

"Einfluss des Sphingolipid-Stoffwechsels auf die Proliferation
des hepatozellulären Karzinoms in vitro"

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Katja Florentine Daniela Jakobi

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2020

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Datum der Disputation: 23.02.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Leber.....	1
1.2	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	4
1.2.1	Risikofaktoren.....	5
1.2.2	HCC- Marker, -Einteilung und -Behandlung.....	7
1.2.3	Heterogenität.....	12
1.3	Sphingolipide.....	13
1.3.1	Struktur und Metabolismus der Sphingolipide.....	14
1.3.2	Sphingolipid-Rheostat.....	17
1.3.3	Sphingosin-1-Phosphat und die Sphingosinkinasen 1 und 2 (SPHK1/2).....	17
1.3.4	Ceramide.....	20
1.3.5	Sphingolipide im HCC.....	22
1.4	Zielsetzung.....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3	Chemikalien.....	27
2.1.4	Allgemeine Zellkulturreagenzien.....	28
2.1.5	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	29
2.1.6	Enzyme, Reagenzien.....	30
2.1.7	TaqMan®-Sonden.....	30
2.1.8	Antikörper.....	31
2.1.9	Puffer- und Lösungszusammensetzungen.....	31
2.1.10	Assays.....	33
2.1.11	Zelllinien.....	34
2.2	Allgemeine Zellkultur Methoden.....	35
2.2.1	Kultivierung der verwendeten Zellen.....	35
2.2.2	Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen.....	35
2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen der verwendeten Zellen.....	35
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	35

2.2.5	Stimulation von HepG2 und Huh7.5 Zellen.....	36
2.3	Molekularbiologische Methoden	37
2.3.1	RNA Extraktion	37
2.3.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	38
2.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR).....	38
2.3.4	Real-Time-PCR (TaqMan®)	39
2.4	Proteinbiochemische Methoden	40
2.4.1	Präparation von Zellysaten.....	40
2.4.2	Bestimmung des Proteingehaltes	40
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.4.4	Elektrotransfer.....	42
2.4.5	Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	43
2.5	Bestimmung zellulärer Parameter	44
2.5.1	DNA Fragmentierungs-ELISA	44
2.5.2	Nachweis der Proliferation mittels [³ H] -Thymidin-Einbau	45
2.5.3	LC-MS/MS	46
2.6	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Wirkung von Sorafenib auf Enzyme des Sphingolipid Stoffwechsels	50
3.2	Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die pERK-Spiegel.....	52
3.3	Beeinflussung der Proliferation der HepG2 Zellen durch Sorafenib und Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels.....	53
3.4	Beeinflussung der Proliferation der Huh7.5 Zellen durch Sorafenib in Kombination mit Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels	55
3.5	Einfluss der kombinierten Inhibition der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2 auf die Proliferation	56
3.6	Einfluss von Sorafenib, Fumonisin B1 und SKI II auf Apoptose und Nekrose von HepG2 und Huh7.5 Zellen	58
3.1	Beeinflussung der Sphingolipid-Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Inhibition regulierender Enzyme	59
3.1.1	Beeinflussung der Dihydroceramid-Spiegel von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1.....	60
3.1.2	Beeinflussung der Dihydroceramid-Spiegel von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und die Sphingosinkinase-Inhibitoren	62

3.1.3	Beeinflussung der Ceramid Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1	65
3.1.4	Einfluss auf die S1P-, Sphingalin-1-Phosphat-, Sphingosin- und Sphingalin- Konzentrationen der HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1	66
3.1.5	Einfluss auf die Ceramid-Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und den Sphingosinkinase-Inhibitoren	67
3.1.6	Einfluss auf die S1P-, Sphingalin-1-Phosphat-, Sphingosin- und Sphingalin-Konzentrationen der HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und den Sphingosinkinase-Inhibitoren.....	69
3.2	Einfluss von oxidativem Stress auf die Dihydroceramid-Konzentrationen	71
4	Diskussion	73
4.1	Verminderte mRNA-Expression durch Sorafenib-Stimulation.....	73
4.2	Hemmung der Phosphorylierung von ERK durch Sorafenib.....	75
4.3	Zusammenhänge zwischen Proliferation und Apoptose- Nekrose- Rate der HepG2 und Huh7.5 Zellen	77
4.3.1	Sorafenib	77
4.3.2	Fumonisin B1.....	79
4.3.3	SKI II.....	81
4.3.4	SLP und SLM.....	84
4.4	Die von SKI II vermittelte Inhibition der Proliferation scheint von Sphingolipiden unabhängig zu sein	87
4.5	Sphingolipide spielen eine untergeordnete Rolle bei der Proliferation von HepG2- und Huh7.5-Zellen.....	88
4.5.1	Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Dihydroceramid-Akkumulation und Einfluss auf die Proliferation	88
4.5.2	Einfluss von S1P auf die Proliferation der Zellen.....	92
5	Schlussfolgerungen	97
6	Zusammenfassung	99
7	Summary.....	101
8	Anhang.....	103
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	103
8.2	Abbildungsverzeichnis	106
8.3	Tabellenverzeichnis.....	107
9	Literaturverzeichnis	108

9.1	Veröffentlichung.....	140
9.1.1	Veröffentlichung aus dieser Arbeit.....	140
9.1.2	Sonstige Veröffentlichungen.....	140
10	Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

In dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen den Behandlungsmöglichkeiten des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und dem Sphingolipid-Stoffwechsel untersucht werden. Um dies besser verstehen zu können wird unter anderem der Entstehungsprozess des HCC und dessen Behandlungsmöglichkeiten beschrieben. Es folgt eine Einführung in den Sphingolipid-Metabolismus und dessen mögliche Verbindungen zur Krebsentstehung. Auch auf die Eignung von Sphingolipiden zur Behandlung von Krankheiten wird eingegangen. Anschließend wird der bis jetzt bekannte Zusammenhang zwischen HCC und Sphingolipiden erläutert.

1.1 Die Leber

Die Leber ist die größte Anhangsdrüse des Darms und kann bei einem Erwachsenen ein Gewicht von ca. 1,5 kg erreichen. Sie besteht aus den zwei großen (Lobus dexter und Lobus sinister) und den zwei kleinen (Lobus quadratus und Lobus caudatus) Leberlappen und befindet sich im oberen rechten Quadranten des Abdomens (Menche 2016).

Die Leberarterie versorgt die Leber mit sauerstoffreichem Blut, welches 25 % des zur Leber gelangenden Blutes darstellt. Die verbleibenden 75 % gelangen über die Pfortader zu Leber, welche sich hier stark verästelt. Hierbei handelt es sich um das gesammelte venöse Blut der Bauchorgane. Dieses enthält z.B. Hormone der Bauchspeicheldrüse, Abbauprodukte der Milz, Stoffe die schon von der Magenschleimhaut (z.B. Alkohol) und Nährstoffe die im Dünndarm resorbiert wurden. Daher umfasst das breite Aufgabenspektrum der Leber z.B. Elemente des Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels. Weiter ist sie für den Umbau und die Ausscheidung (Entgiftung) zahlreicher körpereigener und -fremder Stoffe zuständig (z.B. Alkohol). Auch besitzt die Leber eine Speicherfunktion (z.B. Vitamine und Spurenelemente) und stellt den Hauptsyntheseort zahlreicher Hormone und Proteine

wie z.B. der Serumeiweiße und der Gerinnungsfaktoren dar. (Menche 2016; Trefts et al. 2017).

Wenn man sich den Aufbau der Leber genauer anschaut, kann man erkennen, dass sie aus sehr vielen sogenannten Leberläppchen besteht. Diese haben eine sechseckige Form und stehen an jedem ihrer Eckpunkte jeweils mit zwei weiteren Leberläppchen in Kontakt. An diesem Punkt (Glisson-Trias) laufen jeweils ein Ast der Pfortader und Leberarterie sowie ein kleiner Gallengang entlang. Somit werden drei Leberläppchen gleichzeitig mit dem Blut aus der Pfortader und der Leberarterie versorgt (Abbildung 1) (Trefts et al. 2017; Menche 2016)

Gleichzeitig bilden die Gallengänge sogenannte Gallenkanälchen aus, die in das Innere der Leberläppchen reichen. Hierbei ist die Fließrichtung vom Inneren der Leberläppchen zum Gallengang. So können schlecht wasserlösliche und damit auch schlecht im Blut lösliche Abbauprodukte abgeführt werden. Diese gelangen über die Gallengänge schließlich zur Galle. Hier können sie durch die Gallensäure in Lösung gehalten und schließlich über den Darm ausgeschiedenen werden. Das Lumen der Gallengänge wird durch sogenannte Cholangiozyten ausgekleidet, eine der fünf in der Leber vorzufindenden Zellarten (Abbildung 1)(Trefts et al. 2017; Menche 2016).

Die am häufigsten vorkommende Zellart in der Leber ist allerdings der Hepatozyt. Die Hepatozyten sind maßgeblich am Aufbau der Leberläppchen und damit auch an den Funktionen der Leber beteiligt. In den Leberläppchen sind die Hepatozyten in radiär verlaufenden Zellsträngen angeordnet, welche aus ein bis zwei Lagen Hepatozyten bestehen. Diese wiederum bilden ein dreidimensionales Plattensystem. Zwischen den Hepatozyten verlaufen die sogenannten Lebersinusoide in denen sich das Blut der Pfortader und der Leberarterie vermischt und somit das Kapillarsystem der Leber bildet. Hierbei läuft das Blut zum Zentrum der Leberläppchen und damit in Richtung der Zentralvene. Diese sammelt das Blut aller Leberläppchen, wonach dieses über die drei großen Lebervenen (Vena hepatica) schließlich in die untere Hohlvene (Vena cava inferior) fließt. Über das Blut werden auf diese Weise gut wasserlösliche

Abbauprodukte an die Nieren weitergeleitet und können über den Urin ausgeschieden werden (Trefts et al. 2017; Menche 2016; Piñeiro-Carrero und Piñeiro 2004).

Die Sinusoide wiederum sind mit Sinusepithelzellen ausgekleidet. Diese bilden Poren (50-180 nm Durchmesser), die den Austausch zwischen im Blut vorhandenen Stoffen und Hepatozyten ermöglichen und regeln. In den Sinusoide findet man außerdem Sternzellen, welche in der gesunden Leber der Speicherung von Vitamin A dienen. Kommt es jedoch zu einer Schädigung der Leber, sind diese Zellen auch für die Organisation und Ablagerung von Kollagen verantwortlich (Trefts et al. 2017; Menche 2016; Piñeiro-Carrero und Piñeiro 2004).

Ebenfalls sind hier die Kupffer-Zellen zu finden. Diese stellen die Makrophagen der Leber dar und erkennen und phagozytieren z.B. Bakterien die durch das Pfortader-Blut eingeführt wurden. Auch können die Kupffer-Zellen eine pro- oder antientzündliche Rolle bei der Wundheilung spielen (Trefts et al. 2017; Menche 2016; Piñeiro-Carrero und Piñeiro 2004).

