

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Analyse der molekularen Mechanismen einer Sorafenib-Resistenz
im Hepatozellulären Karzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Carolin Franziska Steinbrenner
aus Karlsruhe

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	11
2 Literaturdiskussion	13
2.1 Das Hepatozelluläre Karzinom	13
2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prävention	13
2.1.2 Klinik, Diagnostik und Staging	18
2.1.3 Therapie	22
2.1.4 Prognose	26
2.2 Krebsentstehung und Molekularbiologie des HCC	26
2.2.1 Allgemeine Krebsentstehung	26
2.2.2 Karzinogenese der Leber	29
2.2.3 Molekularbiologie des HCC	30
2.3 Wirkungsweise und Nebenwirkungen von Sorafenib	34
2.4 Mechanismen der Sorafenib-Resistenz	37
2.4.1 Aktivierung kompensatorischer Signalkaskaden	37
2.4.2 Der Einfluss des Tumormikromilieus (TME)	40
2.4.3 Sonstige bisher bekannte Resistenzmechanismen	40
2.5 Zielsetzung der Studie	41
3 Material und Methoden	43
3.1 Material	43
3.1.1 Geräte	43
3.1.2 Kits	43
3.1.3 Reagenzien	44
3.1.4 Antikörper	45
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	45
3.1.6 Software	45
3.2 Methoden	46
3.2.1 Patientenkollektiv, Probengewinnung und Studienaufbau	46
3.2.2 Auswertung der klinischen Daten	49
3.2.3 Immunhistochemie	49
3.2.4 Mikroskopische Auswertung	51
3.2.5 Statistische Auswertung	54
3.2.6 DNA-/RNA-Isolation	55
3.2.7 RNA-Sequenzierung	57

3.2.8	Bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierung.....	59
4	Ergebnisse	61
4.1	Beschreibung der Studienpopulation	61
4.2	Überlebenszeitanalysen der klinischen Daten	64
4.3	Immunhistochemie	70
4.4	RNA-Sequenzierung	76
4.4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs.....	76
4.4.2	Signifikante Gene	77
4.4.3	Unsupervised Hierarchal Cluster Analysis (UHCA)	77
4.4.4	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	79
4.4.5	Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	80
5	Diskussion	82
5.1	Analyse der Patientendaten.....	82
5.2	Überlebenszeitanalysen	86
5.3	Analyse der Immunhistochemie	91
5.4	Analyse der RNA-Sequenzierung	93
5.4.1	Analyse des Patientenkollektivs	93
5.4.2	Genexpressionsanalysen	94
5.4.3	Funktionelle Analysen.....	94
5.5	Bewertung der Methoden	97
5.5.1	Limitationen der Studie	97
5.5.2	Stärken der Studie	99
5.6	Bewertung der Ergebnisse.....	100
6	Zusammenfassung	102
	Literaturverzeichnis	104

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AFP	α -Fetoprotein
ALD	Alkoholische Lebererkrankung
ARID1A/ARID2	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A and 2</i>
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BSC	<i>Best Supportive Care</i>
c-Jun	c-Jun N-terminale Kinase
c-KIT	<i>Stem-cell Growth Factor Receptor</i>
CCA	Cholangiozelluläres Karzinom
CDKN2A	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CP	Child-Pugh Klassifikation
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i>
CT	Computertomografie
DAA	<i>Direct Acting Antivirals</i>
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase</i>
ES	<i>Enrichment Score</i>

FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B Virus Protein x
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF(1/2 α)	Hypoxie-induzierbarer Faktor (1/2 Alpha)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	Hazard Ratio
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
JAK/STAT	<i>Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
KI	Konfidenzintervall
Log2FC	2er-Logarithmus des Fold Change
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MLL4	<i>Mixed Leukemia Lineage Protein 4</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MTOR(C1)	<i>Mammalian Target of Rapamycin (Complex 1)</i>

NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRF2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PFKFB4	6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 4
PI3K/AKT	Phosphoinositol-3-Kinase/Proteinkinase K
PVI	Portalveneninvasion
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RB	Retinoblastom
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPS6KA3	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 3</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
TACE	Transarterielle Chemo-Embolisation
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TME	Tumormikromilieu
UHCA	<i>Unsupervised Hierarchical Cluster Analysis</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Verteilung der Erkrankungs- und Todesfälle der zehn häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit, adaptiert nach (1).	13
Abbildung 2.2: Geografische Verteilung der altersadaptierten Inzidenz von malignen Lebertumoren (12).	14
Abbildung 2.3: Altersadjustierte Inzidenz pro 100.000 Personen und relatives 5-Jahres-Überleben in den USA zwischen 1975 und 2013.	16
Abbildung 2.4: diagnostischer Algorithmus bei einer HCC-verdächtigen Läsion in der Bildgebung.....	19
Abbildung 2.5: Modifiziertes BCLC Staging System für das hepatozelluläre Karzinom (4).	22
Abbildung 2.6: Die „Hallmarks of Cancer“.	27
Abbildung 2.7: Die molekulare Landschaft der veränderten Gene und Signalkaskaden des HCC, adaptiert nach (75).	34
Abbildung 3.1: Aufbau der Studie.....	48
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der immunohistochemischen Färbung und des Biotin (B) – Streptavidin (A) – HRP – Komplexes (122).....	50
Abbildung 3.3: Normale Leber in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung.	52
Abbildung 3.4: RPS6KA3 Färbung an gesunder Leber in 20-facher Vergrößerung.	53
Abbildung 3.5: Durchführung einer kombinierten DNA-/RNA-Isolation mittels Allprep DNA/RNA FFPE-Kit® von Qiagen, adaptiert nach (130).	55
Abbildung 4.1: Verteilung der Ätiologie der HCC-Patienten als Balkendiagramm.....	62
Abbildung 4.2: Sorafenib-bezogene Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs.	64
Abbildung 4.3: Einfluss des Patientenalters bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	65
Abbildung 4.4: Einfluss des Geschlechts auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	66
Abbildung 4.5: Einfluss des BCLC Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	67
Abbildung 4.6: Einfluss des AFP-Spiegels bei Erstdiagnose im Blut auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	67
Abbildung 4.7: Einfluss der Leberfunktion bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	68
Abbildung 4.8: Einfluss der intrahepatischen Tumorausbreitung bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.....	69
Abbildung 4.9: Einfluss des Vorliegens einer PVI auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.	69
Abbildung 4.10: HCC in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung.	70
Abbildung 4.11: HCC in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung.	71
Abbildung 4.12: HCC in 20-facher Vergrößerung mit RPS6KA3 Färbung.	71
Abbildung 4.13: HCC in 20-facher Vergrößerung mit RPS6KA3 Färbung.	72
Abbildung 4.14: Auswertung der Immunhistochemie: Verteilung der Wahl der Färbekategorien von MAPK14 (links) und RPSKA3 (rechts) im Gesamtkollektiv.	72
Abbildung 4.15: Scatterplot zur Überprüfung des Einflusses der unabhängigen Untersucher auf die Wahl der Färbekategorie.....	73

Abbildung 4.16: Einfluss der MAPK14 Färbekategorie auf die Überlebenszeit.....	74
Abbildung 4.17: Einfluss der RPS6KA3 Färbekategorie auf die Überlebenszeit.....	74
Abbildung 4.18: Forest-Plot als graphische Darstellung der Cox-Regression.....	75
Abbildung 4.19: Heatmap der differenziell exprimierten Gene zwischen „best“ (b1-b12) und „worst“ (w1-w7).	78
Abbildung 4.20: Kaplan-Meyer-Kurven der in der Heatmap gebildeten Cluster 1 und 2.	79
Abbildung 4.21: Einige ausgewählte Enrichment Plots.....	80
Abbildung 4.22: statistisch signifikante Signalwege bei der Testung „worst“ vs. „best“.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Child-Pugh Klassifikation (2).....	21
Tabelle 2.2: ECOG-Einteilung (2).....	21
Tabelle 2.3: Die am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene bzw. Signalwege nach Marquardt et al. (67), Schulze et al. (75) und Zucman-Rossi et. al (72).	31
Tabelle 3.1: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen.	50
Tabelle 3.2: Färbekategorien nach prozentualem Anteil positiver Zellen.....	53
Tabelle 4.1: tabellarische Darstellung der erhobenen Patientendaten.....	62
Tabelle 4.2: erfasste Nebenwirkungen von Sorafenib.	63
Tabelle 4.3: krankheitsbezogene Daten der RNA-Sequenzierungs-Patienten.....	77
Tabelle 4.4: überrepräsentierte Gensets der RNA-Sequenzierung-Proben.	80
Tabelle 4.5: funktionell sortierte statistisch signifikante Signalwege	81

1 Einleitung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre maligne Lebertumor und stellt die sechsthäufigste Tumorerkrankung sowie die dritthäufigste krankheitsbezogene Todesursache weltweit dar (1). Die Tatsache, dass Inzidenz und Mortalität annähernd identisch sind, spiegelt zudem die schlechte Prognose wider (siehe unten, (1)). Da das HCC lange Zeit keine spezifischen Symptome hervorruft, wird es in den meisten Fällen erst spät entdeckt, wenn eine kurative Therapie mittels lokaler Ablation, Leberteilresektion oder einer Transplantation nicht mehr möglich ist (2,3). Erschwerend kommt hinzu, dass das HCC in der überwiegenden Anzahl der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose entsteht. Durch die daraus resultierende eingeschränkte Lebersynthesfunktion werden die Therapiemöglichkeiten, vor allem das Ausmaß einer Resektion, zusätzlich erheblich limitiert (4). In fortgeschrittenen Stadien zeichnet sich das HCC durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber konventioneller Chemo- und Radiotherapie aus, sodass für fortgeschrittene und inoperable HCCs kaum Therapieansätze zur Verfügung stehen. Im Jahr 2007 gelang erstmals die Zulassung eines Medikamentes für diese Indikation aus dem Bereich der zielgerichteten Therapien (5). Mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib besteht seither für fortgeschrittene Tumorstadien die Möglichkeit einer lebensverlängernden Behandlung. Trotz dieser Neuentwicklung führt die Behandlung mit Sorafenib nur bei wenigen Patienten zu einem objektiven Ansprechen und partiellen Remissionen (6,7). Komplette Remissionen werden darüber hinaus nur in Einzelfällen beschrieben. Aktuelle Studien zeigen, dass nur wenige Patienten von Sorafenib über einen längeren Zeitraum profitieren und dass die Tumoren mehrheitlich innerhalb von sechs Monaten eine Resistenz entwickeln (8,9). Die Behandlung mit Sorafenib ist mit einem erheblichen Kostenaufwand sowie dem Auftreten von relevanten Nebenwirkungen vergesellschaftet (6,10). Aufgrund dessen ist die Identifikation zuverlässiger Biomarker essenziell, um die Patienten zu identifizieren, die von der Therapie mit Sorafenib besonders profitieren könnten. Außerdem besteht Interesse daran, die Resistenzmechanismen von Sorafenib zu beschreiben, um gegebenenfalls mit einer Kombinationstherapie die Effektivität zu erhöhen. Bislang konnten jedoch keine geeigneten Marker identifiziert werden.

Ein Grund hierfür ist die ausgeprägte Heterogenität des HCC auf molekularer Ebene. Mit der Möglichkeit des sog. *Next Generation Sequencing* (NGS) kann seit einigen Jahren jedoch das komplette Genom von Tumoren in relativ kurzer Zeit und

vergleichsweise preiswert charakterisiert werden. So konnten durch die Anwendung dieser Methode bereits viele molekulare Veränderungen im HCC identifiziert werden. Die meisten dieser Veränderungen können allerdings nicht durch aktuelle Therapieansätze behandelt werden. Die Heterogenität des Tumors wird darüber hinaus für die ausgeprägte Chemoresistenz verantwortlich gemacht. Obwohl bereits einige Resistenzmechanismen unter einer Therapie mit Sorafenib identifiziert wurden, konnten die Ergebnisse dieser meist präklinischen Studien bislang nicht erfolgreich in den klinischen Alltag umgesetzt werden (9).

In der vorliegenden Studie wurden anhand von Gewebeproben von HCC-Patienten mögliche Mechanismen der Sorafenib-Resistenz auf molekularer Ebene untersucht. Bei allen Patienten lag ein histologisch gesichertes HCC und eine anschließende Sorafenib-Behandlung vor. Die Proben wurden immunhistochemisch auf Proteine gefärbt, die potenziell mit der Resistenz von Sorafenib in Verbindung stehen. Außerdem wurde von einigen Proben eine RNA-Sequenzierung durchgeführt und die differenzielle Genexpression zwischen Patienten mit gutem und schlechtem Ansprechen auf Sorafenib verglichen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prävention

Epidemiologie

Tumorerkrankungen gehören im Jahr 2018 mit 18,1 Millionen Neuerkrankungen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen und führten zu 9,6 Millionen krankheitsbedingten Todesfällen (1). Das Bronchialkarzinom stellt nach wie vor die weltweit häufigste bösartige Neubildung dar, die mit 18,4% auch die höchste Mortalität aufweist (siehe Abbildung 2.1 „Lung“)

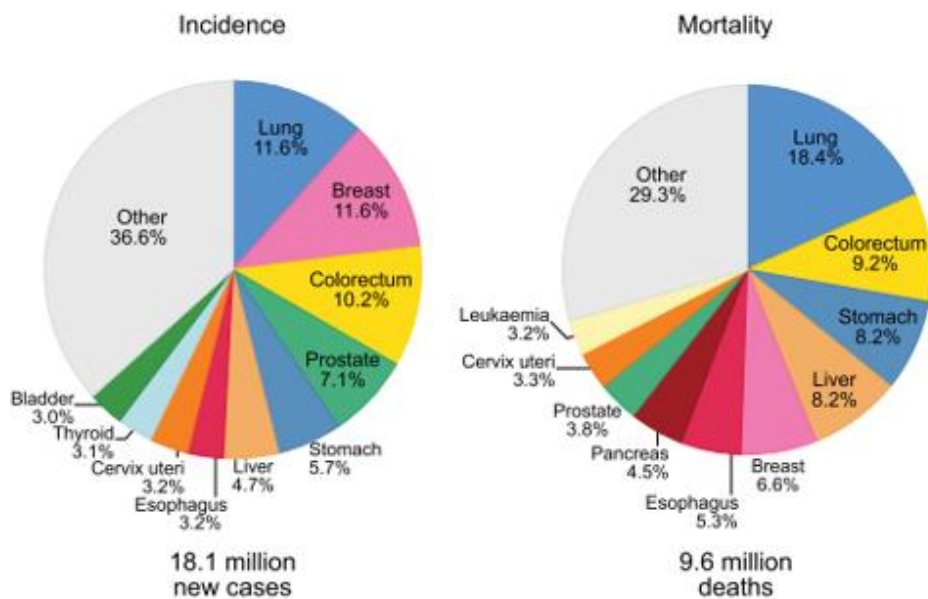


Abbildung 2.1: Verteilung der Erkrankungs- und Todesfälle der zehn häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit, adaptiert nach (1).

Die häufigsten primären malignen Lebertumoren sind das HCC und das intrahepatische Cholangiozelluläre Karzinom (CCA), wobei das HCC mit 75-85% der Fälle den größten Anteil der Morbidität und Mortalität ausmacht (1). Mit 841.000 Neuerkrankungen und 782.000 jährlichen Todesfällen sind maligne Lebertumoren häufig und stellen die dritthäufigste krankheitsbezogene Todesursache bei

Tumorerkrankungen dar (1,11). Männer erkranken bis zu viermal häufiger als Frauen, sodass maligne Lebertumoren bei Männern die fünfthäufigste Tumorerkrankung sind, bei Frauen dagegen die siebthäufigste. Die Inzidenz des HCC weist geografisch große Variationen auf. 80% der HCC Fälle treten in Schwellen- und Entwicklungsländern auf, vor allem in Zentral- und Westafrika sowie Ostasien (siehe Abbildung 2.2).

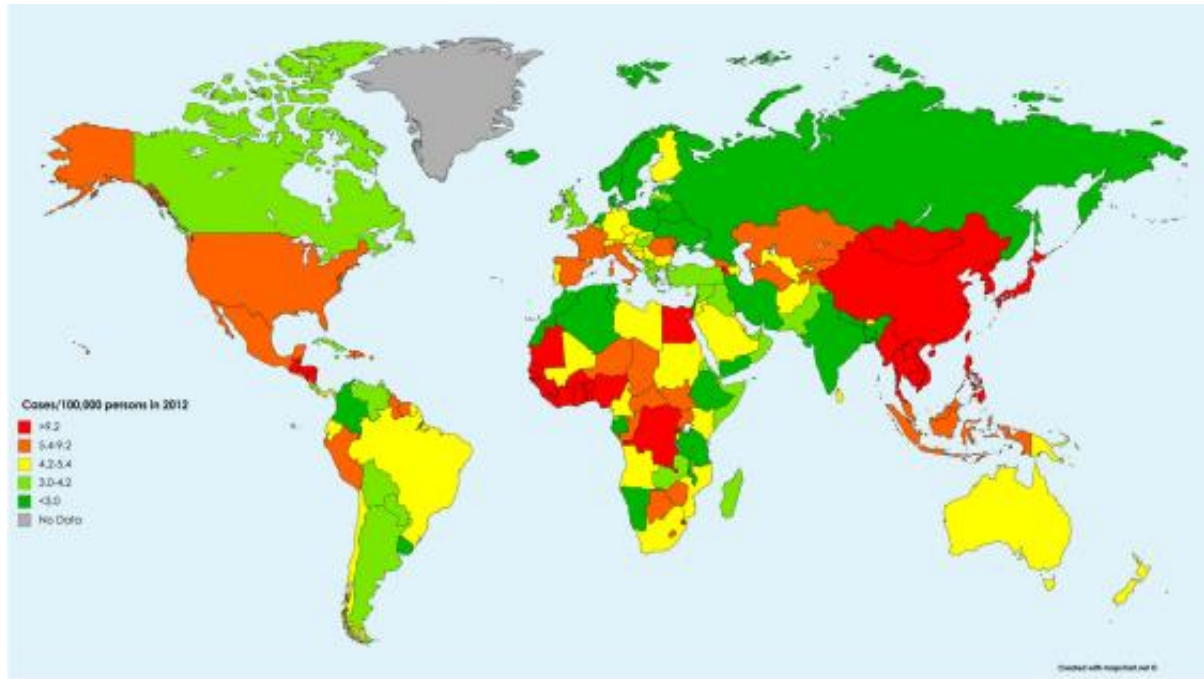


Abbildung 2.2: Geografische Verteilung der altersadaptierten Inzidenz von malignen Lebertumoren (12).

Ätiologie und Risikofaktoren

80-90% aller HCC entstehen auf dem Boden einer Leberzirrhose (12). Das Risiko für die Entwicklung eines HCC ist bei Vorliegen einer Leberzirrhose um den Faktor 30 erhöht (13). Die Leberzirrhose ist nicht nur ein Risikofaktor, sondern wird bereits als eine Krebsvorstufe angesehen, eine sog. Präkanzerose. Die Entstehung einer Leberzirrhose kann durch verschiedene Ursachen begünstigt werden. Grundsätzlich ist sie das Endstadium der meisten chronischen Leberkrankungen.

Die weltweit häufigste Ursache für die Entstehung einer Leberzirrhose sowie des HCC ist die chronische Infektion mit Hepatitis B und C Viren (HBV und HCV) (14). Die persistierende Infektion führt zu einer chronischen Entzündungsreaktion, bei der es durch die resultierende immunlogische Antwort zur Zerstörung der Hepatozyten kommt. Durch die anhaltenden regenerativen Prozesse kann es, in Abhängigkeit der ätiologischen Noxe, nach Jahren bis Jahrzehnten zum fibrotischen Umbau des

Lebergewebes bis zur Leberzirrhose kommen. Die chronische HBV- oder HCV-Infektion *per se* erhöht das Risiko für ein HCC um das 15 – 20 fache (15). Weltweit ist die Hepatitis B für über die Hälfte aller HCC Fälle verantwortlich, in Hochrisikoregionen in Sub-Sahara Afrika und Südostasien macht die Hepatitis B mit 70% den größten Anteil aus (16). Aufgrund identischer Übertragungswege (parenteral, sexuell, vertikal) können Patienten zusätzlich mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) infiziert sein. Das kommt vor allem in den oben erwähnten Hochrisikogebieten in Afrika vor, in denen HIV endemisch auftritt. Die Betroffenen erleiden eine schnellere Progression der Lebererkrankung und haben im Stadium der Leberzirrhose ein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung (11,17). In diesen Regionen spielt neben der Co-Infektion mit HIV auch die Exposition gegenüber dem Aflatoxin, das Gift des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, als Auslöser für das HCC eine Rolle (1). Von Aspergillen befallene Lebensmittel sind vor allem Getreide, Mais und Nüsse. Der Schimmelbefall ist in Entwicklungsländern durch schlechte bzw. unzureichende Ernte-, Trocknungs- und Lagerungsbedingungen besonders ausgeprägt (18). Das Aflatoxin B1 wird in der Leber metabolisiert und bildet eine toxische Epoxidverbindung, welche durch die Bildung von DNA-Addukten kanzerogen ist (18).

Die häufigsten Ursachen eines HCC in westlichen Industrienationen sind die chronische HCV-Infektion und die Alkohol-induzierte Leberzirrhose (ALD). HBV ist in den USA und Westeuropa nur für ca. 15% der HCC Fälle verantwortlich (16). Ein Drittel aller Lebererkrankungen sind in Deutschland durch chronischen Alkoholabusus verursacht (2). Auch die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) stellt vor allem in den Industrienationen einen zunehmend häufiger beobachteten Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC dar (19,20). In den meisten Fällen tritt die NAFLD im Rahmen eines metabolischen Syndroms auf, das durch Adipositas, Insulinresistenz, arterielle Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen gekennzeichnet ist. Die Insulinresistenz und die daraus resultierende pathologische Fettakkumulation im Lebergewebe begünstigt chronische Entzündungsreaktionen, die zu einer Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) und darüber hinaus zu einer Leberzirrhose führen können. HCC können jedoch auch ohne Leberzirrhose aus einer NAFLD entstehen (19). Allein das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 erhöht das Risiko für die Entstehung eines HCC um das Zwei- bis Dreifache (15). Insgesamt wird das Risiko für die Entwicklung eines HCC aus einer NAFLD jedoch geringer geschätzt als das einer NASH oder NASH-Zirrhose. Das HCC-Risiko bei einer NASH-Leberzirrhose wird wiederum geringer geschätzt als das der Virushepatitiden (19,20).

Weiterhin stellen Rauchen, metabolische sowie Speichererkrankungen Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC dar (15). Dazu gehören beispielsweise Eisenspeicherkrankheiten wie die hereditäre Hämochromatose, die Kupferspeicherkrankheit M. Wilson und der hereditäre Alpha-1-Antitrypsinmangel. Des Weiteren können Autoimmunerkrankungen wie die Autoimmunhepatitis oder die Primäre Biliäre Cholangitis eine Leberzirrhose hervorrufen (21).

Insgesamt betrachtet kam es in den letzten vier Jahrzehnten zu einer kontinuierlichen Zunahme der HCC Inzidenz in der westlichen Welt. Man erwartet zudem, dass sich auch in Zukunft dieser Trend fortsetzt (siehe Abbildung 2.3; (15)). Zum einen wird eine weiter steigende Anzahl HCC als Spätkomplikation der Hepatitis-C Infektion vorhergesagt (12). Dem zugrunde liegt die HCV-Infektionswelle, die in den 1920er Jahren zunächst in Japan begann und erst in den 1980er bis 90er Jahren in Europa und Nordamerika das Plateau erreichte (15). Zum anderen wird eine steigende Inzidenz von HCC aufgrund einer NAFLD bzw. NASH angenommen (22). Nach den Daten der *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)*-Database (siehe Abbildung 2.3) sind HCC aufgrund einer NAFLD bereits auf Platz drei hinter Hepatitis C und Alkohol-induzierter Leberzirrhose (19).

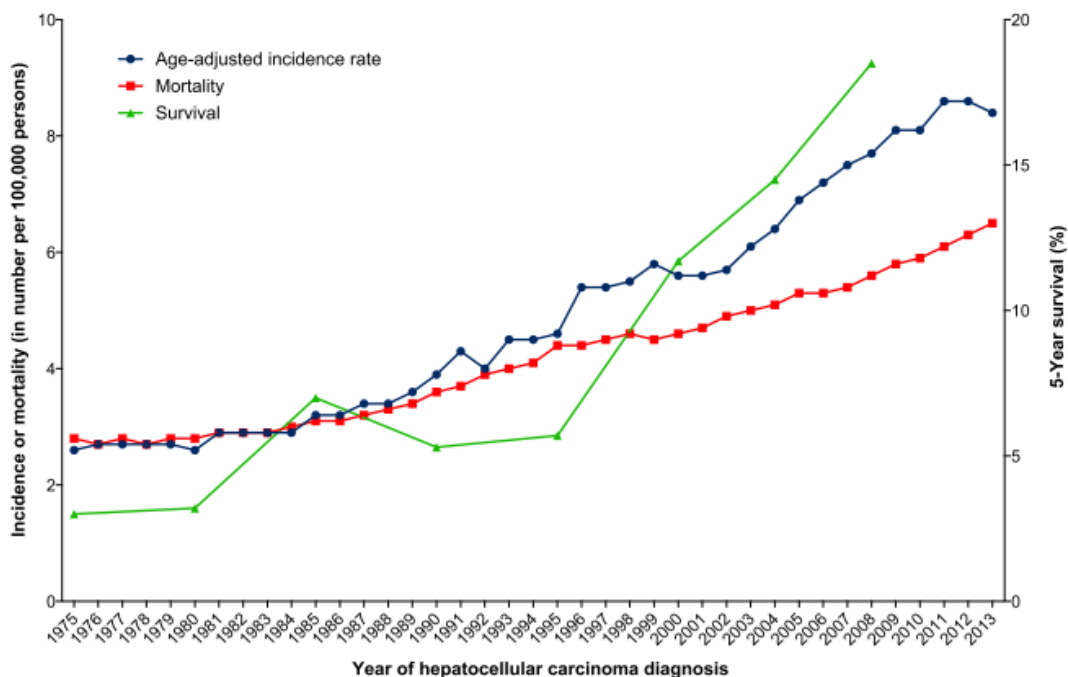


Abbildung 2.3: Altersadjustierte Inzidenz pro 100.000 Personen und relatives 5-Jahres-Überleben in den USA zwischen 1975 und 2013. Verwendet wurden die Daten der SEER-Database (12).

Prävention und Überwachungsstrategien

Einen hohen Stellenwert der primären Prävention des HCC hat die HBV-Impfung, die in Deutschland von der Ständigen Impfkommission im ersten Lebensjahr, aber auch weltweit von der Weltgesundheitsorganisation so früh wie möglich empfohlen wird (4). Die positiven Effekte im Sinne einer sinkenden Inzidenz von chronischer Hepatitis B und HCC waren schon wenige Jahre nach Einführung der Impfung zu verzeichnen (16). Durch die postnatale Impfung von Säuglingen HBV-positiver Mütter kann die vertikale Transmission deutlich reduziert werden. Auch die medikamentöse Behandlung chronisch HBV-Infizierter kann das HCC-Risiko senken (23). Außerdem werden Blutprodukte auf das Vorhandensein von HBV-DNA sowie HIV- und HCV-RNA untersucht. Seit 2014 stehen zur Behandlung der Hepatitis C die *Direct Acting Antivirals (DAA)* zur Verfügung, mit der die Virusinfektion zu einem hohen Anteil geheilt werden kann. Limitierend ist jedoch in vielen Ländern der hohe Preis der Medikamente sowie die umstrittene Wirkung bei bereits eingetretenen Komplikationen. So gibt es Hinweise für eine erhöhte Rezidivrate nach zunächst kurativ behandeltem HCC unter der Interferon (IFN)-freien Therapie (24,25). In einer Metaanalyse konnten zwischen DAA und IFN jedoch keine Unterschiede im Auftreten von Neuerkrankungen sowie Rezidiven eines HCC festgestellt werden (26). Auch sollte bei chronischen Lebererkrankungen eine strikte Alkoholkarenz eingehalten werden, da sich selbst moderater Alkoholkonsum negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken kann und das Risiko für die Entwicklung eines HCC signifikant erhöht ist (27,28). Bei der ALD ist die Alkoholabstinenz die einzige kausale und daher die wichtigste therapeutische Maßnahme, um die Progression der Erkrankung zu verlangsamen und damit das Risiko eines HCC zu senken. Die Abstinenz verbessert das Überleben in allen Krankheitsstadien bei Patienten mit ALD (27). Da die NAFLD meist im Rahmen eines metabolischen Syndroms auftritt, kann vor allem durch eine Förderung einer Lebensstilmodifikation mit mehr Bewegung und einer Gewichtsreduktion das Risiko für hepatologische, aber auch kardiovaskuläre Folgeerkrankungen gesenkt werden (29). Für eine medikamentöse Therapie der NAFLD/NASH gibt es derzeit in Deutschland keine Empfehlungen (30).

Für Patienten mit Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC wird zur Früherkennung eine Leberultraschalluntersuchung im Abstand von sechs Monaten empfohlen. Eine Indikation zum HCC-Screening haben nach den *European Association for the Study of the Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines* deshalb grundsätzlich Patienten mit

Leberzirrhose (4). Da bei einer terminalen Leberinsuffizienz nur eine Lebertransplantation als Therapieoption bei Vorliegen eines HCC in Frage kommt, werden nur Patienten im *Child-Pugh* (CP) Stadium C mit Aussicht auf eine Transplantation in das Screening-Programm aufgenommen. Zur Zielpopulation des HCC-Screenings gehören außerdem HBV-Carrier ohne Leberzirrhose und Patienten mit Grad 3 Leberfibrose je nach individuellem Risikoprofil, z.B. lang bestehende HCV-Infektion (4).

Die Sonografie weist eine Sensitivität von 58 – 89% und eine Spezifität von über 90% für die Entdeckung eines HCC-Herdes auf (31). Erschwert wird die Ultraschalluntersuchung durch den zirrhotischen Umbau der Leber, der durch bindegewebige Septen und Regeneratknoten, sogenannte Noduli, gekennzeichnet ist. Makronoduli können über einen Zentimeter groß werden und sind damit sonographisch schwer von kleinen HCC-Herden zu unterscheiden (32). Für HCC im frühen Stadium nimmt daher die Sensitivität deutlich ab (31). Weiterhin kann die Konstitution des Patienten die Sensitivität einschränken. So ist die Aussagekraft z.B. bei vorliegender Adipositas häufig erheblich eingeschränkt.

Trotz dieser potenziellen Limitationen der Sonografie zeigen die Daten der sog. GIDEON-Studie aus Japan, wo ein ausgedehntes Vorsorgeprogramm etabliert ist, eindeutig, dass Vorsorge die Mortalität senkt und zu einem signifikant längerem Gesamtüberleben führt. In Japan werden 44% der HCC-Patienten in frühen Stadien der Erkrankung, dem sog. *Barcelona-Clinic Liver Cancer* (BCLC; siehe unten) Stadium A, diagnostiziert. In anderen Regionen (Asien-Pazifik, USA, Europa und Lateinamerika) werden hingegen lediglich neun bis 24% der HCC in Stadium A erkannt (33).

2.1.2 Klinik, Diagnostik und Staging

Klinik und Diagnostik

Das HCC weist keine spezifischen Frühsymptome auf, weswegen die Tumoren mehrheitlich erst spät entdeckt werden und eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist (34). Auch die Spätsymptome sind oftmals uncharakteristisch, wobei Druckschmerzen im rechten Oberbauch sowie ungewollter Gewichtsverlust bis zur Kachexie häufig beschrieben werden. Große Tumoren können in der klinischen Untersuchung tastbar sein, begleitend kann Aszites oder eine hepatische

Enzephalopathie als Folge einer eingeschränkten Lebersynthesfunktion auftreten. Aufgrund der häufig späten Diagnosestellung findet man zum Diagnosezeitpunkt bei etwa der Hälfte der HCC-Patienten bereits multiple HCC-Herde vor (2).

Die wesentlichen Merkmale zu der Diagnostik, dem Staging und der Therapie des HCC orientieren sich an den *EASL Clinical Practice Guidelines* von 2018 und der Deutschen S3-Leitlinie von 2013 (4,28). Letztgenannte befindet sich aktuell in der Überarbeitung.

Zur Diagnostik des HCC stehen verschiedene bildgebende Verfahren sowie der histologische Nachweis mittels Biopsie zur Verfügung. Der diagnostische Algorithmus ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

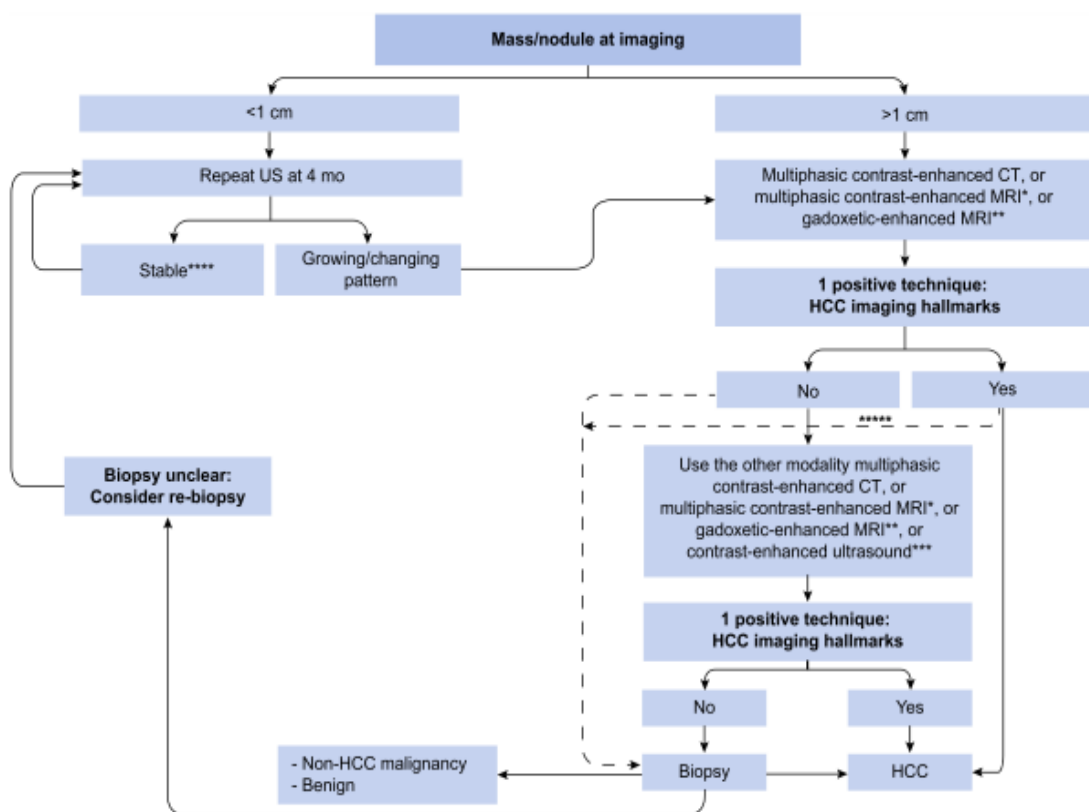


Abbildung 2.4: diagnostischer Algorithmus bei einer HCC-verdächtigen Läsion in der Bildgebung. US: Ultraschall, CT: Computertomografie, MRI: Magnetresonanztomografie (I=*Imaging*), adaptiert nach (4)

Da das Vorliegen einer Leberzirrhose die Entwicklung eines HCC stark begünstigt, ist bei Nachweis eines typischen Kontrastmittelverhaltens in einer dynamischen Schnittbildgebung ein histologischer Nachweis nicht zwingend erforderlich (4). Erste Wahl sind kontrastmittelunterstützte Magnetresonanztomografie (MRT) oder Dreiphasen-Computertomografie (CT). Die MRT weist laut einer Metaanalyse in Kohorten ab dem Jahr 2000 eine Sensitivität 84% auf, die CT eine von 69% bei

vergleichbarer Spezifität (93 vs. 94%) (35). Für Tumoren über zwei Zentimetern liegt die Sensitivität für die CT bei 92%, für die MRT bei 95% (36). Die Sensitivität nimmt vor allem bei Tumoren unter zwei Zentimetern ab, da kleine Tumoren oftmals kein typisches Kontrastmittelverhalten zeigen, was die Diagnosestellung erschwert (35,37). Das typische Kontrastmittelverhalten des HCC zeigt sich in einer Hypervaskularisation in der arteriellen Phase sowie ein sogenanntes „Wash-Out“ Phänomen in der venösen oder spätvenösen Phase. Unter dem „Wash-Out“ versteht man einen schnelleren Abfluss des Kontrastmittels aus dem Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Gewebe, sodass sich der Tumor in der venösen Phase als hypodens bzw. hypointens darstellt. Dieses Kontrastmittelverhalten ist Ausdruck einer gestörten Gefäßarchitektur der Tumore und tritt regelhaft bei Tumoren über zwei Zentimetern, jedoch oftmals nicht bei kleineren Tumoren auf. Deswegen wird, sofern technisch durchführbar, in diesen Fällen von der EASL die Durchführung einer Biopsie empfohlen (4). Läsionen unter einem Zentimeter sollen zunächst nach vier Monaten kontrolliert und bei Veränderung mittels CT oder MRT abgeklärt werden. Bei Unklarheit oder Kontraindikationen für CT oder MRT kann eine Kontrastmittel-Sonografie (*contrast-enhanced ultrasound, CEUS*) durchgeführt werden. Zeigt die Bildgebung kein HCC-typisches Kontrastmittelverhalten soll nach zwei unterschiedlichen Bildgebungen eine Biopsie zum Ausschluss eines malignen Geschehens erfolgen (4).

