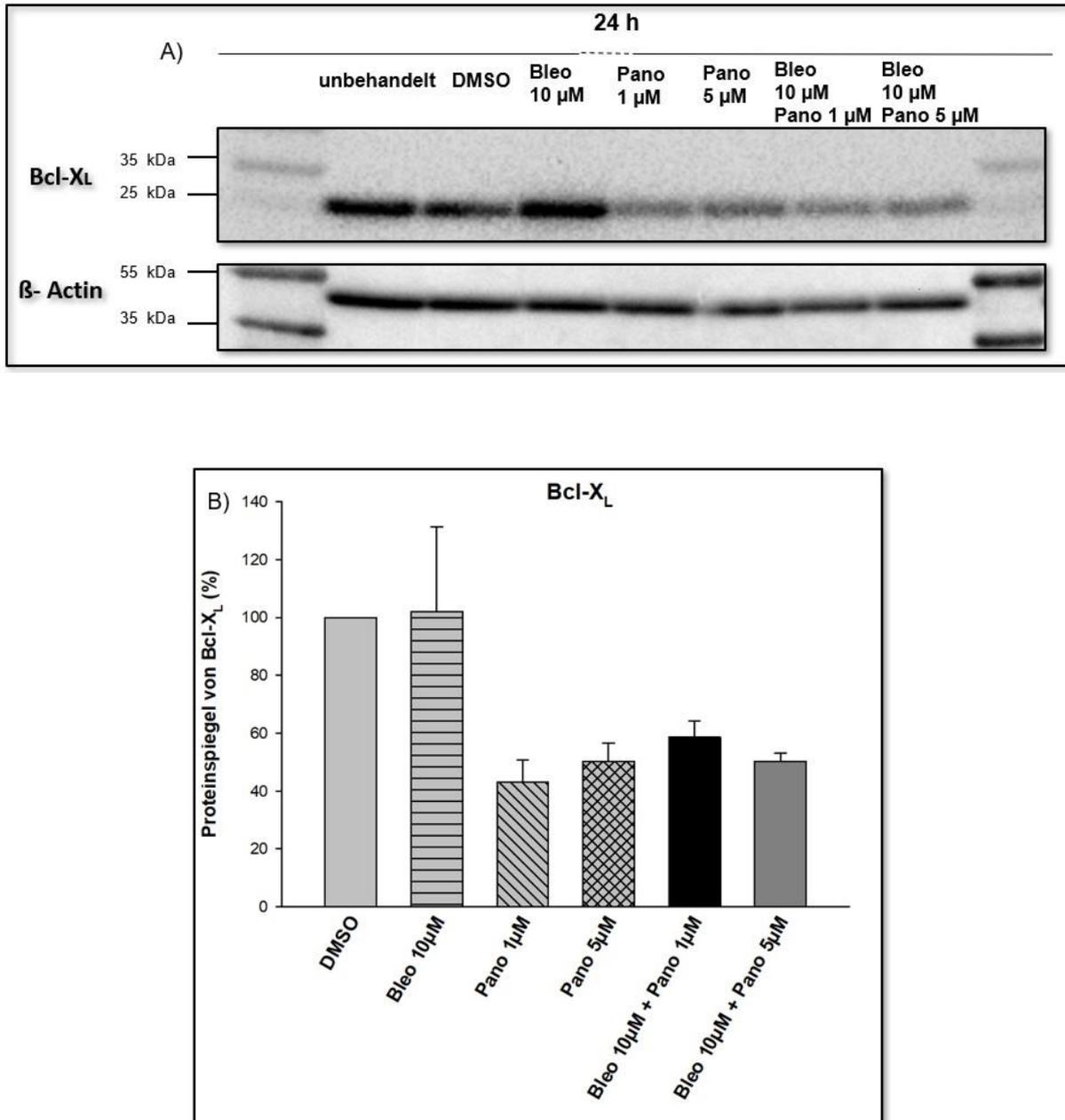
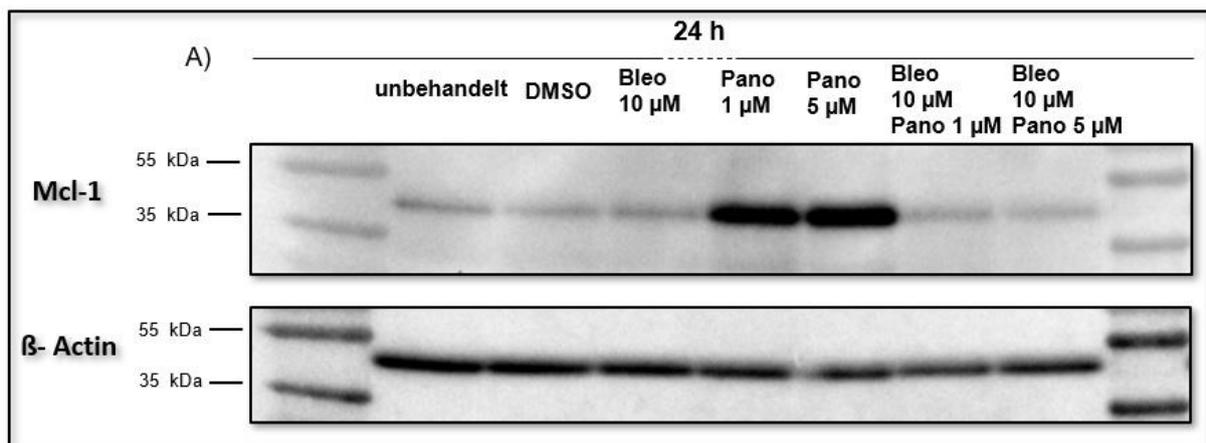


Abbildung 19: Abnahme der Bcl-X_L-Proteinspiegel nach Kombinationsbehandlung mit Bleomycin und Panobinostat. A) HepG2-Zellen wurden kultiviert, stimuliert und nach 24 h wurde Bcl-X_L auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. B) Densitometrische Analyse der Bcl-X_L-Spiegel nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen (der Proteinspiegel in % bezieht sich auf β-Actin). Von drei Replikaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=3).

Ergebnisse

Wie Bcl-X_L ist Mcl-1 ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie und wirkt als kritischer Überlebensfaktor durch Interaktion mit pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, um Apoptose zu unterdrücken. Es wird vermutet, dass Mcl-1 sowohl in Hepatozyten als auch in HCC-Zellen das wichtigste anti-apoptotische Protein der Bcl-2-Familie ist (151–154). Hier konnten wir beobachten, dass Panobinostat zu einer dosisabhängigen Induktion von Mcl-1 führt. Bemerkenswerterweise wird die Panobinostat-vermittelte Induktion von Mcl-1 durch Bleomycin wieder aufgehoben. Dies unterstreicht, dass die Kombination beider Therapeutika ineinandergreift und somit einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt. (Abb. 20).



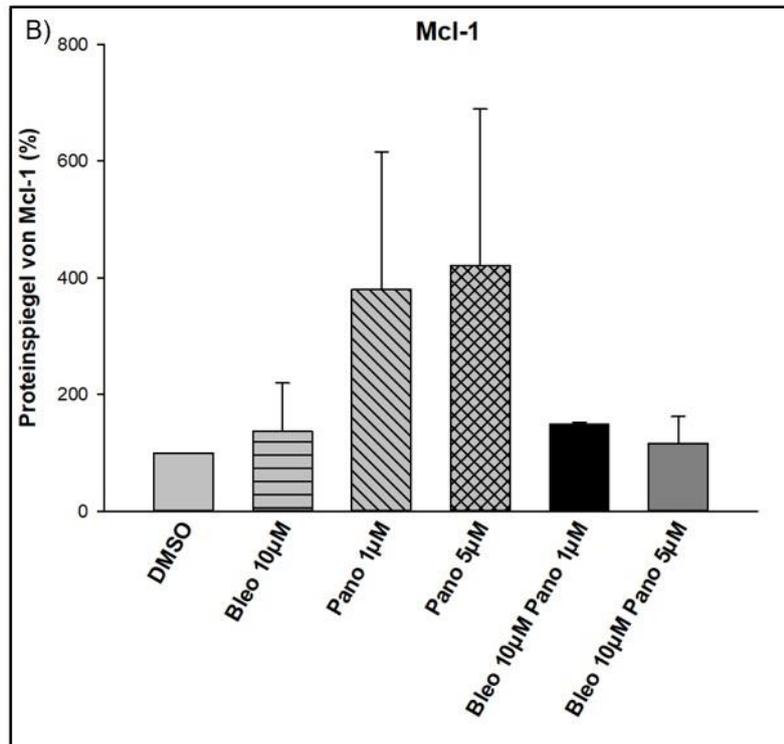


Abbildung 20: Induktion von Mcl-1 durch Panobinostat konsekutive Inhibition des Effekts durch Bleomycin.

A) HepG2-Zellen wurden kultiviert, stimuliert und nach 24 h wurde die Expression von Mcl-1 auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. B) Densitometrische Analyse der Mcl-1-Proteinmenge nach Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen. Die Ergebnisse der densitometrischen Analyse sind jeweils unterhalb des jeweiligen Blots angegeben (der Proteinspiegel in % bezieht sich auf β -Actin). Von drei Replikaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=3).

3.3.3.1. Die Kombinations-Behandlung mit Bleomycin und Panobinostat führt zu einem Verlust der mitochondrialen Membranintegrität

Die Herunterregulation von Bcl-X_L und Mcl-1 durch die Kombination Bleomycin-Panobinostat deutet auf eine Destabilisierung der mitochondrialen Integrität hin. Dieser Prozess kann mit Hilfe des mitochondrialen Membranpotentials untersucht werden. Mittels durchflusszytometrischer Messungen unter Verwendung von TMRE wurden die Effekte auf das mitochondriale Membranpotential untersucht.

Nach Einzel-Behandlung mit Bleomycin wurde keine Verschiebung des Fluoreszenzsignals und damit auch keine Depolarisierung der Mitochondrienmembran beobachtet. Sowohl nach Mono-Behandlung mit Panobinostat als auch nach Kombinationsbehandlung mit Bleomycin-Panobinostat war die Fluoreszenzintensität

Ergebnisse

deutlich verringert. Die Gegenwart von Panobinostat führte somit zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 21).

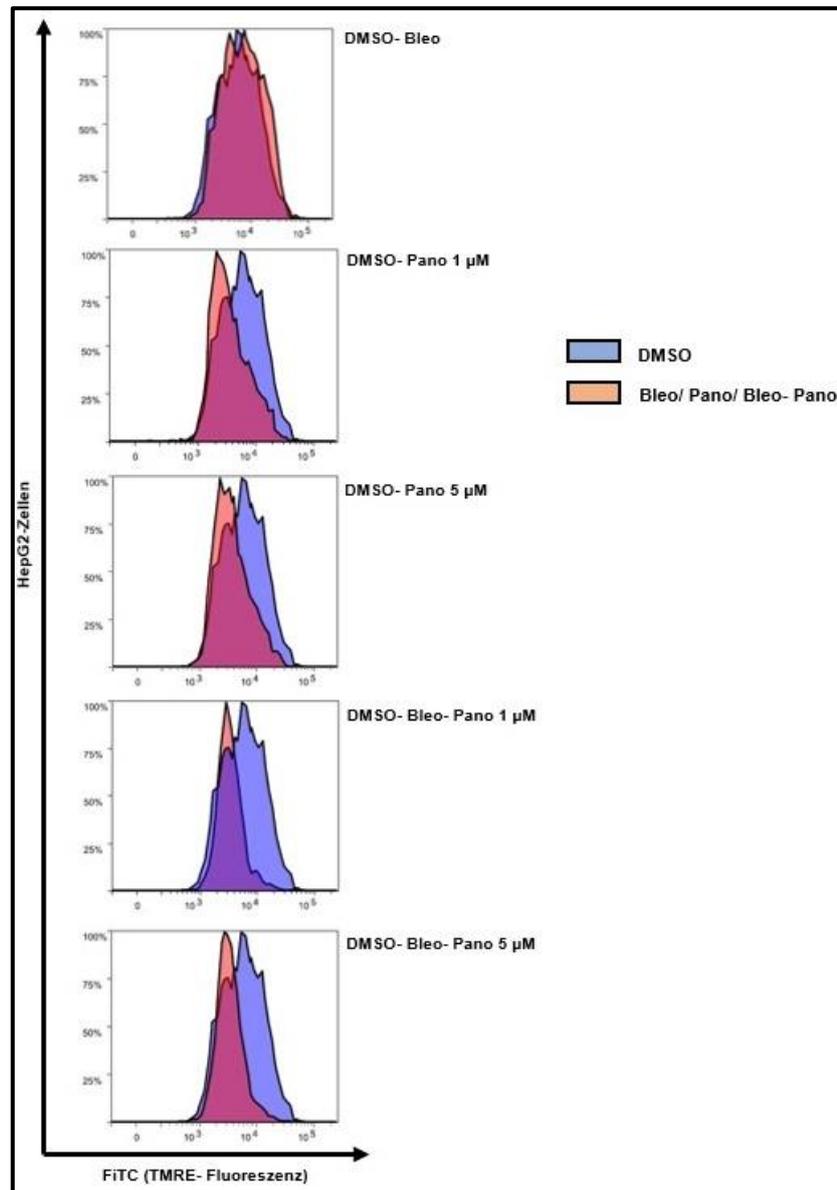


Abbildung 21: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in HepG2-Zellen nach der Behandlung mit Panobinostat und Bleomycin/Panobinostat. Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme der TMRE-Fluoreszenz von HepG2-Zellen nach Behandlung mit Bleomycin oder/und Panobinostat (blau: DMSO, rot: behandelte Zellen mit Bleomycin, Panobinostat und Bleomycin/Panobinostat). Nach der Stimulation wurden HepG2-Zellen für 15 min mit 25 μM TMRE inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt (n=3).