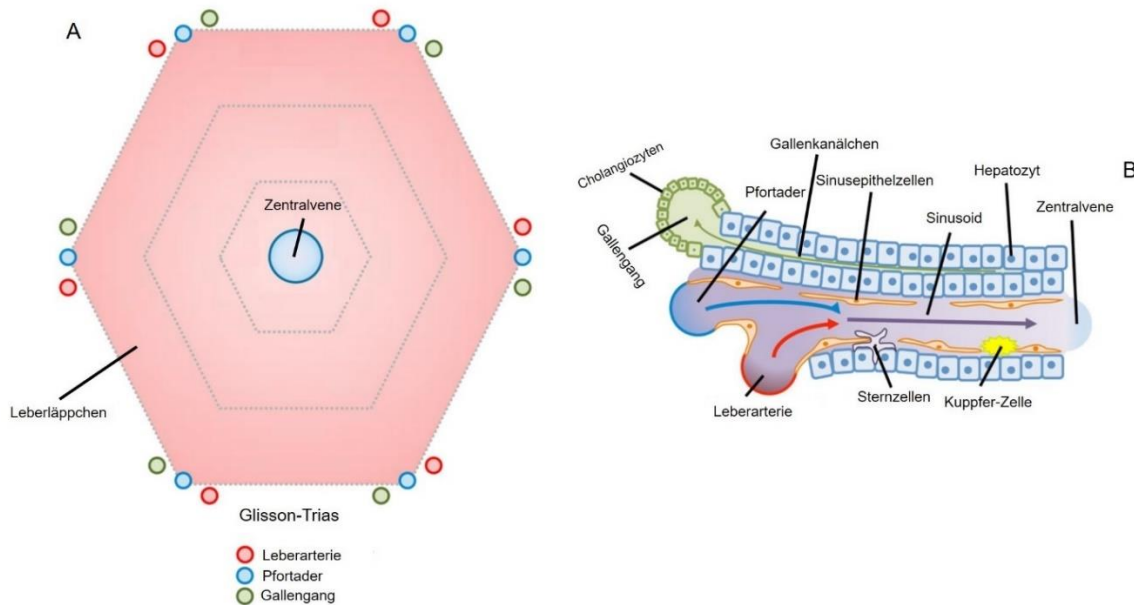


Abbildung 1: **Aufbau der Leberläppchen (A) mit detailiertem Ausschnitt (B)**. Die Leberläppchen haben eine sechseckige Form, an deren Ecken sich das Glisson-Trias befindet. Durch dieses gelangt sauerstoffreiches Blut sowie das gesammelte venöse Blut der Bauchorgane zu den Leberläppchen. Das Blut fließt zur Mitte des Leberläppchen in Richtung Zentralvene. Auf dem Weg werden die im Blut enthaltenen Stoffe (z.B. Glukose, Cholesterin) von den Hepatozyten herausgefiltert und weiterverarbeitet. Weiter werden so die wasserlöslichen Abbauprodukte über das Blut an die Nieren weitergeben und ausgeschieden. Über die Gallenkanälchen gelangen schlecht wasserlösliche Abbauprodukte erst in den Gallengang und schließlich in die Galle. Über die Galle gelangen sie in den Darm und werden ebenfalls ausgeschieden. (modifiziert nach: (Trefts et al. 2017))

1.2 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom („*Hepatocellular carcinoma*“, HCC) stellt neben dem intrahepatischen Cholangiokarzinom („*intrahepatic cholangiocarcinoma*“, iCCA) den häufigsten malignen Tumor der Leber dar (Sia et al. 2017). Wie bereits im Mausmodell (Mu et al. 2015) als auch bei Patienten (Ueno et al. 2001; Matsumura et al. 2013) gezeigt werden konnte, entsteht das HCC direkt aus den Hepatozyten.

Das HCC stellt weltweit die zweithäufigste Krebsart bei Männern und die neunthäufigste Krebsart bei Frauen dar - wobei es bei Männern auch die zweithäufigste von Krebs verursachte Todesart ist. Bei Frauen rangiert das HCC hier auf Platz sechs (Torre et al. 2015). Dasgupta et al. (2020) haben bei einer Meta-Analyse von mehreren Studien aus Nordamerika, Europa und Australien eine steigende Anzahl an HCC-Neuerkrankungen festgestellt. Währenddessen zeigten hier drei von

vier Studien aus Asien eher stabile bis abnehmende Zahlen der HCC Neuerkrankungen.

1.2.1 Risikofaktoren

Die Entstehung des HCC kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Besonders hervorzuheben sind Alkoholmissbrauch sowie eine Infektion mit dem Hepatitis-B (HBV) oder Hepatitis-C-Virus (HCV) (Nault 2014; Bosetti et al. 2014). Weiter hat in den letzten Jahren das Risiko der Entwicklung eines HCC durch NAFLD („*nonalcoholic fatty liver disease*“) bzw. NASH („*nonalcoholic steatohepatitis*“) stark zugenommen. (Kumar et al. 2020).

Eine genauere Aufteilung der Risikofaktoren veröffentlichte die „*European Association for the Study of the Liver*“ 2018 (Peter R. Galle et al. 2018). Hier konnte aufgezeigt werden, dass es z.B. Unterschiede zwischen West-, Mittel- und Osteuropa gibt. In Westeuropa stellt eine HCV-Infektion das größte Risiko für eine Erkrankung an HCC dar, während in Mittel- und Osteuropa der Alkoholmissbrauch an erster Stelle steht. Sowohl Alkoholmissbrauch, als auch eine Infektion mit HCV führen jedoch nicht direkt zur Entwicklung eines HCC. Meist kommt es zunächst zu einer chronischen Schädigung der Leber, im Sinne einer Inflammation des Lebergewebes, einer sogenannten Hepatitis, welche wesentlich zur Entstehung des HCC beiträgt.

Die genauen Mechanismen, wie Alkoholmissbrauch zur Entstehung eines HCC beitragen kann, sind noch nicht vollständig geklärt. Alkoholmissbrauch führt jedoch z.B. zum Entstehen von Entzündungen, Zellschädigung und vermehrtem oxidativem Stress, was zur Entstehung von alkoholtoxischen Leberschäden („*alcoholic liver disease*“, ALD) beiträgt. Unter ALD fasst man verschiedene Lebererkrankungen zusammen, wie z.B. Hepatitis (Leberentzündung), Leberfibrose und auch Leberzirrhose (Setshedi et al. 2010). Bei einer Leberfibrose wird das Lebergewebe vermehrt durch Bindegewebe ersetzt und kann sich zu einer Zirrhose weiterentwickeln. Welche mit einem kontinuierlichen Funktionsverlust der Leber einhergeht (Abbildung 2). Der Zusammenhang zwischen Alkoholmissbrauch und den

darauffolgenden krankhaften Veränderungen der Leber, die schließlich auch zum HCC führen können, konnte von (Orman et al. 2013) durch den Vergleich mehrere Studien bestätigt werden.

Weiter untersuchten (El-Serag 2012) und (Petruzzello 2018) den Zusammenhang zwischen einer Hepatitis-Infektion und dem Entstehen eines HCC, indem sie verschiedene Studien zu diesem ausführlich untersuchten Thema verglichen. Beide konnten dadurch aufzeigen, dass eine HBV-Infektion ebenfalls zur Entwicklung einer Leberzirrhose führen kann. In 70 % bis 90 % der durch HBV-Infektion ausgelösten HCC-Entstehungen kam es vorher zur Leberzirrhose (Abbildung 2). Hierbei scheint die Integration der viralen DNA in die des Menschen eine entscheidende Rolle zu spielen. Ob und wie schnell sich durch eine HCV-Infektion ein HCC entwickelt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu zählt unter anderem das Alter, das Geschlecht und auch die Höhe der Viruslast. Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit einer Zirrhose ebenfalls mit dem Alter. Ob die Entwicklung einer Zirrhose bei der HCC-Entwicklung bei einer HCV-Infektion eine Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt. Hier scheint es, als ob der HCC-Entwicklung eher eine Leberfibrose zugrunde liegt (Abbildung 2). Jedoch haben Menschen mit einer HCV-Infektion ein 15- bis 20-fach erhöhtes Risiko, an einem HCC zu erkranken.

Neuere Studien konnten zeigen, dass mittlerweile auch NAFLD bzw. NASH einen großen Risikofaktor für die HCC Entstehung darstellen (Negro 2020; Anstee et al. 2019). Hierbei entwickelt sich das HCC meistens jedoch nicht direkt aus der NAFLD, sondern es entsteht zunächst eine NASH. Die NAFLD stellt jedoch mittlerweile die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit dar und ihre Prävalenz ist höher als für jede andere chronische Lebererkrankung. Die genauen Faktoren die zu einer HCC Entwicklung aus NAFLD und NASH führen sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Da es bei vielen HCC Patienten mit zugrundeliegender NAFLD/NASH Erkrankung unter anderem nicht zur Zirrhose-Entwicklung kam (Negro 2020). Die häufigsten Faktoren die zu einer NAFLD Entstehung beitragen sind Fettleibigkeit und Typ 2

Diabetes. Dies führte dazu, dass bereits ungefähr 1/3 der Population vieler Länder unter NAFLD leiden. Dies ist auch einer der Gründe warum NAFLD/NASH gerade in Ländern in denen die virale Hepatitis keine größere Rolle spielen einer der Hauptgründe für HCC Entwicklung ist (Anstee et al. 2019). Estes et al. (2018) nutzen Daten über NAFLD/NASH, Fettleibigkeit und Typ 2 Diabetes die bis 2015 erhoben wurden um in einer Modellstudie für verschiedenen Länder berechnen zu könne. Hierbei untersuchten sie wie sich unter anderem die Prävalenz für NASH in diesen Ländern bis 2030 verändern wird. Hierbei kamen die Autoren zu dem Schluss, dass selbst wenn die Level für Fettleibigkeit und Typ 2 Diabetes zurückgehen sich die Prävalenz für NASH in allen untersuchten Ländern, unter anderem Deutschland, um 15–56% steigern würde. Weiter konnten sie berechnen, dass es in Deutschland im Vergleich zu Italien und Spanien die größte Prävalenz für NAFLD bezogene HCC Erkrankungen 2030 geben wird.

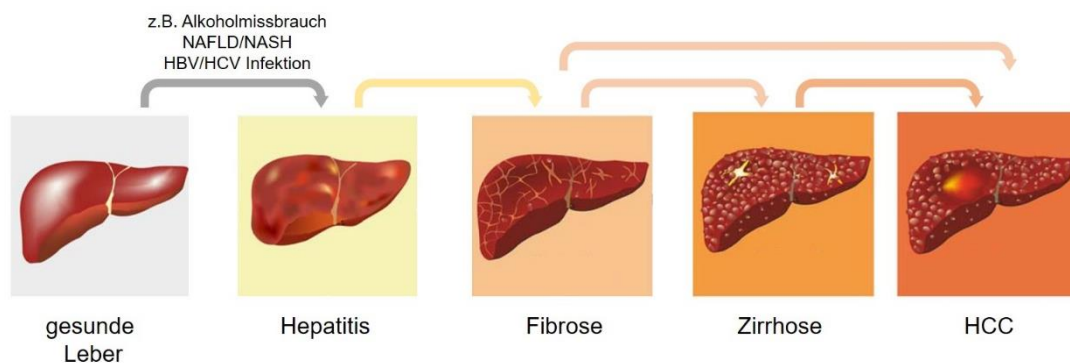


Abbildung 2.: **Übersicht zur Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC).** Der Entstehung des HCC stehen verschiedene Ursachen zugrunde. Durch unterschiedliche Stimuli kommt es zu einer Entzündung der Leber (Hepatitis). Diese kann sich zu einer Fibrose weiterentwickeln. Ausgehend von der Fibrose kann direkt ein HCC entstehen oder es kommt zur Entwicklung einer Zirrhose. Die Mehrheit der HCC-Fälle entsteht bei Patienten mit Leberzirrhose (modifiziert nach: (Weiskirchen und Tacke 2016)).