Bei Patienten mit Verdacht auf ein HCC ohne Leberzirrhose wird eine Biopsie obligat empfohlen, da die Spezifität bei rein bildgebender Diagnostik geringer ausfällt. Außerdem sind Differentialdiagnosen wie Metastasen anderer maligner Tumoren wahrscheinlicher als bei Vorliegen einer Leberzirrhose, die bereits eine Präkanzerose des HCC darstellt. Die beiden Hauptkomplikationen, Blutung und Streuung von Tumorzellen in den Stichkanal, sind gut behandelbar und haben in der Regel keinen Einfluss auf die Überlebenszeit (4).

Staging

Unter Staging versteht man die Einteilung einer malignen Tumorerkrankung in ein bestimmtes Stadium. Es dient der Einschätzung, wie weit sich der Tumor bereits ausgebreitet hat bzw. wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist. Diese Einschätzung wird wiederum benötigt, um dem Patienten die individuell bestmögliche Therapie anbieten zu können und eine Aussage über die Prognose treffen zu können. Für das

HCC gibt es verschiedene Einteilungen. Sowohl von der EASL als auch der S3-Leitlinie wird die BCLC – Einteilung empfohlen (4,28). Sie hat den Vorteil, dass sie neben der Tumorausbreitung auch die Leberfunktion und den Allgemeinzustand der Patienten berücksichtigt, da die Prognose der HCC-Patienten neben der Tumorerkrankung auch von den Folgen einer fortgeschrittenen chronischen Lebererkrankung maßgeblich mitbestimmt wird. Die Syntheseleistung der Leber wird mittels des Child-Pugh (CP) Scores (siehe Tabelle 2.1) ermittelt. Zur Evaluation des Allgemeinzustands dient die *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)-Einteilung (siehe Tabelle 2.2; (2)).

Tabelle 2.1: Child-Pugh Klassifikation (2).

Punkte	1	2	3
Albumin (in g/dL)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Bilirubin (in mg/dL)	< 2	2 -3	> 3
Quick (in %)	> 70	40 - 70	< 40
Aszites (sonographisch)	kein	leicht	mittelgradig
Enzephalopathie	keine	Grad I-II	Grad III-IV
Gesamtzahl	5 - 6	7 - 9	10 - 15
CP-Stadium	A	B	C
1-Jahres-Überleben (in %)	Fast 100%	85	35

Tabelle 2.2: ECOG-Einteilung (2).

Grad 0	normal aktiv
Grad 1	eingeschränkt arbeitsfähig
Grad 2	arbeitsunfähig, < 50% pflegebedürftig
Grad 3	> 50% kontinuierliche Pflege
Grad 4	bettlägerig

Die BCLC-Klassifikation umfasst insgesamt fünf Stadien: 0, A, B, C und D (siehe Abbildung 2.4). Stadium 0 entspricht einem sehr frühen Stadium mit einem einzelnen Tumorherd unter zwei Zentimeter, einer erhaltenen Leberfunktion (CP A) und gutem Allgemeinzustand. Stadium A bedeutet ein frühes Stadium, das in den meisten Fällen eine kurative Zielsetzung mittels Resektion oder Transplantation verfolgt. Dabei liegt ein einzelner Tumor bis fünf Zentimeter oder maximal drei Herde unter drei Zentimetern vor. Bei Vorliegen eines multifokalen oder anderweitig nicht resektablen Tumors, der noch asymptomatisch ist und keine Gefäßinvasion oder Fernmetastasierung aufweist, befindet sich der Patient im Stadium B. Symptomatische

Tumoren mit Gefäßinvasion oder Fernmetastasierung und erhaltener Leberfunktion (in der Regel CP A) kennzeichnen das Stadium C. Das Endstadium D geht mit einer terminalen chronischen Lebererkrankung einher, die keine tumorspezifische Therapie mehr zulässt und außerhalb der Transplantationskriterien liegt (CP C).

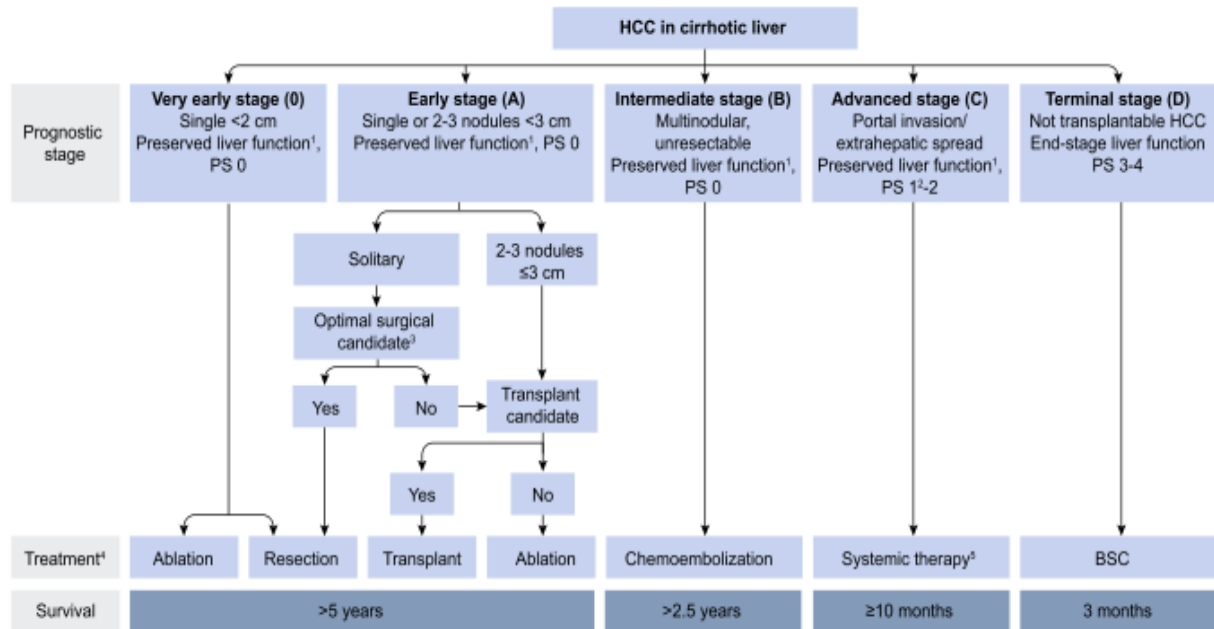


Abbildung 2.5: Modifiziertes BCLC Staging System für das hepatozelluläre Karzinom (4). Unter „Preserved liver function“ ist eine Leberzirrhose im Stadium CP A zu verstehen. Entsprechend bedeutet „End-stage liver function“ CP C. PS: „Performance status“, definiert durch ECOG. Der „optimal surgical candidate“ weist eine geringe perioperative Mortalität <3% auf, genügend Restparenchym sowie ein geringes Risiko für ein postoperatives Leberversagen (<5%) auf. BSC: „best supportive care“.

2.1.3 Therapie

Die Therapie des HCC erfolgt Stadien-abhängig. In den BCLC-Stadien 0 und A werden grundsätzlich kurative Therapieansätze verfolgt. Die Stadien B – D sind durch einen palliativen Ansatz charakterisiert. Hier stehen die Lebensverlängerung und der Erhalt der Lebensqualität im Vordergrund, da die Erkrankung in diesen Stadien in der Regel nicht mehr heilbar ist.

Für das sehr frühe HCC (Stadium 0) bei erhaltener Leberfunktion (CP A und B) wird in der Regel zwischen einem lokal ablativen Verfahren und der Resektion gewählt (28). Beide Ansätze zeigen in verschiedenen Studien vergleichbare Überlebensraten (38,39). Die Ablationsverfahren der ersten Wahl sind die Radiofrequenzablation (RFA) oder alternativ die Mikrowellenablation (MWA). Beide Verfahren zeigen vergleichbare Ergebnisse (40). Bei lokal ablativen Verfahren fällt, neben geringeren Kosten, der

Verlust an funktionstüchtigem Leberparenchym im Vergleich zur Leberresektion geringer aus und führt deshalb postinterventionell zu weniger hepatischen Dekompensationen (35,36). Deswegen werden bei Patienten, die ein hohes Risiko für ein postoperatives Leberversagen aufweisen, die lokal ablativen Verfahren gegenüber der Resektion bevorzugt (42). Weiterhin ist der Einsatz der lokalen Ablation bei tief bzw. zentral sitzenden Tumoren gegenüber der Resektion zu empfehlen. Nachteile sind jedoch, dass eine histologische Aufarbeitung nach der Behandlung deutlich schwieriger zu evaluieren ist und damit die Aussagekraft über das Rezidivrisiko geringer ausfällt. Prädiktiv dafür wären Satellitenmetastasen, geringe Differenzierung und Mikrogefäßinvasion (42). Eine Gewebeprobe kann alternativ auch vor der Behandlung entnommen werden, ist allerdings mit dem Risiko von Stichkanalmetastasen vergesellschaftet.

Im Stadium A, insbesondere für Patienten mit einem solitären HCC-Herd, ist die Resektion die Therapie der Wahl, sofern das Risiko für ein postoperatives Leberversagen gering ist. Das wird vor allem durch das Vorliegen einer relevanten portalvenösen Hypertension sowie einem erhöhten Bilirubin bestimmt. Außerdem steigt das Risiko einer postoperativen hepatischen Dekompensation mit der Größe der geplanten Resektion, insbesondere bei der Resektion von mehr als drei Segmenten. Deswegen besteht die Möglichkeit einer nicht-anatomischen Resektion, welche funktionstüchtiges Lebergewebe spart (4). Auch für große singuläre Tumoren über fünf Zentimeter kann eine Resektion erwogen werden (28). Die Überlebensrate für diese HCC fällt geringer aus als für Tumoren unter fünf Zentimeter, dennoch profitieren die Patienten von einer Resektion. Für HCC-Patienten ohne Leberzirrhose ist Leberteileresektion die Therapie der Wahl. Adjuvante Ansätze sind bislang für das HCC nicht etabliert (4,28,43).

Für Patienten mit Leberzirrhose, für die eine Resektion nicht in Frage kommt, können mit einer Lebertransplantation potenziell kurativ therapiert werden, sofern die Ausbreitung des HCC entsprechend der Mailand-Kriterien erfüllt ist. Diese schreiben einen singulären Tumor unter fünf Zentimetern oder maximal drei Tumorherde unter drei Zentimetern vor. Generell wird die Transplantationslistung anhand des Schweregrades der Leberinsuffizienz vollzogen. Als Einteilung wird hierfür der *Model for End Stage Liver Disease - Score* verwendet. Er erfasst Bilirubin, Kreatinin und das *International Normalized Ratio* (INR). Diese drei Parameter ergeben einen Punktwert, der mit der Dreimonats-Mortalität korreliert. Bei Patienten mit einem HCC gilt jedoch

eine Sonderregelung (sog. *Standard Exception (SE)*). Durch diese Regelung erhalten HCC-Patienten mit zunehmender Wartezeit Extrapunkte, um eine Entlistung durch einen Tumorprogress zu verhindern. Fernmetastasierung sowie eine Makrogefäßinvasion sind Kontraindikationen für eine Transplantation (4,28). Bei Einhaltung der Mailand-Kriterien werden 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 70-80% erreicht, die Rate an Lokalrezidiven liegt bei 15%.

Für das BCLC-Stadium B ist die Transarterielle Chemoembolisation (TACE) die Therapie der ersten Wahl. Das HCC wird regelhaft, im Gegensatz zum restlichen Lebergewebe, hauptsächlich aus Ästen der *A. hepatica* und nur wenig aus dem portalvenösen Blut versorgt. Deshalb schädigen transarterielle Verfahren vor allem den Tumor und weniger das funktionelle Lebergewebe. In die Leberarterie, die den Tumor versorgt, werden ein Zytostatikum, gefolgt einer embolisierenden Substanz oder mit Zytostatika-beladene Mikropartikel, sog. *Beads*, gegeben. Als Zytostatikum werden meist Anthrazykline wie Doxo- oder Epirubicin oder Platinderivate, z.B. Cisplatin, verwendet. Die TACE kann darüber hinaus zur Überbrückung der Wartezeit bis zur Transplantation eingesetzt werden, um weiteres Tumorwachstum zu verhindern, das einer Transplantation im Wege stehen kann. Überschreitet das HCC die Mailand-Kriterien, kann mittels TACE ein sog. „*Downstaging*“ versucht werden. Darunter versteht man eine Behandlung, welche die Tumorlast senken soll, sodass die Kriterien für ein niedrigeres Tumorstadium mit der dafür vorgesehenen Therapie erreicht wird. Im Falle eines HCC wäre das Ziel beispielsweise eine Schrumpfung des Tumors, sodass in einem experimentellen Ansatz sogar eine Resektion oder Transplantation in Erwägung gezogen werden kann (44).

Im fortgeschrittenen BCLC Stadium C ist für Patienten mit gutem Allgemeinzustand und kompensierter Leberzirrhose eine systemische Therapie mit Multikinase-Inhibitoren angezeigt. Sorafenib ist das Mittel erster Wahl, da es in zwei Phase III Studien zu einem signifikant längerem Überleben bei tolerablen Nebenwirkungen im Vergleich zu einer Placebo-Gabe führte (10,7 vs. 7,9 Monate (6) bzw. 6,5 vs. 4,2 Monate (7)). Für Patienten mit CP B zeigte sich in einer Metaanalyse trotz vergleichbarem Ansprechen, Sicherheit und Verträglichkeit ein deutlich kürzeres Überleben (8,8 Monate CP A vs. 4,6 Monate CP B) (45). Alle in der S3-Leitlinie aufgeführten Studien zeigten keinen Überlebensvorteil einer Sorafenib Therapie gegenüber *Best Supportive Care (BSC)* im CP B Stadium. Die Sicherheit scheint aber in diesem Stadium gegeben, sodass die Sorafenib-Therapie in diesem Stadium eine

Einzelfallentscheidung erfordert (28). Sorafenib soll bei guter Verträglichkeit bis zum Tumorprogress gegeben werden. Lenvatinib erwies sich in einer weiteren randomisierten kontrollierten Studie als gleichwertige Alternative zu Sorafenib (46). In den aktuellen EASL Guidelines von 2018 wird auf Grundlage der RESORCE-Studie für HCC-Patienten Regorafenib als Zweitlinien-Medikament empfohlen. Regorafenib zeigte in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie einen Überlebensvorteil für HCC-Patienten, die unter Sorafenib einen Tumorprogress zeigten (47). Weitere medikamentöse Therapieansätze, die sich aktuell in der Erprobung befinden, sind die sog. Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab sowie eine Kombination dieser Immuntherapien mit anderen Substanzen. 2017 zeigten Nivolumab und 2018 Pembrolizumab in Phase II Studien gute antitumorale Effekte (4,48,49). Zwei Phase III Studien zu beiden Medikamenten konnten bisher das Überleben nicht statistisch signifikant verbessern. Untersucht wurden Nivolumab vs. Sorafenib als Erstlinienbehandlung (CKECKMATE 459, (50)) sowie Pembrolizumab vs. Placebo als Zweitlinientherapie (KEYNOTE 240, (51)). Ein weiterer Ansatz, der gerade im Rahmen von Studien getestet wird, ist die Kombinationstherapie einer anti-angiogenen Substanz mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Während sich noch einige dieser Kombinationstherapien in Phase I und II Studien befinden, laufen bereits drei Phase III Studien. Dazu gehört die LEAP-002 Studie, die Pembrolizumab in Kombination mit Lenvatinib als Erstlinientherapie vs. Lenvatinib mit Placebo testet (52). Die COSMIC-312 Studie testet die Kombination aus Cabozatinib mit Atezolizumab vs. Sorafenib vs. Cabozatinib (52). Die Ergebnisse beider Studien sind noch ausstehend. Die IMbrave150-Studie testet die Kombination von Bevacizumab mit Atezolizumab vs. Sorafenib als Erstlinientherapie. Obwohl die Studie noch läuft, ist bereits ein signifikanter Überlebensvorteil sowie ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben der Kombinationstherapie gegenüber der bisherigen Erstlinientherapie mit Sorafenib nachgewiesen worden (52). Aufgrund dieses Ergebnisses erscheint es wahrscheinlich, dass die Kombinationstherapie aus Bevacizumab und Atezolizumab in Zukunft die neue Erstlinientherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen und inoperablen HCC werden wird.

Im Endstadium D ist keine tumorspezifische Therapie mehr indiziert bzw. möglich, da die Patienten neben einem HCC insbesondere unter einer terminalen Lebererkrankung leiden. Kommen diese Patienten nicht für eine Transplantation in Frage, stehen eine suffiziente Schmerztherapie und eine symptomatische Therapie der Leberzirrhose im Sinne eines BSC - Ansatzes im Vordergrund.

2.1.4 Prognose

Die Prognose des HCC ist grundsätzlich schlecht (2). Dazu trägt das Fehlen von Frühsymptomen maßgeblich bei. Hinzu kommt häufig das Problem der begleitend vorliegenden Leberzirrhose, die ebenfalls einen potenziell vital bedrohlichen Zustand darstellt. Außerdem ist das HCC äußerst radio- und chemoresistent (8,53). Die individuelle Prognose hängt jedoch sehr stark vom Tumorstadium ab. Für das HCC im Stadium 0 liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Resektion bei 80-90% (4). In den westlichen Nationen werden ca. 5-10% aller HCC in Stadium 0 entdeckt, wohingegen in Japan bis zu 30% aller HCC in Stadium 0 diagnostiziert werden. Dies führt man auf ein intensiveres Screening-Programm zurück (4). Im Stadium A leben nach fünf Jahren noch 50-70% der Patienten, der Median liegt bei ca. drei Jahren. Ab BCLC Stadium B ist der Therapieansatz in der Regel palliativ und die Lebenserwartung stark eingeschränkt. Im Stadium B beträgt die mediane Überlebenszeit 16 Monate, im Stadium C liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei sechs bis acht Monaten, nach einem Jahr lebt noch ein Viertel der Patienten. Die Lebenserwartung für Patienten im Stadium D beträgt im Median drei bis vier Monate (4).

2.2 Krebsentstehung und Molekularbiologie des HCC

2.2.1 Allgemeine Krebsentstehung

Tumorerkrankungen teilen in wiederkehrenden molekularen Signalwegen zentrale Eigenschaften. Diese wurden von Hanan und Weinberg im Jahr 2000 und in einer Erweiterung 2011 als die „*Hallmarks of Cancer*“ beschrieben (siehe Abbildung 2.6 (54,55)). Gesunde Zellen, die sich zu malignen Zellen entwickeln, erwerben durch dynamische Veränderungen des Genoms diese zentralen Eigenschaften (54,55). Der Erwerb dieser Eigenschaften findet in einem mehrstufigen Prozess statt und befähigt Zellen, zu malignen Tumoren zu entarten (55).

Zu den Eigenschaften, den sog. „*Hallmarks*“, gehört die autarke Steuerung proliferativer Signale, die zu unkontrolliertem Wachstum führt (siehe „*sustaining proliferative signaling*“ in Abbildung 2.6). Oftmals wird dies von Onkogenen vermittelt. Onkogene entstehen durch aktivierende Mutationen oder Gen-Amplifikationen aus sog. Proto-Onkogenen (56). Deren Produkte können die maligne Entartung einer Zelle beeinflussen (56). Zu den Produkten der Proto-Onkogene gehören vor allem für

Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, Transkriptionsfaktoren sowie intra- und extrazelluläre Botenstoffe/-moleküle, welche an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind (57).

Die abnorm gesteigerte Proliferation kann weiterhin durch die Ausschaltung proliferationshemmender Tumorsuppressorgene bewirkt werden („*evading growth suppressors*“, Abbildung 2.6). Der Funktionsverlust dieser Gene begünstigt ebenfalls die Tumorentstehung (56). Tumorsuppressorgene kodieren unter anderem für Enzyme, Signalstoffe und Transkriptionsfaktoren, welche Zellwachstum und -teilung begrenzen sowie die Entstehung weiterer Mutationen verhindern (z.B. DNA-Reparaturenzyme und pro-apoptotische Proteine) (57).

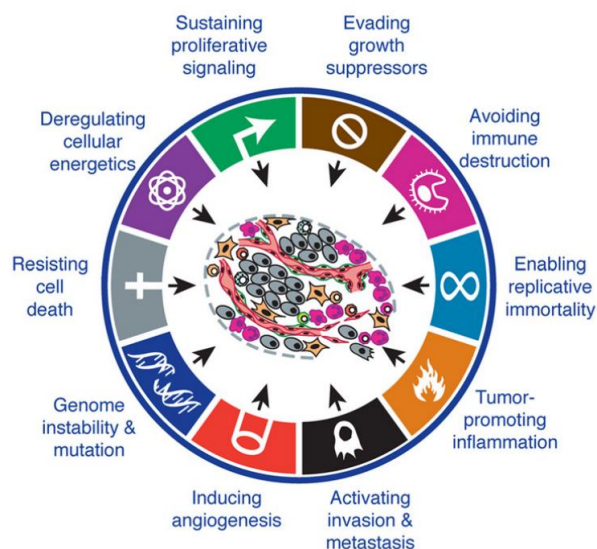


Abbildung 2.6: Die „Hallmarks of Cancer“. Dieses Schaubild zeigt die im Jahr 2000 verfassten sowie die in der Ergänzung 2011 erweiterten zentralen Eigenschaften von Tumorerkrankungen, adaptiert nach (55).

Tumorzellen zeichnet ein unbegrenztes replikatives Potential („*enabling replicative immortality*“, Abbildung 2.6) aus. Im gesunden Gewebe ist die Zahl an Zellteilungen begrenzt. Ist diese Anzahl erreicht, gehen die Zellen in einen Zustand über, der sich Seneszenz nennt (58). Sie verbleiben in der G0 Phase des Zellzyklus und sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Versuchen sie es dennoch, wird unter anderem die Apoptose eingeleitet. Begrenzt wird die Anzahl der Zellteilungen durch die Telomere, eine repetitive Sequenz an den Chromosomenenden (57). Sie schützen die Chromosomenenden, da mit jeder Zellteilung ein kurzes DNA-Segment an den Chromosomenenden verloren geht (56). Durch die Telomere kommt es aber nicht zum

Informationsverlust. Physiologischer Weise kommt in Stammzellen, pathologischer Weise auch in Tumoren, häufig ein Enzym namens Telomerase vor. Dieses Enzym ist in der Lage, die Telomere immer wieder zu verlängern, damit der Zustand der Seneszenz nicht erreicht wird (58).

Tumorzellen besitzen außerdem die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung („*activating invasion and metastasis*“, Abbildung 2.6). Eine besondere Rolle spielt dabei die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Bei der EMT verlieren epitheliale Tumorzellen ihre epithelialen Eigenschaften wie Zellpolarität, Zell-Zell-Verbindungen sowie ihre epithelialen Oberflächenmarker. Sie erlangen dafür mesenchymale Oberflächenproteine und Eigenschaften, z.B. die Fähigkeit zur Migration und Invasion (59). Die veränderten Zellen sind nun in der Lage, sich aus dem Zellverband zu lösen. Durch Eindringen in die Blutgefäße und Absiedelung in anderen Organen kommt es zur Metastasierung.

Darüber sind Tumoren durch die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) gekennzeichnet („*inducing angiogenesis*“). Eine entscheidende Rolle wird dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zugeschrieben, der die Neubildung von Endothelzellen und zum Aussprossen neuer Gefäße führt. Die Genexpression von VEGF kann durch onkogene Signaltransduktion oder bei hypoxischen Zuständen hochreguliert werden (55). Weiterhin können Tumor-assoziierte Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe zur Angiogenese beitragen. Auch der hochregulierte *Fibroblast Growth Factor* (FGF) wirkt sich positiv auf die Angiogenese aus (60). Die neugebildeten Tumorgefäße unterscheiden sich von den üblichen Gefäßen durch eine unregelmäßige und poröse Gefäßstruktur mit abnorm vielen Verzweigungen, vermehrter Durchlässigkeit und Mikrohämorrhagien (61).

Tumore sind außerdem durch eine sog. genomische Instabilität gekennzeichnet, es kommt zu einer starken Zunahme der Mutationsrate („*genome instability & mutation*“). Durch den Verlust von P53 und/oder die Inaktivierung von DNA-Reparaturenzymen werden Tumoren zunehmend empfänglich für mutagene Substanzen bzw. Moleküle und akkumulieren Mutationen (55,56).

Tumore sind weiterhin durch das Umgehen des programmierten Zelltodes („*resisting cell death*“). Häufig liegt eine Inaktivierung des Tumorsuppressors P53 vor, der bei genetischen Schäden die Apoptose einleitet. Durch die Freisetzung von Überlebenssignalen (z.B. IGF) oder anti-apoptotischen Faktoren, wie z.B. Bcl-2, kann

die Apoptose ebenfalls umgangen werden. Ein weiterer Mechanismus besteht in dem Herunterregulieren pro-apoptotischer Faktoren, wie beispielsweise Bax (55).

Tumorzellen zeigen einen veränderten Metabolismus („*deregulating cellular energetics*“). Von den malignen Zellen wird auch unter aeroben Bedingungen die Glykolyse gegenüber der oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung bevorzugt, obwohl die Effizienz der ATP-Gewinnung deutlich geringer ist (55). Dies ermöglicht allerdings die Energieversorgung unter hypoxischen Bedingungen, die in Tumoren häufig auftreten. Außerdem können die Zwischenprodukte der Glykolyse wiederum als Bausteine für Nukleotide und Aminosäuren verwendet werden, die zur Zellteilung benötigt werden (62).

Eine weitere Besonderheit von Tumoren ist die Fähigkeit, der Elimination des Immunsystems zu entgehen („*avoiding immune destruction*“). Dies wird unter anderem durch das Freisetzen von immunsuppressiven Faktoren der Tumorzellen erreicht, z.B. Interleukin (IL) 10 oder *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1), (55,63). Darüber hinaus können neben deutlich veränderten und dadurch immunogenen Tumorzellen, welche eine Aktivierung des Immunsystems auslösen und zerstört werden, auch wenig immunogene Tumorzellen entstehen, die der Überwachung des Immunsystems entgehen können (63).

Die Karzinogenese wird jedoch nicht ausschließlich von den Tumorzellen vermittelt, sondern auch die unmittelbare Umgebung von Tumoren trägt dazu bei. Man bezeichnet dies als Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*, TME) (64). Tumoren können durch Chemotaxis Immunzellen anziehen und eine Entzündungsreaktion auslösen („*tumor promoting inflammation*“). Durch das entzündliche Mikromilieu, bestehend aus Immunzellen und Stroma, werden Wachstumsfaktoren und Überlebenssignale freigesetzt. Über Chemokine werden außerdem regulatorische T-Zellen angelockt, welche die Aktivität anderer Immunzellen hemmen und dadurch die Immuntoleranz vermitteln (65).

2.2.2 Karzinogenese der Leber

Das HCC entsteht in der Regel im Rahmen von chronischen Leberzellschädigungen bzw. Lebererkrankungen. Chronische inflammatorische Prozesse begünstigen den Zelluntergang von Hepatozyten, z.B. durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Dadurch werden viele Zyklen hepatischer Zellschäden,

Zelltod und anschließende Regeneration provoziert (66). Es kommt zu einem dauerhaft erhöhten Zellumsatz, welcher unter anderem zu fehleranfälligen Reparaturprozessen führen kann (67). Es entsteht ein verändertes, inflammatorisches Mikromilieu, das pro-onkogene Eigenschaften aufweist (siehe oben). Dies begünstigt die Entstehung von Mutationen und damit eine maligne Transformation (67). Neben der chronischen Inflammation spielen auch direkt kanzerogene Mechanismen durch Viren oder Toxine bei der Tumorentstehung eine Rolle. Dazu gehören beispielsweise *TP53* Mutationen durch das Aflatoxin oder der Einbau der viralen HBV-DNA in das menschliche Genom (68).

Die maligne Entartung von Hepatozyten stellt einen mehrstufigen Prozess dar, der durch einen sequenziellen Erwerb von genetischen und morphologischen Veränderungen gekennzeichnet ist (67). Zunächst entstehen sog. dysplastische Knoten als Vorstufe eines HCC. Hier werden geringgradige (*low-grade dysplastic nodules*, LGDN) von höhergradigen (*high-grade dysplastic nodules*, HGDN) Dysplasien unterschieden, die sich bei einem Durchbruch der Basalmembran zu invasiven Karzinomen entwickeln können (frühes HCC). Kennzeichnend für das frühe HCC ist die gute Differenzierung bei bereits vorhandener Stromainvasion (69). Kommen weitere Mutationen hinzu, kann sich ein fortgeschrittenes HCC entwickeln. In der Regel ist es nur noch mäßig differenziert und neigt vermehrt zu Gefäßinvasion und Metastasierung (69).

2.2.3 Molekularbiologie des HCC

Die früheste und häufigste molekulare Veränderung während der malignen Transformation ist die Reaktivierung der Telomerase. Sie ist in 90% der HCC vorhanden und bereits in Dysplasien nachweisbar (70,71). Mit 54-60% ist die Mutation im *Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)*-Promotor am häufigsten (72). *TERT*-Promotor-Mutationen werden deshalb als „*Gatekeeper*“ der hepatischen malignen Transformation bezeichnet (72). Weitere Mechanismen, die zu einem unbegrenzten replikativen Potenzial führen, sind *TERT*-Amplifikationen, -Translokationen oder HBV- und Adeno-assoziierte Virus Typ 2 - Insertionen (71). Andere häufige Mutationen betreffen, wie in Tabelle 2.3 dargestellt, die *Wingless Type (WNT)/β-Catenin*-Signalkaskade. Am häufigsten handelt es sich um aktivierende Mutationen des *CTNNB1*-Gens (72). Mutationen des inhibitorischen Komplexes, z.B. *AXIN1* oder *APC*, welche die Funktion von β-Catenin hemmen, sind ebenfalls Treiber-Mutationen des

HCC. Zu den häufigsten Mutationen des HCC gehört außerdem *TP53* (73). Es ist in etwa bei der Hälfte aller Tumorerkrankungen mutiert, das HCC inbegriffen (56).

Andere Gene, bei denen in HCC häufig Mutationen auftreten, sind beispielsweise *CCND1* und *MYC*. Mit ca. 5 - 20% gehört auch der Retinoblastom (RB) – Signalweg zu den häufigen molekularen Veränderungen (2-12% *CDKN2A*, 3-8% *RB1*, (72), siehe Tabelle 2.3). Weitere Schlüssel-Mutationen betreffen die Signalwege *PI3K/AKT/MTOR* (Phosphoinositol-3-Kinase/Proteinkinase K/*Mammalian Target of Rapamycin*) und *RAS/RAF/MAPK* (*Rat Sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-activated Protein Kinase*). Zu der *RAS/RAF/MAPK* Signalkaskade gehört auch das *Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3* (*RPS6KA3*), gleichbedeutend mit der Bezeichnung als *Ribosomal S6 Kinase 2* (*RSK2*). Dieses Enzym ist in zwei bis neun Prozent der Fälle mutiert. *RPS6KA3* wird von der *MAPK* aktiviert und hemmt die *RAS*-Aktivität im Prinzip einer negativen Rückkopplungsschleife. Umgekehrt führt die Inaktivierung von *RPS6KA3* zu einer dauerhaften Aktivierung des *RAS/RAF/MAPK*-Signalkaskade (siehe Abbildung 2.6) (74). *RAS*, *PI3K/AKT* sowie die β -Catenin Signalkaskade werden wiederum von *FGF19* bzw. des *FGF*-Rezeptors 4 aktiviert. Amplifikationen von *FGF19* sind ebenfalls häufiger auftretende Veränderungen (75,76).

Tabelle 2.3: Die am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene bzw. Signalwege nach Marquardt et al. (67), Schulze et al. (75) und Zucman-Rossi et. al (72).

funktioneeller Prozess/ Signalweg	Gen/Signalweg	Mutationen in %	phänotypische Assoziation
Telomerase-Reaktivierung	TERT	54-60	früheste genetische Veränderung
WNT/ β -catenin	CTNNB1	11-37	gute Differenzierung, intratumorale Cholestase
	AXIN1	5-15	
	APC	1-2	
Zellzyklus	TP53	12-48	schlechte Differenzierung, genomische Instabilität, schlechtes Outcome
	CDKN2A	2-12	
	RB1	3-8	
	CCND1	5-14	
epigenetische Veränderungen	ARID1A/ARID2/MLL	4-25	schlechte Prognose
Proliferation	PI3K/AKT/MTOR	10-51	aggressiver Phänotyp, Invasivität und Metastasierung
	RAS/RAF/MAPK	10-43	
	RPS6KA3	2-9	
	FGF19	5-14	
oxidativer Stress	NFE2L2/ KEAP1	5-15	oxidative Phosphorylierung, Tumorprogression
Immunantwort	IL6/JAK/STAT	9	

Mutationen des WNT/ β -Catenin-Signalwegs sind häufig mit intratumoraler Cholestase, vergleichsweise guter Differenzierung, geringer Inflammation des tumorumgebenden Gewebes und längerem Überleben assoziiert (77). Es besteht weiterhin eine Assoziation mit *TERT*-Mutationen und ätiologisch mit hohem Alkoholkonsum (75,78). Die HCC, bei denen *TP53* mutiert ist, befinden sich häufig in fortgeschrittenen Stadien und sind durch chromosomale Instabilität, schlechte Differenzierung, kompaktes histologisches Muster, Angiogenese und vermehrter Inflammation charakterisiert (74,77). Zusammengefasst zeigen HCC, bei denen eine *TP53* Mutation vorliegt, ein deutlich aggressiveres biologisches Verhalten. Ätiologisch lässt sich eine Assoziation mit chronischen HBV-Infektionen herstellen (75). Amplifikationen in Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A- (*CDKN2A*) sowie die selteneren Mutationen im *RB1*-Gen sind ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (75,79). Auch andere Mutationen in Genen, die den Zellzyklus betreffen (*MYC*, *CCND1*), sind mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert (79). Amplifikationen im *FGF19*-Gen sind mit Leberzirrhose, hepatischen Dysplasien und HCC-Entwicklung assoziiert (80). Außerdem führt eine Amplifikation von *FGF19* vermehrt zu EMT und vermittelt dadurch Invasivität und Metastasierung. Demzufolge ist diese Amplifikation auch mit einer schlechten Prognose assoziiert (75,76).

Neben genetischen Alterationen spielen auch epigenetische Veränderungen bei der Hepatokarzinogenese eine bedeutende Rolle. Dazu gehören die Modifikation der Chromatinstruktur, veränderte Nukleosomenpositionen sowie Histon- und DNA-Methylierungen. Für das HCC wurden Mutationen der Tumorsuppressoren *AT-rich interactive domain-containing protein 1A* und *2* (*ARID1A* und *ARID2*) identifiziert (72). In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das HBV Protein x (*HBx*) zu einer Suppression von *ARID2* führt (81). Weiterhin gibt es Hinweise für *Hbx/MLL4* Fusionstranskripte, die zu einer erhöhten Expression von *Mixed Leukemia Lineage Protein 4* (*MLL4*) führen. Das Enzym *MLL4* gehört zu den Histon-Methyltransferasen (81). Es besteht ein ätiologischer Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen im HCC und chronischen Lebererkrankungen, darunter HBV, NASH, HCV und Alkoholabusus.

Vermehrter oxidativer Stress, vermittelt durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wird ebenfalls mit hepatischer Tumorinitiation und -progression in Verbindung gebracht. Umgekehrt führen aber zu hohe ROS-Konzentration zum Zelltod. Um diesem zu entgehen, wird das induzierbare antioxidative System aktiviert, welches die erhöhte

ROS-Konzentration in Tumoren reduziert und folglich die Apoptose verhindert. Reguliert wird dieses System hauptsächlich von dem Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), der von dem Gen *NFE2L2* kodiert wird (82). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Onkogene wie *KRAS*, *B-RAF* und *MYC* zu einer erhöhten Expression von NRF2 führt (82). Auch bei HCC-Tumoren konnten aktivierende Mutationen des *NFE2L2*-Gens und inhibitorische Mutationen von *KEAP-1* als Treiber-Mutationen identifiziert werden (68,72,83).

Interessanterweise gehen die oben genannten Veränderungen der Signalwege mit unterschiedlichem biologischem Verhalten einher. Das HCC kann daher auch in molekulare Subtypen eingeteilt werden (78,84–87). Das Ziel dieser Klassifizierung ist es, zuverlässige Biomarker zu finden und prädiktive Aussagen treffen zu können. Obwohl die Benennung und die Anzahl der Subtypen in den verschiedenen Studien variieren, lassen sich grundsätzlich zwei Subtypen herausfiltern: Ein proliferativer Typ mit aggressiver Tumorbilogie und schlechter Prognose sowie ein nicht-proliferativer Typ mit besserer Überlebensrate und weniger aggressivem Verhalten. Die proliferative Gruppe weist vor allem Mutationen der Zellzykluskontrolle auf und neigt zu chromosomaler Instabilität. Mutationen, die mit gesteigerter Proliferation, Invasion und Metastasierung in Verbindung stehen, sind ebenfalls in diesem Typ überrepräsentiert. Dazu gehören beispielsweise der *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), RAS/MAPK, RPS6KA3, FGF19, PI3K/AKT, MTOR und der *Insulin-like Growth Factor* (IGF) (72,77,87,88). Dieser Subtyp zeigt weiterhin Expressionsmuster hepatischer Progenitorzellen und weist stammzelltypische Oberflächenproteine wie das Epitheliale Zelladhäsionsprotein (EpCAM), Zytokeratin 19, *Stem-cell Growth Factor Receptor* (c-KIT), oder Notch auf (85,86,89). Klinisch weist der proliferative Subtyp eine schlechte Differenzierung und hohe Alpha-Fetoprotein (AFP)-Werte auf, neigt zu Gefäßinvasion, Frührezidiven und bildet häufiger Satellitenmetastasen. Das Überleben fällt bei diesem Subtyp gering aus (77,87).