Um den Prozess der intrinsischen, vom Mitochondrium abhängigen, Apoptose weiter nachzuverfolgen, wurde die Prozessierung von Caspase-9 untersucht. Panobinostat und die Kombination von Panobinostat mit Bleomycin führten zu einer Zunahme der

Ergebnisse

gespaltenen Caspase-9 (Abb. 22). Das bedeutet, dass die Kombination Bleomycin mit Panobinostat auch über den intrinsischen, mitochondrialen, Signalweg Apoptose auslösen kann (Abb. 23).

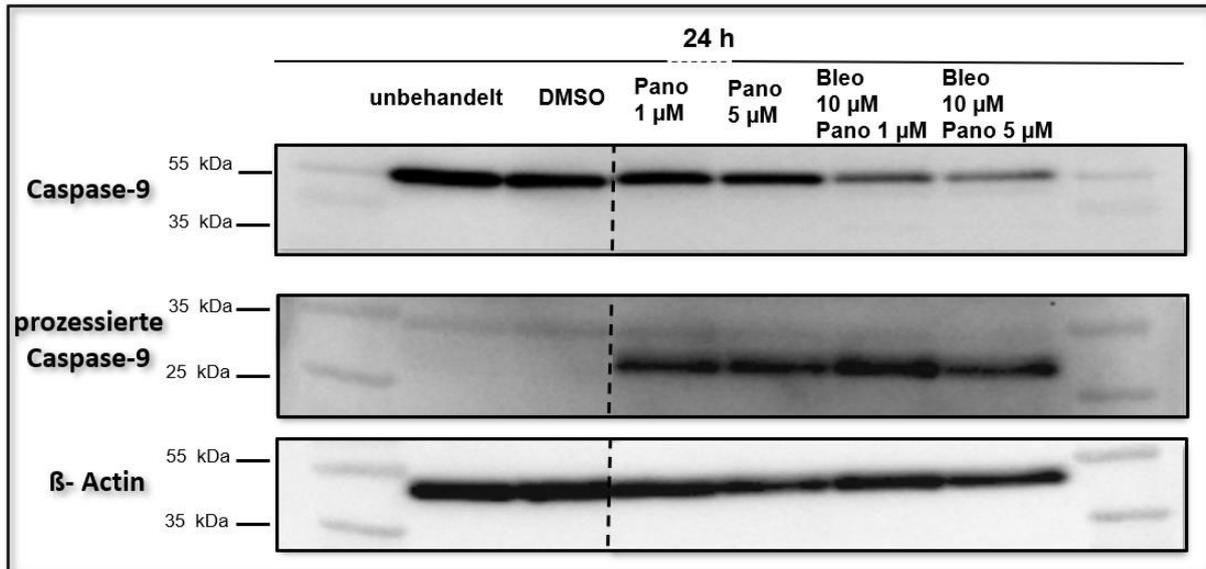


Abbildung 22: Analyse der Caspase-9-Prozessierung nach Behandlung mit Bleomycin oder/und Panobinostat. HepG2-Zellen wurden kultiviert, stimuliert und nach 24 h wurde Caspase-9 (unprozessierte und prozessierte Form) auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. Von drei Replikaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=3). Dargestellt ist die Analyse einer Western Blot Membran, die geschnitten wurde (angezeigt durch gestrichelte Membran).

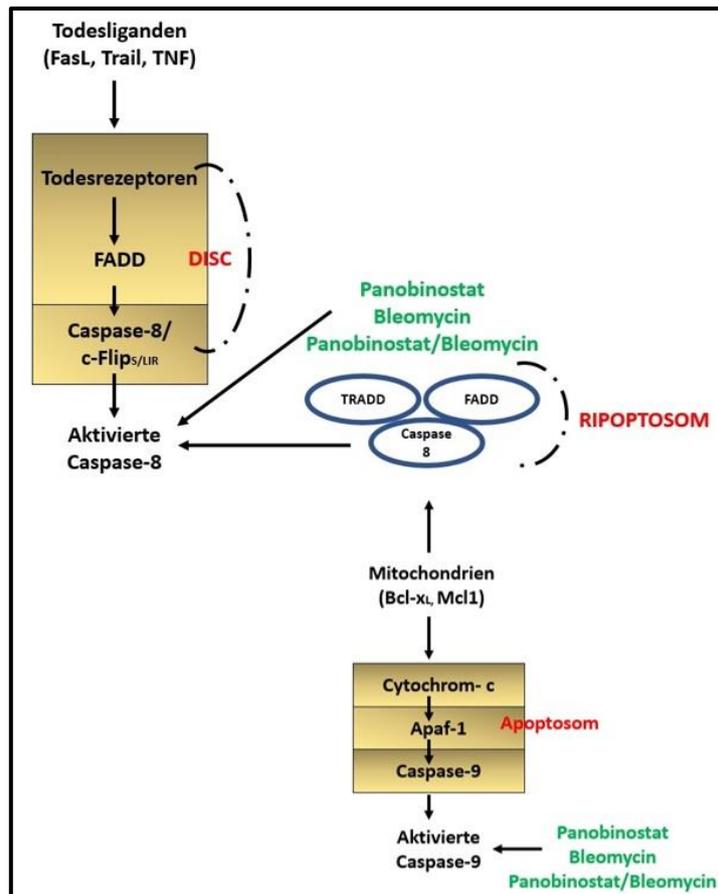


Abbildung 23: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs.

Einleitung der Apoptose – Caspase-3 Aktivierung und PARP Spaltung

Als letzter Schritt nach der Aktivierung der Caspasen-8 und -9 schließt sich die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 an. Sowohl Panobinostat als auch die Kombination Bleomycin-Panobinostat lösten Apoptose durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade aus. Die Kombination Bleomycin-Panobinostat führte zu einer Zunahme der prozessierten Caspase-3 im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (Abb. 24). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass durch die Kombinationsbehandlung mit Bleomycin und Panobinostat Apoptose über das Ripoptosom und den intrinsischen Apoptose-Signalweg induziert wird.

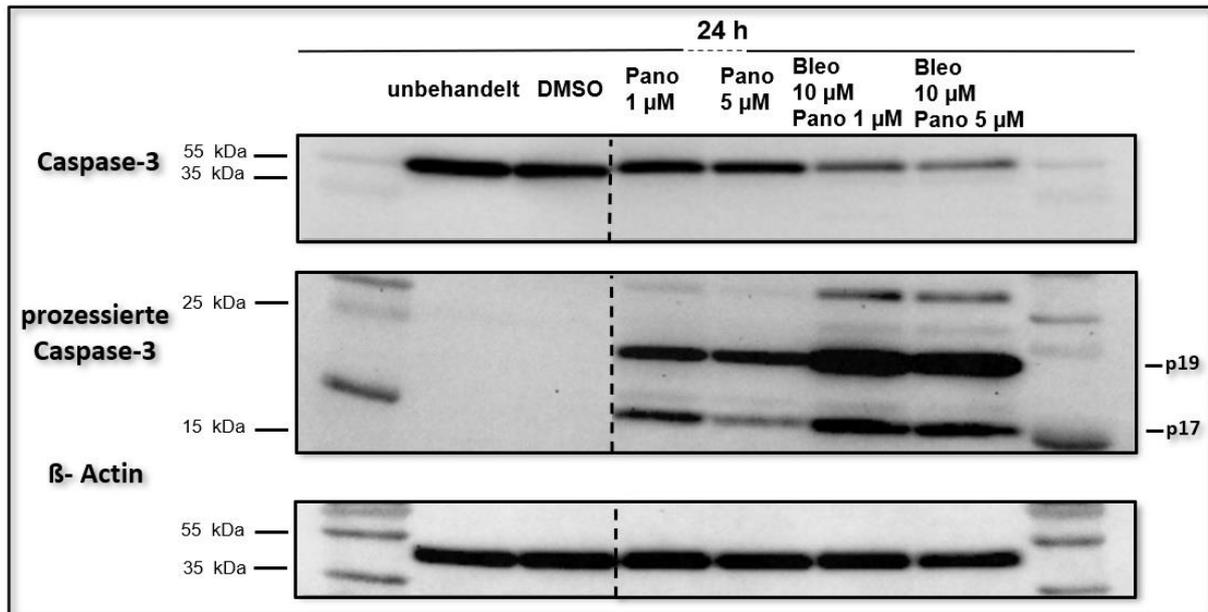


Abbildung 24: Analyse der Caspase-3-Prozessierung nach Behandlung mit Bleomycin oder/und Panobinostat. HepG2-Zellen wurden kultiviert und 24 h stimuliert. Gesamt-Caspase-3 und prozessierte Caspase-3 wurden mittels Western Blot bestimmt. Von drei Replikaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=3). Dargestellt ist die Analyse einer Western Blot Membran, die geschnitten wurde (angezeigt durch gestrichelte Linie).

Die Ergebnisse der Apoptoseinduktion durch die Kombination von Bleomycin und Panobinostat konnten anhand der Spaltung des DNA Reparatur-Enzyms Poly(ADP) Ribosepolymerase (PARP) bestätigt werden. Bei der Induktion von Apoptose wird das 116 kDa große Protein in zwei Spaltprodukte der Größe 89 kDa und 24 kDa gespalten. Im Western Blot konnte nur das 89 kDa-Fragment nachgewiesen werden. In Gegenwart von Panobinostat wurde PARP dosisabhängig prozessiert. Nach Behandlung mit der Kombination Bleomycin-Panobinostat konnte ausschließlich gespaltenes PARP nachgewiesen werden. Auch diese Daten zeigen deutlich einen apoptotischen Zelltod (Abb. 25).

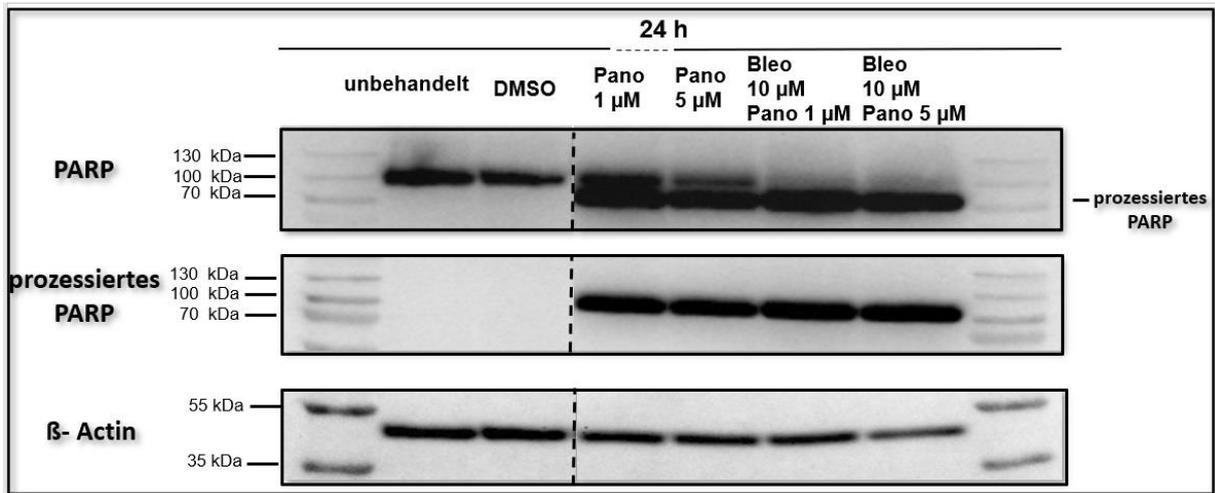


Abbildung 25: PARP-Prozessierung nach Behandlung mit Bleomycin oder/und Panobinostat. HepG2-Zellen wurden kultiviert und 24 h stimuliert. PARP und dessen Spaltprodukt wurden mittels Western Blot bestimmt. Von drei Replikaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=3). Dargestellt ist die Analyse einer Western Blot Membran, die geschnitten wurde (angezeigt durch gestrichelte Linie).

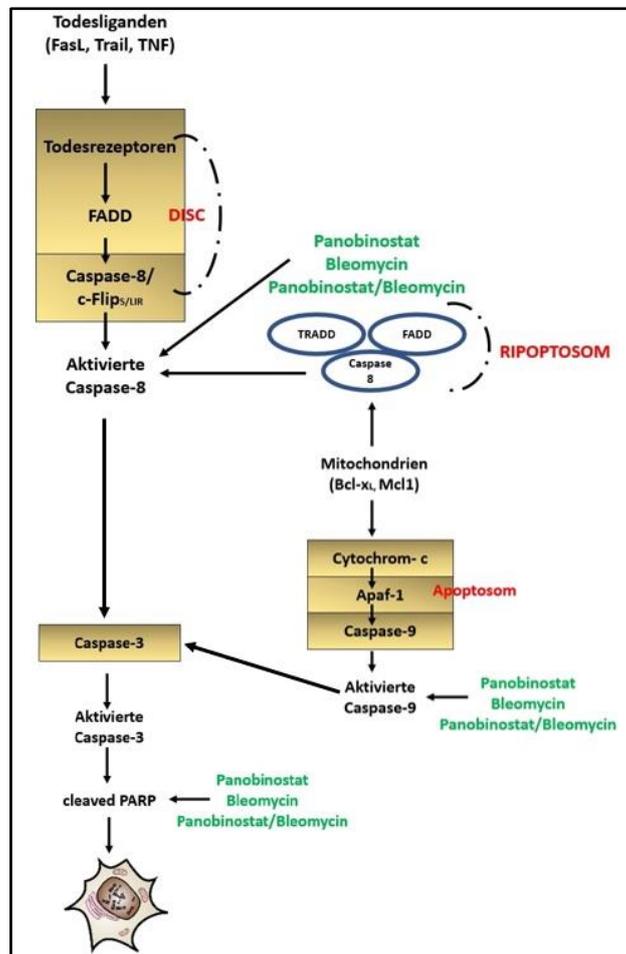


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Caspasen-Aktivierung.