1.2.2 HCC- Marker, -Einteilung und -Behandlung

Wie gut das HCC behandelt werden kann und wie hoch die Überlebenschancen sind, hängt stark davon ab, zu welchem Zeitpunkt es entdeckt wird. Ein entscheidender Punkt ist hier, dass es mit AFP (Alpha-Fetoprotein) im Moment nur einen diagnostischen serologischen Marker für das HCC gibt, welcher allerdings hinsichtlich

eingeschränkter Sensitivität und Spezifität nicht für die Primärdiagnostik geeignet ist (McMahon et al. 1990; Trevisani et al. 2001; Marrero et al. 2009; Lok et al. 2010).

Song et al. (2016) fassten in ihrer Arbeit die Situation zur Erkennung des HCC zu diesem Zeitpunkt zusammen. Dadurch, dass sich die bildgebenden Verfahren wie Ultraschall in den letzten Jahren verbessert haben, könnten diese eine Verbesserung in der Frühdiagnostik mit enger Nachbeobachtung, bei Patienten mit Zirrhose oder fortgeschrittenen Leberfibrose, zeigen. Oft werden AFP und Ultraschall auch gemeinsam zur Überwachung von Patienten verwendet. Auch die Forschung zur Entwicklung neuer Biomarker ist in den letzten Jahren intensiviert worden. Die klinische Feststellung einer HCC-Erkrankung wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die Patienten mit HCC oligosymptomatisch (mit wenigen Symptomen) sind (Gomes et al. 2013).

Daher wurde die Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation entwickelt (Llovet et al. 1999a). Diesem liegt einmal der Child-Pugh-Score (CHILD in Abbildung 3) zur Einstufung der vorahrenden Leberzirrhose und der der Leistungsstatus-Test („*Performance Status Test*“, PST) zugrunde. Anhand dieser Bewertungssysteme werden unter anderem auch die Therapieoptionen für die Patienten festgelegt (siehe Abbildung 3) (Bruix und Llovet 2002; Varela et al. 2003).

Der Child-Pugh-Score (CHILD in Abbildung 3) geht auf zwei Veröffentlichungen zurück. Die erste ist aus dem Jahr 1964 und stammt von Child und Turcotte, welche Patienten mit Leberzirrhose in drei Gruppen einteilten. Die Einteilung erfolgte anhand von zwei biochemischen (Serumalbumin und Bilirubin) und drei klinischen (Aszites, Enzephalopathie und Ernährungsstatus) Variablen (Garcia-Tsao 2016). Diese Einteilung wurde von (Pugh et al. 1973) weitergeführt. Sie vergaben jeder Variablen zwischen einem (gut) und fünf (sehr schlecht) Punkte. So bekommt ein Patient, der bei allen Punkten sehr schlecht abschneidet z.B. 15 Punkte. Dieses Punkte System wurde wieder rum in die Stufen A (5-6 Punkte), B (7-9 Punkte) und C (10-15) eingeteilt.

Beim Leistungsstatus-Test wird berücksichtigt, wie pflegebedürftig und aktiv bzw. bettlägerig ein Patient ist. Dieser reicht von normaler Aktivität (PST 0) bis vollständig bettlägerig (PST 4) (Sørensen et al. 1993). Somit wird mithilfe des CHILD- und PST-Tests die Operabilität bzw. Fähigkeit des Patienten für die Anwendung unterschiedlicher Therapiemodalitäten geprüft (Abbildung 3) (Bruix et al. 2016; Tunissioli et al. 2017; Marquardt und Thorgeirsson 2014).

Die Behandlungsoptionen beim HCC hängen davon ab, wie früh es erkannt wird (Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation, Abbildung 3). In den ersten beiden Stadien der Erkrankung gibt es noch Möglichkeiten der kurativ angesetzten operativen Behandlung. Hierbei wird zwischen der Leberresektion (Teilentfernung) bei noch kompensierter Leberfunktion und der Lebertransplantation bei massiver Einschränkung der Leberfunktion bei gleichzeitiger vorliegender Leberzirrhose unterschieden (Llovet et al. 1999b; Bruix und Llovet 2002; Varela et al. 2003).

Ob ein HCC-Patient für eine Lebertransplantation geeignet ist, hängt davon ab, ob er die sogenannten Mailand-Kriterien erfüllt (Silva und Sherman 2011). Diese wurden von (Mazzaferro et al. 1996) festgelegt und umfassen folgende Kriterien: es darf nur ein einzelner Knoten bis zu einer Größe von 5 cm Vorhandensein oder bis zu drei Knoten die nicht größer als 3 cm sein dürfen. Weiter darf es keine Anzeichen für eine extrahepatische Ausbreitung oder einer makrovaskulären Invasion geben. Die Bedeutsamkeit dieser Kriterien konnten unter anderem von (Klintmalm 1998) und (Yao et al. 2001) bestätigt werden. Das größte Problem bei der Transplantation besteht in einem Mangel an Spenderorganen. Dies kann bei einer so schnell voranschreitenden Krankheit wie dem HCC jedoch sehr entscheidend sein (Llovet et al. 1999b; Cha et al. 2003).

Falls der Patient die Kriterien für eine Lebertransplantation nicht erfüllt, stehen lokal-ablative Verfahren wie die Radiofrequenz-Ablation (*“radiofrequency ablation”*, RFA) oder die perkutane Ethanol-Injektion (*„percutaneous ethanol injection”*, PEI) zur Verfügung. Bei der PEI wird Ethanol (99,5 %) über Nadeln direkt in den Tumor

injiziert (Shiina et al, 1993). Bei der RFA wird der Tumor mittels Einführung einer Elektrode durch Stromstöße behandelt (Curley et al. 1999).

Der nächste Behandlungsschritt beim HCC ist die TACE (trans-arterielle Chemoembolisation, „*Transcatheter arterial chemoembolization*“). Hierbei wird zunächst ein Chemotherapeutikum in die Leberarterie gegeben und diese anschließend blockiert (Embolisation). Die Embolisation soll garantieren, dass das Chemotherapeutikum besser in der HCC-Raumforderung ankommt, ohne weiter im Körper verteilt zu werden und somit besser und gezielter wirken kann (Bruix und Sherman 2005).

Die letzte Behandlungsoption für Patienten mit HCC ist die Behandlung mit systemischen Chemotherapien. Allerdings ist die Behandlung des HCC mit diesen sehr limitiert, da das HCC einen prinzipiell chemoresistenten Tumor darstellt (Marin et al. 2018). Zu den aktuell zugelassenen systemischen Therapien gehört Sorafenib, Regorafenib und Lenvatinib (Faivre et al. 2020).

Sorafenib ist ein RAS/RAF/MEK/ERK und VEGFR („*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*“, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor) Inhibitor (Lyons et al. 2001; Wilhelm et al. 2004). Daher vermindert es das Zellwachstum von Krebszellen, wie unter anderem von Zhang et al. (2018) in akut promyelozytär Leukämie-Zellen gezeigt werden konnte. Llovet et al. (2008) konnten in einer Phase-3-Studie erstmals zeigen, dass die Sorafenib-Behandlung von HCC-Patienten, im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu einer verbesserten Gesamtüberlebenszeit führt. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe konnte hier das mediane Überleben um ca. drei Monate verlängert werden. Cheng et al. (2009) konnten ebenfalls in einer Phase-3-Studie eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit sowie eine längere Zeit ohne Krankheitsverschlechterung in HCC-Patienten sehen, die mit Sorafenib behandelt wurden. Als häufigste Therapie-assoziierte Nebenwirkungen wurden Hand-Fuß-Hautreaktionen, Durchfall und Müdigkeit angegeben. Weiter konnten beide Studien zeigen, dass es in den Patienten zu keinem vollständigen Rückgang des Tumors kam,

sondern Sorafenib eher zu einer Stabilisierung, sogenannte klinische Remission, der Krankheit führt (Desai et al. 2017; Keating 2017).

Es gab in den letzten Jahren verschiedene Ansätze, die Therapie-Optionen für hepatozelluläre Karzinome im fortgeschrittenen Stadium zu verbessern. So untersuchten Meyer et al. (2017) die potentielle Potenzierung der TACE durch die zusätzliche Gabe von Sorafenib im Vergleich zu Placebo. Hierbei konnten sie jedoch keine Verbesserung der Behandlung durch zusätzliche Gabe von Sorafenib feststellen.

Auch gab es mehrere Versuche, neue systemische Chemotherapien für das HCC zu finden. Lenvatinib ist ein oraler Inhibitor unter anderem des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 1-3 („*vascular endothelial growth factor receptor 1–3*“, VEGF), des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 1-4 („*fibroblast growth factor receptor*“, FGF) und des Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptors alpha („*platelet-derived growth factor receptor alpha*“, PDGF Rezeptor alpha). Kudo et al. (2018) konnten in einer Phase-3-Studie zeigen, dass Lenvatinib und Sorafenib sowohl im Behandlungserfolg, als auch in ihrer sicheren Anwendung sehr ähnlich sind. Lenvatinib wurde daher hauptsächlich als zweite Linientherapie zugelassen, da es nicht schlechter als Sorafenib abgeschnitten hat (Faivre et al. 2020)..

Mit Regorafenib wurde eine weitere Chemotherapie gefunden, welche das Gesamtüberleben von Patienten verbessert, deren Krankheit nach Sorafenib Behandlung wieder fortschreitet. Regorafenib kann somit als effektive „Second-line“-Behandlung angesehen werden (Bruix et al. 2017).