Der Nicht-proliferative Subtyp zeigt ein Mutationsspektrum, das vor allem *TERT*-Mutationen, *CTNNB1*/ β -Catenin sowie Immun- und metabolische Signalwege betrifft. Klinisch zeigt sich ein günstigeres biologisches Verhalten mit kleineren, gut differenzierten Tumoren, weniger Satellitenmetastasen und Gefäßinvasion, mikrotrabekuläres und pseudoglanduläres histologisches Muster und niedrigeren AFP-Werten. Die Überlebenszeit von Patienten mit dem nicht-proliferativen Subtyp ist deutlich länger als die des proliferativen Typs (72,77,87,88).

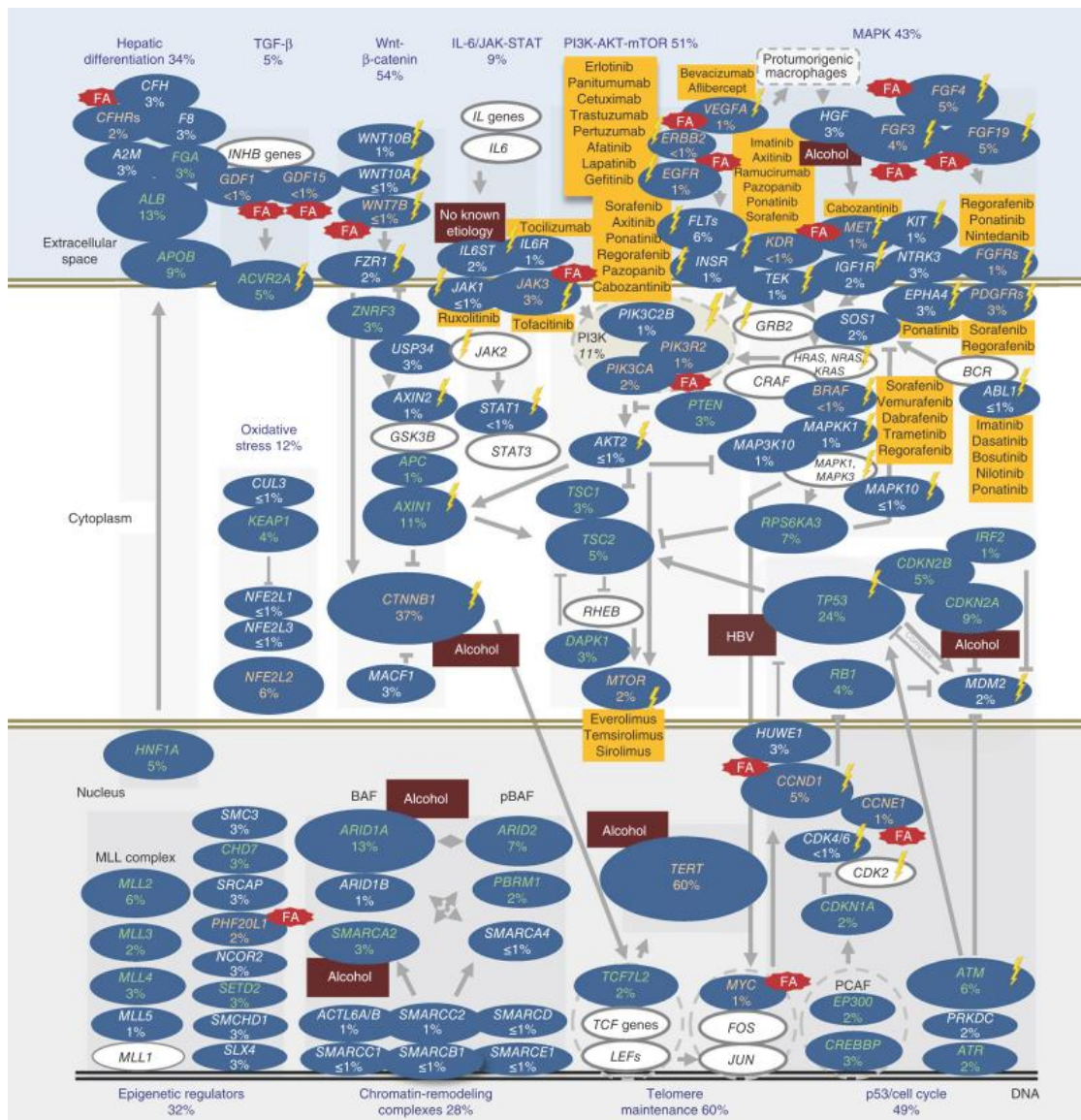


Abbildung 2.7: Die molekulare Landschaft der veränderten Gene und Signalkaskaden des HCC, adaptiert nach (75). Die Häufigkeit der Mutationen ist in Prozent angegeben. In grüner Schrift: inaktivierende Mutationen, orangene Schrift: aktivierende Mutationen, weiße Schrift: unbekannt. Die gelben Kästen zeigen Angriffspunkte von Medikamenten (Phase I -III Studien), die braunen Kästen assoziierte Ätiologie. Weiß hervorgehoben sind Gene, die keine Veränderungen aufweisen.

2.3 Wirkungsweise und Nebenwirkungen von Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®) ist ein Multikinase-Inhibitor, der seit 2007 auf dem Markt ist und neben dem HCC auch Einsatz beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom sowie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom findet (90). Sorafenib ist die erste zugelassene systemische Therapie zur Behandlung des HCC im fortgeschrittenen Stadium mit nachgewiesenem Nutzen für die Patienten. Sie führte in zwei Phase III Studien zu

einer signifikanten Verlängerung des Überlebens (siehe 2.1.3 sowie (6,7)). Wie im Kapitel 2.1.3 beschrieben, wird Sorafenib primär im BCLC Stadium C empfohlen, kann aber auch in BCLC B bei einem Tumorprogress unter der TACE eingesetzt werden (90). Sorafenib inhibiert Serin-/Threonin-Kinasen des VEGF-Rezeptors, des PDGF-Rezeptors, c-KIT, *FMS-like Tyrosin-Kinase* (FLT), RET/Proteinkinase C und die zytoplasmatischen Serin-/Threonin-Kinasen B-RAF und C-RAF (55). Durch VEGF und PDGF wird die Angiogenese behindert, die RAF-Inhibition führt zur Unterbrechung der RAS/RAF/MAPK-Signalkaskade. Damit führt Sorafenib zu einem dualen Mechanismus, der sowohl auf die Proliferation als auch auf die Tumor-Angiogenese abzielt (59). Außerdem gibt es Hinweise in experimentellen Tiermodellen, dass Sorafenib die Apoptose fördert und immunmodulatorisch wirkt (91–93). Eingesetzt wird Sorafenib in der Dosis von 800 mg pro Tag (2x 400mg/Tag) oder dosisreduziert 400 mg pro Tag (6). Das Medikament wird zu 80% hepatisch über das Cytochrom P 450 System eliminiert. Die Pharmakokinetik erwies sich auch bei Niereninsuffizienz sowie bei moderat eingeschränkter Leberfunktion (CP A und B) als unverändert (90).

Sorafenib kann zu vielseitigen Nebenwirkungen führen. Zu den häufigsten und gravierendsten gehören vor allem gastrointestinale, dermatologische, kardiovaskuläre Nebenwirkungen und Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust und Fatigue. Zu den gastrointestinalen Nebenwirkungen gehören Diarrhö, Bauchschmerzen, Übelkeit und Anorexie. Dermatologische Probleme umfassen das Hand-Fuß-Syndrom, Alopezie, trockene Haut, Juckreiz und Ausschlag. Die gastrointestinalen Nebenwirkungen, das Hand-Fuß-Syndrom, Ausschlag sowie Fatigue sind die Nebenwirkungen, die am meisten die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen und häufig zu einer Dosisreduktion zwingen (10). Allerdings sind frühe dermatologische Nebenwirkungen, die eine Dosisanpassung erfordern, mit einem besseren Überleben vergesellschaftet (94). Auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen sowie Blutbildveränderungen sind bei einer Therapie mit Sorafenib zu beachten. Häufig führt Sorafenib zu arterieller Hypertonie, die aber gut auf die Standardmedikation anspricht. Selten kann es zu hypertensiven Krisen, Herzinsuffizienz, myokardialer Ischämie und QT-Verlängerungen kommen. Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse ist bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms mit Sorafenib signifikant erhöht. Dies scheint jedoch für die Behandlung des HCC nicht zu gelten (10). Sorafenib kann außerdem zu Veränderungen der Stimme und selten zu Wundheilungsstörungen führen (6,7,10). Die häufigsten Gründe für die Beendigung der Therapie beim HCC sind Tumorprogression, Diarrhö, Fatigue, das sog. Hand-Fuß-Syndrom und

Leberdysfunktion (10,90). Die meisten Nebenwirkungen, die zum Absetzen des Medikaments zwingen, setzen innerhalb der ersten vier Wochen ein (10).

Das Ansprechen von Sorafenib zeigt sich in einer Verzögerung des Tumorprogresses und einer Verlängerung des Überlebens. Trotz Behandlung kommt es aber bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten zu einem Progress, was wiederum für die Entwicklung einer Resistenz spricht. Deshalb sollen alle Patienten mit fortgeschrittenem HCC bis zur Feststellung eines Tumorprogresses mit Sorafenib behandelt werden (siehe 2.1.3). Sorafenib führt zu wenigen partiellen und selten zu vollständigen Remissionen (6,7). Es wird deshalb eher davon ausgegangen, dass Sorafenib den Tumor in eine Art Ruhezustand versetzt (95). Die Tumorgröße kann trotz Ansprechen aufgrund einer Tumornekrose im Inneren des HCC-Herdes stabil bleiben oder sogar zunehmen (28). Der Tumorprogress soll mittels identischer Bildgebung wie bei Diagnosestellung (CT oder MRT) sowie durch einen Anstieg des AFP-Werts erfasst werden. Auch eine Verschlechterung des Allgemeinzustands kann als Tumorprogress gewertet werden (28). Der AFP-Wert muss jedoch im klinischen Gesamtkonzept betrachtet und z.B. bei aktiver Hepatitis B, C und NASH nur eingeschränkt verwendet werden, da diese tumorunabhängig oftmals zu einem Anstieg des Tumormarkers führen können (96). Die Erhöhung von AFP entsteht im Rahmen chronischer Inflammations- und Regenerationsprozessen in der Leber und ist neben Hepatitiden auch mit dem Vorliegen und dem Schweregrad einer Leberzirrhose assoziiert (97).

Von der Therapie mit Sorafenib profitiert schätzungsweise maximal ein Drittel der Patienten, denn die meisten Tumoren werden innerhalb von sechs Monaten resistent oder weisen sogar eine primäre Resistenz auf (8). Die Sorafenib-Therapie ist außerdem mit einem erheblichen Kostenaufwand vergesellschaftet und kann zu ausgeprägten Nebenwirkungen führen. Umso wichtiger ist es, dass zuverlässige Biomarker die Patienten mit hohen Aussichten auf ein Ansprechen bereits vor Therapiebeginn identifizieren können.

2.4 Mechanismen der Sorafenib-Resistenz

Resistenzmechanismen sind molekulare Veränderungen oder Variationen, welche Tumoren gegenüber einer Therapie unempfindlich machen. Diese können von Therapiebeginn an vorhanden sein (primäre Resistenz) oder sich im Verlauf der Therapie entwickeln (sekundäre oder erworbene Resistenz). So wird auch die Effektivität von Sorafenib häufig durch die Entstehung von Resistenzen limitiert. Die phänotypische Heterogenität des HCC sowie die ausgeprägte molekulare Diversität stellen hierbei große Herausforderungen in der Bewältigung der Therapieresistenz im Allgemeinen, aber auch der gegenüber Sorafenib, dar (59,98). Die derzeit verfügbaren Daten, welche eine prädiktive Aussage über Resistenzentwicklung treffen, sind überwiegend im Rahmen präklinischer Studien. In der Klinik gibt es bisher keine validen Daten, die eine Resistenz vorhersagen können.

2.4.1 Aktivierung kompensatorischer Signalkaskaden

Einer der möglichen Resistenzmechanismen des HCC gegenüber Sorafenib ist die Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs (9). PI3K/AKT reguliert wichtige Zellfunktionen wie Überleben, Proliferation, Metabolismus und Migration (95). Viele Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von PI3K/AKT einen Kompensationsmechanismus der Sorafenib-Effekte darstellen könnte (9). Beim HCC wird der PI3K/AKT Signalweg mit der Akquisition von Stammzelleigenschaften und EMT in Verbindung gebracht bzw. der EMT-Prozess wird von der Aktivierung von PI3K/AKT begleitet (95,99).

RAS/RAF/MEK/ERK (MEK=MAPK/ERK Kinase; ERK= *extracellular signal-regulated proteine kinase*) ist ein wichtiger Signalweg in Zellen, der in HCC konstitutiv aktiviert ist und mit Sorafenib-Resistenz in Verbindung gebracht wird (100). Die Aktivierung dieser Signalkaskade kann unter anderem durch positive Regulatoren, wie z.B. der Rezeptor Tyrosinkinase *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) erfolgen (101). EGFR ist in über der Hälfte aller HCC überexprimiert und wurde in mehreren Studien als Mechanismus der Sorafenib-Resistenz identifiziert (101,102). Durch verschiedene Methoden wie inhibitorische nicht-kodierende RNA, Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) oder monoklonale Antikörper konnte gezeigt werden, dass durch die Inaktivierung von EGFR die Sensibilität von Sorafenib wieder erhöht wird (101,102). In klinischen Phase III Studien zeigte die Blockade von EGFR allerdings keine vielversprechenden Effekte.

Weder der monoklonale Antikörper Cetuximab noch die Kombination des TKI Erlotinib und dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab konnten das Überleben im Vergleich zu einer alleinigen Sorafenib-Therapie wesentlich verbessern (9). Auch durch die Inhibition negativer Regulatoren, wie beispielsweise RPS6KA3, kann eine konstitutive Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK Signalwegs hervorgerufen werden (siehe Abbildung 2.7, (75)). Durch den Verlust der negativen Rückkopplung wird die Signalkaskade stark aktiviert und könnte dadurch einen Resistenzmechanismus von HCC gegenüber Sorafenib darstellen (72). Bislang gibt es jedoch keine Untersuchungen, welche eine mögliche Assoziation einer RPS6KA3-Mutation und der Entwicklung einer Sorafenib-Resistenz testeten.

Eine Aktivierung der RAS/RAF/MEK/ERK Signalkaskade resultiert vor allem in der Aktivierung der MAPK, eine Familie von Proteinkinasen, die hauptsächlich durch mitotische Stimuli aktiviert wird. Die MAPK Signaltransduktion besteht aus ERK, c-Jun N-terminale Kinase (c-Jun) und p38MAPK. Die beiden letzteren, c-Jun und die p38MAPK werden vor allem bei zellulärem Stress aktiviert wie beispielsweise bei Entzündungsreaktionen (103). Pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren, aber auch oxidativer Stress sind starke Aktivatoren der p38MAPK (103,104). Auch c-Jun und die p38MAPK könnten an der Sorafenib-Resistenz beteiligt sein (100,105,106). Die MAPK14 stellt eine wichtige Isoform der Stress-aktivierten p38 α MAPK dar und könnte, wie aus vorherigen Studien hervorgeht, ebenfalls zur Resistenz von Sorafenib beitragen (95,104,106). Eine dieser Studien nutzte die RNA-Interferenz, bei der kleine doppelstränge RNA (z.B. short hairpin (sh)RNA) mit der messenger (m)RNA interagiert und dadurch die Translation verhindert. Auf diese Weise kann die Genexpression gezielter Gene negativ beeinflusst werden. Ein *in vivo* RNA-Interferenz-Screening, bei der verschiedene shRNA in HCC tragende Mäusen eingebracht wurden, zeigte die Inhibition der MAPK14 in HCC-Zellen ein verbessertes Ansprechen auf Sorafenib (104,106). Bei dauerhafter Sorafenib-Exposition wiesen HCC-Zellen eine Induktion der MAPK14 auf. Anschließend reagierten die HCC-Zellen nicht mehr auf Sorafenib und zeigten trotz Behandlung hohe Proliferationsraten (106). Die Kombination aus Sorafenib und einer Inhibition der MAPK14 führte bei Mäusen mit transplantierten humanen HCC zu einem signifikant längeren Überleben als Sorafenib allein (112). In einer weiteren Studie konnte die Induktion von MAPK14 in Sorafenib-resistenten HCC-Zelllinien, die HBV replizierten, bestätigt werden (104). Im Vergleich zu HBV-negativen Zellkulturen zeigten HBV replizierende Zelllinien ein schlechteres Ansprechen auf Sorafenib bei gleichzeitig erhöhten pERK Expression, welche die Autoren der

Induktion der MAPK14 zugeschrieben. Die Blockade des MAPK14 Signalwegs führte zu einer erheblichen Verbesserung des Ansprechens und wirkte der Resistenzentwicklung der Zellen entgegen. Daher stellten die Autoren die Vermutung an, dass die MAPK14 für die HBV-assoziierte Sorafenib-Resistenz verantwortlich sein könnte (104). Auch für c-Jun gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung bei einer Sorafenib-Resistenz des HCC hindeuten. Im Vergleich zu sensiblen HCC-Zellen wurden in resistenten Zellen höhere Expressionslevel sowohl auf mRNA Ebene als auch dem phosphorylierten c-Jun Protein nachgewiesen (100,105). Außerdem zeigten Patienten, deren Tumoren vermehrt c-Jun aufwiesen, ein insgesamt kürzeres Überleben und sprachen schlechter auf Sorafenib an (105). Die Inhibition von c-Jun konnte wiederum die Apoptose der Sorafenib-behandelten HCC-Zellen erhöhen (100).

In einer anderen Studie wurde der IGF und FGF bzw. deren Rezeptoren in resistenten HCC-Geweben überrepräsentiert nachgewiesen (98). Weiterhin zeigte die Untersuchung angereicherte Gensignaturen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, wie z.B. MYC, MTOR, und des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 Alpha (HIF1 α). Bei sensiblen Zellen waren dagegen Gensignaturen hepatischer Differenzierung, Zelladhäsion und Inflammation überrepräsentiert (98). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass FGF in die Resistenzvermittlung von Sorafenib involviert ist. Eine weitere Studie wies nach, dass die Überexpression von FGF19 den apoptotischen Effekt von Sorafenib begrenzt. Der Knockdown von FGF19 in resistenten HCC-Zellen führte zur Sensibilisierung (107).

Weitere Signalwege und Wachstumsfaktoren, die mit der Resistenz von Sorafenib assoziiert werden konnten, betreffen unter anderem die JAK/STAT (Januskinase/*Signal Transducers and Activators of Transcription*) Signalkaskade (108). STAT3 spielt bei Leberentzündungen eine Rolle sowie bei der Tumorprogression. Das Protein ist in vielen Tumoren konstitutiv aktiviert (109). In Sorafenib-resistenten Zellen wurde eine signifikante STAT3-Aktivierung nachgewiesen und der STAT3-Inhibitor Dovitinib sensibilisierte die HCC-Zellen für Sorafenib (109). Weiterhin wurde *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)/c-Met als potenzieller Resistenzmechanismus identifiziert (95). VEGFA Amplifikationen sind dagegen mit gutem Ansprechen assoziiert (108).

2.4.2 Der Einfluss des Tumormikromilieus (TME)

Die Inflammation spielt bei der Hepatokarzinogenese sowie beim TME des HCC eine wichtige Rolle. Das TME des HCC weist einen niedrigeren pH-Wert als gesundes Lebergewebe auf und ist von Hypoxie geprägt (64). Viele Studien beobachteten, dass die Therapie mit Sorafenib die Hypoxie im Tumorgewebe verstärkt (110). Durch die anti-angiogene Wirkung werden Zellklone gefördert, die in der Lage sind, sich an die hypoxischen Zustände zu adaptieren. Man vermutet deshalb, dass die Sorafenib-induzierte Hypoxie einen Resistenzmechanismus darstellt (8,9,110). Resistente HCC weisen im Tumorrinneren eine ausgeprägtere Hypoxie auf als Sorafenib-sensible HCC (110). Einige Studien weisen darauf hin, dass das reduzierte Ansprechen im hypoxischen TME auf die Stabilisierung der HIF zurückzuführen ist (110). Es kommt zur Hochregulation der Enzyme für die Glykolyse sowie diverser onkogener Signalkaskaden durch HIF1 α und HIF2 α (110). Weiterhin treten Tumor-assoziierte neutrophile Granulozyten vermehrt nach Sorafenib-Behandlung in HCC-Geweben auf. Diese Zellen fördern die Neovaskularisation und stellen einen potenziellen alternativen Weg zur Induktion der Angiogenese dar (111).

2.4.3 Sonstige bisher bekannte Resistenzmechanismen

Weitere Mechanismen, die als Ursache für Resistenzentwicklung von Sorafenib entdeckt wurden, sind unter anderem Krebsstammzellen (CSC). Sie machen nur eine geringe Subpopulation der Tumorzellen aus, sind zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung in der Lage und häufig mit Therapieresistenz assoziiert (112,113). Diverse Untersuchungen zeigen, dass in Sorafenib-resistenten HCC vermehrt CSC auftreten (98,112,114).

Auch die EMT soll in der Entwicklung der Sorafenib-Resistenz eine Rolle spielen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der EMT und schlechtem Ansprechen auf Sorafenib gibt (8,59,114). Weiterhin gibt es Studien, die darauf hinweisen, dass die Behandlung mit Sorafenib den Prozess der EMT begünstigen kann (59,115,116).

Weiterhin wird die Autophagie, ein zellulärer Recyclingprozess, als potentieller Resistenzmechanismus diskutiert, allerdings ist die Datenlage uneindeutig (117,118). Auch einige nicht-kodierende RNA, vor allem *micro-* und *long noncoding*-RNA, werden durch ihre Beteiligung an der Regulation der Genexpression als potenzielle Vermittler

einer Sorafenib-Resistenz diskutiert (82,119). Es wurden bereits einige micro- und long noncoding RNA identifiziert, bei denen ein Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter RNA und dem Ansprechen der Sorafenib-Therapie beim HCC nachgewiesen wurde (120,121).

2.5 Zielsetzung der Studie

Bei dem HCC handelt es sich um eine aggressive und tödliche Tumorerkrankung, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, wenn keine kurative Therapie mehr zur Verfügung steht. Die systemische Therapie der ersten Wahl in fortgeschrittenen Stadien ist der Multityrosinkinase-Inhibitor Sorafenib. Trotz signifikanter Verbesserung des Überlebens entwickeln viele Patienten unter der Therapie eine Resistenz und nur wenige weisen eine partielle oder komplette Remission auf, sodass Sorafenib lediglich zu einer medianen Lebensverlängerung von drei Monaten führt. Bislang gibt es keine zuverlässigen Biomarker, welche die Patienten erfassen, die von der Therapie mit Sorafenib besonders profitieren können. Weiterhin könnte eine verbesserte Kenntnis der Resistenzmechanismen die Effektivität von Sorafenib erhöhen, bzw. mögliche Zielstrukturen für eine Kombinationstherapie mit Sorafenib und anderen zielgerichteten Medikamenten identifizieren, welche die Resistenzbildung verhindern können.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, korrespondierende molekulare Veränderungen zu finden, welche die Chemoresistenz gegenüber Sorafenib sowie die Entwicklung von Rezidiven nach Sorafenib-Exposition vermitteln.

In dieser Studie sind Gewebeproben von HCC-Patienten untersucht worden, die im Verlauf ihrer Krankengeschichte eine Therapie mit Sorafenib erhalten haben. Die Proben wurden mittels immunhistochemischen Färbungen auf Proteine untersucht, die potenziell mit der Resistenz von Sorafenib in Verbindung stehen. Anschließend wurde mit den zuvor erhobenen klinischen Patientendaten der potenzielle Einfluss dieser Biomarker auf das Ansprechen von Sorafenib überprüft. Unter der Annahme, dass das Ansprechen auf Sorafenib mit der Überlebenszeit korreliert, wurde der Einfluss des Färbeergebnisses auf die Überlebenszeit unter Sorafenib untersucht. Darüber hinaus wurden mittels RNA-Sequenzierungsproben von Patienten mit einem besonders guten oder schlechten Ansprechen auf Sorafenib analysiert und getestet, welche differenziell

exprimierten Gene mit einem guten bzw. schlechtem Ansprechen auf die Therapie mit Sorafenib assoziiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen beantwortet:

1. Haben ausgewählte klinische Parameter, wie z.B. Alter, Geschlecht, BCLC-Stadium bei Erstdiagnose, AFP-Wert, Leberfunktion, Tumorgröße sowie Anzahl der Herde oder das Vorliegen einer portalvenösen Invasion (PVI), einen Einfluss auf das Überleben unter Sorafenib?
2. Haben die immunhistochemischen Färbungen der Biomarker MAPK14 und RPS6KA3 einen Einfluss auf das Überleben bzw. das Ansprechen auf Sorafenib?
3. Wie viele bzw. welche Gene/Gensets/funktionelle Netzwerke sind bei Patienten mit besonders gutem bzw. schlechtem Ansprechen auf Sorafenib über-/unterrepräsentiert? Gibt es ein molekulares Profil, welches mit gutem bzw. schlechtem Ansprechen assoziiert ist?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, California, USA
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, DE
Heidolph Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
inoLab pH 7110	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Konfokalmikroskop Zeiss Vert.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Multigourmet Dampfgarer	Braun, Kronberg (Taunus), DE
Nano Drop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
VWR Ministar Silverline	VWR, Radnor, USA
Wet Chamber Simport	Simport Scientific (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA

3.1.2 Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Santa Clara, California, USA
Allprep DNA/RNA FFPE-Kit (50) ®	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2	Illumina, San Diego, USA

peqGOLD Total RNA Kit

Peqlab Biotechnologie GmbH,
Erlangen, DE

3.1.3 Reagenzien

Agilent RNA 6000 Nano Leiter

Agilent, Santa Clara, California, USA

Agilent RNA 6000 Nano Reagenzien

Agilent, Santa Clara, California, USA

Bovines Serumalbumin 10%

Roth, Karlsruhe, DE

Dako Pen

Dako, Carpinteria, CA

DNase

Qiagen GmbH, Hilden, DE

Ethanol

Roth, Karlsruhe, DE

Eukitt® quick-hardening mounting medium

Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE

Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III

Merck, Kenilworth, USA

HCL 1 Molar

Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE

Liquid DAB+ Substrate Chromogen System

Dako, Carpinteria, CA

LSAB2 System HRP

Dako, Carpinteria, CA

Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x

Gibco Invitrogen, Karlsruhe; DE

Proteinase K

Qiagen GmbH, Hilden, DE

RNase A

Qiagen GmbH, Hilden, DE

RNase-freies Wasser

Qiagen GmbH, Hilden, DE

Tri-Natrium-Dihydrat 10x

Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE

Triton X 100

Roth, Karlsruhe, DE

Tween 20 for molecular biology

PanReac AppliChem, Barcelona, ES

Wasserstoffperoxid 30%

Roth, Karlsruhe, DE

Xylol

PanReac AppliChem, Barcelona, ES

3.1.4 Antikörper

Anti-RPS6KA3 (polyklonal)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Biotinylated link universal (Anti-Maus/Anti-Hase)	Dako, Carpinteria, CA
Mitogen Activated Protein Kinase 14, Polyclonal Antibody	MyBioSource, Vancouver, CA

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Centrifuge Tubes 50 ml, steril	VWR, Radnor, USA
Collection Tube, 2 ml	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Deckgläser	Knittel-Gläser, Braunschweig, DE
MaiMed-sensitiv Untersuchungshandschuhe	MaiMed, Neuenkirchen, DE
Reaktionsgefäß mit Deckel, 1,5 ml, EasyFit RNase Away	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE Thermo Scientific™ Molecular BioProducts™, Waltham, USA
TipOne® Barrier Tips 1000 µl, 200 µl, 10 µl	Stockwell Scientific, Scottsdale, USA

3.1.6 Software

FastQC (Version 0.11.5)	Babraham Bioinformatics (Babraham Insitute, Babraham, UK)
<i>Gene Set Enrichment Analysis</i> (Version 4.0.3)	Broad Institut, Cambridge, USA (http://www.broad.mit.edu/gsea/)
HISAT2 (Version 2.1.0)	Center for Computational Biology, John Hopkins University, Baltimore, USA
ImageJ 1.5	
<i>Ingenuity® Pathway Analysis</i>	Qiagen GmbH, Redwood City, USA
Microsoft Excel (<i>Office 365</i>)	
R (Version 3.6.0) mit folgenden <i>packages</i> :	<i>Dplyr</i> (Version 0.8.3) <i>featureCounts</i> (Rsubread-1.34.6)

ggplot2 (Version 3.2.1)

Readxl (Version 1.3.1)

Survival (Version 3.1-8)

Survminer (Version 0.4.6)

Bioconductor packages:

ComplexHeatmap (Version 2.0.0)

DESEQ2 (Version 1.36.0)

limma (Version 3.40.6)

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv, Probengewinnung und Studienaufbau

Anhand des HCC-Registers der Universitätsmedizin Mainz wurden seit seiner Etablierung 2003 insgesamt 248 Patienten identifiziert, die an einem HCC litten, im Verlauf ihrer Erkrankung mit Sorafenib (Nexavar®) behandelt wurden und die über eine Gewebeprobe zur wissenschaftlichen Nutzung verfügten. Sorafenib wurde nach Einschätzung des Behandlers in der Dosis von 800 mg oder dosisreduziert 200-400 mg täglich verordnet. Die Länge der Einnahme war vor allem abhängig von dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie oder dem Auftreten von Nebenwirkungen, betrug jedoch mindestens einen Monat, um einen Therapieabbruch aufgrund einer reinen Medikamententoxizität auszuschließen. Die Gewebeproben der HCC-Patienten wurden in Zusammenarbeit mit der Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie sowie dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz gesammelt, aufbereitet und gelagert. Zur Aufnahme in die Studie war es unerheblich, ob es sich um die Erstmanifestation, ein Rezidiv oder eine Metastase des HCC handelte und wo der Tumor lokalisiert war. Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen und Dauermedikation spielten, abgesehen von Sorafenib, für die Aufnahme in die Studie keine Rolle. Alle Patienten wurden sowohl über die Sammlung klinischer Daten als auch über die wissenschaftliche Nutzung des entnommenen Tumorgewebes aufgeklärt. Eine Einwilligungserklärung der Patienten sowie das Ethikvotum der zuständigen Landesbehörde lagen vor. Alle Patientendaten wurden pseudonymisiert verwendet.

Untersucht wurden Biopsien (nachfolgend als „Stanzen“ bezeichnet) und Resektate von Primärtumoren, Rezidiven und Metastasen sowie Explantate. Die Proben wurden nach ihrer Entnahme in Paraffin eingebettet und bis zu den Untersuchungen im Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz gelagert.

Von den 248 Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, mussten 138 von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Proben der Patienten qualitativ unzureichend waren oder die Probe aus anderen Gründen nicht zur Verfügung stand. Weitere Patienten wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da von deren Proben zu wenig Material für die Experimente vorhanden war (n=32 Patienten). Für die Zielsetzung der vorliegenden Studie waren die Überlebenszeitdaten und der Zeitraum der Sorafenib-Einnahme wichtig. Bei vollständigem Fehlen von Angaben zu Nachsorge und Sorafenib-Einnahme wurden die Patienten von der Auswertung ausgeschlossen. Dies traf auf weitere neun Patienten zu, sodass letztendlich 69 Patienten an der Auswertung teilnahmen. Bei einigen Patienten standen mehrere Proben zu Verfügung (85 Proben von 69 Patienten), von denen für die Immunhistochemie jeweils eine Probe pro Patient ausgewählt wurde. Die Auswahl bei mehreren Proben desselben Patienten wird im Detail in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Der Studienaufbau ist ergänzend in Abbildung 3.1 dargestellt.

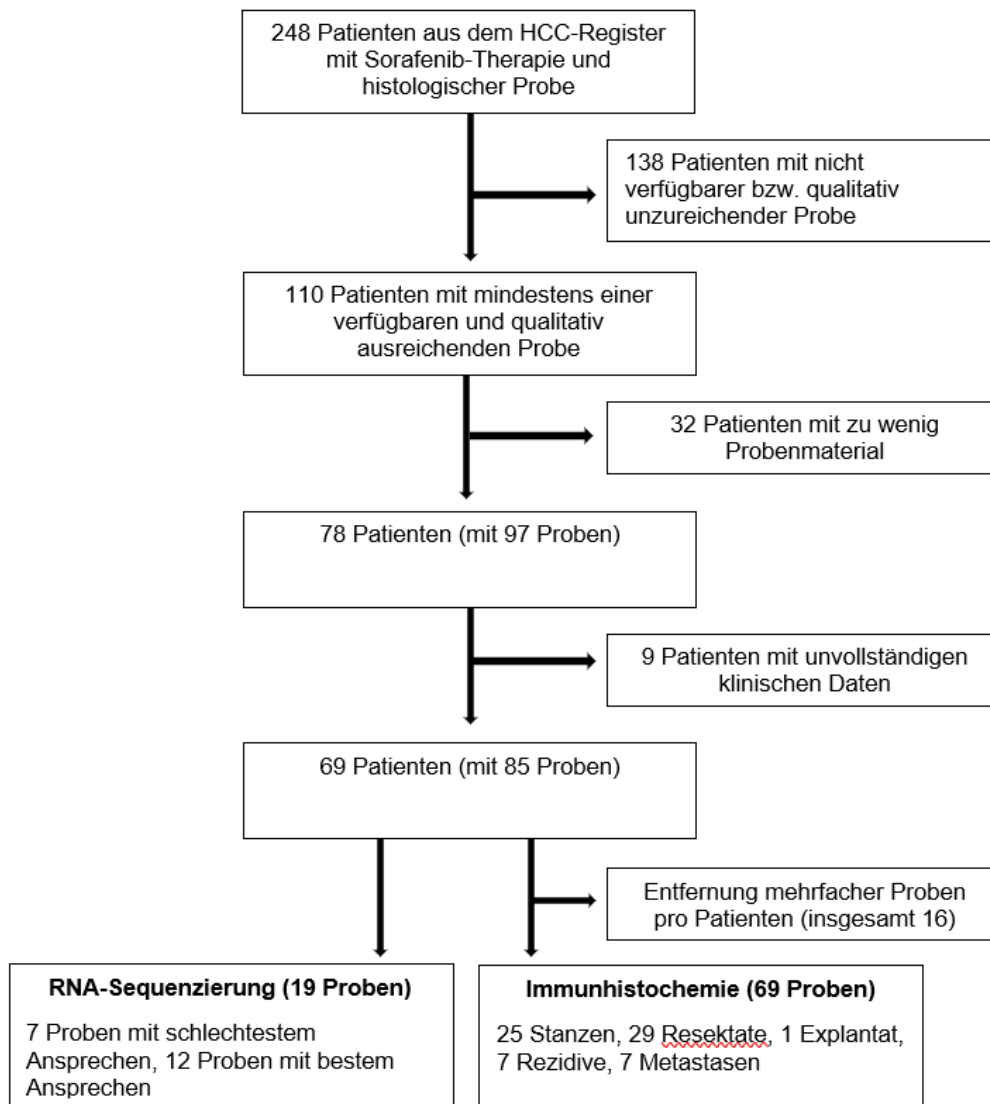


Abbildung 3.1: Aufbau der Studie

Aus dem zuvor beschriebenen Kollektiv wurden für die RNA-Sequenzierung insgesamt 19 Proben ausgewählt. Diese 19 Proben setzen sich aus zwei Gruppen („best“ und „worst“) zusammen, deren Genexpressionsprofile miteinander verglichen wurden. Für die sog. Gruppe „best“ wurden Proben von Patienten ausgewählt, deren Ansprechen auf Sorafenib besonders gut war. Für die sog. Vergleichsgruppe „worst“ wurden entsprechend Proben von Patienten ausgewählt, die nicht oder schlecht auf Sorafenib ansprachen. Da das Ansprechen in dieser Studie anhand der Länge der Überlebenszeit bestimmt wurde, wurden für die Gruppe „best“ die Patienten selektiert, welche die längste Überlebenszeit unter Sorafenib aufwiesen. Für die Gruppe „worst“ wurden die Patienten mit der kürzesten Überlebenszeit, jedoch mindestens einen Monat (siehe oben), unter der Sorafenib-Therapie ausgesucht.

3.2.2 Auswertung der klinischen Daten

Um eine mögliche Assoziation zwischen den molekularbiologischen Daten und den klinischen Parametern zu dem Ansprechen auf Sorafenib zu testen, wurde von der Annahme ausgegangen, dass Patienten, die gut auf Sorafenib ansprechen, das Medikament länger einnehmen, länger progressionsfrei leben und letztendlich eine längere Gesamtüberlebenszeit aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Überlebenszeit unter Sorafenib-Einnahme als Parameter für das Therapieansprechen gewählt. Daraufhin wurde der Zeitraum von Beginn der Sorafenib-Einnahme bis zum Tod oder Drop-Out als Überlebenszeit definiert. Aus den unten aufgeführten Daten wurden mittels Excel die Dauer der Sorafenib-Einnahme sowie die Überlebenszeit in Tagen berechnet.