Zusammengefasst konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Kombination Bleomycin-Panobinostat in HepG2-Zellen Apoptose auslöst, die sowohl über das Ripoptosom als auch über den intrinsischen Apoptose-Signalweg vermittelt wird (Abb. 26).

3.3.4 Der Zelltodinhistor zVad-FMK verhindert die Bleomycin-Panobinostat-induzierte Apoptose

Da der letzte Schritt der Apoptose nach der Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -9 die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 ist, wurde mittels Western Blot die Spaltung von Caspase-3 nach Zugabe der Zelltodinhibitoren zVad-FMK und Nec-1 bestimmt. HepG2-Zellen wurden ausgesät und zunächst mit den jeweiligen Zelltodinhibitoren inkubiert. 15 min danach wurden die jeweiligen Therapeutika hinzugefügt und 24h später erfolgte die Lyse der Zellen.

Bei der alleinigen Behandlung mit Bleomycin in Gegenwart von zVad-FMK, Nec-1, sowie zVad-FMK/Nec-1 zeigte sich kein Effekt auf die Caspase-3 (unprozessiert und prozessiert) (Abb. 27).

In Gegenwart von zVad-FMK war nach Panobinostat-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der Caspase-3-Prozessierung zu beobachten.

Bei der Kombination von Bleomycin und Panobinostat (sowohl mit 1 μ M als auch mit 5 μ M Panobinostat) konnte prozessierte Caspase-3 in Gegenwart von zVad-FMK nicht mehr nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass zVad-FMK den Zelltod blockieren kann. In Gegenwart von Nec-1 zeigte sich bei der Kombination von Bleomycin und Panobinostat weiterhin gespaltene Caspase-3, sodass der Zelltod nicht gehemmt werden konnte. Nach der Stimulation mit zVad-FMK-Nec-1 war prozessierte Caspase-3 nicht mehr nachweisbar.

Zusammenfassend zeigen wir hier, dass es durch die Kombination von Bleomycin und Panobinostat zu einer Prozessierung der Caspase-3 kommt und diese durch zVad-FMK und zVad-FMK-Nec-1 inhibiert wird.

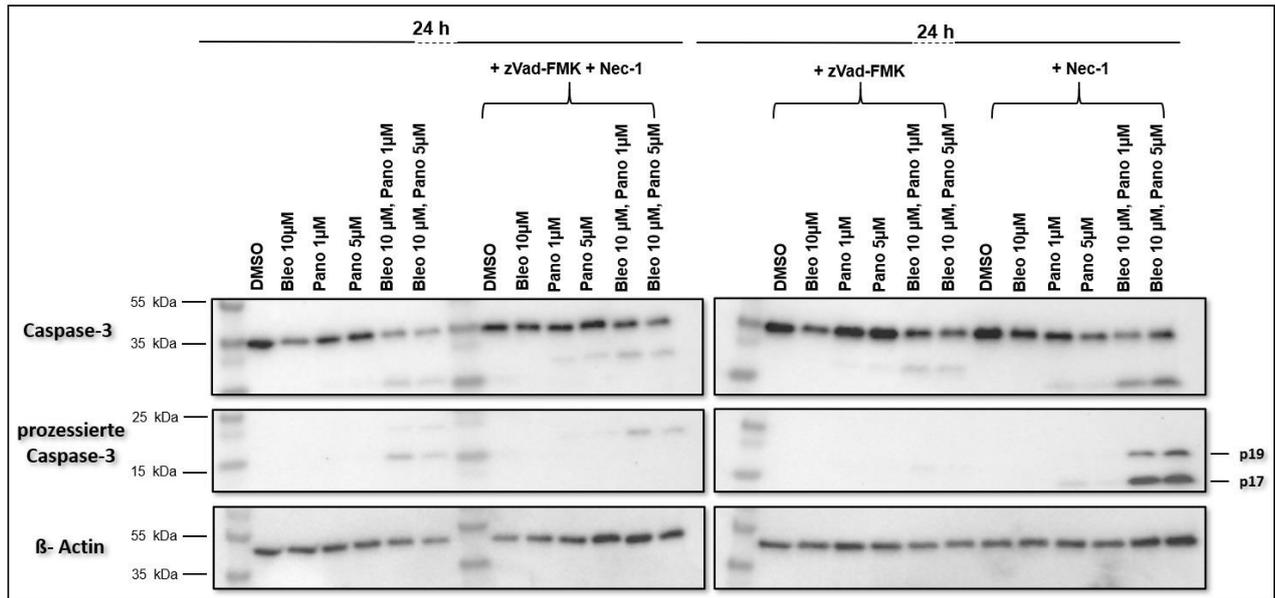


Abbildung 27: zVad-FMK und zVad-FMK-Nec-1 blockieren den Bleomycin-Panobinostat-induzierten Zelltod. HepG2-Zellen wurden kultiviert, mit Zelltodinhhibitoren und anschließend für 24 h mit Bleomycin oder/und Panobinostat stimuliert. Die Proteinmengen an unprozessierter und prozessierter Caspase-3 wurden mittels Western Blot bestimmt (n=3).

Analog wurde im folgenden Experiment die Prozessierung von PARP nach Behandlung mit Zelltodinhhibitoren untersucht. Wir konnten zeigen, dass Panobinostat allein aber auch in Kombination mit Bleomycin zu einer Prozessierung von PARP führt. Zudem wurde ein erhöhter Anteil an prozessiertem PARP nach Behandlung mit der Kombination Bleomycin und Panobinostat beobachtet (Abb. 28). Nach Zugabe von zVad-FMK war weder bei der Kombinationsbehandlung noch bei der Panobinostat-Monobehandlung prozessiertes PARP nachweisbar. In Gegenwart von zVad-FMK-Nec-1 wurde ebenfalls kein prozessiertes PARP nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte die Prozessierung von PARP mit Nec-1 nicht verhindert werden. In Übereinstimmung mit den Daten zur Caspase-3-Aktivierung zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Kombination von Bleomycin und Panobinostat Apoptose in HepG2-Zellen induziert wird.

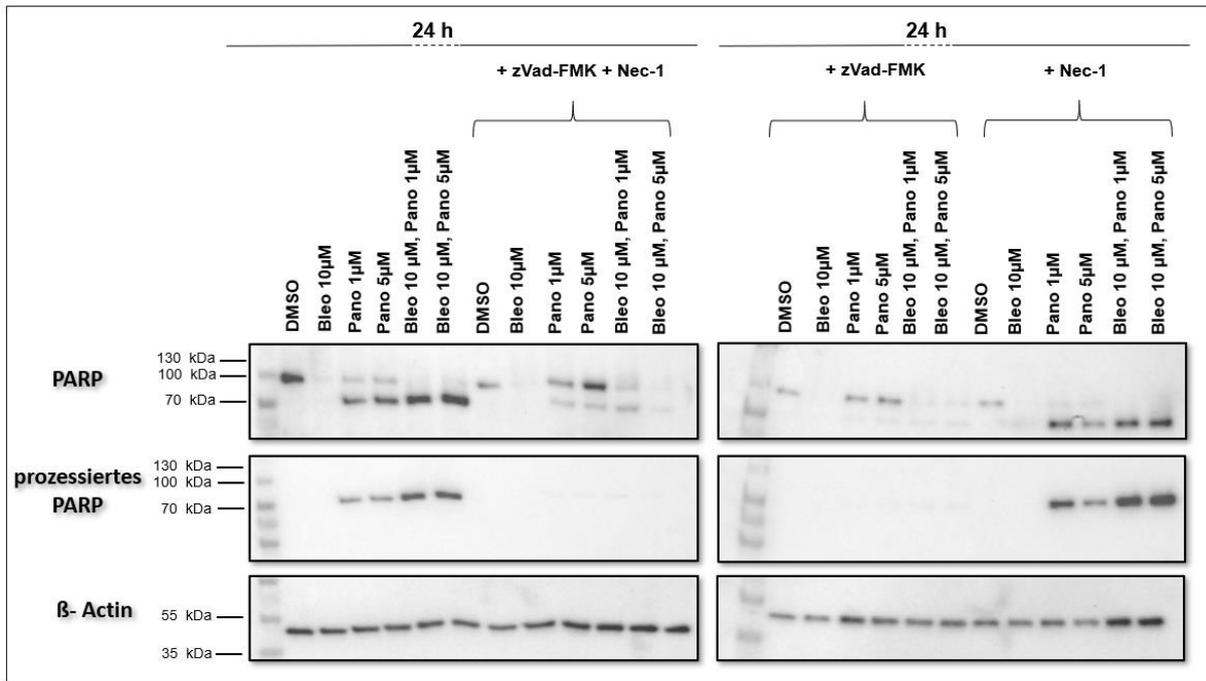


Abbildung 28: zVad-FMK und zVad-FMK-Nec-1 blockieren die Bleomycin-Panobinostat-induzierte PARP-Prozessierung. HepG2-Zellen wurden kultiviert, mit Zelltodinhhibitoren und anschließend für 24 h mit Bleomycin oder/und Panobinostat behandelt. Die intrazellulären Spiegel von PARP und prozessiertem PARP wurden mittels Western Blot bestimmt (n=3).

Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass die Kombinationsbehandlung mit Bleomycin und Panobinostat eine vielversprechende neue Option für die Therapie des HCC darstellt. Wir zeigen, dass diese Kombination Apoptose in Hepatomzellen induziert und zu einer verstärkten Reduktion der Zellviabilität führt. Die Induktion von Apoptose konnten wir auf verschiedenen Ebenen des apoptotischen Prozesses nachweisen:

- (1) Die Caspasen-Kaskade wird durch die Wirkstoffkombination effektiv aktiviert.
- (2) PARP als Zielstruktur von Effektor-Caspasen wird in Gegenwart der Wirkstoffkombination prozessiert.
- (3) zVad-FMK als Pan-Caspase-Inhibitor blockiert die Bleomycin-Panobinostat-induzierten Signalwege.
- (4) Die Mitochondrienmembran wird depolarisiert. Auch wenn noch weitere Experimente durchgeführt werden müssen, um die beteiligten Signalwege genauer zu charakterisieren, können wir zu diesem Zeitpunkt sagen, dass die Therapeutika-

Ergebnisse

Kombination Bleomycin-Panobinostat in HCC Zellen einen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellt.

4. Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine Tumorentität mit einer schlechten Prognose. Der Grund hierfür liegt oft in einer späten Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen, multifokalen Tumorstadium. Als weitere Gründe sind auf der einen Seite die Resistenz gegenüber klassischen Chemotherapien und das Fehlen guter molekularer Targets zu nennen. Auf der anderen Seite ist der Therapeut immer mit der zu Grunde liegenden Lebererkrankung, der Leberzirrhose, konfrontiert, die aufgrund der eingeschränkten Organfunktion der Leber zu einer Therapielimitierung führen kann (23,155). Anfang 2007, als Sorafenib als Multityrosinkinase-Inhibitor für die systemische Therapie des HCC zugelassen wurde, begann eine neue Ära in der systemischen Behandlung des HCC (44). Da das HCC eine Tumorentität darstellt, die im Verlauf oftmals eine Therapieresistenz entwickelt, ist die Entwicklung neuer molekularer therapeutischer Ansätze dringend erforderlich. Darüber hinaus sind das einzigartige Mikromilieu der Leber und die klonale und genomische Instabilität vieler Lebertumore verantwortlich für eine hohe Heterogenität, die eine Behandlung deutlich erschwert (156). Um neue Behandlungsoptionen zu ermitteln, müssen die molekularen Eigenschaften und die Tumor-definierenden Signalwege des HCC besser verstanden werden (157,158).

p53 ist das am häufigsten mutierte Gen im HCC (157). Die entscheidende Wirkung des Status der tumorsuppressiven p53-Familie auf Apoptose, Chemosensitivität und Prognose im HCC wurde von unserer Arbeitsgruppe publiziert (138,159–163). Darüber hinaus zeigen weitere Vordaten unserer Arbeitsgruppe, dass Sorafenib p53-abhängige Apoptose im HCC induzieren kann (164). Mit der Zulassung weiterer TKI und anderer Therapieoptionen - wie Immun-Checkpoint-Inhibitoren beim fortgeschrittenen HCC (1) - besteht der folgerichtige nächste Schritt in der Entwicklung von Kombinationstherapien, um einen weiteren Überlebensvorteil für unsere Patienten durch eine kombinierte Systemtherapie zu erzielen (165).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die Effekte neuer *targeted therapies*, therapeutischer Antikörper, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika auf die das Therapie-Ansprechen entscheidenden zellulären Prozesse (Apoptose vs. Proliferation) von HepG2-Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Daten konnte dann in der Kombination eines HDAC-Inhibitors mit einem Chemotherapeutikum eine optimale

sich ergänzende neue Behandlungsoption in Bezug auf die Aktivierung sowohl des extrinsischen wie auch des intrinsischen Apoptose-Signalweges etabliert werden.