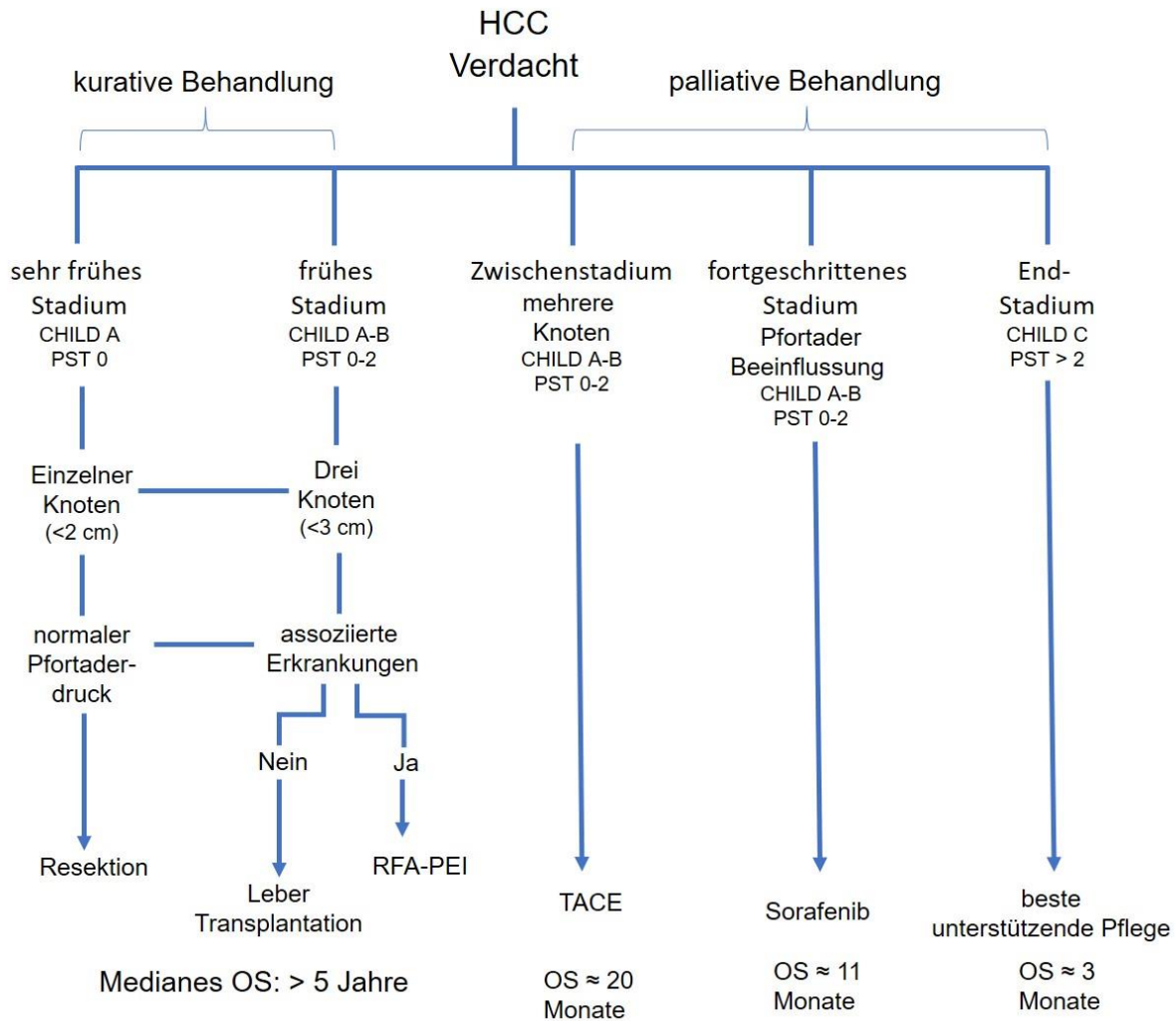


Abbildung 3. Übersicht der Behandlungsoptionen des hepatozellulären Karzinom (HCC) nach der Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation. Ausgehend von dem Stadium, in dem das HCC entdeckt wird, gibt es verschiedene Behandlungsoptionen. Die ersten beiden Stadien können noch kurativ behandelt werden, z.B. mittels Resektion oder Lebertransplantation. Hier beträgt das Gesamtüberleben bis zu über 5 Jahre. Ab dem „Zwischenstadium“ ist nur noch eine palliative Behandlung möglich. Hier findet man die Behandlungsoptionen TACE („Zwischenstadium“) und auch die Behandlung mit Sorafenib („fortgeschrittenes Stadium“). Im Endstadium gibt es keine direkte Behandlung mehr, dem Patienten wird die bestmögliche unterstützende Therapie („best supportive care“) zuteil. Das Gesamtüberleben der letzten drei Stadien reicht von ca. 20 bis herab zu drei Monaten. Die Klassifikation findet anhand der Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation statt und berücksichtigt zum Einen Tumor-bedingte (Anzahl und Größe der Raumforderungen) und zum Anderen Patienten-bezogene Faktoren. OS = Gesamtüberleben („overall survival“), RFA-PAI = Radiofrequenzablation-perkutane Ethanol-Injektion („radiofrequency ablation“ (RFA) und „percutaneous ethanol injection“ (PEI)), TACE = trans-arterielle Chemoembolisation („Transcatheter arterial chemoembolization“, TACE). (modifiziert nach: Marquardt und Thorgeirsson 2014)

1.2.3 Heterogenität

Die Behandlung vom HCC wird weiter durch seine ausgeprägte Heterogenität erschwert. Buczak et al. (2018) konnten durch Untersuchungen des Proteoms von fünf HCC-Patienten sowohl eine inter- als auch intratumorale Heterogenität feststellen. Dass es eine große intratumorale Heterogenität im HCC gibt, konnten Xue et al. (2016)

nachweisen. Bei den meisten HCC-Patienten finden sich mehrerer HCC-Knoten in der Leber. In dieser Studie konnten Mutationen festgestellt werden, die in allen HCC-Knoten eines Patienten vorhanden sind. Sie nannten diese „*ubiquitous mutations*“. Der prozentuale Anteil der „*ubiquitous mutations*“ variierte zwischen den Patienten von 8 % bis zu 97 %. Was aufzeigt, dass es große Unterschiede zwischen HCC-Patienten im Ausmaß ihrer intratumorale Heterogenität gibt. Weiter zeigt diese Studie, dass es nicht ausreicht nur einen der vorhandenen HCC-Knoten zu sequenzieren um die genomischen Merkmale bei HCC-Patienten vollständig zu charakterisieren. Diese könnten wiederum dazu beitragen die mit der Tumorprogression verbundenen genetischen Veränderungen zu untersuchen. Friemel et al. (2015) konnten ebenfalls zeigen, dass die Mehrheit der HCC-Proben von 23 Patienten eine bemerkenswerte intratumorale Heterogenität aufweist. Interessanterweise konnten Xu et al. (2019) diese intratumorale Heterogenität auch mit dem geringen Ansprechen von HCC-Patienten auf die Sorafenib-Behandlung in Verbindung bringen.

Weiter kann eine Chemoresistenz dazu führen, dass der zuerst beobachtete Rückgang des Tumors in ein erneutes verstärktes, meist aggressiveres und weniger chemosensitives Wachstum des Tumors umschlägt. Dies wird durch die synergetische Interaktion zwischen komplexen und vielfältigen Mechanismen der Chemoresistenz („*mechanisms of chemoresistance*“, MOC) beeinflusst. Hierbei sind mehr als 100 Gene beteiligt. Bei dem HCC spielt unter anderem die Dysregulation von Organischen-Anionen-Transporter („*Organic Anion Transporting Polypeptide*“ OATPs), ATP-bindende Kassetten-(ABC)-Proteine, Thymidinphosphorylase (TP), Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD), Tuberin („*tuberous sclerosis complex*“ (TSC2) und das Tumorsuppressor Protein p53 eine wichtige Rolle (Marin et al. 2018).

1.3 Sphingolipide

Neben den Sterolen und den Glycerophospholipiden gibt es eine dritte Hauptgruppe an ubiquitär vorkommenden Membranlipiden: die Sphingolipide (Futerman und Hannun 2004). Entdeckt wurden die Sphingolipide bereits in den 1880ern von J.L.W. Thudichum.

Dieser gab den Lipiden aufgrund ihrer rätselhaften chemischen Struktur in Anlehnung an die Sphinx ihren Namen (Maceyka und Spiegel 2014). Unter anderem führte die Entdeckung, dass Sphingosin eine hemmende Wirkung auf die Proteinkinase C (PKC) hat (Hannun et al. 1986) dazu, dass Sphingolipide auch als Vermittler von Signalen angesehen wurden. Mittlerweile gehören die Sphingolipide zu einer gut erforschten Gruppe von strukturellen und bioaktiven Lipiden.

So gibt es mittlerweile viele Studien, die zeigen konnten, dass Sphingolipide auch maßgeblich an zellulären Prozessen wie Proliferation, Zelltod oder auch Differenzierung beteiligt sind. Weiter können sie Einfluss auf andere Signalwege haben (Morales et al. 2007b). Sphingolipide können zudem eine Rolle z.B. bei der Entstehung von Krebs aber auch dessen Behandlung spielen (Oskouian und Saba 2010). Auch wird ihnen eine Bedeutung in der Vermittlung von chronisch verlaufenden, entzündlichen Krankheiten zugeschrieben (Maceyka und Spiegel 2014). Weiter gibt es verschiedene Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen dem Sphingolipid-Metabolismus und Lebererkrankungen, wie z.B. dem HCC herstellen konnten (Marí und Fernández-Checa 2007)

1.3.1 Struktur und Metabolismus der Sphingolipide

Das Rückgrat der Sphingolipide stellt das Sphingosin dar, ein Aminoalkohol, der über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verknüpft ist. Diese Fettsäure besteht bei Säugetieren meist aus 18-C-Atomen (Abbildung 4, gelb hinterlegt). Ausgehend von diesem Grundgerüst können durch die Bindung verschiedener funktioneller Gruppen an die primäre Hydroxylgruppe oder an die Aminogruppe viele verschiedene Sphingolipide entstehen. Durch das Binden einer weiteren Fettsäure (Abbildung 4, blau hinterlegt) an die Aminogruppe entsteht so das Ceramid, was wiederum das Rückgrat vieler komplexer Sphingolipide ausmacht. Ein weiteres wichtiges Sphingolipid ist das Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Dieses entsteht durch Übertragen eines Phosphatrestes (Abbildung 4, rot hinterlegt) an die Hydroxylgruppe des Sphingosins (Merrill 2002; Pruett et al. 2008; Lahiri und Futerman 2007).

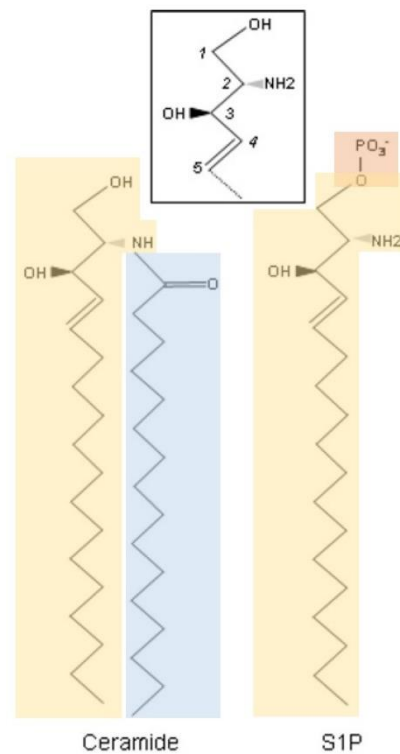


Abbildung 4: **Struktur von Ceramid und S1P.** Allen Sphingolipiden liegt als Rückgrat das Sphingosin (gelb hinterlegt) zugrunde. Durch zusätzliches Anlagern einer Fettsäure (blau hinterlegt) entsteht das Ceramid oder durch Anlagern eines Phosphatrestes (rot hinterlegt) das S1P. (modifiziert nach: (Lahiri und Futerman 2007))

Sphingolipide werden unter anderem über den *de-novo*-Syntheseweg an der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Hierbei entsteht zunächst das 3-Ketosphinganin durch die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA. Diese Reaktion wird durch das Enzym Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysiert. 3-Ketosphinganin wird anschließend durch das Enzym 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Sphinganin reduziert. Das Sphinganin wird anschließend durch eine der sechs Ceramidsynthasen (CerS1-6) in Dihydroceramid acyliert. Im letzten Schritt wird eine Doppelbindung zwischen dem C-4- und C-5-Atom durch das Enzym Dihydroceramid-Desaturase eingebaut. Somit ist die Entstehung der Ceramide und der *de-novo*-Syntheseweg abgeschlossen (Abbildung 5). Ceramide können nun über verschiedene Schritte in komplexere Moleküle wie Sphingomyelin, Dihydrosphingomyelin, Glukosylceramid, Dihydroglukosylceramid und Lactosylceramid umgewandelt werden (Huwiler et al. 2000; Hannun 1994; Chen et al. 2010; Futerman und Riezman 2005; Huwiler et al. 2000).

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, kann, ausgehend vom Ceramid, das S1P über den katabolen Stoffwechselweg gebildet werden. Hierzu wird in einem ersten Schritt Ceramid durch eine der drei Ceramidasen (saure, neutrale und alkalische) zu Sphingosin deacyliert. Dieser Schritt kann durch die Ceramidsynthasen wieder rückgängig gemacht werden. Das Sphingosin kann nun wiederum durch die Sphingosinkinasen zu S1P phosphoryliert werden. S1P kann weiter entweder durch S1P-Phosphatase wieder in Sphingosin dephosphoryliert werden, oder endgültig über die S1P-Lyase am endoplasmatischen Retikulum in Phosphoethanolamin und Hexadecanal abgebaut werden (Huwiler et al. 2000; Hannun 1994; Chen et al. 2010; Futerman und Riezman 2005).