Nachfolgende Daten wurden für diese Studie erhoben und verwendet:

- Geburtsdatum, Alter bei Erstdiagnose und Geschlecht der Patienten
- Beginn und Ende der Sorafenib-Einnahme, Grund des Therapieabbruchs und Nebenwirkungen unter der Sorafenib-Einnahme
- Todesdatum oder Datum des letzten Nachsorgetermins
- BCLC-Stadium bei Erstdiagnose
- Ätiologie der Erkrankung
- AFP-Werte bei Erstdiagnose
- Tumorgröße in Zentimetern und Anzahl der Tumorherde bei Erstdiagnose
- Laborparameter zur Beurteilung der Leberfunktion bei Erstdiagnose (CP Klassifikation)
- Vorliegen einer PVI

3.2.3 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie (IHC) können ausgewählte Proteine auf Grundlage einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion angefärbt und nachgewiesen werden. Zellen, welche die gewünschten Markerproteine auf der Zelloberfläche exprimieren, können dadurch sichtbar gemacht werden. An die Proteinoberfläche (Antigen) bindet zunächst der Primärantikörper, der das Markerprotein spezifisch bindet. An das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet der Sekundärantikörper, der mit einem Farbstoff gekoppelt ist (siehe Abbildung 3.2, (121)). Um die Farbreaktion zu verstärken, wurde ein biotinylierter Antikörper verwendet. Das bedeutet, an den Sekundärantikörper

binden mehrere Biotin-Moleküle, die wiederum an Streptavidin und die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt sind. Durch die erhöhte Enzymkonzentration wird der Farbeffekt intensiviert (122). Als Farbstoff diente Diaminobenzidin (DAB). Die Färbung wurde nach untenstehendem Protokoll durchgeführt (siehe Tabelle 3.1)

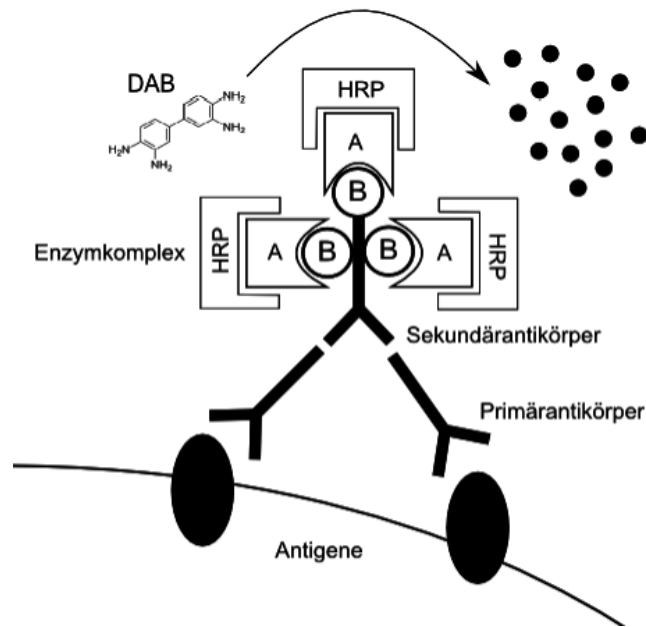


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung und des Biotin (B) – Streptavidin (A) – HRP – Komplexes (122).

Tabelle 3.1: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen.

Schritt	Protokoll	Zeit
1	Deparaffinieren und Hydrieren durch absteigende Alkoholreihe	
	2x Xylol	10 min
	100% Ethanol	5 min
	96% Ethanol	5 min
	80% Ethanol	5 min
	70% Ethanol	5 min
	destilliertes Wasser	10 min
	PBS	5 min
2	Demaskierung der Antigene	
	Kochen im Dampfgarer bei pH 6 (Citratpuffer)	1 h
3	3x Waschen mit PBS-Tween	5 min
4	PBS-Triton X 0,3%	5 min
5	3x Waschen mit PBS-Tween	5 min
6	Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität	

	3% Wasserstoffperoxid (in destilliertem Wasser)	5 min
7	Waschen mit 1x Wasser und 3x PBS-Tween	5 min
8	Blocken unspezifischer Proteinbindungen	
	10% Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS-Tween	1 h
9	Primärantikörper, verdünnt in PBS-Tween	
	MAPK-14 1:80	über Nacht
	RPS6KA3 1:500	über Nacht
10	Waschen mit 3x PBS-Tween	5 min
11	Sekundärantikörper	
	biotinylated link universal von Dako (Anti-Maus/Anti-Hase)	30 min
12	Waschen mit 3x PBS-Tween	5 min
13	Augmentation der Färbung mit Streptavidin-HRP von Dako	30 min
14	Waschen mit 3x PBS-Tween	5 min
15	Durch Zugabe von DAB färben	5 min
16	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	15 sec
17	Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe	
	destilliertes Wasser	
	70% Ethanol	20-30 sec
	80% Ethanol	20-30 sec
	96% Ethanol	20-30 sec
	100% Ethanol	20-30 sec
	2x Xylol	10 min
18	Einbetten in Histol	

3.2.4 Mikroskopische Auswertung

Beide angefärbten Proteine, MAPK14 und RPS6KA3, werden sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern exprimiert (123,124). Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung die jeweils überwiegende Farbreaktion gewertet. RPS6KA3 und MAPK14 werden in fast allen Organen, so auch in der Leber, exprimiert. Von daher konnte gesundes Lebergewebe als Positivkontrolle verwendet werden (123,124). Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls für beide Antikörper durchgeführt. Dazu wurde die Färbung nach dem oben genannten Protokoll durchgeführt, ohne dass die Antikörper aufgetragen wurden.

Nach Etablierung der Färbung wurden alle Proben jeweils mit beiden Antikörpern gefärbt. Im Anschluss wurden von den Schnitten, soweit möglich, zehn Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Zeiss Vert.A1 aufgenommen. Die Fotos wurden mit ImageJ 1.5 ausgewertet. Bei stark über- oder unterbelichteten Fotos wurde die Belichtung vor der Auswertung entsprechend angepasst.

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung nicht als falsch positive Farbreaktion fehl zu deuten, wurde nur eine starke Farbreaktion als positiv gewertet. Die Hintergrundfärbung kann beispielsweise durch die endogene Peroxidase-Aktivität in Hepatozyten bedingt sein. Als Farbvergleich dienten die Positivkontrollen (s. Abb. 3.3 und 3.4).

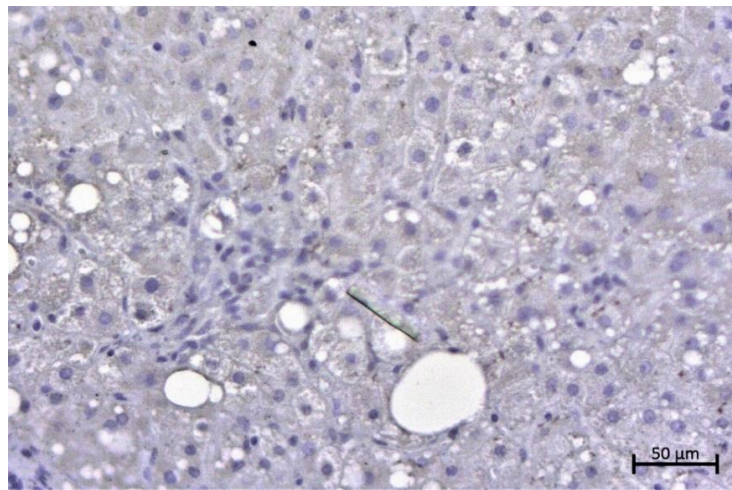
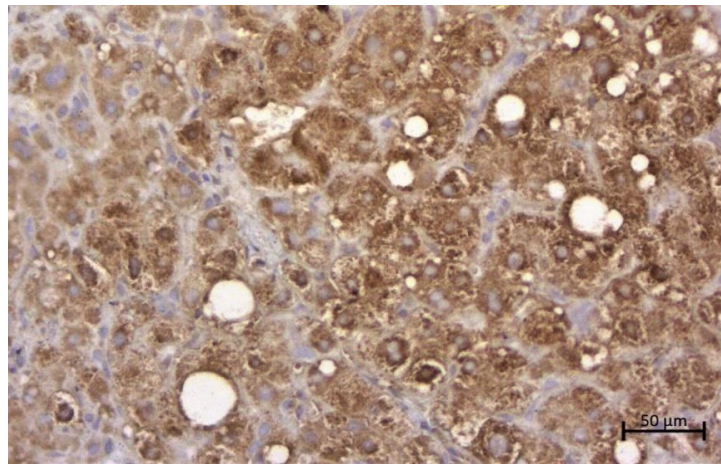


Abbildung 3.3: Normale Leber in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung. Oben Positivkontrolle, unten Negativkontrolle.

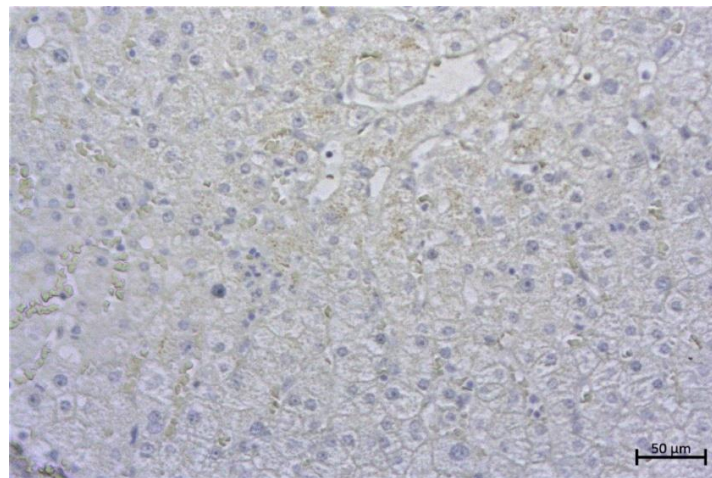
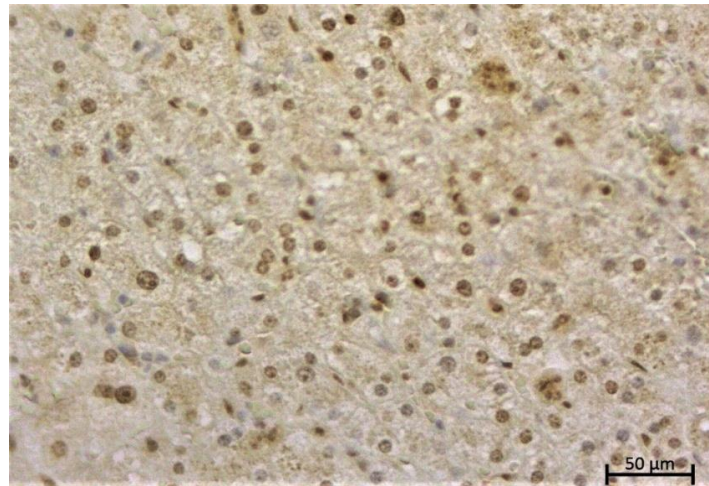


Abbildung 3.4: RPS6KA3 Färbung an gesunder Leber in 20-facher Vergrößerung. Oben: Positivkontrolle unten Negativkontrolle.

Zur Auswertung wurde ein semiquantitatives Auswertungssystem verwendet, das dem etablierten „*quickscore*“ ähnelt (125). Der Anteil positiver Zellen wurde geschätzt und in die nachfolgend aufgeführten Kategorien eingeteilt (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Färbekategorien nach prozentualem Anteil positiver Zellen.

% positive Zellen	Erklärung
0-5%	0: kein Nachweis
5-20%	1: geringfügiger Nachweis
20-50%	2: leichte Streuung
50-80%	3: ausgeprägter Nachweis
80-100%	4: konfluierende Zellen und Fasern

Von den zehn Gesichtsfeldern pro Probe wurde jeweils mittels Excel der Median berechnet. Um ein untersucherabhängiges Bias zu reduzieren und die interne Validität

zu erhöhen, wurden alle Bilder von zwei Untersuchern unabhängig voneinander ausgewertet. Von den Medianwerten beider Untersucher wiederum wurde der Median bestimmt und auf ganze Zahlen gerundet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde R in der Version 3.6.0 benutzt (126). Die Daten wurden zuvor in Microsoft Excel bereinigt, formatiert und mittels des packages *readxl* (Version 1.3.1, (127)) importiert. Patienten ohne histologische Proben wurden von der Analyse ausgeschlossen. Beim Vorliegen mehrerer histologischer Proben desselben Patienten wurde jeweils eine ausgewählt. Bevorzugt wurde diejenige Probe, die zeitnah vor der Sorafenib-Therapie entnommen wurde. Wenn aus dem gleichen Jahr mehrere Proben zur Verfügung standen, wurden Resektate und Explantate gegenüber Biospiestanzten bevorzugt sowie der Primärtumor gegenüber Metastasen.

Zum Vergleich der klinischen Daten zwischen den Gruppen „best“ und „worst“ wurde für die Dauer der Sorafenib-Einnahme, der Überlebenszeit und des Alters der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um die Leberfunktion, Vorkommen einer PVI oder BCLC-Stadium zwischen den Gruppen zu vergleichen, wurde der exakte Test nach Fisher eingesetzt. Zur Testung des potenziellen Einflusses dermatologischer Nebenwirkungen von Sorafenib auf die Überlebenszeit wurde ebenfalls der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Zur Bewertung des Einflusses des jeweiligen verblindeten Untersuchers auf die histologische Färbekategorie wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet und Scatterplots erstellt. Zum Ausschluss einer systematischen Verzerrung durch die Probenart (Stanzbiopsie oder Resektionspräparat) wurde auch der Mann-Whitney-U-Test benutzt.

Für die Überlebenszeitanalysen wurden die packages *Survival* (Version 3.1-8, (128)) und *Survminer* (Version 0.4.6, (129)) verwendet. Bei unbekanntem Todesdatum wurde stattdessen der letzte Nachsorgetermin benutzt, die Zeiten gingen als zensierte Daten in die Analyse ein. Eine Dichotomisierung für stetige Variablen erfolgte entsprechend dem Histogramm im Falle des Alters (über und unter 65, Median 64 Jahre) respektive in Anlehnung an in der Klinik gängige Grenzwerte für das AFP (< 400 oder > 400 ng/ml). Für die Färbekategorien von RPS6KA3 und MAPK14 sowie die Variablen Alter, Geschlecht, BCLC Stadium bei Erstdiagnose, AFP-Wert, Leberfunktion, uni-

/multifokales Tumorwachstum und PVI (ja oder nein) wurden Kaplan-Meyer-Kurven erzeugt und mit dem Logrank-Test auf Unterschiede getestet. Schließlich wurde mit den Daten eine Cox-Regression erstellt, wobei die Färbekategorien dichotomisiert wurden (≤ 2 gegenüber >2). Als graphische Darstellung wurde ein Forest-Plot gewählt.

Statistische Tests werden mit p-Wert angegeben, ein Wert von $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

3.2.6 DNA-/RNA-Isolation

Die kombinierte DNA- und RNA- Isolation wurde mit Hilfe des *Allprep DNA/RNA FFPE-Kits*® durchgeführt und erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Zunächst werden DNA und RNA voneinander getrennt. Dies gelingt mit einem speziellen Lysepuffer, welcher durch die unterschiedliche Lösbarkeit von DNA und RNA eine sequenzielle Freisetzung von DNA und RNA ermöglicht (130). Nach der Auftrennung werden DNA und RNA einzeln aufgereinigt und eluiert. Die Durchführung der kombinierten DNA-/RNA-Isolation ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

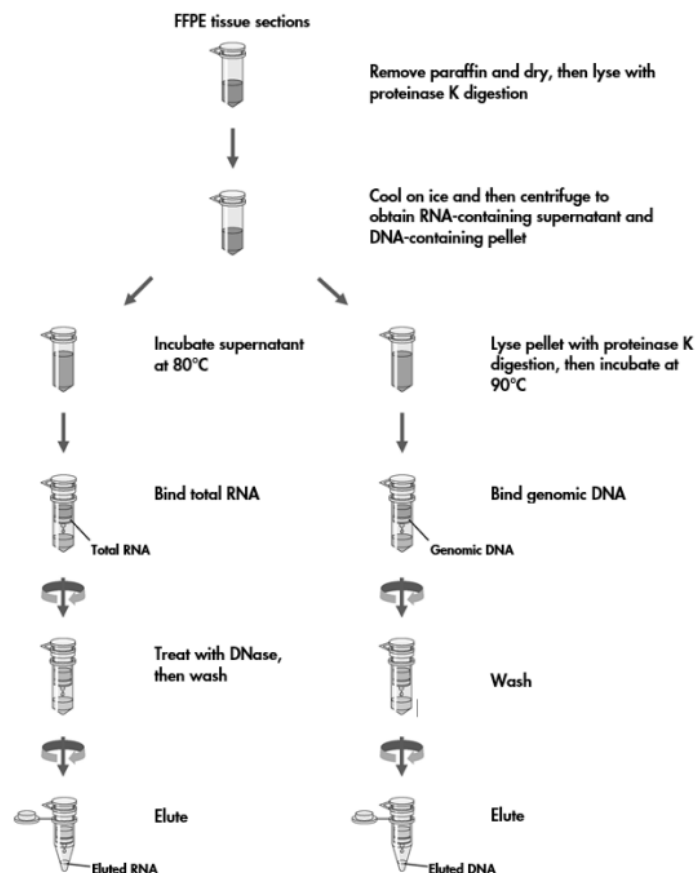


Abbildung 3.5: Durchführung einer kombinierten DNA-/RNA-Isolation mittels Allprep DNA/RNA FFPE-Kit® von Qiagen, adaptiert nach (130).

Da die Gewebeproben in Paraffin eingebettet waren, wurden diese zunächst durch Xylol und Alkohol entparaffiniert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffer chemisch lysiert. Guanidin-Thiocyanat inaktiviert als denaturierendes Agens RNAsen und DNAsen, sodass die Isolation intakter DNA und RNA gelingt. Durch den Zusatz von Proteinase K wird die RNA gelöst, während die DNA und andere unlösliche Bestandteile präzipitieren (130). Nach 20-minütiger Zentrifugation setzte sich ein DNA-enhaltendes als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der RNA-enhaltende Überstand wurde entnommen und in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Der RNA-enhaltende Überstand wurde bei 80°C inkubiert, um verbliebene Formalin-Crosslinks zu lösen (130). Im Anschluss wurde eine 70%ige Ethanol-Lösung zugeführt, welche die verbliebenen Zellbestandteile, vor allem Proteinreste, fällte. Die RNA wurde im gleichen Schritt in ein spezielles Reaktionsgefäß (*RNeasy MinElute® spin column*) gegeben und durch Zentrifugation an eine Silikalgel-Membran gebunden. Im Anschluss wurden DNA-Reste durch das Zugeben von DNase verdaut und eliminiert. In den nachfolgenden Waschschrritten wurde die RNA weiter aufgereinigt und der Alkohol wieder entfernt. Zum Schluss wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Um die DNA zu extrahieren, wurde das DNA-Pellet zunächst resuspendiert und durch die erneute Zugabe von Proteinase K lysiert. Danach wurde die DNA-Lösung zwei Stunden bei 90°C inkubiert, um die DNA-Crosslinks des Formalins aufzulösen (130). Im Anschluss wurde eine Ethanol-Lösung zugeführt und die DNA danach ebenfalls in ein Reaktionsgefäß mit einer speziellen Filtermembran (*QIAmp MinElute® spin column*) übertragen, welche DNA bindet aber für andere Zellbestandteile durchlässig ist. In nachfolgenden drei Waschschrritten wurde die DNA nochmals aufgereinigt und mit dem im Kit enthaltenen ATE-Puffer eluiert.

Der RNA- und DNA-Gehalt wurde mittels Nanodrop (Peqlab) quantifiziert und die Qualität überprüft. Gelagert wurde die RNA anschließend bei -80°C. Die DNA wurde für Folgeuntersuchungen bei -20°C gelagert.

3.2.7 RNA-Sequenzierung

Für die RNA-Sequenzierung wurden insgesamt 19 Proben aus einem Patientenkollektiv ausgesucht, das HCC-Patienten umfasst, die im Verlauf ihrer Krankengeschichte für mindestens einen Monat eine Therapie mit Sorafenib erhielten und über eine histologische Probe vor Beginn der Sorafenib-Therapie verfügten. Die 19 Proben waren aus zwei Gruppen zusammengesetzt („best“ und „worst“). Für die Gruppe „best“ wurden Proben von Patienten ausgewählt, die besonders gut auf Sorafenib ansprachen. Für die Gruppe „worst“ wurden Proben von Patienten ausgewählt, die nicht oder schlecht auf Sorafenib ansprachen. Die Patientenselektionierung ist in 3.2.1 bereits detailliert dargestellt.

Vor der RNA-Sequenzierung muss zunächst die RNA aus den Zellen isoliert werden (siehe 3.2.4). Da für insgesamt drei Patienten nicht mehr ausreichend Paraffinmaterial für die RNA-Sequenzierung zur Verfügung stand, wurde die RNA dieser drei Proben aus frischem Gewebe isoliert. Diese Proben wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolation des Frischgewebes wurde das *RNA PeqGold Total RNA* Kit der Firma PeqLab verwendet.

Anschließend wurde die isolierte RNA mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* qualitätskontrolliert. Der *Agilent 2100 Bioanalyzer* funktioniert nach dem Prinzip einer Gelelektrophorese im Chipformat. Bei der Gelelektrophorese werden geladene Biomoleküle (DNA, RNA, Proteine) in einer Gelmatrix durch das Anlegen einer äußeren Spannung der Größe nach aufgetrennt (56). Die RNA-Proben wurden nach der Größenauftrennung durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert. Mittels der Bioanalyzer Software werden die Ergebnisse, z.B. Probenkonzentration und das sog. Ribosomale Verhältnis (*ribosomal ratio*), als Banden oder Elektropherogramm dargestellt. Das *ribosomal ratio* gibt das Verhältnis zweier ribosomaler Banden an (18S zu 28S), welches bei zunehmender RNA-Degradierung abnimmt und damit ein Maß für die RNA-Integrität darstellt (131). Um die Interpretation der RNA-Integrität zu objektivieren, wurde die *RNA Integrity Number* (RIN, 1-10) entwickelt, wobei 1 eine sehr degradierte und 10 eine äußerst intakte RNA-Probe beschreibt. Alle Proben erfüllten die vorgegebenen Qualitätsstandards mit einer geforderten RIN >2 für FFPE-Proben und eine RIN >7 für die Proben aus frischem Gewebe.

Bevor die RNA sequenziert werden konnte, musste sie außerdem in ein passendes Template umgewandelt werden. Dieser Schritt wird im Englischen als „*library preparation*“ bezeichnet und wurde für unsere Proben den Vorgaben des Herstellers

entsprechend durchgeführt (*Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2*). Da die gesamte RNA aus den Proben isoliert wurde, musste zuerst die mRNA herausgefiltert werden, da über 90% der RNA aus ribosomaler (r)RNA besteht. Dies wurde mit der sog. Poly-A-Selektion erreicht. Da die mRNA mit einem Poly-A-Schwanz versehen ist, kann sie mittels Oligo-dT enthaltenden magnetischen Teilchen herausgefiltert werden. Anschließend wurde die angereicherte mRNA unter erhöhter Temperatur mit zweiwertigen Kationen in 200-300 Basenpaare (BP) große mRNA Abschnitte fragmentiert (132). Zum Schluss wurde aus den zu sequenzierenden RNA-Abschnitten die komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Über eine reverse Transkription erhält man die gewünschte cDNA, die im Gegensatz zur genomischen DNA nur noch die codierenden Abschnitte, die Exons, enthält.

Im Anschluss wurden die cDNA-Fragmente nach der „*Sequencing by synthesis*“ Methode von Illumina® in drei Reihen mit 100 „*Paired End*“ Reads sequenziert. Für die „*Sequencing by Synthesis*“ Methode der Firma Illumina® wurden die cDNA Fragmente nach dem Hinzufügen von Adaptoren auf eine Platte, eine sog. „Flow Cell“, gegeben. Die Fragmente wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, sodass sich Cluster aus verschiedenen cDNA-Fragmenten bildeten. Diese Cluster beinhalteten cDNA-Einzelstränge, die simultan durch DNA-Polymerasen zu Doppelsträngen ergänzt wurden. Dafür wurden Primer für jedes Template und unterschiedlich fluoreszierende Desoxyribonukleotide hinzugegeben. Pro Zyklus wurde eine Base ergänzt, welche durch die unterschiedliche Fluoreszenz der vier Basen identifiziert wurde. Je mehr Zyklen stattfinden, desto länger ist der abgelesene cDNA-Abschnitt, welcher als „Read“ bezeichnet wird. Die cDNA-Fragment-Cluster wurden parallel sequenziert, sodass man am Ende viele kurze cDNA-Sequenzen erhielt. Überschneidende Sequenzen wurden wiederum zusammen sortiert und aneinandergereiht. Da bei menschlicher (c)DNA ein Referenzgenom zur Verfügung steht, konnten die DNA-Fragmente zu Genen und Genort im Genom zugeordnet werden (133).

Die Sequenzierung der Proben erfolgte auf Illumina HiSEQ xTEN. Die Daten wurden uns anschließend im RAW-Format zugesendet und weiterprozessiert (siehe unten).

3.2.8 Bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierung

Die RAW-Daten der RNA-Sequenzierung wurden mittels des Programms FastQC (Version 0.11.5, (134)) auf ihre Qualität überprüft. Reads schlechter Qualität wurden herausgefiltert und Adapter-Sequenzen oder einzelne fehlerhafte Basen entfernt. Danach wurden die Reads mit dem Programm HISAT2 (Version 2.1.0, (135)) dem menschlichen Referenzgenom (GRCh38.88) zugeordnet. Anschließend wurde mit featureCounts (Rsubread-1.34.6, (136)) gezählt, wie viele Reads pro Gen vorlagen. Außerdem wurde mittels DESEQ2 (Bioconductor package, Version 1.36.0, (137)) eine Normalisierung durchgeführt. Diese dient unter anderem der Adjustierung der sog. *Libraries*, aber auch um eine Verzerrung aufgrund längerer Gene zu verhindern, denn diese haben automatisch mehr Reads und sollten nicht als Überexpression fehlinterpretiert werden. Zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde die Output-Matrix von featureCounts in DESEQ2 (Version 1.36.0, siehe oben) eingespielt. Für die Datenanalyse wurde R (Version 3.6.0, (126)) mit den oben aufgeführten „*packages*“ verwendet (siehe 3.1.6). Der Wald-Test wurde für die statistische Testung verwendet. Anschließend wurde eine *unsupervised hierarchal cluster analysis* (UHCA, *Euclidean Distance; complete clustering*) durchgeführt und als Heatmap (*package ComplexHeatmap* Version 2.0.0) visualisiert (138).

Bei einer UHCA werden in einem Datensatz automatisch Muster erkannt und die Daten danach sortiert. Die Daten gruppieren sich demzufolge nach Ähnlichkeit. Die RNA-Sequenzierungs-Proben sollten sich nach Ähnlichkeit in der Genexpression sortieren, es zeigten sich jedoch initial sog. Batch-Effekte. Diese beruhten darauf, dass ein Teil der Proben aus Frischgewebe bestand, während die große Mehrheit der Proben aus Paraffinschnitten hervorging. Das Frischgewebe und die Paraffinschnitte stellten zwei unterschiedliche Datensätze (sog. „*Batches*“) dar und gruppierten sich irrtümlicher Weise zusammen, sodass die Materialart einen unerwünschten Einfluss auf das Ergebnis der Cluster-Analyse hatte. Der Batch-Effekt wurde bei der Anwendung von DESEQ2 berücksichtigt. Zusätzlich wurde eine zweite Batch-Korrektur mittels des *packages limma* (Version 3.40.6, (139)) durchgeführt. Danach war kein Einfluss der Materialart in der Cluster-Analyse mehr zu erkennen und die Batch-Effekte waren als ausreichend korrigiert anzusehen.

Anschließend konnte die Untersuchung der differentiell exprimierten Gene mithilfe weiterer Programme (*Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA, (140,141)) und *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, (142,143))) durch funktionelle Analysen ergänzt werden.

GSEA ist eine Software des Broad Institutes, das humane Gensets aus der MSigDatabase auf ihre differenzielle Expression zwischen zwei Phänotypen testet. Gensets, die einen *NOM P-Value* <0,05 sowie eine *false discovery rate* (FDR) <0,25 aufweisen, werden als statistisch überrepräsentiert angesehen.

IPA ist eine komplexe Software, welche statistisch überrepräsentierte Signalmoleküle und Signalkaskaden herausfiltert, anzeigt und grafisch darstellt. Aufgrund der Vielzahl von Funktionen werden nur diejenigen erwähnt, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Mit dem Wald-Test wurden die statistisch signifikanten Gene berechnet. Auf multiples Testen wurde nach Benjamini und Hochberg korrigiert. Durch die Benajmini-Hochberg-Prozedur wird eine Kontrolle der FDR erreicht (144). Die FDR ist das Verhältnis der Zahl falsch positiver Ergebnisse zu allen positiven Ergebnissen (Falsch-Positiven-Rate). Durch die Wahl einer geringen FDR im Rahmen der Benajmini-Hochberg-Prozedur wird trotz multiplen Testens die Rate falsch positiver Ergebnisse begrenzt. Um die Auswertung in IPA durchführen zu können, wurde von den signifikanten Genen der *Fold Change* ermittelt. Der *Fold Change* beschreibt ein Verhältnis zwischen zwei Größen. In diesem Fall das Verhältnis der gezählten Gene („*Gene Counts*“) zwischen beiden Gruppen. Als Referenz diente die Gruppe mit dem besten Ansprechen. Um die Zahlen übersichtlicher zu gestalten wurde zusätzlich der 2er-Logarithmus der *Fold-Change* Werte genommen. Die Berechnung ist unten dargestellt.

$$\text{Log2FC} = \text{Log2} (\text{GC „worst“} / \text{GC „best“})$$

(FC = Fold Change, Log2 = Logarithmus zur Basis 2, GC „worst“ = Gene counts schlechtes Ansprechen, GC „best“ = Gene counts bestes Ansprechen)

Die *Log2-Fold-Change*-Daten wurden anschließend in IPA eingespeist. Das Programm liefert die bereits auf multiple Testung korrigierten statistisch signifikanten Signalkaskaden sowie Netzwerke und Upstream Regulatoren. Zur Angabe der Signifikanz wird der p-Wert sowie der Z-Score angegeben. Der Z-Score gibt an, wie viele Standardabweichungen die ermittelten signifikanten Signalkaskaden der Gruppe „worst“ von der Referenz (= „best“) abweichen.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Studienpopulation

An der vorliegenden Studie konnten von zunächst 248 rekrutierten Patienten 69 Patienten teilnehmen. Von diesem Patientenkollektiv wurden die in Tabelle 4.1 aufgeführten Daten bei Erstdiagnose des HCC erhoben. Von allen Patienten lag eine Einwilligungserklärung (sog. *informed consent*) sowie ein Ethikvotum vor (siehe 3.2.1).

Das Kollektiv der vorliegenden Studie war im Median 64 Jahre alt und wies einen hohen Anteil männlicher Patienten auf (87%). Bei ca. 30 % der Patienten ergab das Tumorstaging bei Erstdiagnose das BCLC Stadium A, bei ca. 23% das Stadium BCLC B und bei ca. 42% das Stadium BCLC C. Zum Zeitpunkt der Sorafenib-Therapie befanden sich alle Patienten in fortgeschrittenen Stadien. Der AFP-Wert war initial bei knapp einem Viertel der Patienten über 400 ng/ml, bei 13 Patienten lag jedoch keine Information über den AFP-Wert vor. Die Tumoren waren bei Erstdiagnose im Median 6,5 Zentimeter groß und bei über der Hälfte der Patienten lag bei Erstdiagnose ein multifokales HCC vor. Bei knapp einem Drittel der Patienten (32,4%) lag eine portalvenöse Invasion des HCC bei Diagnosestellung vor. Die große Mehrheit der Patienten (73,9%) war begleitend von einer Leberzirrhose betroffen. Davon hatte knapp die Hälfte der Patienten (44,9%) eine leicht eingeschränkte Leberfunktion (CP A), 18 Patienten (26,1%) hatten mit CP B eine deutlich eingeschränkte Leberfunktion. Bei zwei Patienten mit Leberzirrhose war der CP Score nicht erfasst. Bei 17 Patienten (ca. 24,6%) lag keine Leberzirrhose vor. Von einem Patienten fehlte die Information zur Leberfunktion. Von den Patienten ohne Nachweis einer Leberzirrhose war bei acht Patienten (11,6%) keine bekannte chronische Lebererkrankung zu ermitteln. Diese werden als „unklar“ in der Abbildung 4.1 bezeichnet. Bei einem dieser acht Patienten lag am ehesten eine NAFLD/NASH vor, bei zwei weiteren Patienten fand sich eine Leberfibrose. Bei weiteren zwei Patienten lag Rauchen als einziger Risikofaktor vor. Bei einer Patientin wurde ein fibrolamelläres HCC beschrieben. Es handelt sich um eine Sonderform des HCC, welches nicht mit den sonst typischen Risikofaktoren einhergeht (145). In der vorliegenden Studie wurden die meisten HCC durch Alkohol (24,6%) und HCV (23,2%) verursacht. HBV war für 13% der HCC verantwortlich, eine NASH für 10,2%. In 7,3% der Fälle lag eine Hämochromatose als Grunderkrankung

vor, ein Patient litt an einem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel. Bei 8,7% lag eine Leberzirrhose unbekannter Ursache (kryptogen) vor (siehe Abbildung 4.1).

Tabelle 4.1: tabellarische Darstellung der erhobenen Patientendaten.

Gesamtzahl Patienten	69	BCLC Stadium	
		A	21
Alter im Median (in Jahren)	64	B	16
		C	29
Geschlecht			
männlich	60	Tumorausbreitung	
weiblich	9	Okuda-Tumorgroße Median (in cm)	6,5
		Tumor unifokal	21
Sorafenib-Einnahme (in Tagen)		Tumor multifokal	37
Median	120		
Mittelwert	224,4	Leberfunktion/CP Score	
		keine Leberzirrhose	17
mittlere Überlebenszeit (in Tagen)		Leberzirrhose	51
Median	259	CP A	31
Mittelwert	507,5	CP B	18
Ätiologie		AFP-Wert initial	
Alkohol	17	<400 ng/ml	40
HCV	16	>400 ng/ml	16
HBV	9		
NAFLD/NASH	7	PVI	
Hämochromatose	5	ja	22
Alpha-1-Antitrypsin-Mangel	1	nein	46
kryptogene Leberzirrhose	6		
Unklar	8		

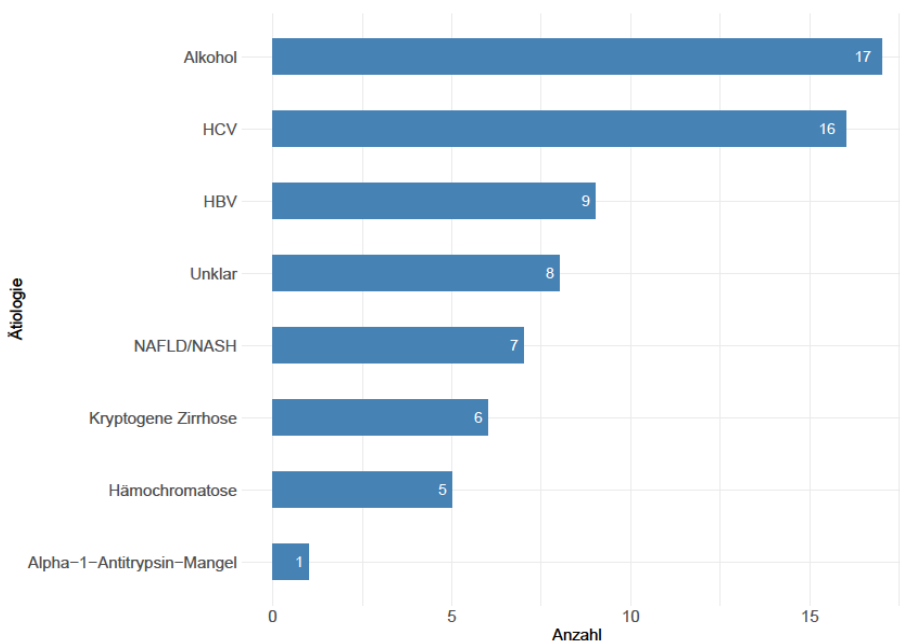


Abbildung 4.1: Verteilung der Ätiologie der HCC-Patienten als Balkendiagramm.

Sorafenib wurde im Median vier Monate (120 Tage) eingenommen. Ca. ein Drittel der Patienten (24) nahm das Medikament länger als sechs Monate ein, knapp 20% der Patienten (13) länger als ein Jahr. Die längste Einnahmedauer betrug ca. 3,2 Jahre (1176 Tage). Da die Erfassung der Nebenwirkungen von Sorafenib erst im Verlauf in das HCC-Register aufgenommen wurde, sind die unerwünschten Wirkungen nur von 18 Patienten dokumentiert. Die Nebenwirkungen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Grad 4 Nebenwirkungen traten bei einer Person auf, bei 5 von 18 (ca. 28%) Patienten waren Grad 3 Nebenwirkungen zu verzeichnen. Von den dokumentierten Nebenwirkungen waren die häufigsten unter Sorafenib gastrointestinale Nebenwirkungen (16 von 18 Patienten oder 88%), am häufigsten Diarrhö und Erbrechen. Fast genauso häufig traten konstitutionelle Nebenwirkungen wie Fatigue und Gewichtsverlust auf (83% der Fälle). Eine Mucositis trat bei vier Patienten (22%) auf. Dermatologische Nebenwirkungen, darunter Ausschlag und das sog. Hand-Fuß-Syndrom, trat bei knapp 40% der Patienten auf (7 von 18). Die dermatologischen Nebenwirkungen traten bei vier Patienten innerhalb von 60 Tagen nach Beginn der Therapie auf (in Tabelle 4.2. als „früh“ bezeichnet). Es wurde mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht, ob frühe dermatologische Nebenwirkungen einen Einfluss auf die Überlebenszeit haben. Das Ergebnis erwies sich als nicht signifikant ($p= 0,137$). Das Auftreten von dermatologischen Nebenwirkungen im Allgemeinen zeigte in der vorliegenden Studie jedoch einen Trend zum besseren Überleben ($p= 0,077$).

Tabelle 4.2: erfasste Nebenwirkungen von Sorafenib. Frühe dermatologische Nebenwirkungen traten innerhalb von 60 Tagen nach Therapiebeginn auf, späte nach 60 Tagen nach Therapiebeginn.