4.1 Targeted therapies: Apoptose oder Nekroptose?

Aktuell sind Sorafenib, Regorafenib, Cabozantinib und Lenvatinib als TKI für die Therapie des HCC zugelassen. Ramucirumab wird als therapeutischer Antikörper zur Behandlung eingesetzt und ist für die Therapie AFP-hoch exprimierender Tumoren zugelassen.

2020 wurde eine neue Kombination aus zwei monoklonalen therapeutischen Antikörpern –Atezolizumab und Bevacizumab in einer multizentrischen Phase 3-Studie bei nicht resektablem HCC in der Erstlinien-Therapie untersucht und zugelassen (43). Atezolizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, der an PD-L1 bindet, um eine Interaktion mit den Rezeptoren PD-1 und B7-1 zu verhindern. Dadurch wird eine tumorbedingte T-Zell-Suppression rückgängig gemacht. Bevacizumab ist ebenfalls ein monoklonaler IgG1 Antikörper, dergegen VEGF gerichtet ist. Er hemmt damit die Angiogenese und das Tumorwachstum. In der Kombinationstherapie konnte Bevacizumab eine augmentierende Funktion in der Tumor-Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zugeschrieben werden. Durch diese neue Kombination verbessert sich das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patienten deutlich im Vergleich zu einer Behandlung mit dem Multityrosinkinase-Inhibitor Sorafenib. Das Gesamtüberleben nach 12 Monaten im Jahr 2020 betrug 67,2 % mit Atezolizumab-Bevacizumab und 54,6 % mit Sorafenib. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 6,8 Monate mit Atezolizumab-Bevacizumab und 4,3 Monate mit Sorafenib. In der aktualisierten Datenanalyse der IMBrave150-Studie vom Januar 2021 zeigte sich nach einem medianen Follow-up von 15,6 Monaten bei Patienten unter der Kombinationstherapie ein Gesamtüberleben von 19,2 Monaten im Vergleich zu 13,4 Monaten unter Sorafenib-Therapie (43).

Monoklonale Antikörper sind im Allgemeinen hochspezifisch, was auch ein Grund für ein geringes Spektrum an Nebenwirkungen ist. Da sie nicht zellpermeabel sind, können sie keine intrazellulären Zielstrukturen angreifen. Monoklonale Antikörper sind somit gegen Oberflächenrezeptoren oder ihre Liganden gerichtet. Die Neutralisierung dieser Proteine blockiert dann komplexe Signalkaskaden, die das Überleben und/oder

die Proliferation der Tumorzellen beeinträchtigen (166). Zellpermeable TKI sind hingegen weniger spezifisch in der Wirksamkeit im Vergleich mit therapeutischen Antikörpern, beziehungsweise weisen Interaktionspunkte mit verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden auf. Gerade hier kann aber deren Vorteil liegen. So handelt es sich z.B. bei Sorafenib um einen Multityrosinkinase-Inhibitor, der gleichzeitig eine Vielzahl onkogener Signalwege blockieren kann und so Zelltod induziert, Angiogenese inhibiert und somit das Tumorstadium beeinträchtigt. Daher galt unser primäres Interesse der Untersuchung der Auswirkungen von TKI auf die Induktion von Zelltod im HCC.

Zunächst wurden die Effekte von Sorafenib, Regorafenib, Cabozantinib und Lenvatinib auf der Ebene des Zellmetabolismus untersucht. Basierend auf diesen Experimenten konnten wir zeigen, dass es durch die Behandlung mit Sorafenib, Regorafenib, Cabozantinib und Lenvatinib zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der Zellviabilität kommt (Abb. 11).

Sorafenib hat zusätzlich eine anti-angiogene Wirkung durch direkte Interaktion mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) (167). Daneben blockiert Sorafenib eine Vielzahl von Tyrosinkinasen wie z.B. Raf und damit den Ras/Raf/MAPK-Signalweg, der Proliferation und Überleben von Tumorzellen steuert (168,169). Die Fähigkeit, multiple Kinasen zu inhibieren, beeinflusst auch die Expression und Aktivierung zahlreicher anderer tumorrelevanter Proteine, wie z.B. Mcl-1, ERK (extracellular signal-regulated kinase)- oder STAT3 (Signalwandler und Aktivator der Transkription) (170–172). Zusammenfassend wirkt Sorafenib sowohl antiproliferativ, anti-angiogenetisch und Zelltod-induzierend.

In vitro Daten anderer Gruppen legen nahe, dass Sorafenib ein limitierter Apoptose-Induktor in HCC-Zellen ist, sofern dieses Arzneimittel in der normalen Serumkonzentration angewendet wird. Eine Studie von Fernando et al. ergab, dass Sorafenib Apoptose in verschiedenen HCC-Zelllinien wie Hep3B, HepG2, SK-Hep1 und PLC/PRF/5 durch Hochregulierung des „BH3 only“-Proteins PUMA induziert (173). In unserer Studie, die im Vergleich zu der oben zitierten Studie den Fokus auf HepG2-Zellen legt, konnte in Übereinstimmung mit Fernando et al. mittels eines MTS- Assays gezeigt werden, dass Sorafenib eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität induziert. Fernando et al. nutzten in ihrer Studie eine Konzentration von 2

μM Sorafenib. Im Vergleich zu dieser Studie, haben wir in unserer Arbeit drei unterschiedliche Konzentrationen untersucht: eine der Serumkonzentration entsprechende Dosis von $4,5 \mu\text{M}$, eine der 2-fachen Serumkonzentration entsprechende Dosis von $9 \mu\text{M}$ und eine der 5-fachen Serumkonzentration entsprechende Dosis von $22,5 \mu\text{M}$. Im Gegensatz zu der oben genannten Studie von Fernando et al. konnte in unseren Untersuchungen der Sorafenib-abhängige Zelltod durch Zelltodinhibitoren (zVad-FMK und Nec-1) nicht blockiert werden. Zudem konnte auf Proteinebene keine gespaltene Caspase-3 als Surrogatparameter für aktive Apoptosevorgänge nachgewiesen werden, sodass basierend auf unseren Daten Sorafenib Apoptose nur in einem geringeren Umfang in therapeutischer Konzentration in den HepG2-Zellen induziert. Diese Ergebnisse unterstreichen das komplexe Wirkungsspektrum des Multityrosinkinase-Inhibitors Sorafenib. Durch die Hemmung einer Vielzahl von Signalwegen werden je nach Dosis und Zeitpunkt unterschiedliche Effekte auf die Induktion des Zelltodes vermittelt. Dies ist von besonderer klinischer Relevanz, da die Induktion einer entzündlichen oder immunologisch still verlaufenden Zelltodform sich auf den Behandlungserfolg auswirkt. Entzündliche Reaktionen führen zu einer Rekrutierung von Immunzellen, die die Behandlung unterstützen können. Eine überschießende inflammatorische Antwort kann hingegen die Gesundheit des Patienten gefährden beziehungsweise die Therapietoleranz deutlich einschränken.

Regorafenib ist ein oral applizierter TKI (174–176) und verwandt mit Sorafenib. Der Unterschied zwischen den beiden TKIs ist die Addition eines zusätzlichen Fluor-Atoms bei Regorafenib. Dadurch wird ein breiteres Hemmprofil und eine größere pharmakologische Aktivität ermöglicht (177). In Bezug auf die strukturelle Ähnlichkeit von Sorafenib und Regorafenib teilen beide Medikamente die Fähigkeit, verschiedene Tyrosinkinasen zu hemmen, die an Signalwegen beteiligt sind, die die Tumorentstehung und das Fortschreiten der malignen Transformation vermitteln (177).

Eine Studie von Carr et al. zeigt, dass Regorafenib die Zellproliferation der HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und PLC/PRF/5 konzentrations- und zeitabhängig reduziert (143). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die Effekte von Regorafenib auf den Zelltod untersucht. Wir konnten zeigen, dass Regorafenib *in vitro* zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität von HepG2-Zellen führt. Daher entsprechen unsere Ergebnisse den Daten der Studie von Carr et al. Wie bei Sorafenib

ist auch hier besonders interessant, welcher Zelltod bei welcher Konzentration und zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung auftritt.

Cabozantinib ist ein weiterer TKI, der eine wichtige Rolle bei der Hemmung von Onkogenese, Angiogenese, Metastasierung und Tumorwachstum spielt (178).

Die wenigen Studien, die den Cabozantinib-induzierten Zelltod im HCC adressieren, haben gezeigt, dass dieses Medikament eine antiproliferative Wirkung auf HCC-Zellen und andere humane Krebszelllinien hat. In Xenotransplantmodellen für das HCC und andere Tumorentitäten inhibiert Cabozantinib die Tumorproliferation und das Tumorwachstum (178,179). Yakes *et al.* und Xiang *et al.* demonstrierten darüber hinaus, dass Cabozantinib durch Inhibition von cMET und VEGF Apoptose initiiert (178). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeiten zeigen unsere Daten, dass Cabozantinib in HepG2-Zellen zu einem verlangsamten Stoffwechsel und somit zu verminderter Proliferation und gesteigertem Zelltod führt. Dieser Effekt war jedoch weniger ausgeprägt als nach Sorafenib- und Regorafenib-Behandlung.

Lenvatinib, ist ein Multityrosinkinase-Inhibitor mit überwiegend anti-angiogener Aktivität, der sich in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms, des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms und des HCCs als wirksam erwiesen hat. Für das HCC ist Lenvatinib in der Erstlinientherapie zugelassen. Lenvatinib vermittelt seine Aktivität durch Hemmung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptorfamilie (VEGFR1–3), der Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptorfamilie (FGFR1–4), des Thrombozyten Wachstumsfaktorrezeptors-alpha (PDGFR α) und des Tyrosinkinaserzeptors cKIT. Daher ist davon auszugehen, dass ein Teil der antitumorösen Wirkung von Lenvatinib durch eine Blockade der Blut- und somit Nährstoffversorgung der Tumorzellen vermittelt wird (42,46). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Lenvatinib die Zellviabilität von HepG2-Zellen *in vitro* nur minimal beeinflusst. Ein Effekt auf die Zellviabilität durch Behandlung mit Lenvatinib trat erst nach längerer Exposition auf. Dies ist nicht überraschend, da in unserem *in vitro* Modell stets eine optimale Nährstoffversorgung gegeben war, und die Zellen unabhängig von VEGFR, FGFR1 und PDGFR α proliferieren konnten.

Wir konnten zeigen, dass die unterschiedlichen TKI, v.a. Sorafenib, Regorafenib und Cabozantinib die Zellviabilität einschränken. Dies deckt sich mit den bisher veröffentlichten Studien anderer Arbeitsgruppen (135,140,143,178,179). An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass je nach verwendetem experimentellem Aufbau

entweder ein apoptotischer oder ein nekrotischer Zelltod induziert wurde. Für die Behandlung des HCC ist es wichtig, diesen Umstand differentiell zu betrachten und zu interpretieren, da Apoptose ohne Inflammation abläuft und ein nekrotischer Zelltod mit einer Entzündung einhergeht. Bei kleineren Tumoren könnte ein inflammatorischer Zelltod von Vorteil sein, da Zellen des Immunsystems durch die Entzündung zum Tumor rekrutiert werden und so die Therapie unterstützen können. Bei größeren Tumoren ist ein entzündlicher Zelltod jedoch ungünstig, da es zu massiven Schäden der umliegenden Organstrukturen durch große Inflammationsherde kommen kann. Hier wäre die Induktion eines apoptotischen Zelltods von Vorteil. Um die Ursachen für die Induktion der unterschiedlichen Zelltodformen zu analysieren, müssen *in vivo* Studien folgen. Hier kann man die Induktion und vor allem den Nutzen der unterschiedlichen Zelltodformen im Rahmen der Therapie genau untersuchen.

4.2 p53 und Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Bedeutung von p53 wird durch die Tatsache deutlich, dass p53 das am häufigsten mutierte Gen in humanen Tumoren ist. TKI nehmen in der Präzisionsonkologie einen wichtigen Platz ein, auch wenn ihre Wirksamkeit durch den Erwerb von Resistenzmechanismen eingeschränkt ist. Wenige Arbeiten haben sich bisher mit dem Zusammenhang zwischen TKI und p53 beschäftigt.

Eine im Jahr 2020 publizierte Studie von Rodríguez-Hernández et al. evaluierte u.a. die Rolle von p53 bei einer TKI-Behandlung (144). Dabei wurden Wildtyp-p53-Zellen (HepG2), Zellen mit *non-sense*-p53-Mutation (Hep3B), Zellen mit *inframe*-p53-Gendeletion (SNU423) und p53-Punktmutation (Huh7 und SNU449) untersucht. In dieser Studie wurden Sorafenib, Regorafenib, Cabozantinib und Lenvatinib in 2D- und 3D-Kulturen verwendet. Es zeigte sich, dass Sorafenib und Regorafenib in einer Konzentration von 10 µM die Zellproliferation wirksam reduzieren und Apoptose in gut differenzierten Wildtyp-p53-exprimierenden HCC-Zellen induzieren. Im Gegensatz dazu schienen Lenvatinib und Cabozantinib in einer Dosis von 10 µM in mäßig bis schlecht differenzierten Zellen mit mutiertem p53 oder ohne p53 wirksamer zu sein. In 2D-Kultur von Hep3B- und Huh7-Zellen zeigten Sorafenib und Regorafenib geringere antiproliferative und pro-apoptische Eigenschaften. Das Fehlen von funktionellem p53 in den meisten HCC-Zellen wurde als möglicher Mechanismus für eine Sorafenib-

Resistenz vorgeschlagen (164,180). Im Vergleich zu diesen Studien untersuchte unsere Arbeit HepG2-Zellen *in vitro* auf Zellviabilität. In diesem Versuchsansatz beobachten wir eine stärkere Abnahme der Zellviabilität nach Sorafenib- und Regorafenib-Behandlung im Vergleich zu Cabozantinib und Lenvatinib.