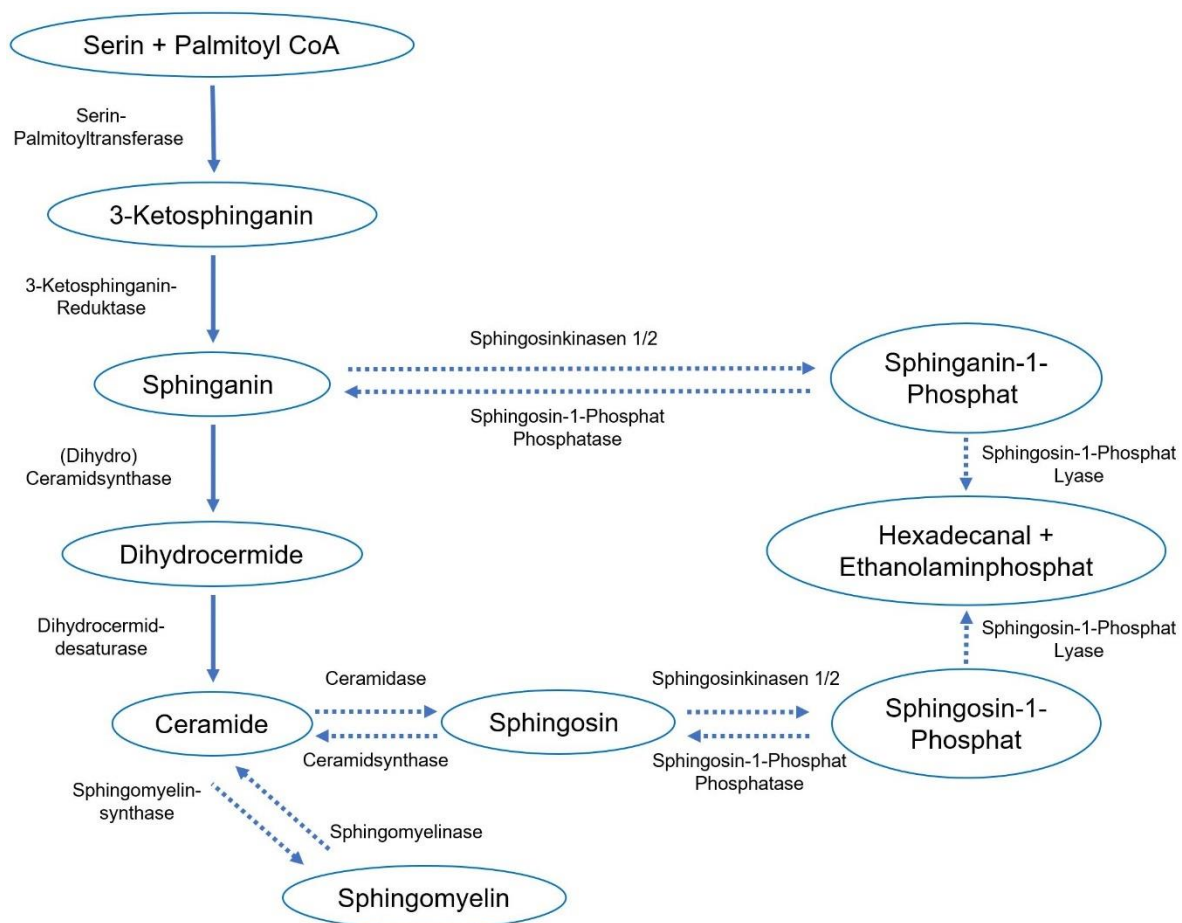


Abbildung 5: **Sphingolipid Stoffwechsel.** Einfache Darstellung des *de-novo*-Sphingolipid-Stoffwechsels und katabolen Sphingolipid-Stoffwechsels. Die an den Schritten beteiligten Enzyme sind jeweils an den Pfeilen angegeben, wobei die Pfeile jeweils die Richtung angeben, in die die Enzyme wirken. Durchgehende Pfeile gehören zum *de-novo*-Stoffwechselweg, die unterbrochenen Pfeile stellen den katabolen Stoffwechselweg dar.

1.3.2 Sphingolipid-Rheostat

Wie schon erwähnt spielen Sphingolipide eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen. Hierbei scheint besonders das Verhältnis zwischen S1P und Ceramiden wichtig zu sein. Dieses Verhältnis ist in der Lage maßgeblich das Gleichgewicht zwischen Proliferation und programmierten Zelltod zu beeinflussen und wird somit auch Sphingolipid-Rheostat genannt. Diese Bezeichnung bezieht sich darauf, dass Ceramide scheinbar für eine pro-apoptotischen und S1P für eine pro-proliferativen Zellantwort verantwortlich sind (Maceyka et al. 2002). Die Verschiebung dieses Gleichgewichts und die darauffolgende veränderte Antwort der Zellen konnten Cuvillier et al. (1996) als Erste beobachten. Hier konnte S1P die durch Ceramid verursachte Apoptose verhindern. Weiter konnten die Autoren zeigen, dass die Balance zwischen den intrazellulären Leveln eine wichtige Rolle spielt.

Ein wichtiger Faktor für das Verhältnisse zwischen Ceramiden und S1P stellt die Aktivität der Enzyme dar, die für die Bildung beider Lipide verantwortlich sind. Durch diese ist ein ständiger Übergang zwischen Ceramiden und S1P möglich (Abbildung 5). Dieses Verhältnis wurde mittlerweile nicht nur mehrfach in unterschiedlichen Krebsarten untersucht, sondern auch therapeutisch manipuliert um gegebenenfalls negative Effekte auf das Zellwachstum ausüben zu können (Newton et al. 2015).

1.3.3 Sphingosin-1-Phosphat und die Sphingosinkinassen 1 und 2 (SPHK1/2)

Anfang der 1990iger Jahre konnte Sphingosin-1-Phosphat (S1P) das erste Mal in direkten Zusammenhang mit intrazellulären Prozessen gebracht werden (Ghosh et al. 1990; Zhang et al. 1991). Seitdem wurde es umfassend erforscht und mit verschiedenen zellulären Prozessen wie dem Überleben der Zelle, Proliferation, Migration und Hemmung der Apoptose in Verbindung gebracht (Payne et al. 2002; Takabe et al. 2008).

S1P kann intrazellulär als „*second messenger*“ fungieren. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass es die Ca^{2+} -Freisetzung fördern kann und einen positiven Effekt

auf das Zellwachstum hat (Spiegel und Milstien 2000; van Brocklyn et al. 1998). S1P kann weiter über verschiedene Transporter aus der Zelle geschleust werden. Dieser Transport geschieht über die ATP-bindende-Kassette-Transporter (ATP-Transporter) ABCA1, ABCC1 und ABCG2 sowie über Spinster2 (Kawahara et al. 2009; Sato et al. 2007; Mitra et al. 2006; Schwalm et al. 2013). Dadurch kann sich S1P an Rezeptoren binden, die sich in der Zellmembran befinden. Es konnten fünf verschiedene dieser Rezeptoren klassifiziert werden, die alle mit unterschiedlichen G-Proteinen gekoppelt sind. Diese wurden als Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren 1 bis 5 (S1PR1-5) bezeichnet. Durch diese kann S1P nicht nur autokrin (an der ausschüttenden Zelle), sondern auch parakrin (an anderen Zellen) wirken. Welche Wirkung S1P dadurch auf die Zellen hat, hängt davon ab, an welchen der Rezeptoren es bindet. Hierbei spielt das mit dem Rezeptor gekoppelte G-Protein eine entscheidende Rolle. Die dadurch aktivierten Signalkaskaden regulieren neben der Proliferation und dem Überleben der Zellen auch die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase sowie die Adhäsion und Migration. Weiter sind sie an der Entwicklung des Immun-, Nerven- und Herz-Kreislaufsystems sowie an entzündlichen Prozessen beteiligt (Choi et al. 2008; Meyer zu Heringdorf und Jakobs 2007; Sanchez und Hla 2004). Dies kann sich auch positiv auf die Proliferation und das Überleben von Tumoren auswirken (Hatoum et al. 2017).

Für die Synthese von S1P sind die Sphingosinkinase 1 (SPHK1) und die Sphingosinkinase 2 (SPHK2) verantwortlich. SPHK1 konnte das erste Mal aus Rattennieren isoliert werden (Olivera et al. 1998). (Liu et al. 2000) konnten durch eine BLAST-Datenbank-Analyse, welcher die murine SPHK1-Sequenz zugrunde lag, auch die Sequenz der murinen SPHK2 identifizieren. Beide Kinasen weisen zwar viele Homologien auf, es konnten jedoch auch 240 zusätzliche Aminosäuren in der SPHK2 identifiziert werden. Wodurch beide Isoformen der Sphingosinkinasen doch auch strukturelle Unterschiede aufweisen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die SPHK1 vor allem im Zytosol lokalisiert ist und durch ERK („*extracellular signal-regulated kinases*“, extrazelluläre signalregulierte Kinasen) am Serin 225 phosphoryliert wird. Dadurch wandert die SPHK1 an die Plasmamembran, um dort ihr Substrat Sphingosin

zu finden (Pitson et al. 2003). Die SPHK2 scheint hingegen eher im Zellkern lokalisiert zu sein (Pitson 2011). Das durch SPHK2 gebildete S1P scheint auch in der Lage zu sein, Apoptose zu vermitteln. So konnten Liu et al. (2003) zeigen, dass die Überexpression von SPHK2 in MEF-Zellen (murine embryonale Fibroblasten) zu einer erhöhten Freisetzung von Zytochrom C aus den Mitochondrien zur Folge hatte. Dies führte wieder rum zur verstärkten Aktivität der Caspase 3, was zur Induktion von Apoptose führte.

Die Sphingosinkinasen können durch verschiedene Faktoren aktiviert werden. Hierzu gehören unter anderem verschiedene Wachstumsfaktoren, z.B. das PDGF („*platelet-derived growth factor*“, Thrombozyten-Wachstumsfaktor) und VEGF („*vascular endothelial growth factor*“, endothelialen Wachstumsfaktor), Interleukine oder auch Ca²⁺-stimulierende Substanzen (Maceyka et al. 2002; Hait et al. 2006; Hait et al. 2007).

Mittlerweile ist ein besonderes Augenmerk auf die Sphingosinkinasen in Bezug auf ihren Zusammenhang mit Krebserkrankungen sowie auch als mögliche Optionen zur Behandlung solcher gelegt worden. Hierbei scheinen Inhibitoren der SPHK1 und SPHK2 eine entscheidende Rolle zu spielen und sind daher verstärkt untersucht worden (Xia et al. 2000; Plano et al. 2014).

Es konnte unter anderem in menschlichen Darmkrebszellen gezeigt werden, dass es zu einem verstärkten Wachstum der Zellen durch eine Überexpression der SPHK2 kommt (Jafari et al. 2019). Weiter konnte in Brustkrebszellen gezeigt werden das SPHK2 eine wichtige Rolle bei deren Wachstum spielt (Maiti et al. 2017). Auch wurde die Überexpression mit einer Resistenz gegen die Krebstherapie in Verbindung gebracht (Liu et al. 2016b; Shi et al. 2017). Weiter scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass die verstärkte Expression der SPHK2 als Biomarker für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs verwendet werden kann (Wang et al. 2014). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Gabe von SPHK2-Inhibitoren möglicherweise für eine neue oder verbesserte Krebstherapie verwendet werden kann (Hasanifard et al. 2019; Lewis et al. 2018).