	Gastrointestinal	Konstitution	Dermatologisch			Mucositis
			gesamt	früh	spät	
Anzahl absolut	16	15	7	4	3	4
%	88	83	39	22	17	22
p-Wert			0,077	0,137		

Die häufigsten Abbruchgründe der Sorafenib-Therapie waren in absteigender Häufigkeit Krankheitsprogress, Verschlechterung des Allgemeinzustands, Tod und Leberinsuffizienz. Der Tumorprogress unter Sorafenib nimmt mit 38,5% mit Abstand den größten Anteil ein. Laut der aktuellen S3-Leitlinie kann jedoch auch eine Verschlechterung des Allgemeinzustands als eine Form des Krankheitsprogresses gewertet werden (28). Bei vier Patienten war der krankheitsbezogene Tod der Grund für die Therapiebeendigung. Damit wären 78,3% der Abbruchgründe direkt oder indirekt auf einen Krankheitsprogress zurückzuführen. Zwei Patienten brachen die

Therapie aufgrund einer Leberinsuffizienz ab. Keiner der Studienteilnehmer brach die Therapie aufgrund einer Medikamententoxizität ab. Von 13 Patienten (18,8%) war kein Grund für den Abbruch der Sorafenib-Therapie angegeben.

4.2 Überlebenszeitanalysen der klinischen Daten

Zunächst wurde das Gesamtüberleben unter Sorafenib aller Patienten untersucht, die an der Studie teilnahmen. Anschließend wurde der Einfluss der oben genannten klinischen Parameter auf die Überlebenszeit der Patienten getestet. Eingezeichnet sind in den entsprechenden Graphen außerdem die Überlebenszeit im Median sowie die tabellarische Darstellung der noch lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt (siehe Abbildungen 4.2 – 4.9).

In Abbildung 4.2 ist die Überlebenszeitanalyse aller Studienteilnehmer dargestellt. Die mediane Sorafenib-bezogene Überlebenszeit des Gesamtkollektivs beträgt 259 Tage oder rund 8,6 Monate. Die 1-Jahresüberlebensrate beträgt 40,6%, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 5,8%. Zum Zeitpunkt der letzten dokumentierten Nachsorge Ende 2017 lebten noch zwei Patienten.

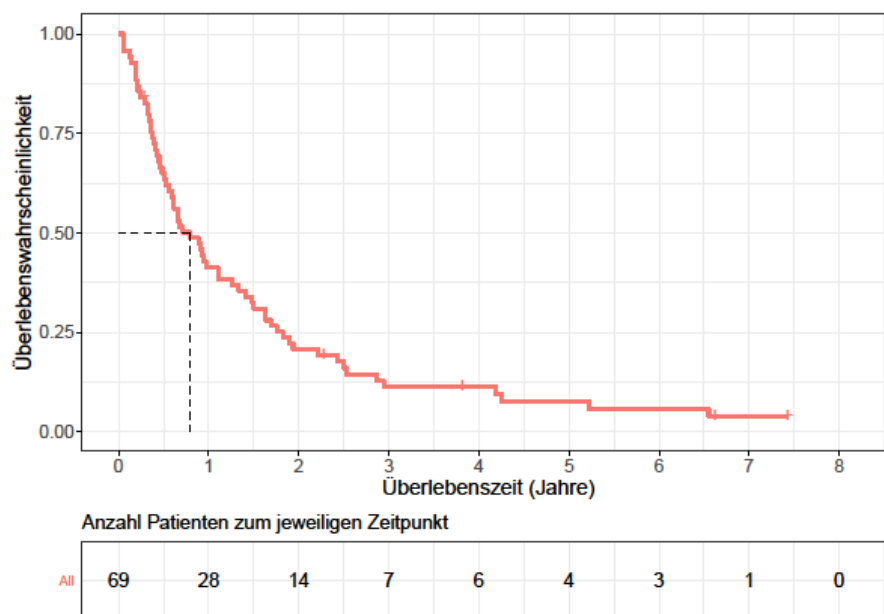


Abbildung 4.2: Sorafenib-bezogene Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs.

Zur Beurteilung des Alterseinflusses wurden die Patienten gemäß dem Alter mit 65 Jahren als Grenze dichotomisiert. Da sich die Dichotomisierung am medianen Alter des Gesamtkollektivs orientiert, sind die beiden Gruppen vergleichbar groß. Die ältere Patientengruppe überlebte unter Sorafenib im Median 214 Tage (7,13 Monate), die jüngeren Patienten wiesen ein mediane Überlebenszeit von ca. 458 Tagen bzw. 15,3 Monaten auf. Die jüngere Patientengruppe zeigt eine signifikant längere Überlebenszeit als die Patienten über 65 Jahre ($p= 0,035$; siehe Abbildung 4.3).

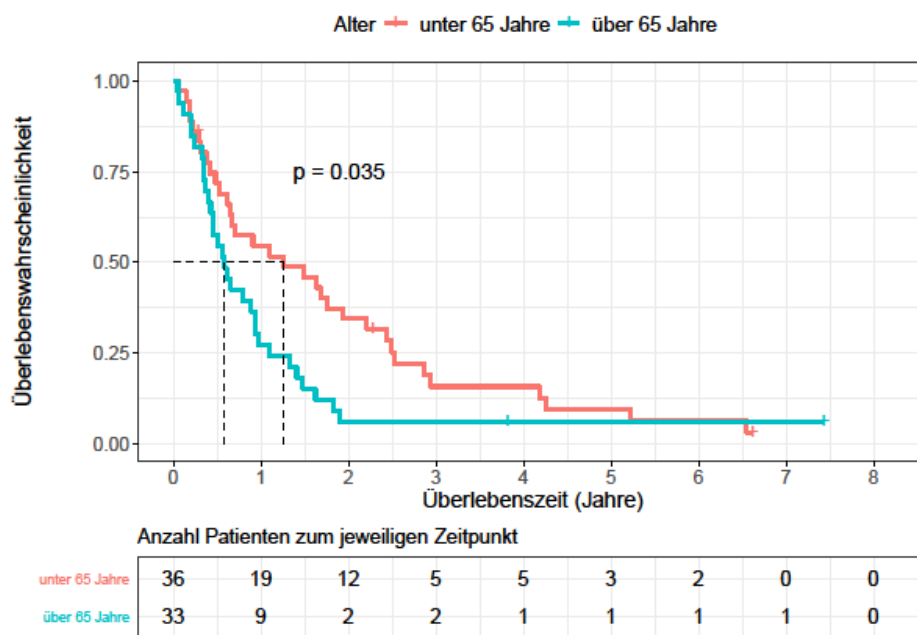


Abbildung 4.3: Einfluss des Patientenalters bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

Der Einfluss des Geschlechts auf die Überlebenszeit ist in Abbildung 4.4. dargestellt. Durch den deutlich höheren Anteil männlicher Patienten entstehen hier zwei ungleich große Gruppen mit 60 männlichen und neun weiblichen Patienten. Die Männer überlebten unter Sorafenib im Median 240 Tage (8 Monate), die Frauen überlebten 808 Tage (26,93 Monate). Trotz dieser großen Diskrepanz der medianen Überlebenszeiten erwies sich der Unterschied als nicht signifikant. Es ist jedoch ein Trend zum besseren Überleben der weiblichen Patienten zu vermerken ($p= 0,079$).

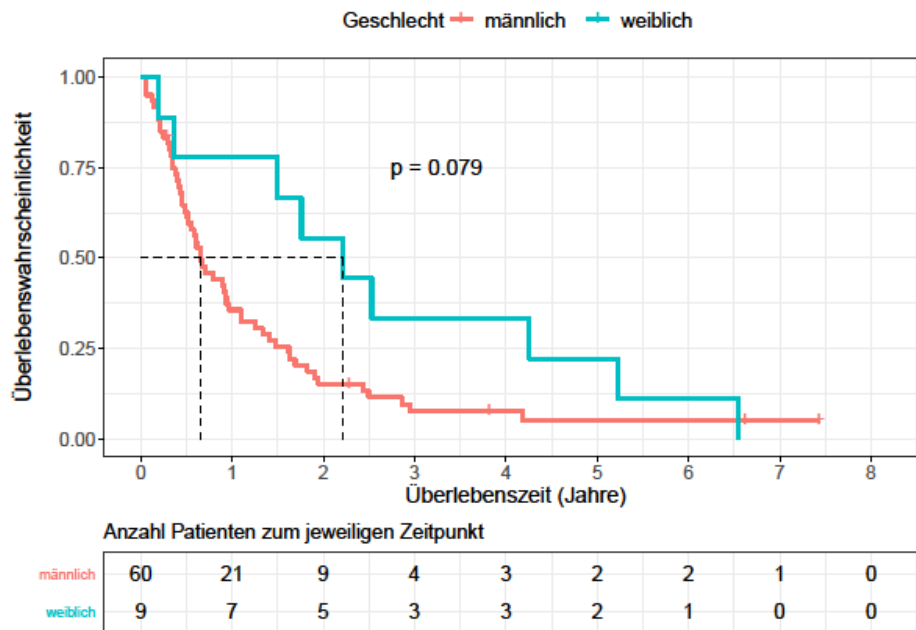


Abbildung 4.4: Einfluss des Geschlechts auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

In Abbildung 4.5 ist der Einfluss des Tumorstadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit dargestellt. Die Überlebenszeit bezieht sich nur auf den Zeitraum unter der Sorafenib-Einnahme. Das mediane Überleben unter Sorafenib lag für Patienten, deren Staging bei Erstdiagnose des HCC BCLC Stadium A ergeben hatte, bei 546 Tagen (18,2 Monaten). Patienten im BCLC Stadium B lebten im Median 367 Tage (12 Monate) unter Sorafenib und Patienten mit initialem BCLC Stadium C überlebten median 222 Tage (7,4 Monate). Für Patienten mit BCLC Stadium B und C bei Erstdiagnose liegt die Letalität nach drei Jahren bei 100% wohingegen bei BCLC Stadium A bei Erstdiagnose nach drei Jahren noch ein Drittel der Patienten am Leben war. Der Graph zeigt somit ein signifikant schlechteres medianes Überleben unter Sorafenib, je höher das Tumorstadium bei Erstdiagnose war ($p = 0,0082$).

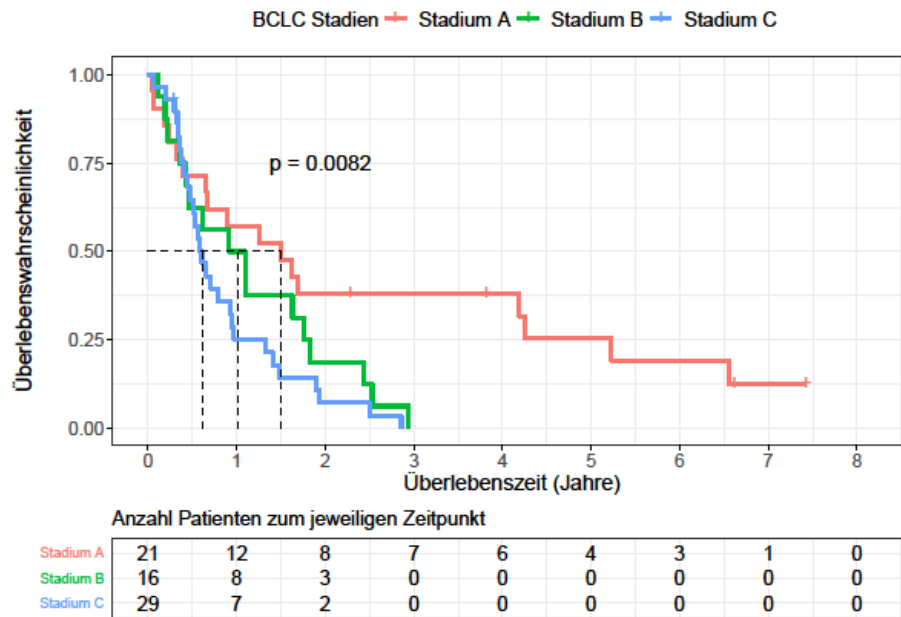


Abbildung 4.5: Einfluss des BCLC Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

Der Serum AFP-Wert wurde ebenfalls bei Erstdiagnosestellung des HCC bestimmt. Als Grenzwert für die Dichotomisierung wurden 400 ng/ml festgelegt. Der Einfluss des AFP-Werts auf die Überlebenszeit der Patienten unter Sorafenib ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Gruppe mit dem hohen AFP überlebte im Median 239 Tage (8 Monate), die Patienten mit einem AFP unter 400 ng/ml wiesen eine mediane Überlebenszeit von 328 Tagen (10,93 Monaten) auf. Die statistische Testung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen <400 ng/ml und >400 ng/ml ($p = 0,34$).

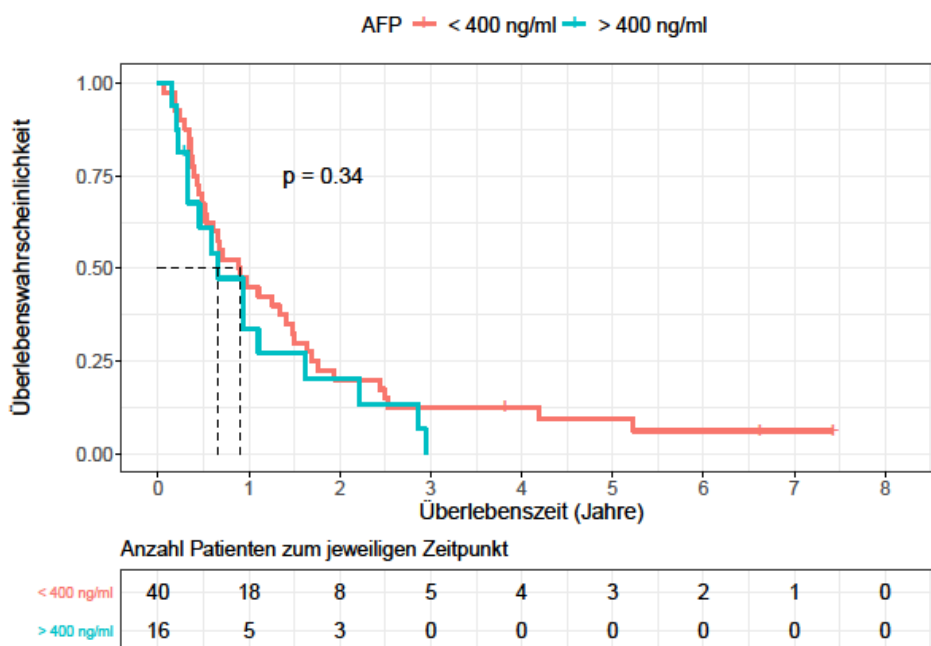


Abbildung 4.6: Einfluss des AFP-Spiegels bei Erstdiagnose im Blut auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

In Abbildung 4.7 ist der Einfluss der Leberfunktion auf das Überleben unter Sorafenib dargestellt. Verglichen wurde keine Leberzirrhose, CP A bei Erstdiagnose und CP B bei Erstdiagnose. Die Patienten ohne Leberzirrhose lebten im Median 515 Tage (17,16 Monate), die Patienten mit CP A lebten 244 Tage (8,13 Monate) und die Patienten mit CP B lebten 192 Tage (6,4 Monate) im Median unter Sorafenib. Von den CP B Patienten starben knapp 90% innerhalb eines Jahres nach Therapiebeginn, während sich die Kaplan-Meyer-Kurven von CP A und keine Zirrhose zunehmend angleichen. Die Leberfunktion erwies sich als statistisch signifikanter Einflussfaktor auf das Überleben unter Sorafenib ($p= 0,012$).

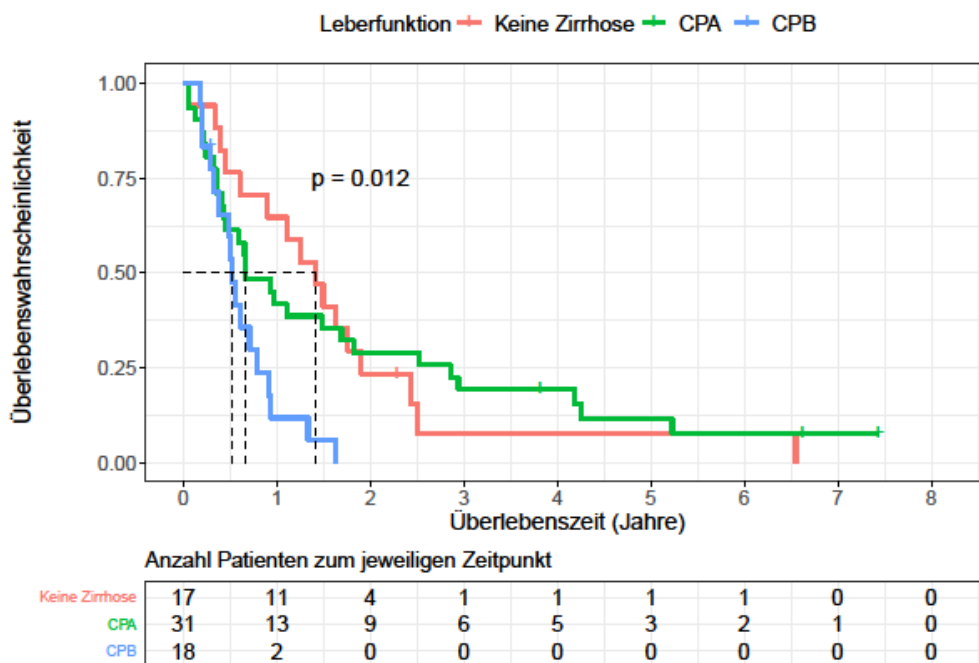


Abbildung 4.7: Einfluss der Leberfunktion bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

In Abbildung 4.8 ist der Einfluss eines unifokalen versus multifokalen HCC bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib zu sehen. Patienten mit unifokalem HCC lebten im Median 515 Tage (17,16 Monate), während die Patienten mit multifokalem HCC 244 Tage (8,13 Monate) überlebten. Von elf Patienten lag keine Information über die Anzahl der Tumorherde vor. Das Ergebnis ist nicht statistisch signifikant, es zeigt sich jedoch ein Trend, dass multifokale HCC einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit haben ($p= 0,064$).

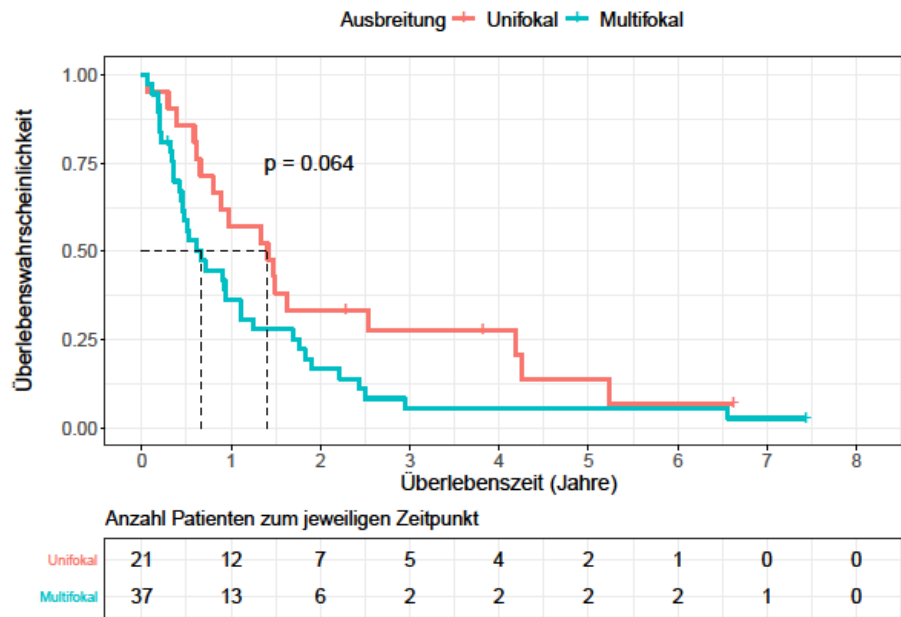


Abbildung 4.8: Einfluss der intrahepatischen Tumorausbreitung bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

Das Ergebnis der PVI als Einflussfaktor auf die Überlebenszeit ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Eine PVI wurde bei 22 Patienten festgestellt, 46 wiesen keine PVI auf. Die Patienten mit PVI wiesen eine mediane Überlebenszeit von 176 Tagen (5,9 Monaten) auf, die Patienten ohne PVI eine von knapp einem Jahr (348 Tage/11,6 Monate). Dieses Ergebnis erwies sich im Logrank-Test als nicht signifikant ($p=0,056$), es zeigt sich jedoch ein Trend, dass das Vorliegen einer PVI sich negativ auf die Überlebenszeit auswirkt (siehe Abbildung 4.9).

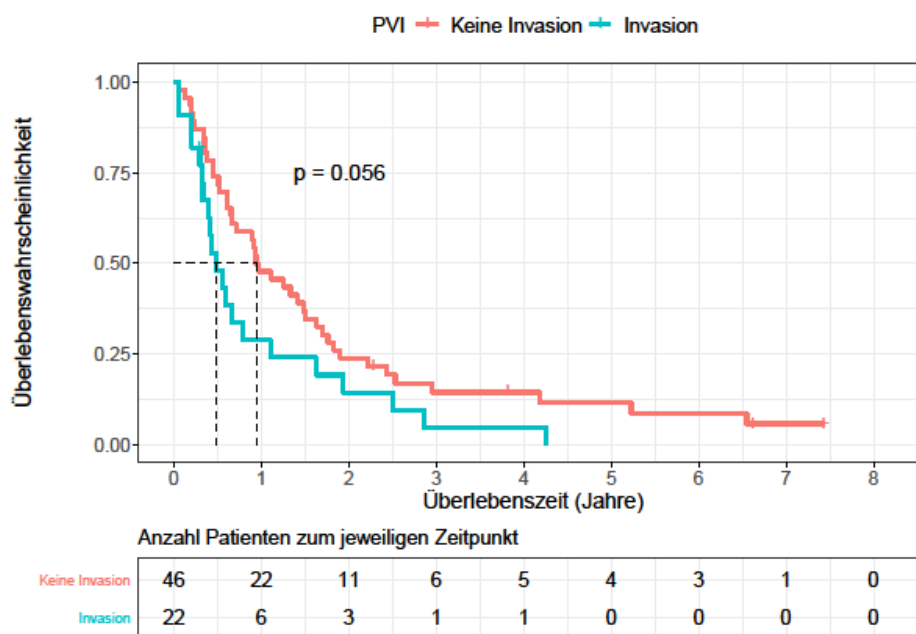


Abbildung 4.9: Einfluss des Vorliegens einer PVI auf die Überlebenszeit unter Sorafenib.

4.3 Immunhistochemie

In der vorliegenden Studie wurden Gewebeproben von HCC-Patienten mit Sorafenib-Therapie immunhistochemisch auf Proteine gefärbt, von denen es in der Literatur Hinweise gibt, dass sie eine Rolle in der Vermittlung der Sorafenib-Resistenz spielen könnten (siehe 2.4.1). Deshalb wurde der potenzielle Einfluss dieser Biomarker auf die Überlebenszeit unter Sorafenib getestet. Außerdem wurden in einer multivariaten Analyse die in 4.1 beschriebenen klinischen Daten sowie die IHC-Biomarker als potenzielle Einflussfaktoren auf die Sorafenib-spezifische Überlebenszeit getestet.

Das hier untersuchte Kollektiv umfasste 69 HCC-Patienten, die über eine histologische Probe verfügten und eine anschließende Sorafenib-Therapie über mindestens einen Monat erhielten. Die klinischen Eigenschaften dieses Patientenkollektivs sind ausführlich in 4.1 beschrieben. Von diesen Patienten wurde jeweils eine immunhistochemische Färbung mit MAPK14 und RPS6KA3 angefertigt und die spezifische Farbreaktion nach den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Färbekategorien ausgewertet. In den Abbildungen 4.10 - 4.13 sind exemplarisch einige Ergebnisse der IHC-Färbung aufgeführt (siehe Tabelle 3.2).

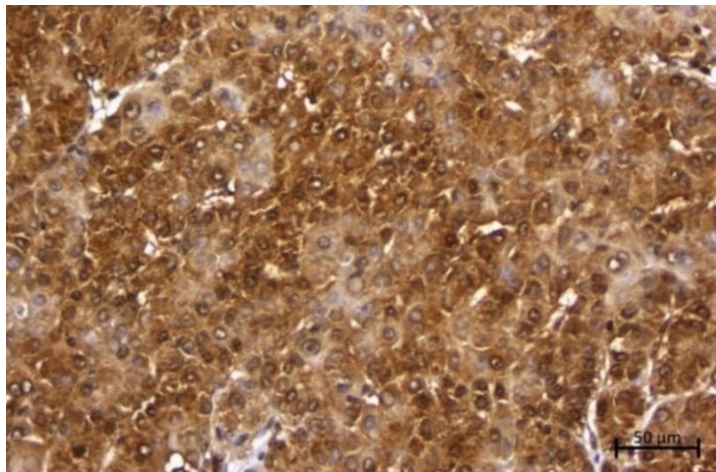


Abbildung 4.10: HCC in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung. Das Bild ergibt eine überwiegend positive Farbreaktion (Farbkategorie 3).

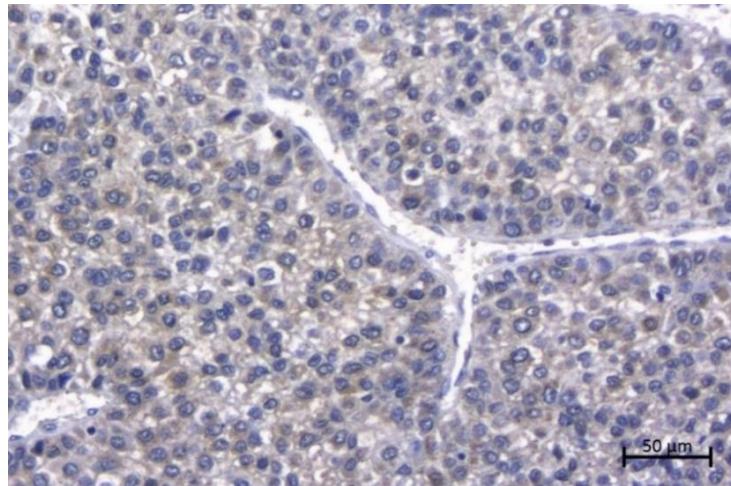


Abbildung 4.11: HCC in 20-facher Vergrößerung mit MAPK14 Färbung. Hier zeigt sich eine negative Farbreaktion (Farbkategorie 0). Leichte Farbreaktionen wurden als unspezifische Hintergrundfärbung interpretiert.

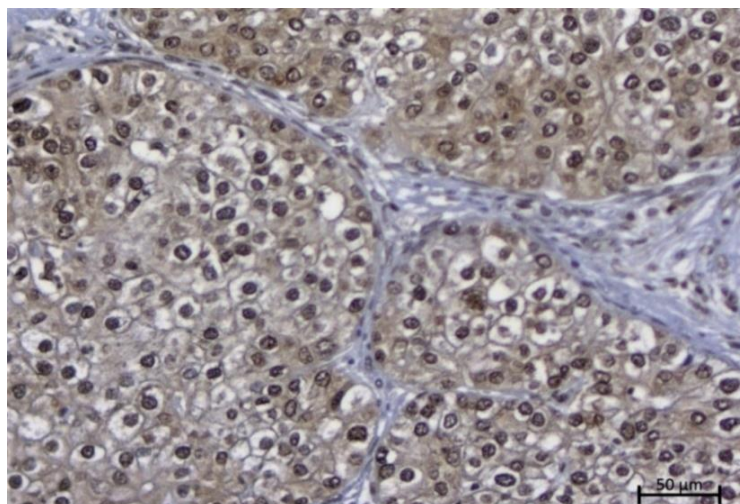
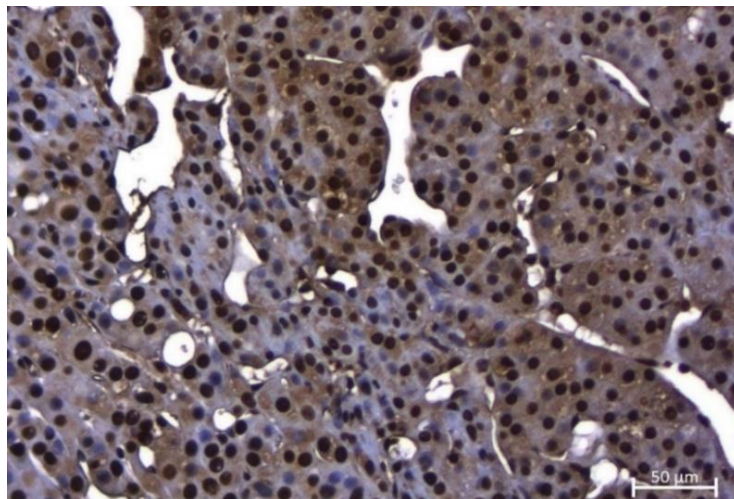


Abbildung 4.12: HCC in 20-facher Vergrößerung mit RPS6KA3 Färbung. HCC mit überwiegend positiver Kernfärbung gegen RPS6KA3 (oben: Farbkategorie 3, unten: Farbkategorie 4)

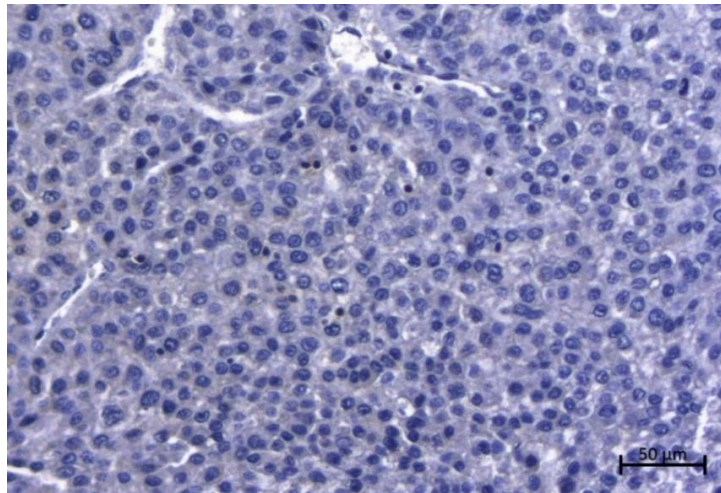


Abbildung 4.13: HCC in 20-facher Vergrößerung mit RPS6KA3 Färbung. HCC mit negativer Farbreaktion (Farbkategorie 0).

Nachfolgend ist in Abbildung 4.14 das Ergebnis der Auswertung der IHC als Balkendiagramm dargestellt. Zu sehen ist, welche Färbekategorie bei den entsprechenden Antikörpern wie oft gewählt wurde. Bei der MAPK14 wurde Kategorie 3 besonders häufig gewählt, bei RPS6KA3 sind die hohen Färbekategorien 3 und 4 mit Abstand am häufigsten gewählt worden. Bei beiden Antikörpern wurde den Färbungen Kategorie 0 am seltensten zugewiesen.

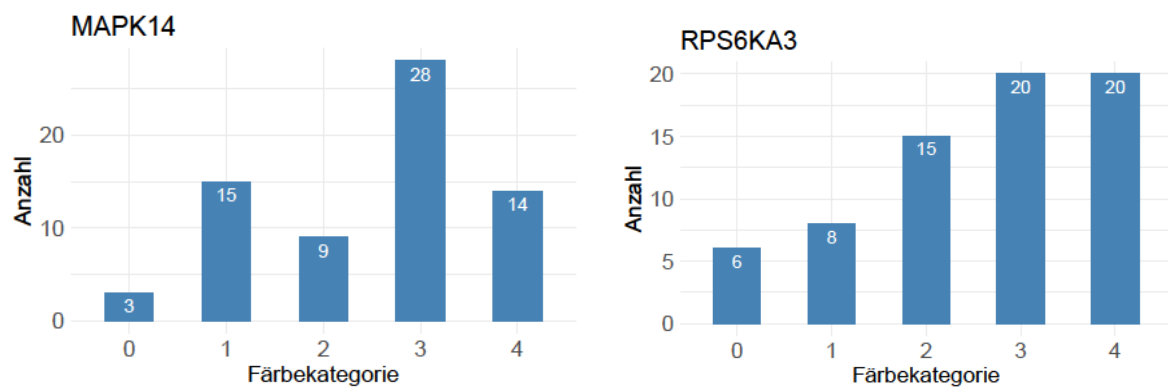


Abbildung 4.14: Auswertung der Immunhistochemie: Verteilung der Wahl der Färbekategorien von MAPK14 (links) und RPSKA3 (rechts) im Gesamtkollektiv.

Um ein untersucherabhängiges Bias bei der Auswertung der IHC-Färbungen zu reduzieren, wurden die IHC-Bilder von zwei Untersuchern unabhängig voneinander ausgewertet. Um den Einfluss der verblindeten Untersucher auf die Wahl der Färbekategorie zu bewerten, wurde untersucht, wie gut die Ergebnisse der beiden Untersucher miteinander korrelieren. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei 0,83 für MAPK14 und bei 0,8 für RPS6KA3 (siehe Abbildung 4.15).

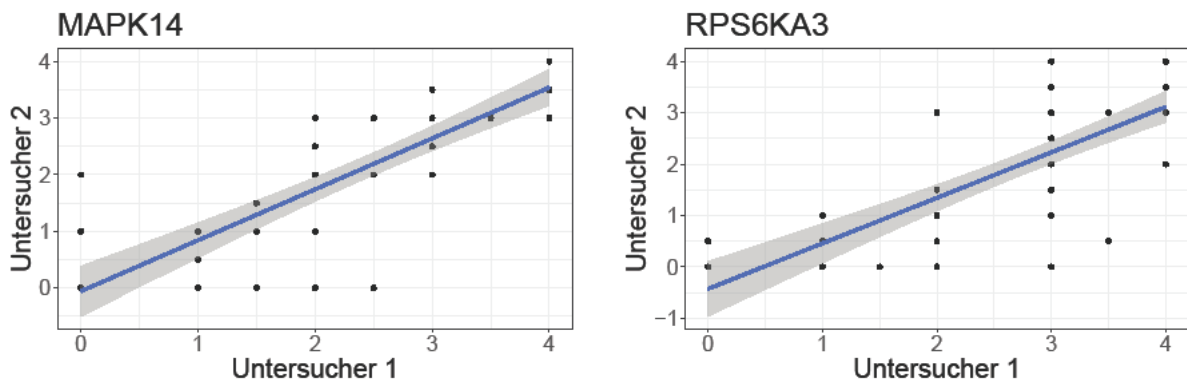


Abbildung 4.15: Scatterplot zur Überprüfung des Einflusses der unabhängigen Untersucher auf die Wahl der Färbekategorie. Links: MAPK14; rechts: RPS6KA3. Auf der X-Achse befindet sich die Wahl der Färbekategorie von Untersucher 1, auf der Y-Achse die Wahl der Färbekategorie von Untersucher 2.

Da sich die Biopsie-Stanzen subjektiv stärker anfärbten als die Resektionspräparate, wurde zum Ausschluss einer systematischen Verzerrung durch die Probenart (Biopsie-Stanze vs. Resektionspräparat) ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Beide Ergebnisse erwiesen sich als nicht statistisch signifikant ($p=0.117$ für MAPK14 und $p=0,058$ für RPS6KA3). Eine Verzerrung durch die Probenart erscheint daher unwahrscheinlich.

Um anschließend einen möglichen Einfluss der Expression der untersuchten Proteine auf das Überleben unter Sorafenib zu testen, wurde ein Logrank-Test durchgeführt und in den Abbildungen 4.16 und 4.17 grafisch als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Färbekategorien wurden dazu dichotomisiert in < 2 und > 2 . Beide Kaplan-Meier-Kurven zeigten keine Separierung zwischen den Färbekategorie-Gruppen < 2 und > 2 . Die Kaplan-Meier-Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied im Überleben ($p=0.97$ für MAPK14 und $p=0.92$ für RPS6KA3).

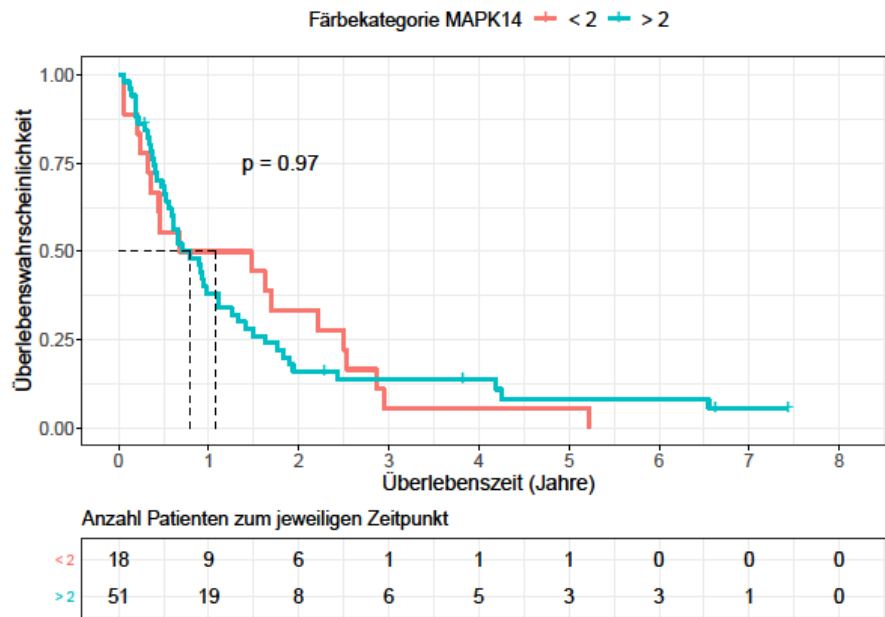


Abbildung 4.16: Einfluss der MAPK14 Färbekategorie auf die Überlebenszeit. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Färbekategorien dichotomisiert in < 2 oder > 2.