In dieser Arbeit wurde die Beziehung zwischen p53- Familie und TKI untersucht, bzw. ob TKI und die p53-Familie als ein Team oder als getrennte Spieler in der Bekämpfung des HCC (inter)agieren. Wir konnten zeigen, dass Sorafenib und Regorafenib zu einer p53 induzieren. Das ist für eine effiziente Induktion des Zelltodes im HCC von hoher klinischer Relevanz.

4.3 Kombinationsstrategien als neue Behandlungsoptionen beim HCC

Ein verbessertes Verständnis der Ätiologie von Tumorerkrankungen hat zu einer Ära molekular zielgerichteter Therapien geführt, die darauf abzielen, hochspezifisch zu sein und weniger Nebenwirkungen zu verursachen. Mit der Zulassung von Regorafenib als Zweitlinientherapie im Jahr 2017 ergab sich eine größere Anzahl an möglichen Therapiekombinationen. Die Arbeiten von Li et *al.* aus dem Jahr 2016 sowie von Cheng et *al.* und Faivre et *al.* aus dem Jahr 2019 zeigen die zahlreichen Behandlungsstrategien basierend auf *targeted therapies*, wie z.B. die Kombination von TKI und/oder monoklonalen Antikörper mit der konventionellen Chemotherapie (181,182). Auch wenn TKI als therapeutische Option für das HCC zugelassen sind, haben die meisten dieser Medikamente eine begrenzte Wirksamkeit bei der Kontrolle der Tumorprogression und die tatsächlichen klinischen Vorteile einer gezielten Therapie sind bisher noch limitiert (182–184).

Das Ziel neuer HCC-Therapien soll darin bestehen, mehrere molekulare Signal-Wege in der HCC-Kaskade mittels Kombinationsbehandlungen anzugreifen. Mit Hilfe von Kombinationsbehandlungen kann eine personalisierte Therapie und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeit die Idee einer Kombinationstherapie verfolgt. Die Kombination aus dem Chemotherapeutikum Bleomycin und dem HDACi Panobinostat wurde von uns als mögliche Kombinationsstrategie für die Entwicklung

einer neuen Therapieoption charakterisiert. Bleomycin und Panobinostat führen beide in HepG2-Zellen zu einer Induktion von p53.

4.3.1 Monotherapie mit Panobinostat und Bleomycin

Bisherige Daten legen nahe, dass ein dereguliertes Muster der HDAC-Expression mit der Karzinogenese beim HCC in Verbindung steht. Die Arbeit von Nam *et al.* beschreibt eine Induktion von HDACs der Klasse 1 (HDAC1- und HDAC2) im HCC im Vergleich zu prämaligen Läsionen (185). Beide, HDAC1 und HDAC2, sind mit einem überlebensfördernden Phänotyp in HCC-Zellen assoziiert. Die aberrante Expression von HDAC3 und HDAC8 potenziert das maligne Replikationspotential von HCC-Zellen weiter. Darüber hinaus fördern HDACs der Klasse II, einschließlich HDAC4, HDAC5, HDAC9 und HDAC10, die Proliferation von Krebszellen. Auch diese HDACs zeigen eine erhöhte Expression im HCC (186).

Panobinostat als Monotherapie ist daher eine vielversprechende Behandlungsoption aufgrund der vielfältigen Wirkungsweise: einerseits durch die Hemmung von HDACs (Klasse I, II, IV) und durch die Herunterregulation verschiedener microRNAs (hsa-miR-19a, hsa-miR-19b1 und hsa-miR-30a-5p) in Hep3B und HepG2 Zellen (132). Di Fazio *et al.* schlagen eine Anwendungsmöglichkeit von Panobinostat bei der Behandlung des HCC vor, da HCC-Zellen häufig defekte extrinsische und/oder intrinsische Apoptosewege aufweisen (128). Sie zeigen, dass HepG2- und Hep3B-Zellen auf Behandlung mit niedrigen Panobinostat-Dosen (0,1 μM) mit einer Verringerung der Zellproliferation und einer signifikanten Zunahme des apoptotischen Zelltods reagieren (128).

Ähnlich zu der Studie von Di Fazio *et al.* wurden in der vorliegenden Arbeit HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Panobinostat-Konzentrationen (0,1-5 μM) über zwei verschiedene Zeiträume (12h-24h) behandelt. Übereinstimmend mit unserer Studie zeigte sich ein Anstieg des spezifischen Zelltodes nach Behandlung mit Panobinostat. Panobinostat zeigte sich effektiv sowohl in niedrigeren Konzentrationen nach längerer Inkubation (48h wie bei Di Fazio *et al.*), als auch in höheren Konzentrationen mit kürzerer Inkubationszeit (128) .

Übereinstimmend mit Di Fazio et al. zeigte unsere Studie eine Panobinostat-induzierte zeit- und dosis-abhängige Aktivierung von Caspase-3. Jedoch zeigten Di Fazio et al. auch, dass gleichzeitig anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 induziert wurden (128). In unserer Arbeit erweitern wir die Untersuchungen auf zusätzliche anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder und zeigen, dass Bcl-X_L herunterreguliert und Mcl-1 induziert wird. Die Induktion von Mcl-1 und auch die Daten von Di Fazio zu Bcl-2 deuten darauf hin, dass in HepG2 Zellen, durch die Behandlung mit Panobinostat, Resistenzmechanismen in Form von anti-apoptotischen Proteinen - angeschaltet werden. Es ist daher davon auszugehen, dass der von Panobinostat induzierte Zelltod durch Inhibition dieser anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder weiter verstärkt werden könnte.

Wir konnten bereits publizieren, dass Bleomycin über p53 den CD95 Todesrezeptor induziert und somit über den *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) Apoptose einleitet (138,139,150). Desweiteren konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass Bleomycin auch zu einer Herunterregulation von Mcl-1 führt, wobei die Bcl-X_L Expression nahezu unverändert blieb. Dies weist daraufhin, dass beide Therapeutika – Panobinostat und Bleomycin - sich optimal ergänzen und mögliche Resistenzmechanismen durch diese spezifisch Wirkstoffkombination effizient umgangen werden können.

4.3.2 Eine neue Kombinationstherapie im HCC - Panobinostat in Kombination mit Bleomycin

Dass Kombinationen von Panobinostat mit anderen Therapeutika vielversprechend sind, wurde in einer Studie aus dem Jahr 2012 gezeigt. In dieser Untersuchung wurde die Kombination von Sorafenib mit Panobinostat, als Behandlungsoption für das HCC analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Behandlung die Proliferation der malignen Zellen deutlich reduziert und Autophagie- und Apoptoseraten induziert wurden (135). Verschiedene klinische Studien untersuchten daraufhin das Potenzial der Kombination von Panobinostat und Sorafenib. Keine dieser Studie erreichte jedoch bisher Phase 3 (186–189).

Suraweera et al. berichten über eine stärker ausgeprägte Sensibilisierung von Prostatakrebszellen nach Behandlung mit HDACi und DNA-schädigenden Agentien

wie Bleomycin, Doxorubicin und Etoposid (190). Nach unserer Kenntnis ist unsere Arbeit die erste, die das Potenzial der Kombination von Panobinostat und Bleomycin im HCC untersucht. Basierend auf unserer Hypothese, dass die Kombination von HDACi mit Therapien, die DNA-Schäden verursachen, zu einer Sensibilisierung von Krebszellen führen kann, untersuchten wir die Kombination von Bleomycin mit Panobinostat.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die Kombination von Bleomycin und Panobinostat zur Induktion von Apoptose führt. Diese konnte durch Caspaseinhibitoren blockiert werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass Panobinostat allein zu einer Herunterregulation des anti-apoptischen Proteins Bcl-X_L und zu einer Induktion von Mcl-1 führt, was für die Induktion eines Resistenzmechanismus spricht. Bleomycin reduziert die Mcl-1-Expression und würde diesem Mechanismus somit entgegenwirken. Dies bestätigte sich in unseren Versuchen. Die Kombination von Bleomycin und Panobinostat zeigte eine deutliche Herunterregulation von Mcl-1. Dies wurde auch durch eine erhöhte Apoptoseinduktion durch die Kombination beider Wirkstoffe gezeigt.

Eine Möglichkeit, um diese Kombination im klinischen Alltag zu nutzen, wäre die Verwendung beider Therapeutika im Rahmen einer TACE. Eine Studie von Wang *et al.* untersuchte die Sicherheit und Wirksamkeit der TACE unter Verwendung von Bleomycin zur Behandlung des intermediären HCCs (191). Hier zeigte sich eine höhere Überlebensrate und ein längeres tumorfreies Intervall. Die HDAC-Hemmung in Kombination mit Bleomycin bei Patienten mit HCC ist damit ein vielversprechender Behandlungsansatz, der weiter im Rahmen präklinische und klinischer Studien erforscht werden sollte. Hier ist insbesondere die Kombination auch mit lokoregionären Therapien vielversprechend.

Bleomycin und Panobinostat ergänzen sich in optimaler Weise. Panobinostat induziert effektiv Apoptose in HCC-Zellen. Durch diese Behandlung wird aber auch Mcl-1 induziert, sodass davon auszugehen ist, dass durch Inhibition der Mcl-1-Expression der Zelltod noch deutlich zu steigern wäre. Bleomycin hemmt die Mcl-1-Expression. Dies führt daher in der Kombination beider Therapeutika zu einer verstärkten Induktion der Apoptose in HCC-Zellen. Daher stellt die Kombinationstherapie von Bleomycin und Panobinostat einen neuen möglichen Ansatz zur Behandlung eines HCC dar.

5. Zusammenfassung

Mit über 800.000 Todesfällen pro Jahr ist das HCC das häufigste primäre Malignom der Leber und stellt eine der Hauptursachen für krebsbedingte Todesfälle weltweit dar. In fortgeschrittenen Stadien gibt es seit der Zulassung von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und monoklonalen Antikörpern eine zunehmende Anzahl an zugelassenen System-Therapeutika. Dabei rücken zum einen Kombinationstherapien – auch mit lokoregionären Therapien - in den therapeutischen Fokus, zum anderen stellt sich über die Zulassungssituation hinaus die klinisch-wissenschaftliche Frage einer optimalen und personalisierten Sequenz in der Anwendung der unterschiedlichen Therapeutika.

Auch wenn eine zielgerichtete Therapie die beste Option für Patienten mit fortgeschrittenem HCC darstellt, ist die Tumorbilogie des HCCs eine Herausforderung, da HCC ein Tumor ist, der schnell Chemoresistenzen entwickeln kann. Die Arzneimittelresistenz ist ein multifaktorielles Phänomen, bei dem p53-Mutationen bei fast jeder Art von Malignomen, insbesondere auch beim HCC, eine bedeutende Rolle spielen.

Die Wirkmechanismen verschiedener Therapeutika, wie *targeted therapies*, neutralisierender therapeutischer Antikörper, HDAC Inhibitoren und Chemotherapeutika sind komplex. Trotz unterschiedlicher Angriffspunkte gelingt es Tumoren und ganz besonders dem HCC Resistenzmechanismen gegen die verschiedenen Behandlungsoptionen zu entwickeln. Daher rücken immer mehr Kombinationstherapien zur Überwindung der Resistenz in der Behandlung eines HCC in den Vordergrund.

In der hier vorgestellten Arbeit habe ich zunächst die molekularen Wirkmechanismen verschiedener Therapeutika analysiert, um sich ergänzende Signalwege zu identifizieren und eine optimale Kombination von Wirkstoffen zu identifizieren.

Es stellte sich heraus, dass Panobinostat sehr effektiv Apoptose im HCC induziert. Dabei aktiviert Panobinostat die Initiator-Caspasen-8 und -9, die dann ihrerseits die Effektor-Caspase-3 spalten. Unsere Analysen deuten darauf hin, dass Caspase-8 über das Ripoptosom und Caspase-9 über das Apoptosom gespalten und aktiviert werden.

Sowohl die Bildung des Ripoptosoms als auch die des Apoptosoms sind vom Mitochondrium abhängig. Die Bildung des Ripoptosoms wird über Smac/Diablo und

die des Apoptosoms über die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum reguliert. Anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder kontrollieren hierbei die Integrität der mitochondrialen Membran und unterbinden die Freisetzung von Smac/Diablo und Cytochrom c.

Panobinostat reguliert mit Bcl-X_L ein wichtiges anti-apoptotisches Bcl-2 Protein herunter. Jedoch wird Mcl-1, ein weiteres anti-apoptotisches Bcl-2 Protein induziert. Dies ist ein gutes Beispiel für die Möglichkeit von Tumorzellen Resistenzmechanismen zu entwickeln und die Induktion von Apoptose zu minimieren oder um sie zu umgehen.