Eine Überexpression der SPHK1 konnte ebenfalls in verschiedenen Krebsarten gefunden werden (Li et al. 2008; Kawamori et al. 2006; Zhu et al. 2017; Liu et al. 2010). Dies konnte häufig mit dem verstärkten Wachstum von Krebszellen in Verbindung gebracht werden (Kohno et al. 2006; Sarkar et al. 2005; Dayon et al. 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass eine SPHK1-Überexpression Einfluss auf die Effektivität von Chemotherapien haben kann (Pchejetski et al. 2008; Rosa et al. 2013). Weiter führte SPHK1 Überexpression zu einem geringeren Überleben der Patienten (Li et al. 2008; Zhu et al. 2017). Außerdem konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Inhibition der SPHK1 einen negativen Effekt auf die Proliferation und das Wachstum von verschiedenen Krebszelllinien hat (Pchejetski et al. 2008; Pan et al. 2011).

Auch im HCC scheint die SPHK1 eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Wang und Wu (2018) zunächst zeigen, dass diese in HCC-Gewebeproben überexprimiert ist. Weiter konnten sie zeigen, dass die Überexpression antiproportional zum Überleben war. Auch konnten sie in verschiedenen HCC-Zelllinien (Hep3B, HepG2, HCCLM3 und SK-Hep1) zeigen, dass es durch die Hemmung der SPHK1 zu einer verminderten Oxaliplatin-Resistenz kommt. Anhand diese Zellkultur-Experimente postulierten die Autoren die Möglichkeit, dass eine Hemmung der SPHK1 gegebenenfalls eine Möglichkeit darstellt, die Oxaliplatin-Resistenz auch in Patienten zu überwinden.

1.3.4 Ceramide

Bei dem bereits erwähnten Sphingolipid-Rheostat spielen neben dem S1P die Ceramide eine wichtige Rolle. Ceramide können durch die sechs Ceramidsynthasen (CerS1-6) entweder über Sphinganin und den Dihydrocermiden oder direkt über Sphingosin gebildet werden. Diese können Fettsäuren (Acylketten) mit verschiedenen Kettenlängen an Sphinganin oder Sphingosin acylieren. Wie lang die Acylkette hierbei ist, hängt von der Ceramidsynthase ab und variiert zwischen C14- und C32-Atomen (Huwiler et al. 2000; Grösch et al. 2012). Weiter hängt von dieser Kettenlänge auch die Eigenschaft der Ceramide ab, also ob sie eher pro-proliferativ oder apoptotisch sind.

Die verschiedenen CerS werden hierbei in unterschiedlichen Organen unterschiedlich stark exprimiert (Grösch et al. 2012; Levy und Futerman 2010).

Die Ceramidsynthasen werden unter anderem durch Aktivierung der Proteinkinase-C oder die DNA-Schäden-Antwort-Mediatoren p53 und ATM ("*ataxia telangiectasia mutated*") aktiviert. In diesem Kontext konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CerS an der durch Ceramid vermittelten Apoptose beteiligt sind. Auch durch die Überexpression der CerS konnte dies bestätigt werden. Weiter konnte eine Verbindung zwischen Ceramidsynthasen und Apoptose durch den Ceramidsynthase-Inhibitor FB1 oder eine Hemmung der SPT aufgezeigt werden (Mullen und Obeid 2012).

Dass Ceramide im allgemeinen für die Induktion von Apoptose verantwortlich sein können, wurde durch unterschiedliche Studien gezeigt (Grösch et al. 2012; Levy und Futerman 2010). Hierzu zählt unter anderem, dass die Inhibition der Ceramidakkumulation einen hemmenden Effekt auf die Apoptose-Induktion hat. Weiter konnte die Anfälligkeit der Zellen für eine Apoptoseinduktion durch die Stimulation mit Ceramiden (C2 und C6), Ceramidanalogen oder die erhöhte Bildung von Ceramiden verstärkt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass es zur Akkumulation von Ceramiden während der Apoptose kommt (Mullen und Obeid 2012).

Ceramide werden auch durch die Hydrolyse von Sphingomyelin durch drei Sphingomyelinasen (sauer, neutral und alkalisch) gebildet. Dieser Signalweg wird durch verschiedene Stressfaktoren aktiviert. Zu diesen gehören unter anderem TNF ("*tumor necrosis factor*", Tumornekrosefaktor), UV-Strahlung, oxidativer Stress, Hitze, Chemotherapeutika und IL3 (Interleukin-3) (Zhang et al. 2009a; Stancevic und Kolesnick 2010; Ruvolo 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass die Sphingomyelinasen ebenfalls in Verbindung zur Ceramid-induzierten Apoptose stehen. Die durch die Sphingomyelinasen vermittelte Apoptose entsteht bereits wenige Minuten nach der ursächlichen Stimulation. Im Gegensatz dazu benötigt die

Synthese und Akkumulation von Ceramiden durch die Ceramidsynthasen eine Zeitspanne von Stunden (Mullen und Obeid 2012).

Die entstandenen Ceramide können Apoptose über verschiedene Wege auslösen oder fördern. Zu diesen Wegen gehört unter anderem die Zytochrom-C-Freisetzung, der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, die Oligomerisierung von pro-apoptotischen Bcl-2-Familie-Proteinen, die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies („*reactive oxygen species*“, ROS) und die Erhöhung der Caspaseaktivitäten (Castro et al. 2014; Mullen et al. 2012; Ueda 2015; Fugio et al. 2020).

Auch der Einfluss von Ceramiden auf Krebszellen wurde bereits untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der CerS2 zu einer verstärkten Proliferation und die Überexpression der CerS4 und CerS6 zur Apoptose und verminderter Zellproliferation in Brust- (MCF-7) und Darmkrebszellen (HCT-116) führt (Hartmann et al. 2012). Weiter fassten Kurz et al. (2019) die Veränderungen von Ceramiden in verschiedenen Krankheiten, wie z.B. multipler Sklerose, koronarer Herzkrankheit, Diabetes, Depression, Krebs sowie Alzheimer zusammen. Auch beschrieben sie die Möglichkeiten, die Ceramide als mögliche Bio-Marker aufweisen.

1.3.5 Sphingolipide im HCC

Es gibt bereits Studien, die untersucht haben, ob eine Beeinflussung des Sphingolipid-Metabolismus im HCC eine Verbesserung der Therapie oder neue Therapieoptionen ermöglichen kann.

So konnten Chatzakos et al. (2012) zeigen, dass die Kombination aus dem SPHK1-Inhibitor SK1-II und Selenit in Huh7-Zellen eine im Vergleich mit der alleinigen Stimulation mit Selenit vermehrte C14-, C16-, C18- und C18:1-Ceramid-Bildung und auf diesem Wege eine gesteigerte Apoptoserate zur Folge hatte. Weiter scheint die Stimulation mit SK1-II die Resistenz gegenüber Selenit zu vermindern und sensibilisiert die Zellen gegenüber dem durch Selenit induzierten Zellzyklus-Arrest sowie die Ceramid-Akkumulation, Apoptose und die gesteigerte ROS Bildung.

Gleichzeitig hat diese Stimulation scheinbar keinen Effekt auf eine normale menschliche Hepatozyten-Zelllinie (MIHA).

Tagaram et al. (2011) konnten weiter zeigen, dass nanoliposomales C6-Ceramid in der Lage ist, die Apoptose in SK-HEP-1-Zellen zu induzieren und gleichzeitig einen Zellzyklus-Arrest auszulösen und die Phosphorylierung von AKT zu vermindern. In einem Mausmodell führte die Gabe von nanoliposomalem C6-Ceramid zu einer verminderten Vaskularisierung, Proliferation und Phosphorylierung von AKT in den Tumorzellen und steigerte zudem die Apoptose. Außerdem konnte es das Tumorwachstum blockieren, was zu einer signifikant verminderten Tumorgröße im Vergleich zur Kontrolle führte. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte diese Effekte von nanoliposomalem C6-Ceramid in einem weiteren Mausmodell bestätigen. Zusätzlich konnte hier festgestellt werden, dass das nanoliposomale C6-Ceramid in der Lage ist, die Anzahl der tumor-assoziierten Makrophagen zu verringern und damit ihre Fähigkeit zur Unterdrückung der anti-tumoralen Immunantwort zu reduzieren. Gleichzeitig verstärkte es die anti-tumoralen Effekte von tumorantigen spezifischen (TAS) CD8⁺-T-Zellen (Li et al. 2018).

Weiter konnten Yin et al. (2018) Ceramide zusammen mit Sorafenib in Liposomen (CE/SF- Liposome) übertragen. Diese konnten in einer ersten Versuchsreihe von HepG2-Zellen problemlos aufgenommen werden. Zudem konnten sie zeigen, dass diese CE/SF-Liposome in der Lage waren, das Tumolvolumen und -gewicht signifikant zu den CE- und SF-Liposom-Kontrollen zu vermindern, ohne sich negativ auf das Gewicht der Mäuse auszuwirken.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Daunorubicin (DNR), ein Chemotherapeutikum, in der Lage ist, die saure Ceramidase in HepG2- und murinen Hepa1c1c7-Zellen, sowie in primären murinen Lebertumorzellen, jedoch nicht in kultivierten Maushepatozyten zu aktivieren. Die Verminderung der sauren Ceramidase durch siRNA („*small interfering RNA*“) oder den Inhibitor N-Oleoyl ethanolamin (NOE) führte in HepG2-, Hep-3B-, SK-Hep- und Hepa1c1c7-Zellen

zu einer gesteigerten Ceramid-Akkumulation im Vergleich zur Stimulation mit DNR alleine. Gleichzeitig wurden die Zellen für den durch DNR induzierten apoptotischen Zelltod sensibilisiert. Weiter konnte in einem HepG2-Xenograft-Modell gezeigt werden, dass die durch siRNA vermittelte Hemmung der sauren Ceramidase zu einem verminderten Tumorwachstum führte, was für einen potentiellen innovativen Ansatz zur Verbesserung der HCC-Therapie sprechen könnte (Morales et al. 2007a).

Auch konnte im Serum von Patienten mit Leberzirrhose gezeigt werden, dass die Ceramid- und Dihydroceramid-Level mit der Schwere der Krankheit signifikant vermindert werden (Grammatikos et al. 2015).

Es wurde bereits postuliert, dass Sphingolipide auch als mögliche neue Biomarker für das HCC in Betracht gezogen werden können. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Ceramide und Dihydroceramide sowie S1P, Sphinganin-1-Phosphat und Sphingosin im Serum von HCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Zirrhose signifikant erhöht sind (Grammatikos et al. 2016).

1.4 Zielsetzung

In den letzten Jahren ist der Sphingolipid-Stoffwechsel stark in den Fokus der Grundlagenforschung gerückt. Hier scheint vor allem der Sphingolipid-Rheostat, das Verhältnis von S1P und Ceramiden, eine wichtige Rolle zu spielen. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass S1P eher für das Wachstum von Zellen und Ceramide eher für die Induktion von Apoptose zuständig sind (Olivera et al. 1999; Taha et al. 2006). Daher wurde in mehreren Studien versucht, das Wachstumsverhalten von z.B. Krebszellen durch Regulation der Enzyme, die für dieses Gleichgewicht verantwortlich sind, zu beeinflussen. Hierzu zählen Sphingosinkinase 1 und 2 (SPHK1 und 2), Ceramidsynthesen und Ceramidasen (Strub et al. 2010; Oskouian und Saba 2010; Pitson 2011).