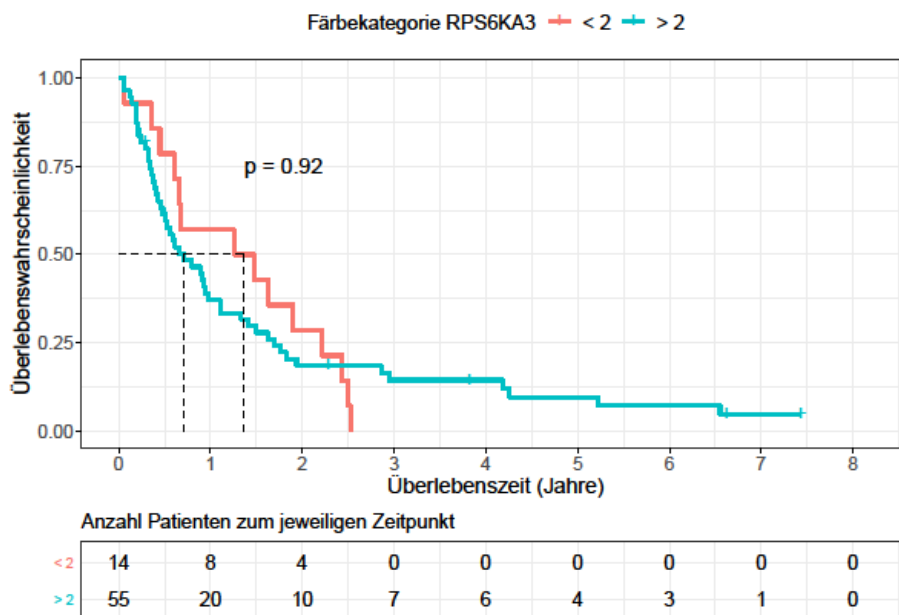


Abbildung 4.17: Einfluss der RPS6KA3 Färbekategorie auf die Überlebenszeit. Die Färbekategorien wurden dichotomisiert.

In der Cox-Regression (siehe Abbildung 4.18) ist der Einfluss mehrerer Variablen auf die Überlebenszeit unter Sorafenib dargestellt. In der Abbildung 4.18 ist die zu testende Einflussgröße (links) mit Hazard Ratio, Konfidenzintervall (Mitte) und p-Wert (rechts) zu sehen. Die Färberegebnisse zeigen ein Hazard Ratio (HR) nahe der Referenz (=1) und lassen auf keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit

schließen (HR MAPK14: 1,42; $p= 0,505$; HR RPS6KA3: 0,85; $p= 0,776$). Beide Färbeergebnisse wiesen darüber hinaus recht breite Konfidenzintervalle (KI) auf, was auf eine große Streubreite der Ergebnisse hinweist. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für den Einfluss des AFP (HR 1,20; KI 0,53-2,8; $p= 0,659$) sowie des Geschlechts (HR 1,89; KI 0,63-5,7; $p= 0,258$). Das weibliche Geschlecht, das im Logrank-Test einen Trend zum besseren Überleben zeigte, wies im Cox-Regressionsmodell einen schwachen Trend zum schlechteren Überleben auf. Das Alter zeigte ein HR von 1,82, ein KI von 0,87- 3,8 sowie einen p -Wert von 0,111. Im Gegensatz zum Logrank-Test erwies sich das Alter für > 65 Jahre in der Cox-Regression nicht als statistisch signifikanter Einflussfaktor. Als signifikanter negativer Einflussfaktor zeigte sich eine PVI auf die Überlebenszeit (HR 2,61; KI 1,13- 6,0; $p= 0,024$). Das multifokale Tumorwachstum war auch in der Cox Regression kein statistisch signifikanter Einflussfaktor, bestätigte jedoch einen negativen Trend bezüglich der Überlebenszeit unter Sorafenib (HR 1,95; KI 0,98-3,9; $p= 0,059$). Mit einem knappen, aber signifikanten Ergebnis erwies sich die CP B Leberzirrhose auch in der multivariaten Analyse als negativer Einflussfaktor auf das Überleben (HR 2,83; KI 1,0- 8,0; $p= 0,05$).

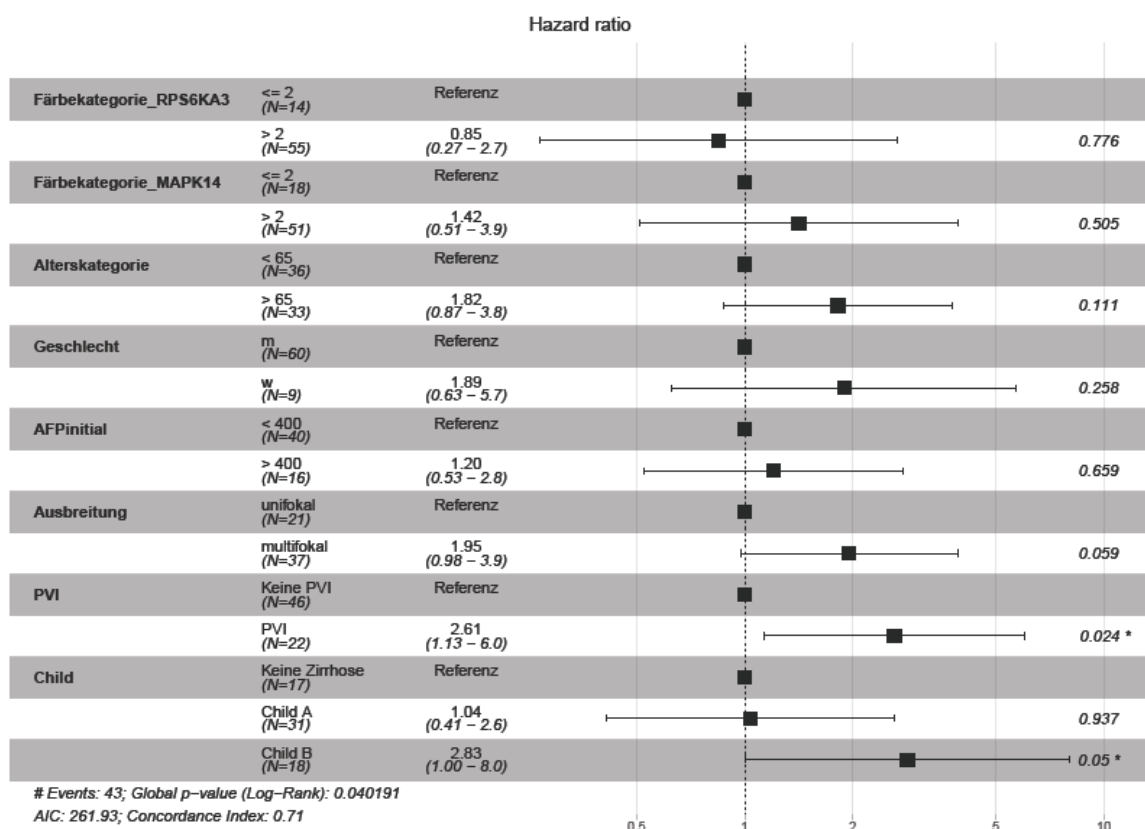


Abbildung 4.18: Forest-Plot als graphische Darstellung der Cox-Regression. Die grauen Zeilen geben den potenziellen Einflussfaktor und die Referenzgröße vor, in den weißen Zeilen befindet sich der geschätzte Effekt mit Angabe der Konfidenzintervalle. In der rechten Spalte befinden sich die p -Werte.

4.4 RNA-Sequenzierung

Zur Identifikation von molekularen Biomarkern bzw. Profilen, welche mit der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Sorafenib assoziiert sind, wurde eine RNA-Sequenzierung von Gewebeproben von insgesamt 19 HCC-Patienten mit besonders gutem und besonders schlechtem Ansprechen auf Sorafenib durchgeführt und miteinander verglichen („best“ vs. „worst“).

4.4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Auswahl der 19 Patienten für die RNA-Sequenzierung erfolgte anhand der oben genannten Einschlusskriterien. Diese umfassten das Vorliegen eines HCC, das über mindestens einen Monat mit Sorafenib therapiert wurde und von dem eine Gewebeprobe zur wissenschaftlichen Nutzung zur Verfügung stand. Für die Gruppe „best“ wurden Patienten mit der längsten Sorafenib-bezogenen Überlebenszeit ausgewählt, für die Gruppe „worst“ Patienten mit der kürzesten Überlebenszeit unter Sorafenib.

In Tabelle 4.2 sind die klinischen Daten der Patienten der Gruppen „best“ und „worst“ im Vergleich aufgeführt. Das mediane Alter lag für die Gruppe „best“ bei 59 Jahren. In der Gruppe „best“ waren vier Patienten bei Erstdiagnose BCLC A und jeweils drei Patienten BCLC B und C. Bei drei Patienten der Gruppe „best“ lag keine Leberzirrhose vor, bei fünf Patienten lag eine CP A und bei zwei Patienten eine CP B Leberzirrhose vor. Bei einem dieser Patienten lag eine PVI vor. In der Gruppe „worst“ lag das mediane Alter bei 71 Jahren. Zwei Patienten waren bei Erstdiagnose BCLC A, drei BCLC B und zwei BCLC C. Bei zwei Patienten der Gruppe „worst“ lag keine Leberzirrhose vor, bei zwei Patienten eine CP A, drei Patienten hatten eine CP B Leberzirrhose. Das Alter ist in der Gruppe „best“ deutlich niedriger, erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p=0,0627$). Die Leberfunktion der Gruppe „best“ ist etwas besser und es liegen weniger PVI vor als bei Gruppe „worst“ vor, die Ergebnisse sind jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p=0,44$ für Leberfunktion und $p=0,25$ für PVI). Die Verteilung der BCLC Stadien bei Erstdiagnose ist in beiden Gruppen in etwa gleich ($p=1$).

Die Dauer der Sorafenib-Einnahme beträgt in der Gruppe „best“ im Median 542 Tage (18,1 Monate), in der Gruppe „worst“ 45 Tage (1,5 Monate). Die Überlebenszeit unter

Sorafenib beträgt in der Gruppe „best“ 942 Tage (31,4 Monate; 2,6 Jahre) und in der Gruppe „worst“ 126 Tage (4,2 Monate). Die Unterschiede in der Dauer der Sorafenib-Einnahme (p-Wert = 0,00075) und der Überlebenszeit unter Sorafenib (p-Wert = 0,0001) zwischen den Gruppen „best“ und „worst“ sind statistisch hoch signifikant.

Tabelle 4.3: krankheitsbezogene Daten der RNA-Sequenzierungs-Patienten

	"best"	"worst"	p-Wert
mediane Sorafenib-Einnahme (in Tagen)	541,5	45	0,00075
mediane Überlebenszeit (in Tagen)	941,5	126	0,00010
medianes Alter (in Jahren)	59	71	0,0627
keine Zirrhose/ CP A / CP B	3/5/2	2/2/3	0,4385
BCLC A/B/C	4/3/3	2/3/2	1
PVI	1	3	0,25

4.4.2 Signifikante Gene

Nach abgeschlossener Qualitätskontrolle und Ausschluss von Batch-Effekten wurden mittels des Wald-Tests die signifikanten Gene berechnet. Die signifikanten Gene sind diejenigen, die sich in ihrer Expression am meisten zwischen den Proben unterscheiden, das heißt, die am meisten über- oder unterrepräsentiert sind. Die Testung ergab 1369 Gene, die einen p – Wert < 0,05 und 332 Gene, die ein p < 0,01 aufwiesen. Als Referenz diente die Gruppe „best“. Gegenüber „best“ waren in der Gruppe „worst“ 1103 Gene unterrepräsentiert und 266 Gene überrepräsentiert für p < 0,05. Für p < 0,01 waren in der Gruppe „worst“ 74 Gene über- und 258 Gene unterrepräsentiert.

4.4.3 Unsupervised Hierarchal Cluster Analysis (UHCA)

Um molekulare Subgruppen zu identifizieren und um anschließend ein Genexpressionsprofil zu erhalten, wurde mit den zuvor ermittelten signifikanten Genen eine UHCA durchgeführt. In Abbildung 4.19 ist das Ergebnis der *Euclidean Distance* Cluster-Analyse als Heatmap dargestellt. Eingesetzt wurden die aus dem Wald-Test resultierenden signifikanten Gene mit einem p-Wert < 0,01. Die RNA-Sequenzierungs-Proben (b1-12 und w1-7) sortierten sich nach Ähnlichkeit in der Genexpression.

Es ist festzustellen, dass sich alle „best“- und alle „worst“-Proben zueinander sortiert haben. Weiterhin ist vor allem im oberen Abschnitt des Graphen ein klarer Unterschied in der Intensität zwischen beiden Gruppen erkennbar. Diese beiden Beobachtungen ergeben zwei große Cluster mit einer guten Auftrennung von „best“ und „worst“.

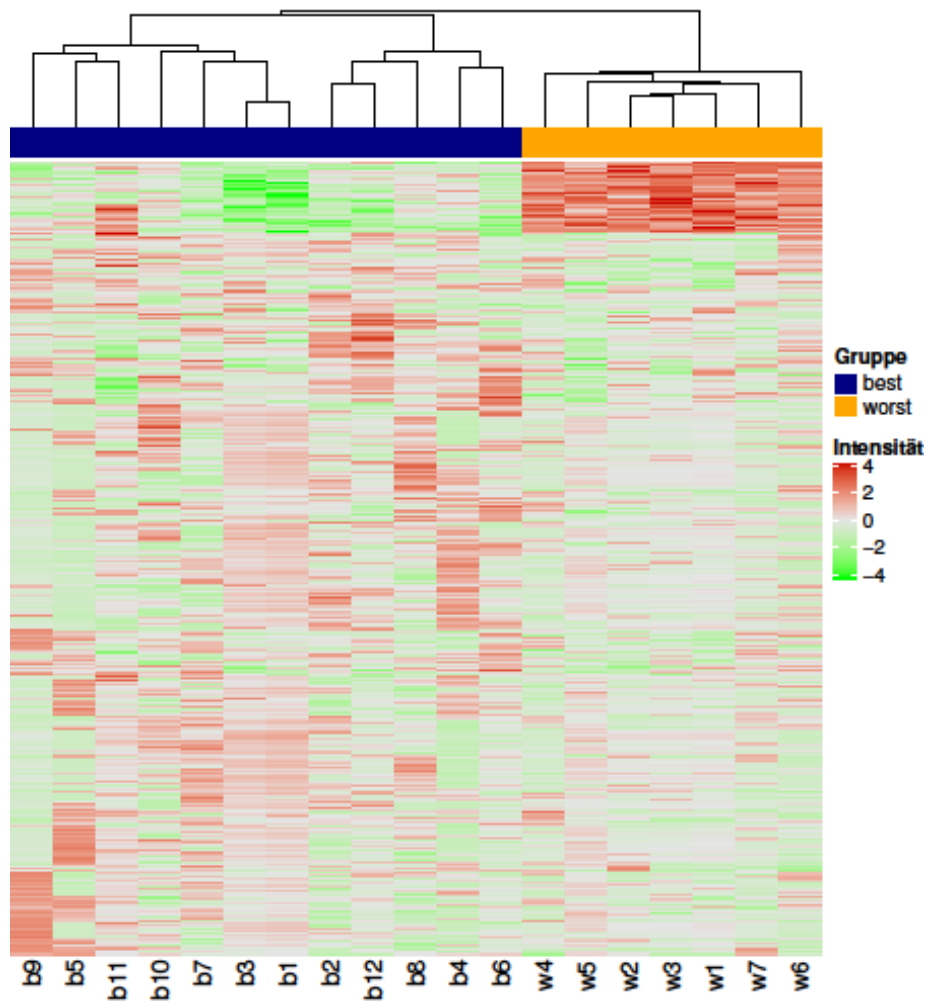


Abbildung 4.19: Heatmap der differenziell exprimierten Gene zwischen „best“ (b1-b12) und „worst“ (w1-w7). Cluster 1 mit allen „best“- Proben und Cluster 2 mit allen „worst“- Proben

Um im Anschluss die biologische Relevanz der Cluster zu testen, wurden die entsprechenden Proben, welche die Cluster enthalten, als Subgruppe zusammengefügt und einem Logrank-Test unterzogen, der grafisch als Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 4.20 dargestellt ist. Cluster 1, welches die Proben der Gruppe „worst“ enthält, weist ein medianes Überleben von ca. 4,5 Monaten auf. Bei Cluster 2, welches die Proben von „best“ enthält, liegt das Überleben im Median bei knapp 3 Jahren. Das Überleben zwischen den beiden Clustern zeigt sich als hochgradig statistisch signifikant ($p < 0,0001$) und weist auf eine gute Separierung der beiden Cluster in der Überlebenszeit hin.

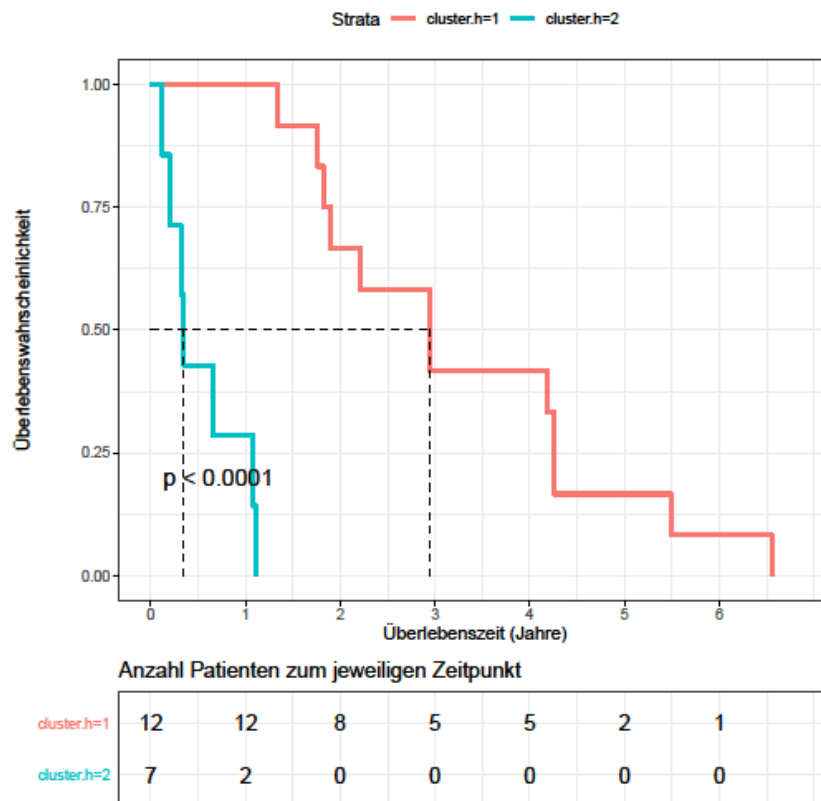


Abbildung 4.20: Kaplan-Meier-Kurven der in der Heatmap gebildeten Cluster 1 und 2.

4.4.4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Um die identifizierten Genexpressionsprofile weiter funktionell zu charakterisieren, wurden GSE-Analysen durchgeführt. GSEA beruht auf dem Prinzip, dass Gene mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften oder regulatorischem Potential, die zu definierten Gensets zusammengefasst sind, zwischen zwei Gruppen unterschiedlich angereichert oder aktiviert sein können. Die Gensets, die zwischen den Gruppen am meisten über- oder unterrepräsentiert sind, haben die höchsten bzw. niedrigsten *Enrichment Scores* (ES). Diese können als *Enrichment Plots* graphisch dargestellt werden. Im Folgenden sind auszugsweise einige *Enrichment Plots* aufgeführt (Abbildung 4.21). Es wurde die Gruppe mit dem schlechtesten Ansprechen („worst“) gegen die Gruppe mit dem besten Ansprechen („best“) getestet. Getestet wurden insbesondere Gensets der *MSigDatabase*, die thematisch passend erschienen. Dazu gehörten alle sog. „*curated Genesets*“, „*Hallmarks*“ und „*oncogenic signature gene sets*“. Als „*Number of permutations*“ wurde 1000 bzw. 100 gewählt und als Chip Plattform diente „*Human_ENSEMBL_Gene_ID_MSigDB.v7.0.chip*“

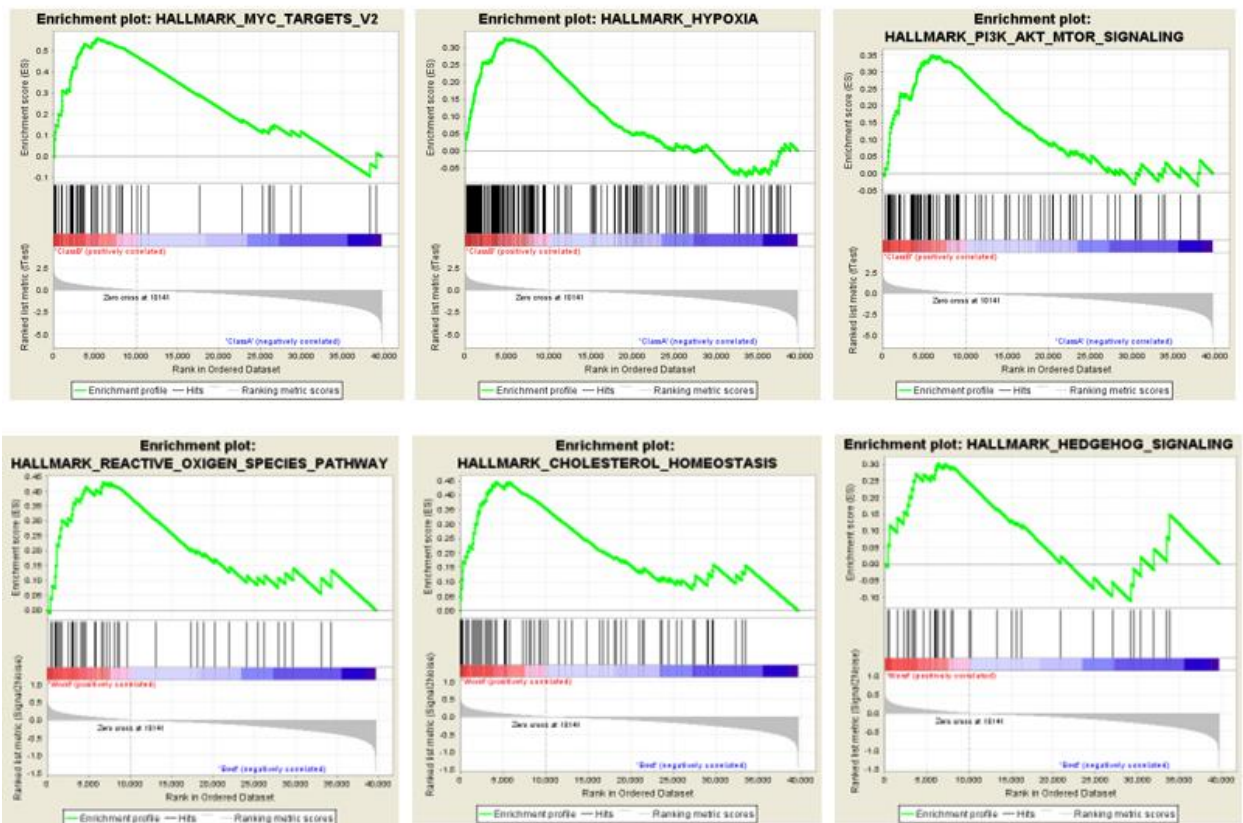


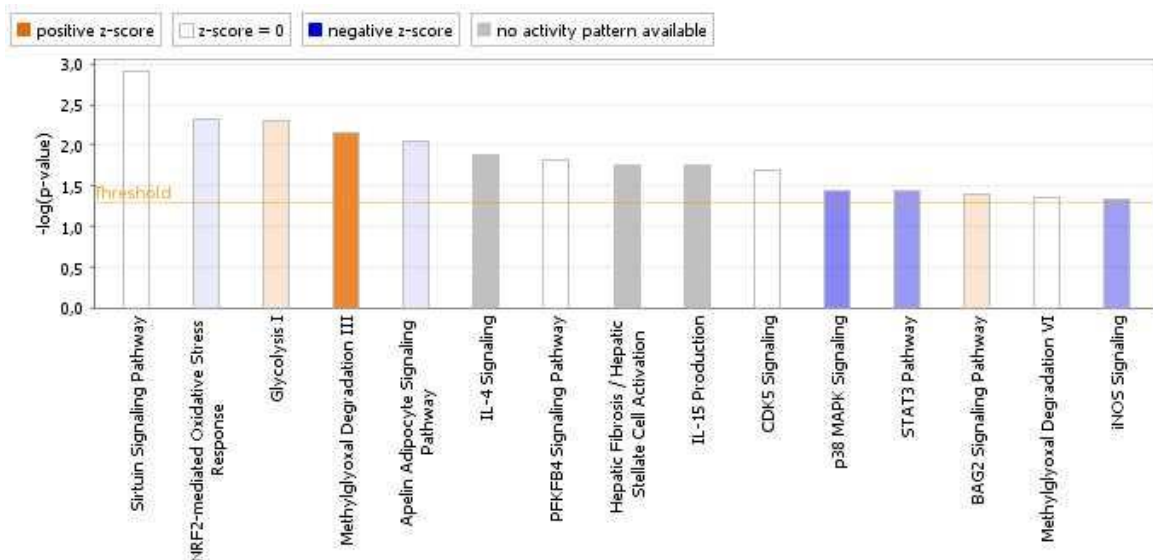
Abbildung 4.21: Einige ausgewählte *Enrichment Plots*.

Tabelle 4.4: überrepräsentierte Gensets der RNA-Sequenzierung-Proben. ES=*Enrichment Score*; NES=*Normalized Enrichment Score*; NOM p-Val=p-Wert; FDR=*False Discovery Rate*. Aufgeführt werden alle Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 und einer FDR <0,25.

Gene set	size	ES	NES	NOM p-Val	FDR	q-Val
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	198	0.597	2.127	0	0	
HALLMARK_ADIPOGENESIS	191	0.519	1.814	0	0.132	
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	198	0.542	1.768	0	0.114	
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	155	0.491	1.688	0.018	0.174	
HALLMARK_PEROXISOME	102	0.439		0.034	0.164	
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	58	0.56	1.611	0.02	0.151	

4.4.5 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Neben aktivierten Gensets können Gene auch bezüglich ihrer Funktion in Signalwegen und funktionellen Netzwerken beschrieben werden. Hierzu wurden mit IPA aus den Log2FC Daten statistisch überrepräsentierte Signalmoleküle bzw. Signalkaskaden zwischen den beiden Gruppen schlechtestes („worst“) versus bestes Ansprechen („best“) unter Sorafenib berechnet und visualisiert. In der Abbildung 4.22 sind die wichtigsten statistisch signifikanten Signalwege dargestellt.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Abbildung 4.22: statistisch signifikante Signalwege bei der Testung „worst“ vs. „best“.

Funktionell umfassen die 15 hier aufgeführten statistisch signifikanten Signalwege unter anderem metabolische Signalwege wie *Glycolysis*, *Methylglyoxal Degradation* oder *PFKFB4 Signaling*. Diese Signalwege sind vor allem in der Gruppe „worst“ überrepräsentiert. Vertreten sind auch Signalwege, die mit einer zellulären Stressantwort assoziiert sind (*NRF2-mediated oxidative stress response*, *p38MAPK Signaling*, *iNOS*, *Sirtuin Signaling*). Signalwege, die eine Aktivierung von Immun-Signalmolekülen vermitteln (IL-4 und IL-15), sind eher in der „best“ Gruppe aktiviert (in Abbildung 4.22 nicht dargestellt). Darüber hinaus sind „*Hepatic Fibrosis*“, „*CDK5 Signaling*“, „*STAT3*“ und „*BAG2 Signaling*“ ebenfalls überrepräsentierte Signalwege. Die genannten Signalwege und -moleküle sind thematisch sortiert in Tabelle 4.4 dargestellt. Von den statistisch signifikanten *Upstream*-Regulatoren fielen vor allem das aktivierte NFE2L2 Gen sowie der inaktivierte HGF auf.

Tabelle 4.5: funktionell sortierte statistisch signifikante Signalwege

Metabolische Signalwege	Stress-Antwort assoziierte Signalwege	Immunsystem-assoziierte Signalwege	Sonstige
Glycolysis I	NRF2-mediated Oxidative Stress Response	IL-4	Hepatic Fibrosis/ Stellate Cell Activation
Methylglyoxal Degradation III	p38 MAPK Signaling	IL-15	CDK 5 Signaling
Methylglyoxal Degradation VI	Sirtuin Signaling		BAG2 Signaling
PFKFB4 Signaling	iNOS		STAT3

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, auf molekularer Ebene Einflussfaktoren auf das Überleben von HCC-Patienten zu finden, die mit Sorafenib behandelt wurden. Damit sollen potenzielle Resistenzmechanismen von Sorafenib identifiziert werden.

Für die vorliegende Studie wurden Patienten rekrutiert, die an einem HCC im fortgeschrittenen Stadium erkrankt waren und mindestens einen Monat mit Sorafenib behandelt wurden. Von jedem Studienteilnehmer wurden klinische Daten erfasst sowie Gewebeproben gesammelt, hier vor allem Biopsien und Resektate. Aus den Gewebeproben wurden immunhistochemische Färbungen mit zwei verschiedenen Antikörpern angefertigt. Aus diesem Patientenpool wurden darüber hinaus insgesamt 19 Patienten ausgesucht, die entweder ein besonders gutes oder besonders schlechtes Ansprechen auf Sorafenib aufwiesen. Insgesamt wurden 12 mit gutem und sieben mit dem schlechtem Ansprechen in die Studie einbezogen. Von diesen Proben wurde RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Anschließend wurden die beiden Gruppen auf differenziell exprimierte Gene untersucht. Dazu wurden zunächst die signifikanten Gene berechnet. Mit den signifikanten Genen wurde zur Identifikation molekularer Subgruppen eine Cluster-Analyse durchgeführt und ein Genexpressionsprofil erstellt. Ergänzend wurden zur funktionellen Charakterisierung GSE-Analysen sowie sog. *Pathway*-Analysen mittels IPA durchgeführt.

5.1 Analyse der Patientendaten

Für die vorliegende Studie waren 248 HCC-Patienten rekrutiert worden. Ausgewertet wurden schließlich 69 Patienten. Dies entspricht, verglichen mit anderen klinischen Studien, einer hohen, aber nicht ungewöhnlichen Ausfallrate (6). Die häufigsten Gründe für einen Drop-Out waren die nicht verfügbare Probe oder Materialknappheit. Weitere neun Patienten mussten aufgrund von fehlenden Überlebenszeitdaten von der Auswertung ausgeschlossen werden. In die Daten der Drop-Out Patienten bestand keine Einsicht. Formal wurden deshalb die Daten der Patienten, die von der Studie ausgeschlossen wurden, nicht mit denen der Studienteilnehmer verglichen. Demzufolge ist eine mögliche systematische Verzerrung durch die Auswahl der Studienteilnehmer nicht gänzlich auszuschließen. Es bestehen jedoch keine konkreten

Hinweise dafür, dies anzunehmen. Im Kontext der bestehenden Literatur umfasst die Größe der Studie ein großes Kollektiv an Patienten. Insgesamt bleibt zu erwähnen, dass in den nationalen und internationalen Leitlinien die Gewinnung einer Histologie für die Diagnosesicherung des HCC oftmals nicht erforderlich ist (4,28), sodass das für die Studie essenzielle Vorliegen einer Histologie zum Ausschluss vieler Patienten führte. Zudem handelt es sich bei dem HCC in Deutschland um eine seltene Tumorerkrankung, sodass das gesammelte Kollektiv als einzigartig anzusehen ist.

Die vorliegende Studie beinhaltet eine retrospektive Analyse, bei der Patienten über ein klinisches Register identifiziert wurden. Für alle Studienteilnehmer lag eine Einwilligungserklärung sowie ein Ethikvotum vor. Es wurden ausschließlich HCC-Patienten untersucht, welche mit Sorafenib behandelt wurden. Bei der ausgewählten Kohorte handelt es sich um eine repräsentative Kohorte westlicher HCC-Patienten. Es wurden HCC-Patienten jeden Alters, Geschlechts, Ätiologie sowie aller initialen Tumorstadien entsprechend der Einschlusskriterien inkludiert. Außerdem wurden die teilnehmenden Patienten über einen langen Zeitraum (bis Ende 2017) nachverfolgt.

In der Zusammensetzung der Studienpopulation ist ein hoher Anteil männlicher Patienten (87%) zu verzeichnen. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, da das HCC bei Männern häufiger auftritt als bei Frauen. Das Verhältnis erkrankter Männer zu Frauen wird in der Literatur 2:1 bis 4:1, teilweise sogar bis 8:1 beschrieben (146–148). In der vorliegenden Studie beträgt das Verhältnis Männer: Frauen 6,7:1. Das Verhältnis der Geschlechter ist damit als repräsentativ für die untersuchte Tumorerkrankung anzusehen. Zusammenfassend sind Frauen nicht nur in dieser, sondern in nahezu allen Studien über das HCC unterrepräsentiert. Die geringere Inzidenz von HCC bei Frauen wird auf einen protektiven Effekt des Östrogens zurückgeführt. In einer *in vivo* Studie unterdrückte Östrogen die Sekretion von IL-6 in Kupffer-Zellen und führte zu einer reduzierten Inzidenz an HCC (149). Aufgrund des hormonellen Schutzes durch das Östrogen tritt das HCC bei Frauen auch durchschnittlich später auf als bei Männern. Frauen weisen darüber hinaus unter 55 Jahren eine bessere bzw. längere Überlebensrate auf (148). In der vorliegenden Studie sind die Frauen deutlich jünger als die Männer (56 vs. 68 Jahre). Dieser Effekt kann jedoch bei einer geringen Anzahl von neun Frauen der zufälligen Auswahl geschuldet sein.

Das untersuchte Patientenkollektiv war im Median 64 Jahre alt. Dieses Alter deckt sich mit anderen großen Studienpopulationen aus westlichen Industrieländern, z.B. den Daten der SEER-Database der USA (150). Auch für Europa liegt der Häufigkeitsgipfel zwischen 63 und 65 Jahren (12).

In Europa bzw. den westlichen Industrienationen sind die häufigsten Ätiologien in absteigender Reihenfolge HCV, Alkohol, HBV und NAFLD/NASH (12,15,19). In Italien lagen laut einer Studie 44-66% der HCC einer chronischen HCV Infektion zugrunde (151). Tang et al. schrieben der HCV Infektion 44-75% der HCC in Europa zu (12). In unserer Studie liegt der Anteil mit 23% niedriger, stellt aber dennoch die zweithäufigste Ursache der HCC Erkrankungen dar. Alkohol wird in der Literatur als die zweithäufigste Ursache von HCC mit bis zu 23% angegeben (15). In der vorliegenden Studie befindet sich der Anteil mit knapp 25% in einem ähnlichen Bereich, nimmt aber die häufigste Ursache ein. Ein Grund für das etwas häufigere Auftreten von Alkohol-assoziierten HCC könnte der regionalen Besonderheit geschuldet sein, dass Mainz in einem Weinanbaugebiet liegt und deshalb die Inzidenz von ALD erhöht sein könnte. Die HBV-Infektion wird in westlichen Nationen (hier: USA) für 10-15% der HCC verantwortlich gemacht (151). Mit 13% liegt dieser Anteil auch in unserer Studie in diesem Bereich und folgt an dritter Stelle nach HCV und Alkohol. Für NAFLD/NASH als Ursache des HCC werden 10-12% angegeben (19). In der vorliegenden Studie werden der NASH 10,7% der HCC zugeschrieben und passt zu den Daten von Degasperi und Colombo, welche die NAFLD/NASH nach den Virushepatitiden und Alkohol einordnen (19). Damit entspricht die Verteilung der Ätiologie, insbesondere die Verteilung von chronischen HCV- und HBV-Infektionen, des Alkoholabusus sowie der NAFLD/NASH, dem Erkrankungsprofil westlicher Industrienationen (siehe 2.1.1).

Es wird vermutet, dass die NASH eine häufige Ursache der kryptogenen Leberzirrhose darstellt, die in der vorliegenden Studie einen Anteil von 8,7% ausmacht. Bugianesi et al. zeigten, dass bei Patienten mit kryptogener Zirrhose häufiger Risikofaktoren für eine NASH vorlagen als bei anderer Ätiologie, sodass die NASH als Ursache einer kryptogenen Zirrhose in Frage kommt (152). Weiterhin können histopathologische Charakteristika einer NASH in weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nicht mehr nachweisbar sein und somit die Diagnose nicht mehr sichergestellt werden (153). Es ist somit denkbar, dass auch in dem vorliegenden Patientenkollektiv ein Teil der als kryptogen benannter Ätiologien eine NASH zugrunde liegt. Allerdings fehlen histologische Hinweise, um diesen Verdacht hinreichend zu bestätigen.

Vergleichsweise hoch fällt der Anteil an HCC auf, die in Lebern ohne Leberzirrhose entstanden sind. Der Anteil beträgt in der vorliegenden Studie 24,6%. In der Literatur wird der Anteil meist mit 10 - 20% angegeben (12,151,154,155). Dieser Effekt könnte bei einer Studiengröße von 69 Teilnehmern zufallsbedingt sein und könnte sich eventuell bei einer größer angelegten Studie angleichen. Der hohe Anteil HCC ohne Leberzirrhose spiegelt sich in dem ebenfalls hohen Anteil „unklarer Ätiologien“ wider. Auch nach intensivem Studium der klinischen Dokumentation war bei acht Patienten kein Hinweis auf eine chronische Lebererkrankung zu eruieren. Aber auch in anderen Studien gibt es einen variablen Prozentsatz an HCC, denen keine Ätiologie zugeordnet werden kann (153). Dieser wird mit bis zu 30-40% angegeben (156). Als häufige Ursache eines HCC unklarer Ätiologie wird die NAFLD/NASH vermutet (156). Eine Studie von Alexander et al. impliziert beispielsweise eine Assoziation zwischen einer NAFLD und HCC in nicht-zirrhotoser Leber. Sie zeigten, dass HCC in nicht-zirrhotoser Leber signifikant häufiger eine Steatose bzw. eine NASH aufwies als CCA in nicht-zirrhotoser Leber (157). Da in den letzten 10 Jahren in der westlichen Welt ein erheblicher Anstieg an NAFLD und NASH beobachtet wird, könnte auch in der vorliegenden Studie der hohe Anteil an nicht-zirrhotosen Lebern durch das Vorliegen einer NASH bedingt sein (19). Allerdings lag nur bei einem von acht Patienten mit unklarer Ätiologie klinische und histologische Hinweise für eine NAFLD/NASH vor. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie die an einem HCC-erkrankten Patienten in der Bevölkerung eines europäischen Landes gut widerspiegelt.