Bleomycin, ein Chemotherapeutikum, das DNA-Schäden induziert, reguliert Mcl-1 hingegen herunter, sodass eine Kombination mit Panobinostat sich optimal ergänzt. Die Kombinationsbehandlung aus Bleomycin und Panobinostat führt sowohl zur Inhibition der Expression von Bcl-X_L wie auch zur Herunterregulation von Mcl-1. Dadurch bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, was dann zu einer deutlichen Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-9 führt. Diese Caspasen spalten dann Caspase-3 und induzieren massiv Zelltod. Abbildung 30 fasst die wichtigsten Ergebnisse meiner Arbeit graphisch zusammen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Kombination aus zwei Anti-Tumor-Therapeutika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, wie Bleomycin und Panobinostat, durch die Induktion mehrerer Signalwege effizient Apoptose im HCC auslösen kann. Die Kombination dieser beiden Wirkstoffe ist somit ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung einer neuen Therapieoption für das HCC auch in Kombination mit loko-regionären Therapien wie der TACE.

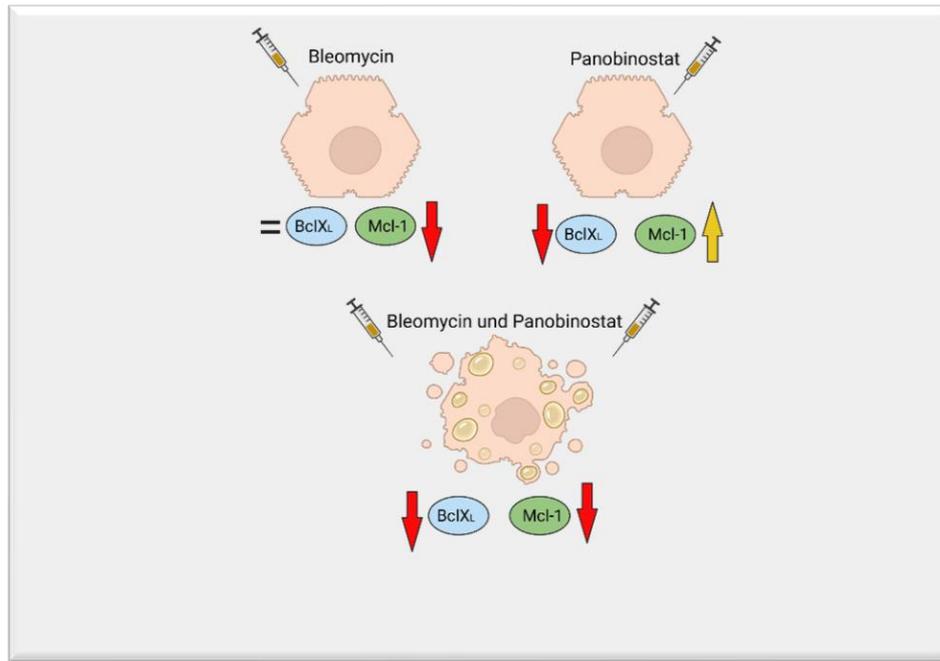


Abb. 30.: Kombination von Bleomycin und Panobinostat. Bleomycin reguliert Mcl-1 herunter. Panobinostat reguliert Bcl-X_L herunter und induziert die Expression von Mcl-1. Die Kombination beider Therapeutika reguliert beide anti-apoptischen Bcl-2 Familienmitglieder herunter und induziert daher deutlich effizientere Apoptose im HCC. Daher stellt eine Kombinationstherapie eine mögliche neue Behandlungsoption für das HCC dar.

6. Abkürzungsverzeichnis

μM = Mikromol

AASLD = American Association for the Study of Liver Diseases

AP-1 = Aktivator-Protein-1

APAF-1 = Apoptotic protease activating factor 1

ATP = Adenosintriphosphat

Bax = Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 = B-cell lymphoma 2

Bcl-2-L10 = Bcl-2-like protein 10

Bcl-B = B-cell lymphoma B

BCLC = Barcelona Clinic Liver Cancer

Bcl-X_L = B-cell lymphoma-extra large

Bcl-X_S = B-cell lymphoma-extra small

BH3 = Bcl-2 homology (BH) domain 3

BID = BH3 interacting-domain death agonist

Bok/Mtd = Bcl-2 related ovarian killer/Matador

Boo (Diva) = Bcl-2 homolog of ovary

CdK = Cyclin-dependent kinases

c-FLIP = cellular FLICE-like inhibitory protein

d.F. = der Fälle

DAMP = damage-associated molecular-pattern

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DBD = DNA-Bindungsdomäne

DEB-TACE = drug-eluting bead transarterielle Chemoembolisation

EASL = European Association for the Study of the Liver

ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group,

ERK = Extracellular-signal Regulated Kinase

FADD = Fas-associated protein with death domain

FGF = Fibroblast Growth Factor

HBV = Hepatitis B Virus

HCC = hepatocellular carcinoma

HCV = Hepatitis C Virus

HDV = Hepatitis D Virus

kDa = Kilodalton

Mcl-1 = myeloid leukemia cell differentiation protein

Mdm2 = Mouse double minute 2 homolog

MLKL = Mixed lineage kinase domain-like protein

mM = Millimol

MOMP = Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease

NASH = non-alcoholic steatohepatitis

NF κ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

o.g. = oben genannt

PARP = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF- β = Platelet-derived growth factor β

Abkürzungsverzeichnis

PRD = Proline-rich sequence
recognition domains

RAF = Rapidly Accelerated
Fibrosarcoma

RET = rearranged during transfection

RFA = Radiofrequency ablation

RIP = Radiofrequency ablation

ROS = Reactive oxygen species

SAM = Sterile-Alpha-Motif Domain

TACE = transarterielle
Chemoembolisation

TAD = Transaktivierungsdomäne

TID = transactivation-inhibitory (TI)
domain

TNF = tumor necrosis factor

v.a. = vor allem

VEGF = Vascular Endothelial Growth
Factor

Z-VAD-FMK = Benzyloxycarbonyl-Val-
Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone

z.B. = zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. - PubMed - NCBI [Internet]. [zitiert 22. November 2019]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29628281>
2. Kirstein MM, Vogel A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Basel Switz.* 2014;32(5):545–53.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, u. a. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 1. März 2015;136(5):E359-386.
4. McGlynn KA, London WT. The Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma, Present and Future. *Clin Liver Dis.* Mai 2011;15(2):223–x.
5. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog.* 2017;16:1.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, u. a. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* Mai 2021;71(3):209–49.
7. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, u. a. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primer.* 21. Januar 2021;7(1):1–28.
8. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* April 2021;18(4):223–38.
9. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, u. a. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol.* 1. Oktober 2018;69(4):896–904.
10. El-Serag HB, Davila JA. Surveillance for hepatocellular carcinoma: in whom and how? *Ther Adv Gastroenterol.* Januar 2011;4(1):5–10.
11. Puoti C. New insights on hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects [Internet]. [zitiert 19. Juni 2020]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.20517/2394-5079.2018.67>
12. Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, u. a. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 01 2017;3(12):1683–91.
13. Dhanasekaran R, Bando S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research.* 12. Mai 2016;5:879.
14. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Baltim Md.* Januar 2021;73 Suppl 1:4–13.

15. Schwertheim S, Westerwick D, Jastrow H, Theurer S, Schaefer CM, Kälsch J, u. a. Intranuclear inclusions in hepatocellular carcinoma contain autophagy-associated proteins and correlate with prolonged survival. *J Pathol Clin Res.* 2019;5(3):164–76.
16. Ho DWH, Lo RCL, Chan LK, Ng IOL. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer.* Oktober 2016;5(4):290–302.
17. Karin M. New insights into the pathogenesis and treatment of non-viral hepatocellular carcinoma: a balancing act between immunosuppression and immunosurveillance. *Precis Clin Med.* Juni 2018;1(1):21–8.
18. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* August 2002;31(4):339–46.
19. Donati B, Valenti L. Telomeres, NAFLD and Chronic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 15. März 2016;17(3):383.
20. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention – IARC [Internet]. [zitiert 24. Oktober 2021]. Verfügbar unter: <https://www.iarc.who.int/featured-news/new-world-cancer-report/>
21. Krebs - Krebs in Deutschland - Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Internet]. [zitiert 24. Oktober 2021]. Verfügbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html
22. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* September 2006;6(9):674–87.
23. Tejeda-Maldonado J, García-Juárez I, Aguirre-Valadez J, González-Aguirre A, Vilatobá-Chapa M, Armengol-Alonso A, u. a. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: An update. *World J Hepatol.* 27. März 2015;7(3):362–76.
24. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, u. a. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology Baltim Md.* 2018;68(2):723–50.
25. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, u. a. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primer.* 21. Januar 2021;7(1):1–28.
26. Matsushita H, Takaki A. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *BMJ Open Gastroenterol.* 2019;6(1):e000260.
27. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med.* Februar 2006;147(2):58–66.
28. Fitzmorris P, Singal AK. Surveillance and Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol.* Januar 2015;11(1):38–46.
29. Sun VCY, Sarna L. Symptom management in hepatocellular carcinoma. *Clin J Oncol Nurs.* Oktober 2008;12(5):759–66.
30. Momin BR, Pinheiro PS, Carreira H, Li C, Weir HK. Liver cancer survival in the United States by race and stage (2001–2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer.* 15. Dezember 2017;123 Suppl 24:5059–78.

31. Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J*. Januar 2000;76(891):4–11.
32. Herold G. *Innere Medizin*. ISBN: 978-3-9814660-8-9. - Google Search [Internet]. [zitiert 27. November 2019]. Verfügbar unter: https://www.google.com/search?rlz=1C1SQJL_enDE851DE876&sxsrf=ACYBGNTDsndqDxpEwnbu_Bmlk-6pZr8_Ew%3A1574845582819&ei=jjzeXc_SMYHxkwWH4aagAg&q=Herold+G.+Innere+Medizin.+ISBN%3A+978-3-9814660-8-9.&oq=Herold+G.+Innere+Medizin.+ISBN%3A+978-3-9814660-8-9.&gs_l=psy-ab.3...3986.4599..5048...0.2..0.78.273.4.....0....1..gws-wiz.....0i71.M4_9skVKfaQ&ved=0ahUKEwjP0aj8hirmAhWB-KQKHYewCSQQ4dUDCA&uact=5
33. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, u. a. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. Mai 2018;154(6):1706-1718.e1.
34. Grammer S. Hepatozelluläres Karzinom und biliäre Karzinome. 2021;207.
35. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329–38.
36. Mezale D, Strumfa I, Vanags A, Kalva A, Balodis D, Strumfs B, u. a. Diagnostic Algorithm of Hepatocellular Carcinoma: Classics and Innovations in Radiology and Pathology. *Hepatocell Carcinoma - Adv Diagn Treat* [Internet]. 5. November 2018 [zitiert 19. Juni 2020]; Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/hepatocellular-carcinoma-advances-in-diagnosis-and-treatment/diagnostic-algorithm-of-hepatocellular-carcinoma-classics-and-innovations-in-radiology-and-pathology>
37. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. April 2012;56(4):908–43.
38. Yao FY, Fidelman N. Reassessing the boundaries of liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Where do we stand with tumor down-staging? *Hepatol Baltim Md*. März 2016;63(3):1014–25.
39. Soldera J, Balbinot SS, Balbinot RA, Cavalcanti AG. Diagnostic and Therapeutic Approaches to Hepatocellular Carcinoma: Understanding the Barcelona Clínic Liver Cancer Protocol. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2016;9:67–71.
40. van Meer S, de Man RA, van den Berg AP, Houwen RHJ, Linn FHH, van Oijen MGH, u. a. No increased risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis due to Wilson disease during long-term follow-up. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(3):535–9.
41. Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, u. a. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Gastrointestin Liver Dis*. 1. September 2010;19(3):311–7.
42. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, u. a. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 24. März 2018;391(10126):1163–73.
43. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, u. a. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 14. Mai 2020;382(20):1894–905.

44. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, u. a. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 24. Juli 2008;359(4):378–90.
45. Cosma LS, Weigand K, Müller-Schilling M, Kandulski A. Lenvatinib as First-line Treatment of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Impaired Liver Function in Advanced Liver Cirrhosis: Real World Data and Experience of a Tertiary Hepatobiliary Center. *J Gastrointest Liver Dis*. 18. Juni 2021;30(2):247–53.
46. Oikonomopoulos G, Aravind P, Sarker D. Lenvatinib: a potential breakthrough in advanced hepatocellular carcinoma? *Future Oncol Lond Engl*. Februar 2016;12(4):465–76.
47. Sun T, Liu H, Ming L. Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2017;44(2):716–27.
48. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, u. a. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 07 2017;389(10064):56–66.
49. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, u. a. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 5. Juli 2018;379(1):54–63.
50. Nault JC. The end of almost 10 years of negative RCTs in advanced hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 7. Januar 2017;389(10064):4–6.
51. Llovet JM, Montal R, Villanueva A. Randomized trials and endpoints in advanced HCC: Role of PFS as a surrogate of survival. *J Hepatol*. 1. Juni 2019;70(6):1262–77.
52. Blaya D, Aguilar-Bravo B, Hao F, Casacuberta-Serra S, Coll M, Perea L, u. a. Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury. *Hepatol Baltim Md*. 2018;68(2):691–706.
53. Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, u. a. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 1. Februar 2019;20(2):282–96.
54. Jain A, Chitturi S, Peters G, Yip D. Atezolizumab and bevacizumab as first line therapy in advanced hepatocellular carcinoma: Practical considerations in routine clinical practice. *World J Hepatol*. 27. September 2021;13(9):1132–42.
55. Beal EW, Tumin D, Kabir A, Moris D, Zhang XF, Chakedis J, u. a. Trends in the Mortality of Hepatocellular Carcinoma in the United States. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. Dezember 2017;21(12):2033–8.
56. Kelly CM, Shahrokni A. Moving beyond Karnofsky and ECOG Performance Status Assessments with New Technologies. *J Oncol [Internet]*. 2016 [zitiert 18. Oktober 2020];2016. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811104/>
57. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2009;9(10):749–58.
58. Sethi I, Romano RA, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, u. a. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 7. August 2015;16(1):584.

59. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, u. a. p63, a p53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol Cell*. 1. September 1998;2(3):305–16.
60. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, u. a. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 22. August 1997;90(4):809–19.
61. Soussi T. The history of p53. *EMBO Rep*. November 2010;11(11):822–6.
62. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res*. 19. Dezember 2016;5(6):632–8.
63. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. Mai 1979;17(1):43–52.
64. Beck J, Turnquist C, Horikawa I, Harris C. Targeting cellular senescence in cancer and aging: roles of p53 and its isoforms. *Carcinogenesis*. 12. August 2020;41(8):1017–29.
65. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. August 2021;1876(1):188556.
66. Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol*. 2016;6:77.
67. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 17. März 2014;25(3):304–17.
68. Kim H, Kim K, Choi J, Heo K, Baek HJ, Roeder RG, u. a. p53 Requires an Intact C-Terminal Domain for DNA Binding and Transactivation. *J Mol Biol*. 3. Februar 2012;415(5):843–54.
69. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets Ther*. 19. Dezember 2013;7:57–68.
70. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. September 2010;2(9):a004887.
71. Labuschagne CF, Zani F, Vousden KH. Control of metabolism by p53 - Cancer and beyond. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870(1):32–42.
72. Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, u. a. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*. 6. Mai 2004;429(6987):86–92.
73. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 22. Dezember 1997;420(1):25–7.
74. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 15. Mai 1997;387(6630):296–9.
75. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):359–70.
76. Carr MI, Jones SN. Regulation of the Mdm2-p53 signaling axis in the DNA damage response and tumorigenesis. *Transl Cancer Res*. Dezember 2016;5(6):707–24.

77. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 7. September 2017;170(6):1062–78.
78. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, u. a. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. Juli 2007;14(7):1237–43.
79. Aizawa S, Brar G, Tsukamoto H. Cell Death and Liver Disease. *Gut Liver*. 15 2020;14(1):20–9.
80. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. August 1972;26(4):239–57.
81. Krammer PH, Kamiński M, Kiessling M, Gülow K. No life without death. *Adv Cancer Res*. 2007;97:111–38.
82. Kamiński MM, Röth D, Krammer PH, Gülow K. Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. Oktober 2013;61(5):367–84.
83. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*. 23. Juni 2001;322(7301):1536–8.
84. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. Juni 2007;35(4):495–516.
85. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*. Januar 2011;1813(1):238–59.
86. Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*. Oktober 2018;45(5):1469–78.
87. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie*. Dezember 2008;31(12):702–6.
88. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. August 2002;31(4):214–23.
89. Olasode BJ. Dying by default, the biology of apoptosis: a review. *East Afr Med J*. Februar 1997;74(2):108–11.
90. Taschenlehrbuch Biochemie (E-Book PDF) - Thieme.de - Thieme Webshop - Gerd P. Püschel, Hartmut Kühn, Thomas Kietzmann, Wolfgang Höhne, Bruno Christ [Internet]. Thieme Webshop. [zitiert 27. Mai 2020]. Verfügbar unter: <http://www.thieme.de/shop/Biochemie/Pueschel-Kuehn-Kietzmann-Hoehne-Christ-Taschenlehrbuch-Biochemie-9783132429031/p/00000000255424402>
91. Allart S, Martin H, Detraves C, Terrasson J, Caput D, Davrinche C. Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of deltaN-p73alpha. *J Biol Chem*. 9. August 2002;277(32):29063–8.
92. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, u. a. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. März 2018;25(3):486–541.
93. Lavrik IN, Eils R, Fricker N, Pforr C, Krammer PH. Understanding apoptosis by systems biology approaches. *Mol Biosyst*. 16. September 2009;5(10):1105–11.

94. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2015;16(6):2129–44.
95. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 15. Januar 2005;118(2):265–7.
96. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. Juli 2016;37(7):8471–86.
97. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016;8(4):603–19.
98. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*. 4. April 2003;139(2–3):89–97.
99. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, u. a. A Cell’s Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 24. August 2019;20(17).
100. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175–93.
101. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. Dezember 2008;27(Suppl 1):S2-19.
102. Delbridge ARD, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ*. Juli 2015;22(7):1071–80.
103. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*. 28. August 1998;281(5381):1322–6.
104. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 23. April 1999;274(17):11549–56.
105. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, u. a. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. September 2001;8(3):705–11.
106. Choudhury S. A comparative analysis of BCL-2 family. *Bioinformatics*. 2019;15(4):299–306.
107. Davey GM, Kurts C, Miller JFAP, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, u. a. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med*. 7. Oktober 2002;196(7):947–55.
108. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*. 6. August 1999;274(32):22686–92.
109. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. Mai 2009;1787(5):414.
110. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oktober 2010;11(10):700–14.
111. Schneider AT, Gautheron J, Feoktistova M, Roderburg C, Loosen SH, Roy S, u. a. RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell*. 09 2017;31(1):94–109.

Literaturverzeichnis

112. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* Mai 2019;29(5):347–64.
113. Sprooten J, De Wijngaert P, Vanmeerbeek I, Martin S, Vangheluwe P, Schlenner S, u. a. Necroptosis in Immuno-Oncology and Cancer Immunotherapy. *Cells.* August 2020;9(8):1823.
114. Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* 2015;282(1):19–31.
115. Feoktistova M, Wallberg F, Tenev T, Geserick P, Leverkus M, Meier P. Techniques to Distinguish Apoptosis from Necroptosis. *Cold Spring Harb Protoc.* 4. Januar 2016;2016(4):pdb.top070375.
116. Feoktistova M, Geserick P, Panayotova-Dimitrova D, Leverkus M. Pick your poison: the Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis. *Cell Cycle Georget Tex.* 1. Februar 2012;11(3):460–7.
117. Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276(1):G1-6.
118. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* Dezember 2004;16(6):663–9.
119. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1184–95.
120. He S, Huang S, Shen Z. Biomarkers for the detection of necroptosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2016;73(11–12):2177–81.
121. Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther.* 2016;17(9):899–910.
122. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* Juni 2019;43(6):582–92.
123. Schroeder A, Warnken U, Röth D, Klika KD, Vobis D, Barnert A, u. a. Targeting Thioredoxin-1 by dimethyl fumarate induces ripoptosome-mediated cell death. *Sci Rep.* März 2017;7(1):43168.
124. Yu H, Guo P, Xie X, Wang Y, Chen G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *J Cell Mol Med.* 2017;21(4):648–57.
125. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res.* 1. Januar 2011;3(2):166–79.
126. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1. April 2014;6(4):a018713.
127. Gahr S, Mayr C, Kiesslich T, Illig R, Neureiter D, Alinger B, u. a. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat affects angiogenesis in hepatocellular carcinoma models via modulation of CTGF expression. *Int J Oncol.* 1. September 2015;47(3):963–70.
128. Di Fazio P, Schneider-Stock R, Neureiter D, Okamoto K, Wissniowski T, Gahr S, u. a. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat inhibits growth of hepatocellular carcinoma models by alternative pathways of apoptosis. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol.* 1. Januar 2010;32(4):285–300.

129. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 13. August 2007;26(37):5541–52.
130. Liu KY, Wang LT, Hsu SH. Modification of Epigenetic Histone Acetylation in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 3. Januar 2018;10:8.
131. DI FAZIO P, MONTALBANO R, QUINT K, ALINGER B, KEMMERLING R, KIESSLICH T, u. a. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in hepatocellular carcinoma models. *Oncol Lett*. Januar 2013;5(1):127–34.
132. Henrici A, Montalbano R, Neureiter D, Krause M, Stiewe T, Slater EP, u. a. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat suppresses the expression of oncogenic miRNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Carcinog*. August 2015;54(8):585–97.
133. Di Fazio P, Montalbano R, Neureiter D, Alinger B, Schmidt A, Merkel AL, u. a. Downregulation of HMGA2 by the pan-deacetylase inhibitor panobinostat is dependent on hsa-let-7b expression in liver cancer cell lines. *Exp Cell Res*. 10. September 2012;318(15):1832–43.
134. Song X, Wang J, Zheng T, Song R, Liang Y, Bhatta N, u. a. LBH589 Inhibits proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via inhibition of gankyrin/stat3/akt pathway. *Mol Cancer*. 5. Oktober 2013;12:114.
135. Lachenmayer A, Toffanin S, Cabellos L, Alsinet C, Hoshida Y, Villanueva A, u. a. Combination therapy for hepatocellular carcinoma: Additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *J Hepatol*. Juni 2012;56(6):1343–50.
136. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. Dezember 1979;282(5739):615–6.
137. Kabakov AE, Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. In: Calderwood SK, Prince TL, Herausgeber. *Chaperones: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [zitiert 20. Oktober 2020]. S. 107–27. (Methods in Molecular Biology). Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9
138. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, u. a. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer*. 2010;126(9):2049–66.
139. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, u. a. p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. *J Exp Med*. 7. Dezember 1998;188(11):2033–45.
140. Ramucirumab and GSK1838705A Enhance the Inhibitory Effects of Low Concentration Sorafenib and Regorafenib Combination on HCC Cell Growth and Motility [Internet]. [zitiert 23. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627995/>
141. Rodríguez-Hernández A, Navarro-Villarán E, González R, Pereira S, Soriano-De Castro LB, Sarrias-Giménez A, u. a. Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by Sorafenib in hepatoblastoma cells. *Redox Biol*. 22. Juli 2015;6:174–82.
142. Ferrari SM, La Motta C, Elia G, Ragusa F, Ruffilli I, Quattrini L, u. a. Antineoplastic Effect of Lenvatinib and Vandetanib in Primary Anaplastic Thyroid Cancer Cells Obtained From Biopsy or Fine Needle Aspiration. *Front Endocrinol* [Internet]. 2018 [zitiert 23. Oktober 2020];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00764/full>

143. Carr BI, Cavallini A, Lippolis C, D'Alessandro R, Messa C, Refolo MG, u. a. Fluoro-sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence and recovery. *J Cell Physiol.* Februar 2013;228(2):292–7.
144. Rodríguez-Hernández MA, Chapresto-Garzón R, Cadenas M, Navarro-Villarán E, Negrete M, Gómez-Bravo MA, u. a. Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death Dis.* 7. Mai 2020;11(5):1–10.
145. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* Dezember 2005;315(3):971–9.
146. Wai Ling Khoo TS, Rehman A, Olynyk JK. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. In: Tirnitz-Parker JEE, Herausgeber. *Hepatocellular Carcinoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2019 [zitiert 11. April 2020]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549199/>
147. Mingard C, Paech F, Bouitbir J, Krähenbühl S. Mechanisms of toxicity associated with six tyrosine kinase inhibitors in human hepatocyte cell lines. *J Appl Toxicol JAT.* 2018;38(3):418–31.
148. Moore D. Panobinostat (Farydak): A Novel Option for the Treatment of Relapsed Or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Pharm Ther.* Mai 2016;41(5):296–300.
149. Kaminski M, Kiessling M, Süß D, Krammer PH, Gülow K. Novel role for mitochondria: protein kinase C-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol.* Mai 2007;27(10):3625–39.
150. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, u. a. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest.* 1. Februar 1997;99(3):403–13.
151. Watanabe J, Kushihata F. 7 - The Detection and Clinical Aspect of Immunohistochemical Analysis of Bcl-xL Protein in Hepatocellular Carcinoma. In: Hayat MA, Herausgeber. *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas* [Internet]. Academic Press; 2005 [zitiert 21. April 2020]. S. 201–5. (Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas, Volume 3; Bd. 3). Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874578405800248>
152. Yu Q, Liu ZY, Chen Q, Lin JS. Mcl-1 as a potential therapeutic target for human hepatocellular carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban.* August 2016;36(4):494–500.
153. Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M, u. a. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 1. Januar 2006;28(1):25–32.
154. Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, u. a. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol.* Januar 2006;44(1):151–7.
155. El Jabbour T, Lagana SM, Lee H. Update on hepatocellular carcinoma: Pathologists' review. *World J Gastroenterol.* 14. April 2019;25(14):1653–65.

156. Samonakis DN, Kouroumalis EA. Systemic treatment for hepatocellular carcinoma: Still unmet expectations. *World J Hepatol.* 18. Januar 2017;9(2):80–90.
157. Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. April 2014;20(8):2072–9.
158. Pagliarini R, Shao W, Sellers WR. Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Rep.* März 2015;16(3):280–96.
159. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* Dezember 2006;9(6):288–306.
160. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, u. a. TAp63 α induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 6. Juli 2005;24(13):2458–71.
161. Müller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, u. a. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* Dezember 2005;12(12):1564–77.
162. Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Müller M. Dominant negative (Δ N) p63 α induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 28. Mai 2010;396(2):335–41.
163. Schuster A, Schilling T, Laurenzi V, Koch A, Seitz S, Staib F, u. a. Δ Np73 β is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle Georget Tex.* 1. Juli 2010;9:2629–39.
164. Brost S, Thomas AL, Quack C, Bantel H, Falk CS, Müller M. The multikinase inhibitor sorafenib induces p53 family-dependent apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Z Für Gastroenterol.* August 2013;51(8):K83.
165. Bteich F, Di Bisceglie AM. Current and Future Systemic Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol.* Mai 2019;15(5):266–72.
166. Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* April 2003;2(4):296–313.
167. 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.* 1. Oktober 2008;7(10):3129–40.
168. Kurosu T, Ohki M, Wu N, Kagechika H, Miura O. Sorafenib Induces Apoptosis Specifically in Cells Expressing BCR/ABL by Inhibiting Its Kinase Activity to Activate the Intrinsic Mitochondrial Pathway. *Cancer Res.* 1. Mai 2009;69(9):3927–36.
169. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, u. a. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 15. Dezember 2006;66(24):11851–8.