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Sorafenib als bereits zugelassene medikamentöse Standardtherapie beim HCC einen Einfluss auf den Sphingolipid-

Stoffwechsel hat. Weiter sollte untersucht werden, ob diese Therapie durch Manipulation des Sphingolipid-Stoffwechsels verbessert werden kann. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren von wichtigen Enzymen des Sphingolipid-Stoffwechsels verwendet. Um den Einfluss von Ceramiden auf das HCC und dessen Behandlung zu analysieren, wurde zudem der Ceramidsynthase-Inhibitor Fumonisin B1 (FB1) verwendet. Weiter sollte überprüft werden, inwiefern das HCC von SPHK1 und SPHK2 beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurde zur spezifischen Inhibition der SPHK1 SLP7111228 (SLP) und zur spezifischen Inhibition der SPHK2 SLM6031434 (SLM) verwendet. Auch wurde SKI II eingesetzt, um beide Sphingosinkinasen unspezifisch hemmen zu können.

2 Material und Methoden

Auflistung der verwendeten Materialien sowie der angewendeten Methoden.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Filmentwickler, CP1000	AGFA Healthcare, Bonn
Thermocycler	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	
Thermomixer compact	Eppendorf GmbH, Hamburg
Strahlenmessgerät Tri Carb 2100 TR	GMI, Ramsey, USA
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Heraeus, Hanau
Herasafe Sterilbank	
Inkubator Heraeus BB 622002	
Megafuge 1.0 R	
7500 Fast Real-Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
Mikroplattenlesegerät SpectraMax M5	Molecular Devices, San Jose, CA, USA
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PeqlabBiotechnologie, Erlangen
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Neustadt
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Nitrozellulose-Membran 0,2µm	BioRad, München
Stripette® Zellkultur Pipetten	Corning Incorporated, New York, USA
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zellkulturröhrchen (50 ml, 15 ml)	Falcon, Oxnard, USA
Hyperfilm™ECL	GE Healthcare, München
Kryoröhrchen Cellstar (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, µClear®, Schwarz, CELLSTAR®	
Zellkulturplatten (96-Well-Platten)	
Zellkulturschalen (60mm Durchmesser)	
Steriflip® Sterilfilter System	Merck Millipore, Schwalbach
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Sigma-Aldrich, Steinheim
MicroAmp® Fast Optical 96-Well reaction plate	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Whatman® Filterpapier 3mm	Whatman International Ltd., Maidstone, GB

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
ProteinMarker VI, Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	KMF optichem, Lohmar
ProSieveQuand Color Proteinmarker	Lonza
Chloroform, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid (NaOH),	Merck, Schwalbach

Chemikalie	Hersteller
Magermilchpulver	Naturaflor, Dietmannsried
Szintillationscocktail (Lumasafe™ PLUS)	PerkinElmer, Rodgau
Pferdeserum	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Proteaseinhibitor-Cocktail Complete®	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), Glycin, Roti®-Histofix (4% phosphatgepufferte Formaldehydlösung) Roti®-Quant,	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS) Bovines Serumalbumin (BSA, fettsäurefrei), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Isopropanol, Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Methanol, Natriumchlorid (NaCl), Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄), Ponceau S, Salzsäure, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Trichloressigsäure, Trizma® base (Tris Base), Tween-20, TRI Reagent® RNA Isolation Reagent, β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BSA (Albumin Standard), Dimethylsulfoxid (DMSO),	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA

2.1.4 Allgemeine Zellkulturreagenzien

Tabelle 4: Zellkulturreagenzien – und Stimulanzen

Stimulanzen und Reagenzien	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau 0,4%	Bio-Rad, München
Fenretinide, Myriocin	Cayman, Ann Arbor, MI, USA
Fumonisin B1 (FB1)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Sorafenib	LC Laboratories, Woburn, MA, USA

Stimulanzen und Reagenzien	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS), -Ca ²⁺ , -Mg ²⁺ , Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL), 0,05% Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Staurosporin	Merck, Schwalbach
N-Acetyl-L-Cystein (NAC), SKI II (Sphingosinkinase Inhibitor), SLM6031434 (SPHK2 Inhibitor, SLM), SLP7111228 (SPHK1 Inhibitor, SLP), β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
alamarBlue™ Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA

2.1.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung
Auftaumedium	DMEM 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat, 20 % FCS
Wachstumsmedium	DMEM 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat 10 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL)
Hungermedium	500 ml DMEM 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat 0,1 mg/mL BSA/PBS (fettsäurefrei)
Einfriermedium	10 % DMEM 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat 40 % FCS 50 % DMSO

2.1.6 Enzyme, Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Reagenzien

Enzym/Reagenz	Hersteller
Immobilion™ Western Blot Chemiluminescent HRP Substrat	Merck, Schwalbach
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich, Steinheim
ABsolute™ Blue QPCR Low ROX Mix, dNTP Mix (10 mM), Random Hexamer Primer, RevertAid™ Reverse Transkriptase, RiboLock™, Ribonuklease Inhibitor, 5x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA

2.1.7 TaqMan®-Sonden

Alle verwendeten TaqMan®-Sonden stammen von der Firma Life Technologies aus Darmstadt. Es wurden ausschließlich humane Sonden verwendet

Tabelle 7: Verwendete TaqMan Sonden

Gen	Sondenname	Bestellnummer
18S	18S	Hs99999901_s1
Saure Ceramidase	ASAH1	Hs1001661_m1
Neutrale Ceramidase	ASAH2	Hs01015663_m1
Dihydroceramide Desaturase 1	DEGS1	Hs00983869_m1
Sphingosinkinase 1	SPHK1	Hs00184211_m1
Sphingosinkinase 2	SPHK2	Hs0021999_m1
Serine-Palmitoyl-Transferase	SPTLC1	Hs00272311_m1

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Erst-Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Erst-Antikörper

Antikörper	Hersteller
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) (Rabbit monoclonal, 1:1000)	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Rabbit, 1:1000)	
Anti- β -Actin Klon AC-15 (Mouse, monoclonal, 1:30000)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.8.2 Zweit-Antikörper

Tabelle 9: Verwendete Zweit-Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Maus- IgG (Schaf, HRP-gekoppelt, 1:5000)	GE Healthcare, München
Anti-Kaninchen-IgG (Esel, HRP-gekoppelt, 1:5000)	

2.1.9 Puffer- und Lösungszusammensetzungen

2.1.9.1 Allgemeine Puffer

Tabelle 10: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1 l VE-H ₂ O

Puffer	Zusammensetzung
PBS + 0,1% Tween-20 (PBST)	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,1 % (w/v) Tween-20 ad 1 l VE-H ₂ O

2.1.9.2 Puffer und Lösungen RNA-Analyse

Tabelle 11: Verwendete Lösungen und Puffer für die RNA-Analyse

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) ad 1 l Milli-Q-Wasser über Nacht rühren, anschließend autoklavieren
75 % Ethanol-Lösung	75 ml Ethanol (puriss.) ad 100 ml dd-Wasser

2.1.9.3 Puffer und Lösungen Protein-Analyse

Tabelle 12: Verwendete Lösungen und Puffer für die Protein-Analysen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 10% Glycerin 2 mM EDTA 2 mM EGTA 50 mM NaF 10 nM Natriumpyrophosphat 2 mM DTT 200 µM Na ₃ VO ₄ 1% Triton-X 100 40 mM β-Glycerophosphat kurz vor Anwendung 200 µL Protease- Inhibitor-Cocktail-Lösung zu 4,8 mL Lysispuffer zugeben

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Proteaseinhibitor-Cocktail (25x Stocklösung)	1 Tablette Complete® in 2 ml ddH ₂ O
SDS-Denaturierungs- und Ladepuffer (4x)	12,5 % SDS 40 % Glycerin 5 % Bromphenolblau 20 % β -Mercaptoethanol 100 mM Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Laufpuffer (10x Ansatz)	60,55 g Tris-Base 288,27 g Glycin 20 g SDS ad 2 L destilliertes Wasser
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	60,8 g Tris-Base mit konzentrierter HCl-Lösung pH 6,8 einstellen ad 1 L destilliertes Wasser
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	181,65 g Tris-Base mit konzentrierter HCl-Lösung pH 8,8 einstellen ad 1 L destilliertes Wasser
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin (pH 8,3) 10 % Isopropanol
Ponceau S-Lösung	0,2 g Ponceau S 3 g Trichloressigsäure 100 mL destilliertes Wasser
Milchpulverlösung (5 %)	5 g Magermilchpulver in 100 ml PBST
Blockierungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 200 mM NaCl 2 % Triton-X 100 3 % BSA 10 % Pferdeserum

2.1.10 Assays

Cell Death Detection ELISA PLUS

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.11 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden zwei humane Zelllinien verwendet. Zum einen die hepatozelluläre Zelllinie Huh7.5, die von Prof. Dr. Christian Lange (Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Essen) zur Verfügung gestellt wurde. Zum anderen die hepatozelluläre Zelllinie HepG2, welche von der Firma LGC Standards (ATCC-HB-8065) bezogen wurde.

2.2 Allgemeine Zellkultur Methoden

2.2.1 Kultivierung der verwendeten Zellen

Beide Zelllinien wurden in Wachstumsmedium gehalten und in einem Inkubator der Firma Heraeus bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

2.2.2 Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Als erstes wurde das verbrauchte Wachstumsmedium abgesaugt, anschließend wurde PBS (ohne -Ca²⁺ und -Mg²⁺) auf die Zellen gegeben und ebenfalls abgesaugt. Damit sich die Zellen von der Flasche lösen, wurde als nächstes Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium abgestoppt. Abschließend wurden die Zellen mit frischem Wachstumsmedium verdünnt und weiter kultiviert werden.

2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der verwendeten Zellen

Zur kryogenen Konservierung der Zellen, wurden diese zunächst wie unter 2.2.2 beschrieben abgelöst und bei 1200 UpM für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde dann pro Kryoröhrchen aliquotiert und langsam in einem Einfrierbad auf -80 °C runtergekühlt. Nach ca. 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, wurden diese nach dem Auftauen in Auftaumedium aufgenommen. Am folgenden Tag wurde das Auftaumedium entfernt und durch Wachstumsmedium ersetzt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst wie unter 2.2.2 beschrieben mit 1,5 ml Trypsin abgelöst und in ein 50 ml Zellkulturröhrchen überführt. Davon wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. Hierbei kann das

Trypanblau nur durch die Zellwand von toten Zellen dringen und färbt diese blau an. Dieses Gemisch wurde dann auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl der lebenden Zellen schließlich mit Hilfe eines Lichtmikroskops erfasst. Hierbei wurden die Zellen in allen Quadranten der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.5 Stimulation von HepG2 und Huh7.5 Zellen

Für die Stimulation der Zellen wurden diese wie unter 2.2.2 und 2.2.4 aus den Flaschen gelöst und gezählt. Alle hier verwendeten Stimulanzien wurden in DMSO gelöst. Bei allen beschriebenen Versuchen wurde eine 0,2 % DMSO Vehikel-Kontrolle mitgeführt.

Für die RNA- und Proteinextraktion sowie die LC/MS-MS Analysen wurden die Zellen in Zellkulturschalen (PS) mit einem Durchmesser von 60 mm ausgelegt. Nachdem die Zellen eine Dichte von ca. 90 % erreicht hatten (nach ca. 24 h) wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch 3 ml Hungermedium ersetzt. Dieses wurde nach 24 h abgesaugt. Die nun folgenden Stimulationen fanden in 2 ml frischem Hungermedium statt. Das NAC wurde direkt in Hungermedium gelöst. Dies führte jedoch zu einer pH-Wert Verschiebung in den sauren Bereich. Um den pH-Wert einstellen zu können wurden NaOH Plättchen ebenfalls in Hungermedium gelöst und zu dem NAC-Medium gegeben bis wieder ein pH-Wert von 7 erreicht wurde.