Sorafenib wurde im Median 120 Tage (vier Monate) eingenommen und damit etwas kürzer, aber noch vergleichbar wie in der SHARP-Studie (5,3 Monate, (6)). Im Vergleich zu anderen Studien, welche die Nebenwirkungen unter Sorafenib untersuchten, traten in der vorliegenden Studie konstitutionelle Nebenwirkungen häufiger auf, vor allem die Fatigue mit 83% versus 27,5% im SHARP Trial oder in der Studie von Reig et al. (6,94). Auch gastrointestinale Nebenwirkungen traten in der vorliegenden Studie häufiger auf als in anderen Studien. Die Häufigkeit dermatologischer Nebenwirkungen passt prozentual hingegen gut zu den anderen beiden genannten Studien (6,94). Allerdings waren in der vorliegenden Studie die Nebenwirkungen von nur 18 Patienten erfasst, was eine relativ kleine Gruppengröße darstellt und einen Großteil des Patientenkollektivs nicht berücksichtigt. In der SHARP Studie und der Studie von Reig et al. wurden die Nebenwirkungen von über 100 Teilnehmern untersucht. In der Studie von Reig et al. wurde ein Zusammenhang von

dem Auftreten früher dermatologischer Nebenwirkungen und einem besseren Ansprechen auf Sorafenib nachgewiesen (94). Dies konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden ($p=0,137$). Das Auftreten von dermatologischen Nebenwirkungen im Allgemeinen zeigte in der vorliegenden Studie jedoch einen Trend zum besseren Überleben ($p=0,077$). Allerdings wurden die Nebenwirkungen nur von etwas mehr als einem Viertel der Patienten erfasst. Möglicherweise kann der Effekt, insbesondere der frühen dermatologischen Nebenwirkungen, aufgrund der unvollständig erfassten Daten nicht nachgewiesen werden, denn die Mehrheit der Patienten ist nicht in dieser Untersuchung abgebildet.

78,8% der Abbruchgründe der Sorafenib-Behandlung sind auf einen Tumorprogress oder Tod durch das HCC zurückzuführen (siehe 4.1). Bei 18,8 % ist der Abbruchgrund unklar, eine Medikamentenunverträglichkeit konnte allerdings weitestgehend ausgeschlossen werden. Keiner der Studienteilnehmer, von denen der Abbruchgrund bekannt ist, hat die Therapie aus diesem Grund beendet (siehe 3.2.2). Die Tatsache, dass die große Mehrheit der Patienten Sorafenib aufgrund eines Tumorprogresses beendet hat, könnte dafürsprechen, dass das Ansprechen der Patienten auf die Sorafenib-Therapie mit der Dauer der Einnahme korreliert. Allerdings wiesen mehr als 20% der Patienten unbekannte oder andere Abbruchgründe auf, sodass nicht sicher davon ausgegangen werden kann. In der SHARP-Studie waren die beiden häufigsten Abbruchgründe Medikamentennebenwirkungen und Tumorprogress (6). In der vorliegenden Studie war eine Mindesteinnahmezeit von Sorafenib von einem Monat vorausgesetzt, um Therapieabbrüche aufgrund reiner Toxizität auszuschließen. Dies könnte ein Grund sein, warum die Medikamententoxizität als Abbruchgrund für unsere Studie eine untergeordnete Rolle spielt.

5.2 Überlebenszeitanalysen

Die 5-Jahres-Überlebensrate in dieser Studie ist mit 5,8% erwartungsgemäß schlecht. Die mediane Überlebenszeit liegt mit 8,6 Monaten zwischen den beiden Sorafenib-Zulassungsstudien (SHARP Studie 10,7 Monate; Asia Pacific Studie 6,5 Monate, (6,7)) Das 1-Jahres-Überleben ist mit 40,6% etwas schlechter als das der SHARP-Studie (44%). Da das hier vorliegende Patientenkollektiv eher dem der SHARP-Studie entspricht, wurde eine ähnliche Überlebenszeit erwartet. Die Überlebenszeit der

vorliegenden Studie stimmt mit diesen Erwartungen überein, besonders unter dem Aspekt, dass mehr als ein Viertel der Patienten eine schlechtere Leberfunktion als CP A hatten. Die Zulassungsstudien für Sorafenib wurden nur mit CP A Patienten durchgeführt. Für CP B gibt es Studien, die eine deutlich geringere Effektivität von Sorafenib zeigen als bei CP A Patienten (45). Da CP B Patienten 26,1% der Studienteilnehmer ausmachten, könnte dies die Gesamtüberlebensrate unter Sorafenib insgesamt negativ beeinflusst haben. Dies bestätigte die Kaplan-Meier-Analyse der Leberfunktion, welche einen signifikanten Unterschied im Überleben in Abhängigkeit der Leberfunktion zeigte ($p= 0,012$). Auch die durchgeführte Cox-Regression zeigte ein signifikant schlechteres Überleben von CP B Patienten im Vergleich zu keiner Leberzirrhose oder CP A ($p= 0,05$). Dieses Resultat passt zu den Ergebnissen vieler anderer Studien, welche den Einfluss der Leberfunktion auf das Überleben von HCC-Patienten unter Sorafenib untersuchten. In diesen Studien erwies sich die Leberfunktion als signifikanter Einflussfaktor auf das Überleben der Patienten (158–160). Marrero et al. zeigten z.B. in einer großen multizentrischen Studie, dass eine CP B Leberzirrhose mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit unter Sorafenib einhergeht (medianes Überleben CP A 13,6 Monate vs. 5,2 Monate für CP B, (160)). Auch in der in 2.1.3 erwähnten Metaanalyse fällt das mediane Überleben unter Sorafenib für CP B Patienten deutlich geringer aus (8,8 Monate für CP A vs. 4,6 Monate für CP B, (45)).

Das Patientenalter wird bei Tumorerkrankungen in verschiedenen Studien als prognostisch wichtig beschrieben (161–163). In unserer Studie zeigte sich in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikanter Überlebensvorteil für die unter 65-Jährigen ($p= 0,035$). Man führt den Effekt, dass das Überleben bei Tumorerkrankungen bei jüngeren Menschen besser ausfällt als bei Älteren, unter anderem darauf zurück, dass die Funktion der Organsysteme mit zunehmendem Alter physiologischerweise nachlässt oder im Rahmen von Erkrankungen pathologisch eingeschränkt ist (164). Ältere Menschen leiden häufiger unter Komorbiditäten und je nach Einschränkung durch Komorbiditäten werden seltener kurative Therapieoptionen gewählt (165). Beispielsweise sind invasive Maßnahmen wie Resektionen bei reduzierten Organfunktionen oftmals nur noch eingeschränkt möglich. Darüber hinaus ist die Mortalität bei großen Operationen durch Begleiterkrankungen, die im Alter häufiger auftreten, erhöht. Auch medikamentöse Therapien sind je nach Ausprägung der Begleiterkrankungen nur noch eingeschränkt möglich (165). Der Alterseinfluss beim HCC ist abhängig vom Tumorstadium. Jüngere Patienten weisen vor allem bei

niedrigen Tumorstadien ein besseres Gesamtüberleben auf als Ältere. Der Überlebensvorteil nimmt in fortgeschrittenen Stadien ab (163). In der vorliegenden Studie befanden sich ausschließlich Patienten in fortgeschrittenen Stadien. Der Unterschied im Überleben war in der multivariaten Analyse bereits nicht mehr statistisch signifikant ($p= 0,111$; siehe Abbildung 4.18), sodass nur von einem begrenzten Einfluss des Alters auf das Überleben ausgegangen werden muss.

Wie in 5.1 bereits diskutiert, waren Frauen in der vorliegenden Studie deutlich unterrepräsentiert. Dies führte dazu, dass zwei unterschiedlich große Gruppen (60 Männer, 9 Frauen) resultierten. Die Gruppe der Patientinnen war damit anfälliger für einen Bias. Ein Confounder könnte in dieser Studie das unterschiedliche Alter der Gruppen sein. Denn das mediane Alter der Frauen betrug 56 Jahre, das mediane Alter der Männer dagegen 68 Jahre. Laut einer SEER-Analyse haben Frauen einen altersabhängigen Überlebensvorteil (148). Dieser trifft vor allem auf Patientinnen unter 55 Jahren zu, danach wird er geringer und ist für über 65-Jährige nicht mehr statistisch nachweisbar (148). Die vorliegenden Ergebnisse sind nicht signifikant und besitzen daher eine eingeschränkte Aussagekraft. Aber da die Cox-Regression auf das Alter korrigiert, passt der Trend sowohl im Logrank-Test als auch in der Cox-Regression zu den Daten der SEER-Analyse.

In der vorliegenden Studie lebten die Patienten, die sich bei Erstdiagnose des HCC in BCLC-Stadium A befanden, unter der Einnahme von Sorafenib signifikant länger als die, welche primär in Stadium B und C diagnostiziert wurden (mediane Überlebenszeit unter Sorafenib 18,2 Monate für BCLC A bei Erstdiagnose, 12 Monate für BCLC B und 7,4 Monate für BCLC C bei Erstdiagnose; $p= 0,0082$). Die mediane Überlebenszeit unter Sorafenib ist aber auch in Stadium B besser als in BCLC C. Die Überlebenszeit der Patienten zeigt somit eine Abhängigkeit vom initial diagnostizierten Tumorstadium. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei Patienten, die bei Erstdiagnose in frühen Stadien entdeckt wurden, zunächst ein kurativer Therapieansatz verfolgt wurde, dem eine regelmäßige Nachsorge folgte. Durch die Nachsorge könnten Rezidive oder ein Tumorprogress auch in fortgeschrittenen Stadien ggf. früher entdeckt und behandelt worden sein (166). Für diese Patienten könnte zum einen das *Lead-Time-Bias* eine Rolle spielen. Darunter ist zu verstehen, dass es nur zu einer längeren Überlebenszeit kommt, weil Tumoren früher entdeckt werden. Insgesamt bleibt die Mortalität aber unverändert. Aufgrund des teilweise sehr viel längeren Überlebens der BCLC A Patienten und der geringeren Mortalität in dieser

Gruppe (3-Jahres-Mortalität 66,67% in BCLC A vs. 100% in BCLC B und C) wird nicht davon ausgegangen, dass der Überlebensvorteil ausschließlich auf das *Lead-Time-Bias* zurückzuführen ist.

Eine andere Erklärung für diesen Effekt könnte darin liegen, dass Tumoren, die durch die Nachsorge ggf. früher entdeckt und behandelt werden, besser auf Sorafenib ansprechen. Zu einem früheren Diagnosezeitpunkt könnten die Tumoren noch bessere klinisch-prognostische Eigenschaften aufweisen. In vorangegangenen Arbeiten konnten verschiedene klinische und laborchemische Merkmale mit prognostischem Einfluss auf das HCC identifiziert werden. Zu den prognostisch ungünstigen Merkmalen zählen das Vorliegen einer PVI, ein hohes AFP, schlechte Differenzierung sowie vermehrt Satellitenmetasen (72,77,87). Bezüglich einer Sorafenib Therapie wurden in einer multivariaten Analyse von Wörns et al. das Vorliegen einer Makrogefäßinvasion, Aszites sowie höheres BCLC Stadium als prognostisch ungünstige Faktoren identifiziert (167). In anderen Studien wurden als prognostisch günstige Faktoren das frühe Auftreten dermatologischer Nebenwirkungen unter Sorafenib, erhaltene Leberfunktion (CP A) sowie ein niedrigeres BCLC Stadium (BCLC B vs. C) und die Abwesenheit einer PVI beobachtet (94,168). Einige der hier erwähnten klinischen Einflussfaktoren wurden ebenfalls getestet und werden im Nachfolgenden diskutiert.

Zu vermuten wäre weiterhin, dass durch Nachsorge früher entdeckte Tumoren trotz fortgeschrittener Stadien auf molekularbiologischer Ebene ein prognostisch günstigeres Mutationsspektrum aufweisen und konsekutiv ein weniger aggressives biologisches Verhalten zeigen könnten. Dieser mögliche Zusammenhang ist aber aus den Daten dieser Studie nicht zu entnehmen bzw. wurde nicht nähergehend untersucht. In einer Studie von Nault et al. wurden HCC verschiedener Stadien mittels *Whole Exome Sequencing* untersucht (169). In dieser Studie wurden HCC im BCLC Stadium 0 und A vermehrt mit guter Differenzierung, weniger Mikrogefäßinvasion und Mutationen hepatischer Differenzierung assoziiert, wohingegen BCLC C Tumoren vermehrt mit schlechter Differenzierung und Mutationen assoziiert waren, die mit gesteigerter Proliferation und einer schlechten Prognose einhergehen, z.B. *TP53* (169). Diese Studie ist für die unsere nur bedingt übertragbar, da zum Zeitpunkt der Sorafenib-Therapie ausschließlich fortgeschrittene Stadien vorlagen. Sie zeigt aber, dass früher entdeckte Tumoren ein prognostisch günstigeres molekularbiologisches Profil aufweisen. Fraglich ist, ob es auch unter den fortgeschrittenen Stadien noch

Unterschiede gibt, welche einen Überlebensvorteil unter Sorafenib, wie in der vorliegenden Studie, erklären könnten. Die hier aufgedeckte Assoziation eines geringeren initialen Tumorstadiums mit einer längeren Überlebenszeit unter Sorafenib bietet jedoch einen Anhalt für potenzielle Folgestudien, die das molekularbiologische Profil in fortgeschrittenen Tumorstadien auf eventuelle Unterschiede näher untersuchen könnten.

Einen Unterschied im Überleben anhand der AFP-Werte konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden (univariate Analyse: $p=0,34$; multivariate Analyse: $p=0,659$). Das ist ein eher überraschendes Ergebnis, da in vielen Studien ein hohes AFP mit einer schlechteren Prognose assoziiert wird (siehe oben, (72,77,87)). Als Grenzwert wird häufig 200 ng/ml oder 400 ng/ml verwendet. In dieser Studie wurde 400 ng/ml als Grenzwert angewandt. Das ergab zwei ungleich große Gruppen, da nur 16 unserer Patienten ein AFP >400 ng/ml aufweisen. Trotz ungleich großer Gruppen ist in der vorliegenden Studie jedoch auch kein Trend zu erkennen, sodass ein hoher AFP-Wert in dieser Studie kein relevanter Einflussfaktor zu sein scheint.

Um zu prüfen, ob das Vorliegen eines multifokalen HCC einen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten hat, wurde die „Ausbreitung“ mittels Kaplan-Meier Analyse untersucht und mit in die Cox-Regression einbezogen. Weiterhin sollte die multifokale Ausbreitung als potenzieller Confounder ausgeschlossen werden. Da multifokale Tumoren seltener kurativ behandelt werden können, sind sie generell mit einer schlechteren Prognose assoziiert (siehe Abbildung 2.5). Aber auch bei HCC im fortgeschrittenen Stadium liegt die Vermutung nahe, dass mehrere Tumorherde mit einer geringeren Überlebenszeit einhergehen (170). Die Cox-Regression zeigt ein knapp nicht signifikantes Ergebnis ($p=0,059$). Obwohl die Ergebnisse nicht statistisch signifikant sind, ist sowohl in der Kaplan-Meier-Analyse als auch in der Cox Regression ein Trend zu erkennen, dass multifokale HCC zu einem schlechteren Überleben unter Sorafenib führen (univariate Analyse: $p=0,064$; multivariate Analyse: $p=0,059$). Der Trend entspricht damit der Erwartung, auch wenn er nicht so eindeutig ausfällt wie angenommen. Hier hätte eine größer angelegte Studie gegebenenfalls zu einem signifikanten Ergebnis führen können.

Weiterhin wurde der Einfluss des Vorliegens einer PVI auf die Überlebenszeit untersucht. In klinischen Studien weisen Patienten mit PVI eine signifikant höhere Mortalität auf als Patienten ohne PVI (171). Wie oben erwähnt, ist die Makrogefäßinvasion eine Eigenschaft des proliferativen Subtyps und mit schlechtem

Überleben assoziiert (72,77). Dieser Einflussfaktor spielt eine so große Rolle, dass die PVI unter anderem ein Kriterium der BCLC-Klassifikation für Stadium C ist und eine Kontraindikation zur Transplantation darstellt (siehe Abbildung 2.5 sowie Kapitel 2.1.3). Die durchgeführte Kaplan-Meyer-Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit zwischen Patienten mit und ohne PVI ($p=0,056$), das Ergebnis ist jedoch nur knapp nicht signifikant. Es besteht somit ein Trend zu einer kürzeren Überlebenszeit bei vorhandener PVI. In dieser Studie hatten 46 Patienten keine PVI, bei 22 Patienten lag dagegen eine PVI vor. Da 22 Patienten mit PVI eine kleine Gruppengröße darstellt, könnte das Ergebnis bei einer größeren Stichprobe durchaus den Einfluss auf das Überleben bestätigen. Ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigte sich zudem in der Cox-Regression (siehe Abbildung 4.18; HR 2,61; $p=0,024$). Hier zeichnet sich erwartungsgemäß ein klarer negativer Einfluss der PVI auf die Überlebenszeit der Patienten ab.

5.3 Analyse der Immunhistochemie

Das HCC ist vor allem in fortgeschrittenen Stadien durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen charakterisiert. Es konnten bereits einige Schlüsselveränderungen identifiziert werden, dazu gehören unter anderem Mutationen von TERT, TP53, WNT/ β -catenin oder CDKN2A/RB1. Während die Mechanismen der Hepatokarzinogenese größtenteils entschlüsselt wurden, fehlen prädiktive Biomarker, welche das Therapieansprechen vorhersagen können. In der vorliegenden Studie wurden zwei Enzyme mithilfe der IHC untersucht. Die MAPK14 konnte in der Literatur bereits mit der Resistenzentwicklung von Sorafenib assoziiert werden (104,106). In der Studie von Rudalska et al. zeigte die Inhibition der MAPK14 durch RNA-Interferenz in HCC-Zellen ein verbessertes Ansprechen auf Sorafenib (106). Die Kombination aus Sorafenib und einer pharmakologischen Inhibition der MAPK14 führte bei Mäusen mit HCC zu einer signifikant verbesserten Überlebensrate als mit Sorafenib allein (106). In einer weiteren Studie von Witt-Kehati et al. wurde ebenfalls eine Induktion von MAPK14 in Sorafenib-resistenten HCC-Zelllinien beobachtet (104). Die Blockade des MAPK14 Signalwegs führte zu einer signifikanten Verbesserung des Ansprechens auf Sorafenib.

RPS6KA3 wurde bislang nicht mit der Entwicklung der Sorafenib-Resistenz in Verbindung gebracht. RPS6KA3 wurde als Treiber-Mutation identifiziert und ist in ca.

5% der HCC mutiert (75). Die inaktivierende Mutation von RPS6KA3 ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (74,75,77). Die Inaktivierung von RPS6KA3 führt zu einer RAS-Aktivierung (siehe Abbildung 2.7). Die konstitutiv aktivierte RAS/RAF/MAPK Signalkaskade wurde bereits mit der Resistenzentwicklung von Sorafenib assoziiert (100). Aufgrund dieses zusammenhängenden Signalweges könnte RPS6KA3 an der Entwicklung der Resistenz von Sorafenib beteiligt sein. Auch in anderen Tumorerkrankungen, wie beispielsweise dem Multiplen Myelom oder der Akuten Myeloischen Leukämie, sind Mutationen von RPS6KA3 beschrieben und oftmals mit einer Therapieresistenz vergesellschaftet (172–174). In Multiplen Myelom Zellen zeigte eine Inaktivierung von RPS6KA3 zu einer Sensibilisierung gegenüber Lenalidomid (173). Auch in Triple-negativen Brusttumorzellen wurde unter anderem RPS6KA3 für die Vermittlung einer Resistenz gegenüber MTOR-Inhibitoren identifiziert (174). Interessanterweise beschreiben die zuletzt erwähnten Studien eher eine Überaktivierung von RPS6KA3, während beim HCC eher inaktivierende Mutationen beschrieben werden (siehe oben sowie Abbildung 2.7).

Weder in der Kaplan-Meyer-Analyse noch in der Cox-Regression zeigte sich eine signifikante Assoziation der beiden Proteine mit dem Überleben der Patienten unter Sorafenib. Besonders das Ergebnis der MAPK14 war aufgrund der bereits bestehenden Daten unerwartet. So konnte allerdings auch eine andere Studie die Rolle der MAPK14 als Resistenzvermittler nicht bestätigen (98). In dieser Studie wurden Mäuse mit menschlichen HCC mit Sorafenib behandelt. Anschließend wurde mittels Microarray eine Transkriptom-Analyse von Sorafenib-sensiblen mit Sorafenib-resistenten Tumoren verglichen. Es konnte eine vermehrte Aktivierung des IGF-Rezeptors und FGF-Rezeptors festgestellt werden, nicht jedoch der MAPK14 (98). Ob die MAPK14 wesentlich zu einer Resistenzentwicklung beiträgt, bedarf somit noch weiteren Studien mit größerem Patientenkollektiv und weiteren molekularbiologischen Methoden. Einschränkend ist zudem zu erwähnen, dass die untersuchten Patientenproben nicht unmittelbar vor der Sorafenib-Therapie entnommen wurden, sondern teilweise mehrere Monate bis Jahre zwischen Probenentnahme und Behandlung vergangen waren. Der Einfluss dieser Latenz kann aktuell nicht abgeschätzt werden, könnte jedoch potenziell das molekulare Profil der Proben, z.B. durch unspezifische Proteindegradierung, beeinflusst haben. Da RPS6KA3 in Zusammenhang mit der Sorafenib-Resistenz noch nicht untersucht wurde, ist fraglich, ob diese IHC-Untersuchung methodisch ausreichend ist, um einen Einfluss dieses Enzyms auszuschließen. Auch wenn die vorliegende Studie indes keinen Anhalt gibt,

die Rolle dieses Proteins in Zusammenhang mit der Sorafenib- Resistenz weiterzuverfolgen, wäre es beispielsweise interessant, die Expression mit dem Auftreten einer Mutation zu überlagern und entsprechend mit dem Ansprechen zu assoziieren.

Im Cox-Regressionsmodell wurden mehrere potenzielle Einflussfaktoren berücksichtigt und auf mögliche Confounder (z.B. Alter) korrigiert. Aufgrund der relativ vielen eingefügten Variablen bei einer überschaubaren Studiengröße, war es schwierig, signifikante Ergebnisse zu erzielen. Das Ergebnis der IHC bleibt dennoch aussagekräftig, denn es ist keinem statistischen Test eine Auffälligkeit zu entnehmen. Durch die Cox-Regression konnte eine systematische Verzerrung weitestgehend ausgeschlossen werden.

5.4 Analyse der RNA-Sequenzierung

In der vorliegenden Studie wurden HCC-Patienten mit besonders gutem und schlechtem Ansprechen auf Sorafenib mittels RNA-Sequenzierung auf ihre differenzielle Genexpression untersucht. Der Vergleich der Genexpressionsprofile ergab klare Unterschiede zwischen den beiden Gruppen „best“ und „worst“. Zur weiteren Charakterisierung dieser Unterschiede wurden außerdem funktionelle Analysen durchgeführt.

5.4.1 Analyse des Patientenkollektivs

Aus dem in 4.1 beschriebenen Patientenkollektiv wurden für die RNA-Sequenzierung 19 Patienten ausgewählt (Auswahl siehe oben) und deren klinische Daten gesondert ausgewertet (siehe Tabelle 4.2). Um mögliche Confounder auszuschließen bzw. um eine Vergleichbarkeit der klinischen Eigenschaften der beiden Gruppen „best“ und „worst“ zu gewährleisten, wurden Alter, Leberfunktion, die Anzahl vorliegender PVI sowie die BCLC Stadien bei Erstdiagnose miteinander verglichen. All diese Parameter zeigen keine signifikanten Unterschiede, wobei die kleinen Gruppengrößen zu beachten sind. Einen signifikanten Unterschied zeigt sich trotz der geringen Teilnehmerzahl sowohl in der Einnahmedauer von Sorafenib als auch der Überlebenszeit unter Sorafenib. Da es zwischen den klinischen Parametern keine signifikanten Differenzen gibt, sind die Unterschiede in der Sorafenib-Einnahmedauer

und der Überlebenszeit am ehesten auf das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie mit Sorafenib zurückzuführen.

5.4.2 Genexpressionsanalysen

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen der oben beschriebenen Patienten konnte eine molekulare Signatur identifiziert werden, die mit dem Ansprechen auf Sorafenib assoziiert ist. Insgesamt wurden 1369 Gene identifiziert, die zwischen den Patienten mit gutem Ansprechen gegenüber den Patienten mit schlechtem Ansprechen signifikant unterschiedlich exprimiert wurden.

Die UHCA zeigt, dass sich die Tumoren innerhalb einer Gruppe zu einem Cluster ordnen. Das weist auf eine gewisse Homogenität innerhalb der Gruppen in Bezug auf die identifizierte Signatur hin. Darüber hinaus findet sich eine klare Trennung zwischen den Tumoren der Gruppe „best“ und „worst“. Aus dieser Auftrennung der Gruppen in zwei Cluster lässt sich schließen, dass es beträchtliche Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Gruppen und in deren zellulären Funktionen gibt. Die Cluster 1 und 2 zeigen in der anschließenden Kaplan-Meyer-Analyse einen hochgradig statistisch signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit ($p < 0,0001$). Die gute Separierung der Cluster 1 und 2 weist darauf hin, dass das Genexpressionsprofil eine bemerkenswerte biologische Relevanz besitzt.

5.4.3 Funktionelle Analysen

Um von den differenziell exprimierten Genen auf Veränderungen in molekularen Signalwegen und den zellulären Funktionen schließen zu können, wurden mittels GSEA und IPA funktionelle Analysen durchgeführt.

Interessanterweise konnten in der Gruppe mit schlechtem Ansprechen („worst“) einige Gensets als überrepräsentiert identifiziert werden, die bereits in anderen Studien mit der Resistenz-Entwicklung von Sorafenib assoziiert wurden. Dazu gehören PI3K/AKT/MTOR, der zu MTOR gehörige Enzymkomplex MTORC1 und Hedgehog (9,95,112,175), siehe 2.4.1). Insbesondere PI3K/AKT, aber auch Hedgehog wurde bereits in Studien mit der EMT und Resistenz gegenüber Sorafenib assoziiert (95,112,176,177). Bestätigt werden konnte diese Assoziation auch in anderen Studien durch die Inhibition der PI3-Kinase, welche die Migration und das invasive Verhalten abschwächte (176). Außerdem konnte durch einen spezifischen AKT-Inhibitor ein

Rückgang des EMT-Phänotyp sowie der P-Glykoprotein vermittelte *Multi-Drug-Resistance* (MDR) nachgewiesen werden (99). MYC ist beim HCC mit einer schlechten Prognose assoziiert und eine erhöhte Aktivität des Onkogens wurde bereits in Sorafenib-resistenten Zellkulturen nachgewiesen, ebenso MTORC1 und PI3K (98). Auch anti-apoptotische Proteine wie BAG2, das zur BCL-2-Familie gehört, sind in der „worst“ Gruppe signifikant erhöht.

Weiterhin sind Hypoxie-assoziierte Signalwege und Zellfunktionen in der „worst“ Gruppe vermehrt aktiviert. Dazu gehört das Genset „*Hypoxia*“, die gesteigerte Aktivierung der Glykolyse sowie Abbauwege von Methylglyoxal. Methylglyoxal entsteht in geringen Mengen als Nebenprodukt der Glykolyse (178). Es ist äußerst reaktiv, toxisch und mutagen (178). Die 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 4 (PFKFB4) ist ebenfalls in der Gruppe „worst“ überrepräsentiert. PFKFB4 ist ein Regulator der Glykolyse, der in vielen Tumoren überexprimiert ist. Er wird insbesondere bei hypoxischen Zuständen induziert und wird zum Überleben und Wachstum von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen benötigt (179). Weniger passend erscheint in diesem Zusammenhang das deutlich überrepräsentierte Genset der oxidativen Phosphorylierung, da in der Literatur die oxidative Phosphorylierung eher mit dem Ansprechen von Sorafenib assoziiert wird (180). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass Sorafenib die oxidative Phosphorylierung inhibiert und dadurch die Apoptose der Tumorzellen begünstigt (181). Insgesamt gibt es aber nur wenige experimentelle Hinweise über diesen Zusammenhang.

Ein weiterer Teil des Expressionsprofils der „worst“ Gruppe betrifft Signalwege, die mit einer Begrenzung der zellulären Stressantwort assoziiert werden. NRF2 und vor allem sein aktivierter Upstream Regulator NFE2L2 gehört wie in 2.2.3 beschrieben zum induzierbaren antioxidativen System. Es wird bei erhöhten ROS-Konzentrationen aktiviert und wirkt dadurch anti-apoptotisch (82). Weiterhin führt MYC, das ebenfalls in den Proben mit schlechtem Ansprechen überrepräsentiert ist, zu einer Aktivierung dieses Systems (82).

Mit gutem Ansprechen auf Sorafenib assoziiert sind Gensets und Signalkaskaden, die eher eine Aktivität im Bereich der zellulären Stressantwort sowie der Inflammation aufweisen. So zeigten funktionelle Netzwerke, die sich um IL-4 und IL-15 konzentrierten, eine Zuordnung der Gruppe „best“. Beides sind Zytokine, die eine Aktivierung des Immunsystems vermitteln (182). Insbesondere IL-15 wird durch die Stimulation von T- und Natürlichen Killerzellen einen antitumoröse Aktivität

zugeschrieben (182–184). Ferner zeigten sich eine Aktivierung von Signalwegen, die mit p38MAPK, STAT3 und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) vergesellschaftet sind (siehe 4.16). Stimuliert wird die Aktivität der p38MAPK überwiegend von oxidativem Stress und pro-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren (siehe 2.4.1) (103,104). Dieses Ergebnis passt zu der Studie von Tovar et al. (98), die ein Ansprechen auf Sorafenib in xenotransplantierten HCC ebenfalls mit Inflammation assoziieren konnten. In dieser Studie wurden HCC-Xenotransplantate an Mäusen mit Sorafenib behandelt. Anschließend wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt und Sorafenib-sensible mit Sorafenib-resistenten Tumoren verglichen. Neben einer inflammatorischen Antwort wurde hepatische Differenzierung, Zelladhäsion und besseres Outcome mit Sorafenib-sensiblen Tumoren assoziiert (98).

STAT3 ist ein gut charakterisiertes Onkogen, dem kontextabhängig vielseitige Funktionen zugeschrieben werden (185). In Bezug auf Tumorerkrankungen soll es unter anderem Auswirkungen auf die Proliferation, Angiogenese oder EMT haben und wurde sogar schon mit Sorafenib-Resistenz assoziiert (109,185). Der IL6-JAK-STAT3 Signalweg wird aber auch als wichtiger Vermittler der Tumor-assoziierten Entzündung beschrieben (186). In dieser Studie wurde STAT3 eher im Zusammenhang mit gutem Ansprechen assoziiert. Den Hinweis anderer Studien, dass STAT3 in die Resistenzentwicklung von Sorafenib involviert ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

iNOS ist in vielen malignen Tumoren überexprimiert und die Wirkung von Stickstoffmonoxid wird als konzentrationsabhängig beschrieben. Geringe Konzentrationen fördern eher die Karzinogenese, wohingegen hohe Konzentrationen zu oxidativem Stress, zellulärem Stress durch reaktive Stickstoffverbindungen und zur Apoptose führen (187). In Bezug auf das HCC gibt es keine Untersuchungen. Um die Funktion dieses Enzyms besser interpretieren zu können, bedarf es weitere Studien, welche diesen Sachverhalt weiter untersuchen. In der vorliegenden Studie ist iNOS eher mit gutem Ansprechen assoziiert.

Zusammenfassend konnten unsere RNA-Sequenzierungsanalysen eine molekulare Signatur der Sorafenib-Resistenz identifizieren. Zum Erhalt dieser Signatur erwies es sich als hoch effektiv, die Patienten nach ihrem individuellen Ansprechen auf Sorafenib aufzuteilen. Patienten mit schlechtem Ansprechen zeigten beispielsweise eine gesteigerte Aktivität von PI3K/AKT/MTOR, MYC sowie Hypoxie-assoziierten metabolischen Signalwegen. Patienten mit gutem Ansprechen zeigten hingegen

überrepräsentierte Signalmoleküle aus dem Bereich der Inflammation und der Vermittlung einer zellulären Stressantwort. Die Signatur könnte daher eine verbesserte Selektion der Patienten in der klinischen Routine erlauben und sollte in prospektiven größeren Kohorten validiert werden. Vorteilhaft ist zudem, dass die Proben an unbehandelten Patienten entnommen wurden. Daher wäre die Patientenselektion nach dieser Signatur vor Beginn einer Therapie mit Sorafenib einsetzbar.

5.5 Bewertung der Methoden

5.5.1 Limitationen der Studie

Wie jede klinische und experimentelle Studie unterliegt auch diese Studie gewissen Limitationen. Diese betreffen die Patienten- und Probenauswahl sowie die Erhebung und Dokumentation laborchemischer und anderer krankheitsbezogener Daten. Auch die Mitarbeit der Patienten spielt für die Erhebung und Auswertung klinischer Daten eine entscheidende Rolle. Weiterhin ist die Auswahl der Untersuchungsmethoden von Bedeutung. Aufgrund dieser zahlreichen Einflussfaktoren müssen die Grenzen einer solchen Studie diskutiert werden, wenn eine Translation in die klinische Praxis ermöglicht werden soll.

In 5.1 wurde die Größe dieser Studie mit 69 Patienten zwar als ausreichend bewertet, dennoch ist es bei dieser relativ geringen Teilnehmerzahl schwierig, bei kleinen Unterschieden zwischen Gruppen statistisch und klinisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. In unseren Ergebnissen zeigten einige Resultate einen wegweisenden Trend, aber keine statistische Signifikanz. Bei diesen Ergebnissen hätte eine höhere Teilnehmerzahl möglicherweise zu einem signifikanten Unterschied führen können. Für die RNA-Sequenzierung wurden darüber hinaus lediglich 19 Patienten ausgewählt, um ein molekularbiologisches Profil für HCC mit gutem und schlechtem Ansprechen auf Sorafenib zu erstellen. Für die Etablierung eines solchen explorativen Profils, das sich noch in der Entwicklung befindet, können 19 Proben zwar ausreichend sein, jedoch sollte es in einer unabhängigen Kontroll-Kohorte mit einer größeren Patientenzahl validiert werden, bevor es in die klinische Praxis übersetzt werden kann. Die Reliabilität und Validität dieses Profils ist bei einer Probenzahl von sieben respektive zwölf nicht gegeben und bedarf einer weitergehenden Testung.

In 5.1 wurde die Patientenauswahl diskutiert. Es wurde festgestellt, dass Frauen in dieser Studie unterrepräsentiert sind. Unter der Berücksichtigung, dass das HCC bei Männern häufiger vorkommt, erwies sich die Verteilung der Geschlechter für die untersuchte Erkrankung jedoch als repräsentativ.

Bei insgesamt acht Patienten war die Ätiologie nicht zu ermitteln und musste mit „unklar“ angegeben werden. Die Bezeichnung „unklar“ macht damit den viertgrößten Anteil in der vorliegenden Studie aus. Das kann die Interpretation der Ergebnisse erschweren oder im schlimmsten Falle verzerren. Allerdings kommt es in nahezu allen Studien vor, dass Daten fehlen oder unvollständig sind. Weiterhin gibt es Fälle, bei denen es keinen ätiologisch fassbaren Grund für den Ausbruch einer Erkrankung gibt. Der Anteil unklarer Ätiologie in dieser Studie deckt sich allerdings mit dem anderer Studien und wird teilweise sogar noch höher angegeben (156).

Eine bekannte Limitation von IHC Färbungen, die nicht nur diese Studie betrifft, ist die zu einem gewissen Grad subjektive Auswertung. Darüber hinaus kann eine ausgeprägte Hintergrundfärbung die Auswertung erschweren. Außerdem gibt es keine einheitlichen Auswertungssysteme. Dies limitiert die Vergleichbarkeit von IHC-Daten zwischen verschiedenen Studien (125). Wir entschieden uns für ein semiquantitatives Auswertungssystem, das für IHC-Untersuchungen wie die hier vorliegende häufig verwendet wird (125). Um die Objektivität der Auswertung der IHC-Färbungen zu verbessern, wurden die Färbungen von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Die Korrelationskoeffizienten der beiden Auswertungen sind mit 0,8 und 0,83 für beide Antikörper der Stichprobengröße entsprechend gut, die Auswertungen stimmen zu großen Teilen überein. Subjektiv erschienen die Biopsien insgesamt stärker angefärbt als die Resektate. Auch die Verteilung der Färbekategorien mit einer deutlich häufigeren Wahl hoher Färbekategorien bei beiden Antikörpern ließ diesen Verdacht bestehen. Da die Färbemethode ebenfalls an größeren Gewebestücken etabliert wurde, sollte eine Verzerrung durch die Probenart ausgeschlossen werden. Es wurde bestätigt, dass die Probenart keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Färbeergebnis hat ($p= 0.117$ für MAPK14 und $p= 0,058$ für RPS6KA3).