170. Chen KF, Tai WT, Liu TH, Huang HP, Lin YC, Shiau CW, u. a. Sorafenib Overcomes TRAIL Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells through the Inhibition of STAT3. *Clin Cancer Res.* 1. November 2010;16(21):5189–99.
171. Blechacz BRA, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ. Sorafenib Inhibits Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Signaling in Cholangiocarcinoma Cells by Activating the Phosphatase Shatterproof 2. *HepatoL Baltim Md.* Dezember 2009;50(6):1861–70.
172. Tai WT, Cheng AL, Shiau CW, Huang HP, Huang JW, Chen PJ, u. a. Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1. November 2011;55(5):1041–8.
173. Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM, Lledó JL, Caja L, Campbell JS, u. a. SORAFENIB SENSITIZES HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS TO PHYSIOLOGICAL APOPTOTIC STIMULI. *J Cell Physiol.* April 2012;227(4):1319–25.
174. Ferraro D, Zalcborg J. Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors: clinical evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol.* September 2014;6(5):222–8.
175. Schroeder B, Li Z, Cranmer LD, Jones RL, Pollack SM. Targeting gastrointestinal stromal tumors: the role of regorafenib. *OncoTargets Ther.* 2016;9:3009–16.
176. Mei L, Du W, Idowu M, von Mehren M, Boikos SA. Advances and Challenges on Management of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Front Oncol.* 2018;8:135.
177. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* Oktober 2018;15(10):599–616.
178. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, u. a. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther.* Dezember 2011;10(12):2298–308.
179. Xiang Q, Chen W, Ren M, Wang J, Zhang H, Deng DYB, u. a. Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. Juni 2014;20(11):2959–70.
180. Wei J chao, Meng F di, Qu K, Wang Z xin, Wu Q fei, Zhang L qiang, u. a. Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacol Sin.* Februar 2015;36(2):241–51.
181. Faivre S, Rimassa L, Finn RS. Molecular therapies for HCC: Looking outside the box. *J Hepatol.* Februar 2020;72(2):342–52.
182. Cheng AL, Hsu C, Chan SL, Choo SP, Kudo M. Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1. Februar 2020;72(2):307–19.
183. Lin J, Wu L, Bai X, Xie Y, Wang A, Zhang H, u. a. Combination treatment including targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 25. Oktober 2016;7(43):71036–51.
184. Faivre S, Rimassa L, Finn RS. Molecular therapies for HCC: Looking outside the box. *J Hepatol.* Februar 2020;72(2):342–52.

Literaturverzeichnis

185. Nam SW, Park JY, Ramasamy A, Shevade S, Islam A, Long PM, u. a. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology*. 2005;42(4):809–18.
186. Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Moris D, Spartalis E, Pawlik TM. Histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma: A therapeutic perspective. *Surg Oncol*. Dezember 2018;27(4):611–8.
187. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov*. September 2014;13(9):673–91.
188. Papeleu P, Vanhaecke T, Elaut G, Vinken M, Henkens T, Snykers S, u. a. Differential Effects of Histone Deacetylase Inhibitors in Tumor and Normal Cells—What Is the Toxicological Relevance? *Crit Rev Toxicol*. 1. Januar 2005;35(4):363–78.
189. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 6. Juli 2012;150(1):12–27.
190. Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol*. 2018;8:92.
191. Wang Y, Fu JX, Zhang JL, Yuan K, Yuan B, Yuan HJ, u. a. [Transarterial chemoembolization with bleomycin treatment for moderate-advanced hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 23. Oktober 2018;98(39):3166–70.

8. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Patricia-Iuliana Mester-Pavel, geboren am 26.06.1991 in Constanța, Rumänien erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

9. Danksagung

Am Schluss meiner Doktorarbeit möchte ich doch das Wichtigste nicht vergessen, mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich während meiner akademischen Laufbahn begleitet haben und mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling, die mich als Doktorandin in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Herzlichen Dank für die Vergabe dieses interessanten Themas aus dem gastroenterologischen Forschungsgebiet, einem Feld, in dem ich in Zukunft tätig sein will. Danke für die stetige Unterstützung auf fachlicher und persönlicher Ebene, für das Ermöglichen der Präsentation meiner Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen, sowie für Ihre engagierte Betreuung. Ihre motivierende Art und Ihre Präsenz waren mir über die gesamte Zeit eine große Unterstützung. Danke auch für Ihre Rolle als Mentorin und für die wertvollen Erkenntnisse, die mich in meiner klinischen und akademischen Karriere begleiten werden.

Einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit haben PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow und PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst geleistet. Ihnen möchte ich besonders für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit danken, insbesondere für die sehr intensiven Besprechungen. Sie hatten stets ein offenes Ohr für die anstehenden Probleme und halfen mir mit konstruktiven Ratschlägen und Diskussionsansätzen, um manche Hürde zu überwinden.

Mein Dank geht auch an das ganze Team der Arbeitsgruppe Müller-Schilling, insbesondere an Elisabeth Aschenbrenner für die geduldige Einarbeitung in das Thema und die einzelnen Methoden, die gute Betreuung während der ganzen Zeit und die schnelle Hilfe bei Fragen und Problemen, sowie für die große Geduld! Wie Marie Curie gesagt hat: *„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt“*. Danke Lisa, dass Du mit deinem Enthusiasmus und immer guten Laune diese Märchenwelt in meinen Augen geöffnet hast!

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe danke ich für die sehr freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei allen Fragen: Dr. rer. pysiol. Marika Haderer, Marlen Michalski, Kirstin Pollinger, Heidi Gschwendtner, Manuela Gunckel und Martina

Danksagung

Meisinger. Zudem möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Arne Kandulski für seine Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Vlad der immer auf meiner Seite stand und mich mit großem Engagement unterstützte. Danke für Deine innovativen Ideen, Deine Geduld und die vielen konstruktiven Gespräche.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die ihr ganzes Leben auf meiner Seite standen und die mir immer Liebe und Geduld geschenkt haben. Danke von ganzem Herzen für die Unterstützung, das Verständnis, die Geduld, die aufmunternden Worten in den schwierigsten Zeiten und dass Ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet. Danke Mutti für deine regelrechte konstruktive Kritik und danke Euch beiden, Mutti und Vati, dass Lob nur gegeben wurde, wenn es verdient war!

Ohne Euch wäre ich nicht die Person, die ich heute bin und dafür werde ich Euch mein ganzes Leben dankbar sein!

Herzlichen Dank!

10. Lebenslauf

<p>Patricia- Iuliana Mester-Pavel</p> <p>Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I</p> <p>Gastroenterologie, Endokrinologie, Rheumatologie und Infektiologie</p> <p>Universitätsklinikum Regensburg</p> <p>Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg</p> <p>Tel: + 49 941 944-17130</p> <p>Email: patricia.mester@ukr.de</p>		
<p>Werdegang</p>		
<p>Beruflicher Werdegang</p>	<p>November 2017- Zurzeit</p> <p>Mai 2017 - Oktober 2017</p>	<p>Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I Klinikdirektorin: Prof. Dr. med. M. Müller-Schilling, MHBA Funktion: Assistenzärztin für Innere Medizin</p> <p>Klinik Donaustauf Zentrum für Pneumologie, psychosomatische Medizin und Psychotherapie Chefarzt Prof. Dr. M. Pfeifer Funktion: Assistenzärztin für Innere Medizin</p>
<p>Qualifikationen</p>	<p>2021</p> <p>2019</p>	<p>Zusatzbezeichnung Notfallmedizin Bayerische Landesärztekammer</p> <p>Kurs für Prüfer und Mitglieder der Prüfgruppe nach dem Arzneimittelgesetz (AMG), Universitätsklinikum, Regensburg</p>
<p>Studium</p>	<p>2010-2016</p>	<p>Studium der Humanmedizin Fakultät für Medizin und Pharmazie Universität "Ovidius" Constanța, Rumänien</p>
<p>Titel Dissertation</p>	<p>2022</p>	<p>Wirkmechanismen von <i>targeted therapies</i> und die Entwicklung neuer Kombinationstherapien zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms</p>

Titel Lizenzarbeit	2016	„Boutonneuse-Fieber bei Kindern. Klinisch-epidemiologische Berücksichtigungen“
Forschung		
Preise/ Stipendien	2020	Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
	2019	Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
	2019	Stipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin European Federation of Internal Medicine Summer-School, Ede, Holland
	2018	Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
Sprachkenntnisse	Rumänisch	Muttersprache
	Deutsch	C1-Zertifikat Deutsches Sprachdiplom der Kultusminister der Länder in der Bundesrepublik Deutschland
	English	First Certificate in English, University of Cambridge
Außerberufliches Engagement		
Ehrenamtliche Tätigkeiten	2010	Mitglied des „Demokratischen Forums der Deutschen in Rumänien“
	2013	Gründungsmitglied des „Lions Club Balkanica“ Constanța

Publikationen/ Veröffentlichungen

Mester P., Pavel V., Schlosser S., Haimerl M., Utpatel K., Kunst C., Gülow K., Müller-Schilling M., Schmid S., Eine seltene fokale Raumforderung parenchymatöser Oberbauchorgane. *Der Gastroenterologe* 2020; 16:35-40
<https://doi.org/10.1007/s11377-020-00492-1>.

Mester P., Krieg I., Bayerl F., Feldhaus F. (2019), European School of Internal Medicine 2019 – Erfahrungsbericht. *Dtsch Med Wochenschr* 2019; 144(20): 1464.
[DOI: 10.1055/a-0993-0794](https://doi.org/10.1055/a-0993-0794).

Wissenschaftliche Posterbeiträge und Vorträge

- 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Münster (2021)
V. Pavel, **P. Mester**, K. Gülow, C. Kunst, L. Aschenbrenner, M. Müller-Schilling, S. Schmid. Biomarkers for Diagnosis of Sepsis in Patients with Liver Cirrhosis. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2021. 59(01): e24; DOI: 10.1055/s-0040-1722007 (2021). (Poster)
- 36. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Mainz (2020)
P. Mester, E. Aschenbrenner, C. Kunst, K. Gülow, M. Müller-Schilling. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma by a novel combination of histone deacetylase inhibitor LBH589. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2020. 58(01): e52; DOI: 10.1055/s-0039-3402242 (Poster)
V. Pavel, H Gößmann, **P. Mester**, C. Kunst, K. Gülow, M. Müller-Schilling, S. Schmid (2020). Partielle Milzembolisation als Rescue-Behandlungsoption bei Varizenblutung - monozentrische Erfahrung über drei Jahre. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2020. 58(08): e186, DOI: 10.1055/s-0040-1716232 (2020). (Poster)

- UEG Week Virtual 2020

Pavel V., Kandulski A., **Mester P.**, Kunst C., Gülow K., Schmid S., Müller-Schilling M. (2020). Black esophagus – a case report (Poster)

Pavel V., Gößmann H., **Mester P.**, Gülow K., Kunst C., Müller M., Schmid S.A. (2020). Partial splenic embolization used for rescue treatment for variceal bleeding - monocentric experience over three years (Poster)

- 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Wiesbaden (2019)

Mester, P.-I., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Kunst, C., Gülow, K., Müller-Schilling, M. (2019). Induktion von einem nicht-apoptotischen Zelltod in der humanen Zelllinie HepG2 nach Behandlung mit neuen *Targeted Therapies*. Zeitschrift für Gastroenterologie 2019, 57(9). (Kurzvortrag)

- 6th German-Romanian Symposium of Gastroenterology, Regensburg (2019)

Mester, P., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Gschwendter, H., Gülow, K., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Induction of non-apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2 after treatment with new *Targeted Therapies*. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases 2019, 28 (Suppl 1). (Poster)

- 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2019)

Mester, P., Moleda, L., Müller-Schilling, M. (2019). Akzidentelle Spätmanifestation einer zystischen Fibrose bei rezidivierenden Pankreatitiden. Internist 2019, 60(Suppl 1). (Poster)

Mester, P., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Gschwendter, H., Gülow, K., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Einfluss neuer HCC-Therapeutika auf die Regulation der p53-Familie und die Induktion von Zelltod in Hepatomzelllinien. Internist 2019, 60(Suppl 1). (Poster)

- 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Heidelberg (2019)

Mester, P., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Gschwendter, H., Gülow, K., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Impact of new targeted therapies on the regulation of p53-family and cell death behavior of hepatoma cells in hepatocellular carcinoma. Zeitschrift für Gastroenterologie, 57(1) (Poster).

- 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Mannheim (2018)

Mester, P., Peschel G., Weigand K., Müller-Schilling M. (2018). Pancreatic panniculitis- a dermatological illness or an internistic pancreatic disease? Der Internist Sonderheft 01/2018, Band 59. (Poster)

- 5th German-Romanian Symposium of Gastroenterology, Hermannstadt (Sibiu) (2018)

Mester, P., Peschel G., Weigand K., Müller-Schilling M. (2018). Pancreatic panniculitis- a dermatological illness or an internistic pancreatic disease? Journal of gastrointestinal and liver diseases, 27(Suppl 1). (Poster)