Bei dem HCC handelt es sich um einen molekular äußerst heterogenen Tumor. Die Heterogenität wird auch für die ausgeprägte Therapieresistenz verantwortlich gemacht. Mit Biopsien und mit kleinen Anteilen eines Resektats können nur kleine Ausschnitte eines HCC untersucht werden. Denkbar wäre, dass eine Probe eines

anderen Tumoranteils ein etwas verändertes Mutationsspektrum hätte aufweisen oder zu einem anderen Färbeergebnis in der IHC hätte führen können (188). Weiterhin konnte nur eine Probe von einer Person ausgewertet werden, auch wenn bei einigen Patienten mehrere zur Verfügung gestanden hätten. Teilweise unterschieden sich zwei Proben desselben Tumors in der IHC erheblich. Eine andere Auswahl hätte vielleicht zu einem veränderten Ergebnis geführt. Die Auswahl der ausgewerteten Proben wurde bei mehreren Verfügbaren möglichst einheitlich getroffen (siehe 3.2.5). Das Problem, dass immer nur eine pars pro toto untersucht werden kann, betrifft und limitiert Studien generell und macht deshalb randomisierte kontrollierte klinische Studien unersetzlich.

5.5.2 Stärken der Studie

Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte nach nur wenigen Ausschlusskriterien und ist deshalb für die untersuchte Erkrankung repräsentativ. Darüber hinaus ist es die bislang größte Studie an westlichen HCC-Patienten, die mit Sorafenib behandelt wurden. Somit umfassen diese Studie und damit auch die RNA-Sequenzierungsdaten ein einmaliges Kollektiv. Die Patienten wurden zudem über einen sehr langen Zeitraum nachbeobachtet (14 Jahre) und nur bei wenigen Patienten fehlten Überlebenszeitdaten. Des Weiteren wurden viele klinische Variablen erfasst, untersucht und als potenzielle Confounder berücksichtigt.

Mit der RNA-Sequenzierung (oder dem NGS im Allgemeinen) wurde eine Methode gewählt, mit der nicht nur einzelne Moleküle untersucht werden können, sondern mit der das komplette Genom, Exom bzw. die Genexpression verschiedener Tumoren untersucht und charakterisiert werden kann. Dadurch können molekularbiologische und klinische phänotypische Eigenschaften miteinander verknüpft werden, wie es auch in dieser Arbeit das Ziel war. Dies eröffnet die Möglichkeit, zuverlässigere prognostische bzw. prädiktive Aussagen treffen zu können und in Zukunft bestenfalls noch zielgerichtetere Therapiekonzepte zu entwickeln.

5.6 Bewertung der Ergebnisse

Bei der Immunhistochemie konnte die Rolle der MAPK14 in der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Sorafenib, entgegen der Erwartungen, nicht bestätigt werden. Ebenso konnte kein Hinweis erbracht werden, dass RPS6KA3 in die Vermittlung der Chemoresistenz involviert ist. Aufgrund der wenig aussagekräftigen Ergebnisse wurde als nächstes eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Der Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit gutem und schlechtem Ansprechen mittels UHCA ergab klare Unterschiede zwischen beiden Gruppen, aus denen sich Auswirkungen auf das biologische Verhalten der Tumoren vermuten ließen. Weiterführende funktionelle Analysen ergaben eine molekulare Signatur, welche einige Veränderungen in Signalkaskaden aufzeigten, die bereits in anderen Studien mit der Resistenz von Sorafenib assoziiert wurden. Dazu gehören bei den Tumoren mit schlechtem Ansprechen beispielsweise PI3K/AKT/MTOR, MYC sowie Hypoxie-assoziierte metabolische Signalwege. Bei Tumoren mit gutem Ansprechen überwogen eher Signalmoleküle aus dem Bereich der Inflammation und einer zellulären Stressantwort. Die RNA-Sequenzierung mit 19 Proben kann für eine erste Erstellung einer molekularen Signatur ausreichend sein, die Zuverlässigkeit dieses Profils muss jedoch weiter überprüft werden. Dazu müssten größere Studien folgen, welche diese Signatur auch in großen Kohorten nachweisen. Im Idealfall in einer multizentrischen Studie, welche eine größere Patientenzahl ermöglicht und zusätzlich potenzielle regional bedingte Verzerrungen vermindert (z.B. vermehrter Alkoholkonsum im Weinanbaugebiet). Außerdem muss in weitergehenden Studien evaluiert werden, ob dieses Profil eine prognostische Relevanz besitzt. Das zukünftige Ziel dieser und nachfolgender Untersuchungen sollte die Translation eines molekularen Profils in den klinischen Alltag sein. Ein solches Profil soll in seiner prognostischen Aussagekraft so zuverlässig funktionieren, dass durch eine Gensequenzierung die Patienten identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von Sorafenib profitieren werden. Darüber hinaus kann ein molekulares Profil der Ausgangspunkt für zukünftige Kombinationstherapien sein, welche die Effizienz von Sorafenib erhöhen und dadurch eine noch zielgerichtetere und individualisierte Therapie ermöglichen. Die Heterogenität des HCC wird auch in Zukunft eine große Herausforderung bleiben. Dennoch gibt der technische Fortschritt des letzten Jahrzehnts einen Grund zum Optimismus, gerade im Bereich der Gensequenzierung und des „*molecular profiling*“.

Für Mammakarzinome wird gerade mithilfe des NGS ein Bluttest entwickelt, der die Prognose nach neoadjuvanter Chemotherapie so gut vorhersagen soll, dass möglicherweise nicht mehr alle Frauen im Anschluss operiert werden müssen (189). Erstrebenswert wäre, mittels NGS von zirkulierender Tumor-DNA oder Tumor-DNA aus einer Gewebeprobe auch für das HCC einen Test zu entwickeln, der voraussagt, ob eine systemische Therapie mit Sorafenib erfolgsversprechend sein wird. Darüber hinaus zeichnen sich in der Immunonkologie nennenswerte Fortschritte ab. Die Immun-Checkpoint-Inhibitoren könnten, vor allem in Kombination mit einer anti-angiogenen Substanz, in Zukunft die Prognose des HCC weiter verbessern.

Zusammenfassend ist es in der vorliegenden Studie gelungen, anhand von einer integrativen RNA-Sequenzierungsanalyse, nicht aber mittels konventioneller Immunhistochemie, molekulare Veränderungen zwischen HCC-Patienten mit gutem und schlechtem Ansprechen auf Sorafenib zu identifizieren. Weiterhin zeigte die Auswertung der krankheitsbezogenen Patientendaten erwartungsgemäß Alter, Leberfunktion und PVI als relevante Einflussfaktoren auf die Prognose. Außerdem fand sich ein inverser Zusammenhang zwischen dem initial diagnostizierten Tumorstadium und der Sorafenib-bezogenen Überlebenszeit. Dieser Zusammenhang sollte jedoch im Rahmen einer größeren Studie reevaluiert werden. Sollte sich bestätigen, dass HCC, welche bei Erstdiagnose ein niedrigeres Tumorstadium aufweisen und im Verlauf mit Sorafenib behandelt werden, besser auf das Medikament ansprechen, würde mithilfe einer Intensivierung von Screening und Nachsorge die Prognose wesentlich verbessern können. Vielleicht wäre damit eine ähnliche Prognose wie in Japan zu erzielen. Das wäre eine Verbesserung der medianen Überlebenszeit um ungefähr das Vierfache (3). Aber auch unabhängig von dem Ansprechen auf Sorafenib lässt der Vergleich dieser Überlebenszeitdaten eine intensivierete Überwachung von Risikopatienten sinnvoll erscheinen.

6 Zusammenfassung

Sorafenib ist seit 2007 das Medikament erster Wahl zur Behandlung des fortgeschrittenen und inoperablen HCC. Aufgrund einer hohen Rate an primären und erworbenen Resistenzen begrenzt sich der Überlebensvorteil durch Sorafenib auf drei Monate im Median. Die hier vorliegende Studie verfolgte das Ziel, mithilfe von klinischen Patientendaten, immunhistochemischen Färbungen und einer integrativen RNA-Sequenzierungsanalyse Veränderungen auf molekularer Ebene zu identifizieren, welche die Chemoresistenz gegenüber Sorafenib vermitteln.

Untersucht wurde ein Studienkollektiv von 69 HCC-Patienten, das für mindestens einen Monat mit Sorafenib behandelt wurde. Das Therapieansprechen wurde anhand der Länge der Überlebenszeit unter Sorafenib bewertet. Statistisch signifikante klinische Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit fanden sich im Logrank-Test bzw. in der Cox-Regression für das Alter und das Vorliegen einer PVI. Es zeigte sich weiterhin eine Abhängigkeit der Überlebenszeit von der Leberfunktion und vom Tumorstadium bei Erstdiagnose - je niedriger das initiale Tumorstadium war, desto besser war das Überleben unter Sorafenib.

Mit den immunhistochemischen Färbungen konnte weder für die MAPK14 noch für RPS6KA3 ein Hinweis erbracht werden, dass sie an der Resistenzentwicklung von Sorafenib beteiligt sind. Hingegen konnte mit Hilfe von RNA-Sequenzierungsanalysen, die an ausgewählten Patienten durchgeführt wurden, beim Vergleich der Genexpressionsprofile eine molekulare Signatur identifiziert werden, welche Patienten mit schlechtem Sorafenib-Ansprechen von Patienten mit gutem Ansprechen unterschied. Tumoren mit schlechtem Ansprechen zeigten Veränderungen in PI3K/AKT/MTOR, MYC sowie Hypoxie-assoziierten metabolischen Signalwegen. Tumoren mit gutem Ansprechen zeigten überrepräsentierte Signalwege der Inflammation und einer zellulären Stressantwort. Damit ist es gelungen, eine vielversprechende Genexpressionssignatur zu erstellen, welche in Folgestudien auf Zuverlässigkeit und ihre prognostische Relevanz überprüft werden kann. Ein übergeordnetes Ziel für die Zukunft wäre es, ein Profil zuverlässiger Biomarker zu erhalten, welches die Wahrscheinlichkeit für HCC-Patienten vorhersagt von einer Therapie mit Sorafenib zu profitieren. Ein weiteres Ziel könnte auch in einem verbesserten Früherkennungs- und Nachsorgeprogramm liegen, um die Gesamtprognose zu verbessern. Auch ein früheres Erkennen von Rezidiven oder

eines Tumorprogresses könnte zu einem besseren Ansprechen auf Sorafenib führen. Diese Hypothese müsste jedoch in Folgestudien ebenfalls weiter untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Nov 1;68(6):394–424.
2. Herold G, editor. *Innere Medizin 2015: eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Selbstverl; 2015. 1002 p.
3. Kudo M, Lencioni R, Marrero JA, Venook AP, Bronowicki J-P, Chen X-P, et al. Regional differences in sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma: GIDEON observational study. *Liver International*. 2016;36(8):1196–205.
4. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018 Jul 1;69(1):182–236.
5. Kirstein MM, Vogel A. Systemische Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *VIS*. 2013;29(2):84–91.
6. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2008 Jul 24;359(4):378–90.
7. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2009 Jan 1;10(1):25–34.
8. Chen J, Jin R, Zhao J, Liu J, Ying H, Yan H, et al. Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2015 Oct;367(1):1–11.
9. Niu L, Liu L, Yang S, Ren J, Lai PBS, Chen GG. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2017 Dec 1;1868(2):564–70.
10. Brose MS, Frenette CT, Keefe SM, Stein SM. Management of Sorafenib-Related Adverse Events: A Clinician’s Perspective. *Seminars in Oncology*. 2014 Feb 1;41:S1–16.
11. El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2011 Sep 22;365(12):1118–27.
12. Tang A, Hallouch O, Chernyak V, Kamaya A, Sirlin CB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdom Radiol*. 2018 Jan 1;43(1):13–25.
13. Cabibbo G, Petta S, Calvaruso V, Cacciola I, Cannavò MR, Madonia S, et al. Is early recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV cirrhotic patients affected by treatment with direct-acting antivirals? A prospective multicentre study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017;46(7):688–95.
14. Suh JK, Lee J, Lee J-H, Shin S, Tchoe H jin, Kwon J-W. Risk factors for developing liver cancer in people with and without liver disease. *PLoS One* [Internet]. 2018 Oct 29 [cited 2019 Aug 4];13(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6205612/>

15. Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control* [Internet]. 2017 Sep 7 [cited 2019 May 14];24(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937247/>
16. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 2012 Mar;379(9822):1245–55.
17. Pinato D, Pria AD, Sharma R, Bower M. Hepatocellular carcinoma: an evolving challenge in viral hepatitis and HIV coinfection. *Aids*. 2017 Mar;31(5):603–11.
18. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2013 Oct 1;60:218–37.
19. Degasperi E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(2):156–64.
20. Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism*. 2016 Aug 1;65(8):1151–60.
21. Shiani A, Narayanan S, Pena L, Friedman M. The Role of Diagnosis and Treatment of Underlying Liver Disease for the Prognosis of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* [Internet]. 2017 Sep 7 [cited 2019 Aug 4];24(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937237/>
22. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2019 Oct 1;71(4):793–801.
23. Seto W-K, Lau EHY, Wu JTK, Hung IFN, Leung WK, Cheung K-S, et al. Effects of nucleoside analogue prescription for hepatitis B on the incidence of liver cancer in Hong Kong: a territory-wide ecological study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017;45(4):501–9.
24. Reig M, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *Journal of Hepatology*. 2016 Oct;65(4):719–26.
25. Is the risk of neoplastic recurrence increased after prescribing direct-acting antivirals for HCV patients whose HCC was previously cured? [Internet]. [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0168827816304810?token=01BAD445292CB6E081723A543B30A627EC5B965730375CDD1D065893A2534C153AFBBB62E1DC2E559D4ACC9E0F0BA1CA>
26. Waziry R, Hajarizadeh B, Grebely J, Amin J, Law M, Danta M, et al. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression. *Journal of Hepatology*. 2017 Dec 1;67(6):1204–12.
27. O’Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307–28.
28. S3-Leitlinie hepatozelluläres Karzinom. 2013;153.
29. Portillo-Sanchez P, Cusi K. Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2019 Nov 26];2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471954/>
30. 021-025I_S25_NASH_Nicht_alkoholische_Fettlebererkrankung_2015-01.pdf.

31. Fetzner DT, Rodgers SK, Harris AC, Kono Y, Wasnik AP, Kamaya A, et al. Screening and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma: An Introduction to Ultrasound Liver Imaging Reporting and Data System. *Radiologic Clinics of North America*. 2017 Nov 1;55(6):1197–209.
32. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL, editors. *Robbins basic pathology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013. 910 p.
33. Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma | SpringerLink [Internet]. [cited 2017 Oct 14]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11523-017-0484-7>
34. Kaiser K, Mallick R, Butt Z, Mulcahy MF, Benson AB, Cella D. Important and relevant symptoms including pain concerns in hepatocellular carcinoma (HCC): a patient interview study. *Support Care Cancer*. 2014 Apr 1;22(4):919–26.
35. Roberts LR, Sirlin CB, Zaiem F, Almasri J, Prokop LJ, Heimbach JK, et al. Imaging for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2018;67(1):401–21.
36. Lee YJ, Lee JM, Lee JS, Lee HY, Park BH, Kim YH, et al. Hepatocellular Carcinoma: Diagnostic Performance of Multidetector CT and MR Imaging—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology*. 2015 Jan 5;275(1):97–109.
37. Aubé C, Oberti F, Lonjon J, Pageaux G, Seror O, N’Kontchou G, et al. EASL and AASLD recommendations for the diagnosis of HCC to the test of daily practice. *Liver International*. 2017 Oct 1;37(10):1515–25.
38. Gavriilidis P, Askari A, Azoulay D. Survival following redo hepatectomy vs radiofrequency ablation for recurrent hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *HPB*. 2017 Jan 1;19(1):3–9.
39. Fu C, Liu N, Deng Q, Li X, Ma K, Bie P. Radiofrequency ablation vs. surgical resection on the treatment of patients with small hepatocellular carcinoma: a system review and meta-analysis of five randomized controlled trials. *Hepatogastroenterology*. 2014 Sep;61(134):1722–9.
40. Facciorusso A, Maso MD, Muscatiello N. Microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Hyperthermia*. 2016 Apr 2;32(3):339–44.
41. Cucchetti A, Piscaglia F, Cescon M, Colecchia A, Ercolani G, Bolondi L, et al. Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2013 Aug 1;59(2):300–7.
42. Molinari M, Helton S. Hepatic resection versus radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic individuals not candidates for liver transplantation: A Markov model decision analysis. *The American Journal of Surgery*. 2009 Sep 1;198(3):396–406.
43. Bruix J, Takayama T, Mazzaferro V, Chau G-Y, Yang J, Kudo M, et al. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2015 Oct 1;16(13):1344–54.
44. Otto G, Schuchmann M, Hoppe-Lotichius M, Heise M, Weinmann A, Hansen T, et al. How to decide about liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: Size and number of lesions or response to TACE? *Journal of Hepatology*. 2013 Aug 1;59(2):279–84.

45. McNamara MG, Slagter AE, Nuttall C, Frizziero M, Pihlak R, Lamarca A, et al. Sorafenib as first-line therapy in patients with advanced Child-Pugh B hepatocellular carcinoma-a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2018 Oct 29;105:1–9.
46. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*. 2018 Mar 24;391(10126):1163–73.
47. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017 Jan 7;389(10064):56–66.
48. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *The Lancet*. 2017 Jun 24;389(10088):2492–502.
49. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattan S, Ogasawara S, Palmer D, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2018 Jul 1;19(7):940–52.
50. Yau T, Park JW, Finn RS, Cheng A-L, Mathurin P, Edeline J, et al. LBA38_PRCheckMate 459: A randomized, multi-center phase III study of nivolumab (NIVO) vs sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC). *Annals of Oncology* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2019 Nov 28];30(mdz394.029). Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz394.029>
51. Finn RS, Ryoo B-Y, Merle P, Kudo M, Bouattour M, Lim H-Y, et al. Results of KEYNOTE-240: phase 3 study of pembrolizumab (Pembro) vs best supportive care (BSC) for second line therapy in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *JCO*. 2019 May 20;37(15_suppl):4004–4004.
52. Faivre S, Rimassa L, Finn RS. Molecular therapies for HCC: Looking outside the box. *Journal of Hepatology*. 2020 Feb 1;72(2):342–52.
53. Kumari R, Sahu MK, Tripathy A, Uthansingh K, Behera M. Hepatocellular carcinoma treatment: hurdles, advances and prospects. *Hepat Oncol* [Internet]. 2018 Sep 28 [cited 2020 Feb 22];5(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6613045/>
54. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
56. Alberts B, Schäfer U, Häcker B, editors. *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2011. 1928 p.
57. Möhler DM. Die Rolle des Tumor-Mikromilieus für die Aktivierung von Krebsstammzellen in hepatozellulären Karzinomen. :102.
58. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2017 Feb 1;58(2):R129–46.
59. Mir N, Jayachandran A, Dhungel B, Steel* RS and JC. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: A Mediator of Sorafenib Resistance in Advanced Hepatocellular Carcinoma [Internet]. *Current Cancer Drug Targets*. 2017 [cited 2019 Jul 18]. Available from: <http://www.eurekaselect.com/151932/article>

60. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009 Oct;19(5):329–37.
61. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Apr;36(3):321–31.
62. Pavlova NN, Thompson CB. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):27–47.
63. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology.* 2015 Dec 1;35:S185–98.
64. Tahmasebi Birgani M, Carloni V. Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int J Mol Sci [Internet].* 2017 Feb 14 [cited 2019 Jul 11];18(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343939/>
65. Zhang Q, Lou Y, Bai X-L, Liang T-B. Immunometabolism: A novel perspective of liver cancer microenvironment and its influence on tumor progression. *World J Gastroenterol.* 2018 Aug 21;24(31):3500–12.
66. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):674–87.
67. Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Nov;15(11):653–67.
68. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology.* 2016 Apr 1;64(1, Supplement):S84–101.
69. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology.* 2009;49(2):658–64.
70. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology.* 2014 Dec 1;60(6):1983–92.
71. Nault J-C, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2019 Jun 28;1.
72. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2015 Oct 1;149(5):1226-1239.e4.
73. Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber TD, Gong Z, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.* 2013 Sep;23(9):1422–33.
74. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012 May 6;44(6):694–8.
75. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics.* 2015 May;47(5):505–11.

76. Zhao H, Lv F, Liang G, Huang X, Wu G, Zhang W, et al. FGF19 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by modulating the GSK3 β / β -catenin signaling cascade via FGFR4 activation. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;7(12):13575–86.
77. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *Journal of Hepatology*. 2017 Oct 1;67(4):727–38.
78. Letouzé E, Shinde J, Renault V, Couchy G, Blanc J-F, Tubacher E, et al. Mutational signatures reveal the dynamic interplay of risk factors and cellular processes during liver tumorigenesis. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Nov 3 [cited 2019 Jul 3];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5670220/>
79. Ahn S-M, Jang SJ, Shim JH, Kim D, Hong S-M, Sung CO, et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology*. 2014;60(6):1972–82.
80. Raja A, Park I, Haq F, Ahn S-M. FGF19–FGFR4 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cells*. 2019 Jun;8(6):536.
81. Huang W, Skanderup AJ, Lee CG. Advances in genomic hepatocellular carcinoma research. *Gigascience*. 2018 01;7(11).
82. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011 Jul;475(7354):106–9.
83. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, Chen K, Selitsky SR, Savich GL, et al. Identification of Driver Genes in Hepatocellular Carcinoma by Exome Sequencing. *Hepatology*. 2013 Nov;58(5):1693–702.
84. Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, et al. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nature Genetics*. 2016 May;48(5):500–9.
85. Lee J-S, Heo J, Libbrecht L, Chu I-S, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature Medicine*. 2006 Apr;12(4):410.
86. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and α -Fetoprotein Expression Defines Novel Prognostic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1451–61.
87. Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet J-P, Chiang DY, et al. Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Sep 15;69(18):7385–92.
88. Ke K, Chen G, Cai Z, Huang Y, Zhao B, Wang Y, et al. Evaluation and prediction of hepatocellular carcinoma prognosis based on molecular classification. *Cancer Manag Res*. 2018 Nov 5;10:5291–302.
89. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb;30(1):35–51.
90. Keating GM. Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Target Oncol*. 2017;12(2):243–53.

91. Sonntag R, Gassler N, Bangen J-M, Trautwein C, Liedtke C. Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 2014 Jan;5(1):e1030.
92. Chen M-L, Yan B-S, Lu W-C, Chen M-H, Yu S-L, Yang P-C, et al. Sorafenib relieves cell-intrinsic and cell-extrinsic inhibitions of effector T cells in tumor microenvironment to augment antitumor immunity. *International Journal of Cancer.* 2014;134(2):319–31.
93. Cao M, Xu Y, Youn J, Cabrera R, Zhang X, Gabrilovich D, et al. Kinase Inhibitor Sorafenib Modulates Immunosuppressive Cell Populations in a Murine Liver Cancer Model. *Lab Invest.* 2011 Apr;91(4):598–608.
94. Reig M, Torres F, Rodriguez-Lope C, Forner A, Llarch N, Rimola J, et al. Early dermatologic adverse events predict better outcome in HCC patients treated with sorafenib. *Journal of Hepatology.* 2014 Aug 1;61(2):318–24.
95. Nishida N, Kitano M, Sakurai T, Kudo M. Molecular Mechanism and Prediction of Sorafenib Chemoresistance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases.* 2015 Oct 21;33(6):771–9.
96. Chawla A, Ferrone C. Hepatocellular carcinoma surgical therapy: perspectives on the current limits to resection. *Chin Clin Oncol.* 2018 Oct;7(5):48.
97. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: Results from the HALT-C Trial. *Journal of Hepatology.* 2005 Sep 1;43(3):434–41.
98. Tovar V, Cornella H, Moeini A, Vidal S, Hoshida Y, Sia D, et al. Tumour initiating cells and IGF/FGF signalling contribute to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2017 Mar 1;66(3):530–40.
99. Dong J, Zhai B, Sun W, Hu F, Cheng H, Xu J. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One [Internet].* 2017 Sep 21 [cited 2019 Jul 30];12(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5608310/>
100. Haga Y, Kanda T, Nakamura M, Nakamoto S, Sasaki R, Takahashi K, et al. Overexpression of c-Jun contributes to sorafenib resistance in human hepatoma cell lines. *PLOS ONE.* 2017 Mar 21;12(3):e0174153.
101. Ezzoukhry Z, Louandre C, Trécherel E, Godin C, Chauffert B, Dupont S, et al. EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *International Journal of Cancer.* 2012;131(12):2961–9.
102. Blivet-Van Eggelpoël M-J, Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Barbu V, Rey C, et al. Epidermal growth factor receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Hepatology.* 2012 Jul 1;57(1):108–15.
103. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in biochemical sciences.* 2000;25(6):257–260.
104. Witt-Kehati D, Fridkin A, Alaluf MB, Zemel R, Shlomai A. Inhibition of pMAPK14 Overcomes Resistance to Sorafenib in Hepatoma Cells with Hepatitis B Virus. *Transl Oncol.* 2018 Apr;11(2):511–7.

105. Chen W, Xiao W, Zhang K, Yin X, Lai J, Liang L, et al. Activation of c-Jun predicts a poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma: Preliminary Clinical Evidence. *Scientific Reports*. 2016 Mar 11;6:22976.
106. Rudalska R, Dauch D, Longerich T, McJunkin K, Wuestefeld T, Kang T-W, et al. In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat Med*. 2014 Oct;20(10):1138–46.
107. Gao L, Wang X, Tang Y, Huang S, Hu C-AA, Teng Y. FGF19/FGFR4 signaling contributes to the resistance of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 09;36(1):8.
108. Zhu Y-J, Zheng B, Wang H-Y, Chen L. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 2017 May;38(5):614–22.
109. Tai W-T, Cheng A-L, Shiao C-W, Liu C-Y, Ko C-H, Lin M-W, et al. Dovitinib Induces Apoptosis and Overcomes Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma through SHP-1–Mediated Inhibition of STAT3. *Mol Cancer Ther*. 2012 Feb 1;11(2):452–63.
110. Méndez-Blanco C, Fondevila F, García-Palomo A, González-Gallego J, Mauriz JL. Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Mol Med [Internet]*. 2018 Oct 12 [cited 2019 Jul 26];50(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6185986/>
111. Zhou S-L, Zhou Z-J, Hu Z-Q, Huang X-W, Wang Z, Chen E-B, et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology*. 2016 Jun 1;150(7):1646-1658.e17.
112. Chow AK-M, Ng L, Lam CS-C, Wong SK-M, Wan TM-H, Cheng NS-M, et al. The Enhanced Metastatic Potential of Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells with Sorafenib Resistance. Takehara T, editor. *PLoS ONE*. 2013 Nov 11;8(11):e78675.
113. Iyer AK, Singh A, Ganta S, Amiji MM. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Nov 30;65(13):1784–802.
114. Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*. 2014 Sep;33(36):4451–63.
115. Huang X-Y, Ke A-W, Shi G-M, Zhang X, Zhang C, Shi Y-H, et al. α B-crystallin complexes with 14-3-3 ζ to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(6):2235–47.
116. Dazert E, Colombi M, Boldanova T, Moes S, Adametz D, Quagliata L, et al. Quantitative proteomics and phosphoproteomics on serial tumor biopsies from a sorafenib-treated HCC patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 2;113(5):1381–6.
117. Sun T, Liu H, Ming L. Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *CPB*. 2017;44(2):716–27.
118. Shi Y-H, Ding Z-B, Zhou J, Hui B, Shi G-M, Ke A-W, et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. *Autophagy*. 2011 Oct 1;7(10):1159–72.

119. Ghidini M, Braconi C. Non-Coding RNAs in Primary Liver Cancer. *Front Med* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 15];2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2015.00036/full>
120. Azumi J, Tsubota T, Sakabe T, Shiota G. miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression. *Cancer Science*. 2016 Sep 1;107(9):1256–62.
121. Jin W, Jin W, Chen L, Chen L, Cai X, Cai X, et al. Long non-coding RNA TUC338 is functionally involved in sorafenib-sensitized hepatocarcinoma cells by targeting RASAL1. *Oncology Reports*. 2017 Jan 1;37(1):273–80.
122. Folkert K. Veränderung des zerebralen Inflammationsstatus in der Frühphase des ARDS im Schweinmodell. :109.
123. Tissue expression of MAPK14 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2019 Jan 5]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112062-MAPK14/tissue>
124. Tissue expression of RPS6KA3 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2019 Jan 5]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000177189-RPS6KA3/tissue>
125. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol* [Internet]. 2014 Nov 29 [cited 2019 Sep 4];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260254/>
126. R Development Core Team. a language and environment for statistical computing: reference index [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2010 [cited 2019 Dec 7]. Available from: <http://www.polsci.wvu.edu/duval/PS603/Notes/R/fullrefman.pdf>
127. Wickham H, Bryan J, attribution) Rs (Copyright holder of all R code and all C code without explicit copyright, code) MK (Author of included R, code) KV (Author of included libxls, code) CL (Author of included libxls, et al. readxl: Read Excel Files [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 7]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>
128. Therneau TM, until 2009) TL (original S->R port and R maintainer. survival: Survival Analysis [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 8]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
129. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2' [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 7]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
130. Qiagen. AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook. 2017.
131. Mueller, Lightfoot, Schroeder. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control.
132. Castven D. Patient-derived cancer cells to dissect the molecular basis of treatment response in primary liver cancer: a mechanistic and functional approach.
133. Illumina. Illumina Sequencing by Synthesis [Internet]. [cited 2018 Dec 12]. Available from: https://www.youtube.com/watch?annotation_id=annotation_1533942809&feature=iv&src_vid=HMYcQWhwB8E&v=fCd6B5HRaZ8

134. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [cited 2019 Dec 7]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
135. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015 Apr;12(4):357–60.
136. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*. 2019 May 7;47(8):e47–e47.
137. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Dec 7];15(12). Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>
138. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016 Sep 15;32(18):2847–9.
139. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47–e47.
140. Bild A, Febbo PG. Application of a priori established gene sets to discover biologically important differential expression in microarray data. *PNAS*. 2005 Oct 25;102(43):15278–9.
141. GSEA [Internet]. [cited 2019 Dec 7]. Available from: <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>
142. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*. 2014 Feb 15;30(4):523–30.
143. Ingenuity Pathway Analysis [Internet]. QIAGEN Bioinformatics. [cited 2019 Dec 7]. Available from: <https://www.qiagenbioinformatics.com/?qia-storyline=products/ingenuity-pathway-analysis>
144. Benjamini Y, Yekutieli D. The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics*. 2001;29(4):1165–88.
145. Chaudhari VA, Khobragade K, Bhandare M, Shrikhande SV. Management of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Chinese Clinical Oncology* [Internet]. 2018 Sep 14 [cited 2019 Dec 28];7(5). Available from: <http://cco.amegroups.com/article/view/21275>
146. West J, Card TR, Aithal GP, Fleming KM. Risk of hepatocellular carcinoma among individuals with different aetiologies of cirrhosis: a population-based cohort study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017;45(7):983–90.
147. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis*. 2017 Jan 1;16(1):1.
148. Yang D, Hanna DL, Usher J, LoCoco J, Chaudhari P, Lenz H-J, et al. Impact of sex on the survival of patients with hepatocellular carcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. *Cancer*. 2014;120(23):3707–16.

149. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. *Science*. 2007 Jul 6;317(5834):121–4.
150. Njei B, Rotman Y, Ditah I, Lim JK. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality. *Hepatology*. 2015;61(1):191–9.
151. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol*. 2013 Jul;47(0):S2–6.
152. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002 Jul 1;123(1):134–40.
153. Margini C, Dufour JF. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver International*. 2016;36(3):317–24.
154. Desai A, Sandhu S, Lai J-P, Sandhu DS. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol*. 2019 Jan 27;11(1):1–18.
155. Lee DH, Lee JM. Primary malignant tumours in the non-cirrhotic liver. *European Journal of Radiology*. 2017 Oct 1;95:349–61.
156. Ozakyol A. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology). *J Gastrointest Canc*. 2017 Sep 1;48(3):238–40.
157. Alexander J, Torbenson M, Wu T-T, Yeh MM. Non-alcoholic fatty liver disease contributes to hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver: A clinical and pathological study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(5):848–54.
158. Kim HY, Park J-W, Joo J, Kim H, Woo SM, Lee WJ, et al. Worse outcome of sorafenib therapy associated with ascites and Child-Pugh score in advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(11):1756–61.
159. Abou-Alfa GK, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Lathia C, et al. Safety and Efficacy of Sorafenib in Patients with Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Child-Pugh A versus B Cirrhosis. *Gastrointest Cancer Res*. 2011;4(2):40–4.
160. Marrero JA, Kudo M, Venook AP, Ye S-L, Bronowicki J-P, Chen X-P, et al. Observational registry of sorafenib use in clinical practice across Child-Pugh subgroups: The GIDEON study. *Journal of Hepatology*. 2016 Dec 1;65(6):1140–7.
161. Wong SF, Matheson L, Morrissy K, Pitson G, Ashley DM, Khasraw M, et al. Retrospective analysis of cancer survival across South-Western Victoria in Australia. *Australian Journal of Rural Health*. 2016;24(2):79–84.
162. Rabi ZA, Zoranovic T, Milovanovic J, Todorovic-Rakovic N, Nikolic-Vukosavljevic D. Breast cancer in postmenopausal patients: Impact of age. :7.
163. Zhang W, Sun B. Impact of age on the survival of patients with liver cancer: an analysis of 27,255 patients in the SEER database. *Oncotarget*. 2015 Jan 21;6(2):633–41.
164. Zhang X, Meng X, Chen Y, Leng S, Zhang H. The Biology of Aging and Cancer: Frailty, Inflammation, and Immunity. *The Cancer Journal*. 2017 Aug;23(4):201–5.

165. Sarfati D, Koczwara B, Jackson C. The impact of comorbidity on cancer and its treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(4):337–50.
166. Hatzaras I, Bischof DA, Fahy B, Cosgrove D, Pawlik TM. Treatment Options and Surveillance Strategies After Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014 Mar 1;21(3):758–66.
167. Wörns MA, Koch S, Niederle IM, Marquardt JU, Nguyen-Tat M, Gamstätter T, et al. The impact of patient and tumour baseline characteristics on the overall survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Digestive and Liver Disease*. 2013 May 1;45(5):408–13.
168. Marisi G, Cucchetti A, Ulivi P, Canale M, Cabibbo G, Solaini L, et al. Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma: Are there any predictive and/or prognostic markers? *World J Gastroenterol*. 2018 Sep 28;24(36):4152–63.
169. Nault J-C, Martin Y, Caruso S, Hirsch TZ, Bayard Q, Calderaro J, et al. Clinical Impact of Genomic Diversity From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* [Internet]. [cited 2020 Jan 2];n/a(n/a). Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.30811>
170. Yu L, Liu X, Wang X, Dang Z, Jiang Y, Wang X, et al. Impact of gender as a prognostic factor in HBV-related Hepatocellular Carcinoma: the survival strength of female patients in BCLC stage 0-B. *J Cancer*. 2019;10(18):4237–44.
171. Greten TF, Papendorf F, Bleck JS, Kirchhoff T, Wohlberedt T, Kubicka S, et al. Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. *Br J Cancer*. 2005 May 23;92(10):1862–8.
172. Hospital M-A, Jacquelin A, Mazed F, Saland E, Larrue C, Mondesir J, et al. RSK2 is a new Pim2 target with pro-survival functions in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):597–605.
173. Zhu YX, Yin H, Bruins LA, Shi C-X, Jedlowski P, Aziz M, et al. RNA interference screening identifies lenalidomide sensitizers in multiple myeloma, including RSK2. *Blood*. 2015 Jan 15;125(3):483–91.
174. He J, McLaughlin RP, van der Noord V, Foekens JA, Martens JWM, van Westen G, et al. Multi-targeted kinase inhibition alleviates mTOR inhibitor resistance in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2019 Nov 1;178(2):263–74.
175. Ding J, Zhou X-T, Zou H-Y, Wu J. Hedgehog signaling pathway affects the sensitivity of hepatoma cells to drug therapy through the ABCC1 transporter. *Lab Invest*. 2017 Jul;97(7):819–32.
176. Zhang H, Wang Q, Liu J, Cao H. Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway reverses sorafenib-derived chemo-resistance in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2018 Jun;15(6):9377–84.
177. Chen K-F, Chen H-L, Tai W-T, Feng W-C, Hsu C-H, Chen P-J, et al. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway Mediates Acquired Resistance to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Apr 1;337(1):155–61.
178. Nokin M-J, Bellier J, Durieux F, Peulen O, Rademaker G, Gabriel M, et al. Methylglyoxal, a glycolysis metabolite, triggers metastasis through MEK/ERK/SMAD1 pathway activation in breast

- cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 14];21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343302/>
179. Chesney J, Clark J, Klarer AC, Imbert-Fernandez Y, Lane AN, Telang S. Fructose-2,6-Bisphosphate synthesis by 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*. 2014 Jul 13;5(16):6670–86.
 180. Chen C-L, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metabolism*. 2016 Jan 12;23(1):206–19.
 181. Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Effect of sorafenib on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 2011 Nov 16;670(1):39–43.
 182. Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway Immunologie*. 7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. 1093 p.
 183. Easom NJW, Stegmann KA, Swadling L, Pallett LJ, Burton AR, Odera D, et al. IL-15 Overcomes Hepatocellular Carcinoma-Induced NK Cell Dysfunction. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 9 [cited 2020 Jan 4];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5954038/>
 184. Guo Y, Luan L, Patil NK, Sherwood ER. Immunobiology of the IL-15-IL-15R α Complex as an Antitumor and Antiviral Agent. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017 Dec;38:10–21.
 185. Avalle L, Camporeale A, Camperi A, Poli V. STAT3 in cancer: A double edged sword. *Cytokine*. 2017 Oct 1;98:42–50.
 186. Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell*. 2013 Mar;4(3):176–85.
 187. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*. 2015 Dec 1;6:334–43.
 188. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.
 189. McDonald BR, Contente-Cuomo T, Sammut S-J, Odenheimer-Bergman A, Ernst B, Perdigones N, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis to detect residual disease after neoadjuvant therapy in breast cancer. *Science Translational Medicine*. 2019 Aug 7;11(504):eaax7392.