Für die RNA- Extraktion wurden die Zellen jeweils für 4 h, 6 h, 8 h und 24 h mit 5 µm Sorafenib oder mit der Vehikel-Kontrolle stimuliert.

Die Zellen die für die Proteinextraktion verwendet wurden, wurden für 2 h entweder mit 5 µm Sorafenib, 25 µm FB1 oder einer Kombination aus Sorafenib und FB1 stimuliert. Wobei die Zellen 1 h mit FB1 alleine vorstimuliert wurden bevor Sorafenib oder DMSO dazu gegeben wurde.

Bei den ersten LC/MS-MS-Versuchen wurden die Zellen ebenfalls für 24 h entweder mit 5 µm Sorafenib, 25 µm FB1 oder einer Kombination aus Sorafenib und FB1 stimuliert. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen entweder mit 5 µm Sorafenib, 10 µm SKI II, 1 µm SLM oder 1 µm SLP stimuliert. Weiter wurden die Zellen

jeweils mit einer Kombination aus 5 μm Sorafenib und den einzelnen Inhibitoren stimuliert. Hierbei wurden die Zellen mit FB1 1 Stunde und mit SKI II, SLM oder SLP jeweils 2 Stunden alleine stimuliert bevor Sorafenib oder DMSO als Kontrolle dazu gegeben wurde.

Für den DNA-Fragmentierungs-ELISA wurden die Zellen in einer 96- „Well“-Platte ausgelegt und am nächsten Tag in Hungermedium für 24 h stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit Sorafenib, FB1 und SKI II alleine oder in Kombination mit Sorafenib wie weiter oben bereits beschrieben.

Für den Proliferation Assay wurden die Zellen zunächst in einem 50 ml Zellkulturröhrchen in normalem Medium mit den Stimulanzen und dem [^3H] - Thymidin vermischt. Die Stimulation mit Sorafenib und / oder FB1, SKI II, SLM und SLP erfolgte wie weiter oben bereits beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in einer 24- „Well“-Platte ausgelegt und für 24, 48 oder 72 h wachsen gelassen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA Extraktion

Nach beendeter Stimulation wurde das Medium abgesaugt und auf jede der verwendeten Zellkulturschale 1 ml TRI Reagent® gegeben. Nun wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den Platten gekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 μL Chloroform wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und anschließend für 5 bis 10 min zwecks Phasenbildung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hiernach wurden die Proben für 20 min bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Da sich die RNA nun in der oberen wässrigen Phase befand, wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt (ca. 500 μl). Zur nun folgenden RNA Präzipitation wurde auf jede Probe 500 μL Isopropanol gegeben. Auch hier wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als nächstes wurden die Proben bei 13000 UpM und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach diesem Schritt ist die RNA bereits als Pellet

sichtbar gewesen. Das Isopropanol wurde nun verworfen und auf das Pellet wurde 1 ml 75-prozentigen Ethanol gegeben und anschließend für 5 min bei 13000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Das Ethanol wurde nun ebenfalls verworfen. Um alle Reste der Lösungsmittel zu entfernen, wurden die Reaktionsgefäße mit offenem Deckel für ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die so gewonnene RNA wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und zur besseren Lösung für 10 min bei 54 °C im Thermomixer bei 300 UpM geschüttelt. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop™ ND-100 Spektrophotometers bestimmt. Hierbei wurde die optische Dichte (OD) der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um die Konzentration (c) zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V steht hierbei für den Verdünnungsfaktor und F für den RNA spezifischen Multiplikationsfaktor von 40. Durch das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ kann überprüft werden, ob die Probe mit Proteinen oder Phenol verunreinigt ist. Ist eine Probe weitestgehend proteinfrei, liegt der berechnete Wert bei etwa 2,0.

2.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) die RNA in ihre komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei wurde von jeder Probe 1,2 µg RNA eingesetzt. Pro Probe wurde dann 1 µl Random Hexamer Primer dazu gegeben und mit DEPC Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Die Proben wurden dann kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und schließlich in den Thermocycler gestellt. Dieser erhitzte die Proben zunächst für 5 min auf 70 °C. Danach werden die Proben aus dem Cycler genommen und auf Eis abgekühlt. Nun wurde pro Probe

4 μl	5x Reaction Buffer
0,5 μl	RiboLock Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)
2 μl	10 mM dNTP Mix
1 μl	RevertAid TM Reverse Transkriptase (200 U/ μl)

hinzugegeben. Somit ergibt sich ein Endvolumen von 20 μl . Das Gemisch wurde nun zurück in den Thermocycler gestellt. Dort wurden die Proben als nächstes für 10 min bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 42 °C für 60 min. Um die Reaktion abzustoppen werden die Proben für 10 min auf 70 °C erhitzt. Als letztes wurden 80 μl DEPC Wasser auf die Proben gegeben und so ein Endvolumen von 100 μl erreicht. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Real-Time-PCR (TaqMan®)

Bei dieser PCR Methode werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden verwendet. Diese ermöglichen die Quantifizierung der PCR-Produkte pro Amplifikationszyklus. Die hierfür verwendete cDNA wurde wie unter 2.3.3 beschrieben hergestellt. Neben dem Ziel-Gen wurde auch jeweils 18S als Kontrolle quantifiziert. 18S ist ein Gen, welches durch Stimulation nicht stark reguliert wird. Es eignet sich daher gut als Kontrolle. Zur Durchführung der PCR wurden je Probe folgende Reagenzien dazugegeben:

18S (rRNA)

1 μl cDNA
 0,3 μl genspezifische Sonde
 (Fam-Markiert) inklusive Primer
 9,7 μl Wasser
 9 μl Low Rox Mix

Ziel-Gen

5 μl cDNA
 1 μl genspezifische Sonde
 (Fam-Markiert) inklusive Primer
 5 μl Wasser
 9 μl Low Rox Mix

Von jeder Probe wurden 2 Mal 10 μl auf eine MicroAmp® Fast Optical 96-„Well“ Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend in ein 7500 Fast Real-Time PCR System gestellt und durchlief folgende Zyklen:

50 °C 5 sec	1 Zyklus
95 °C 15 min	1 Zyklus
95 °C 15 sec	} 40 Zyklen
60 °C 1 min	

Die Ergebnisse dieser Analyse werden als ct-Werte angegeben. Die ct-Werte geben an, wann die Fluoreszenz der Proben das erste Mal die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode, bei der die Ergebnisse des zu untersuchenden Gens in Relation zur Kontrolle (18S) gesetzt werden, kann die Genexpression relativ quantifiziert werden.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Zelllysaten

Nachdem die Stimulation beendet war (siehe 2.2.5), wurden die 60 mm Zellkulturschalen zunächst auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Hiernach wurden die Schalen mit 1 ml kalten PBS gewaschen. Nun wurde zwischen 150 μ l und 200 μ l Lysispuffer (siehe 0) auf die Platten gegeben. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber mit dem Puffer zusammen von der Schale gekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um den Proteingehalt in den Proben zu erhöhen, wurden die Zellen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450) aufgeschlossen. Um die so entstandenen Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen, wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Damit eine bessere Vergleichbarkeit gegeben ist, wurde der Proteingehalt der Proben vorab bestimmt. Für die Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde die

Bradford-Methode angewendet. Hierbei erstellt man zunächst unter Zuhilfenahme von BSA eine Standardreihe mit bekannten Proteinmengen. Diese Standardreihe wurde wie folgt erstellt:

Tabelle 13: Pipettierschema für die BSA Standardreihe

ddH ₂ O	800 µl	797 µl	794 µl	791 µl	788 µl	776 µl	752 µl
BSA (1 mg/ml)	0 µl	3 µl	6 µl	9 µl	12 µl	24 µl	48 µl

Von den zu bestimmenden Proben wurden 3 µl mit ddH₂O ebenfalls auf 800 µl aufgefüllt. Um den Proteingehalt optisch bestimmen zu können, wurde nun zu jeder Probe und der Standardreihe 200 µl Bradford Protein Assay Reagenz (Roti®-Quant) dazugegeben. Nach Durchmischen der Proben wurden jeweils 100 µl in Duplikaten auf eine 96-Well-Platte gegeben. Diese Platte wurde dann in das Mikroplatten-Lesegerät Sunrise gegeben, welches die optische Dichte der Proben bei 595 nm misst. Mit Hilfe der Software Magellan3 konnte über die Absorption dann der Proteingehalt bestimmt werden. Hiernach wurden sogenannte Proteinlysate hergestellt. Hierfür wurden 30 µg bis 100 µg Protein mit 12,5 µl 4x SDS vermischt und mit Lysispuffer auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung für 10 min bei 95 °C erhitzt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um später die Expression der Zielproteine untersuchen zu können wurden diese mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die hierfür erforderlichen SDS-Gele wurden nachfolgendem Schema hergestellt:

Tabelle 14: Pipettierschema für das Sammelgel

Sammelgel (für 2 Gele)	dH ₂ O	SDS- PAGE- Sammel- gelpuffe	Polyacrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	SDS (10 %)	Ammonium- persulfat (APS) 10%	Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)
	6 ml	2,5 ml	1,3 ml	100 µl	60 µl	20 µl

Tabelle 15: Pipettierschema für Trenngele

Trenngel (für 2 Gele)	dH ₂ O	SDS- PAGE- Trenngel- puffer	Polyacrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	SDS (10 %)	Ammonium- persulfat (APS) 10%	Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)
8 %	9,3 ml	5 ml	5,4 ml	200 µl	200 µl	10 µl
10 %	8 ml	5 ml	6,7 ml	200 µl	200 µl	10 µl
12 %	6,7 ml	5 ml	8 ml	200 µl	200 µl	10 µl

Die Gele wurden dann in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde. In die Taschen des Sammelgels wurden zunächst 9 µl eines Molekulargewichtsmarkers pipettiert und anschließend die zu untersuchenden Proteinlysate. Zunächst durchliefen die Proben das Sammelgel bei einer Spannung von 70 V. Sobald sie das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 100 V bis 110 V erhöht.

2.4.4 Elektrotransfer

Um den Proteingehalt später untersuchen zu können, müssen die Proteine vom Gel auf eine 0,2 µm starke Nitrozellulose-Membran überführt werden. Hierzu wurde mittels „Semi Dry“ Methode nach Kyhse-Andersen (1984) ein elektrisches Feld parallel zum Gel aufgebaut. Hierbei wurden auf die „Semi Dry“ Apparatur (TransBlot SD, BioRad) zunächst 2 Whatman-Papiere, eine Nitrozellulose-Membran, das Gel und nochmal 2 Whatman-Papiere gelegt. Es wurde nun eine Spannung von 12 V für 75 min

angelegt. Hierdurch konnten die Proteine auf die Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Anschließend wurde die Membran mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt um zu überprüfen ob die Proteinübertragung erfolgreich war. Dieses wurde anschließend mit PBST wieder von der Membran gewaschen

2.4.5 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

Um die Stärke der Proteinexpression nachweisen zu können, wurden die Membranen zunächst für 1 h und bei Raumtemperatur mit einer Fünf prozentigen Milchpulverlösung (in PBST) inkubiert. Dies diente zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen. Anschließend wurden die Membranen kurz mit VE H₂O gewaschen und die entsprechenden Erstantikörper auf die Membranen gegeben. Die Erstantikörper wurden in Blockierungspuffer entsprechend der angegebenen Verdünnungen angesetzt (siehe 2.1.8.1). Eine Ausnahme stellte hier der Actin Antikörper dar, welcher in Blockierungspuffer mit 0,5% Milch angesetzt wurde. Die Membranen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Antikörper von den Membranen entfernt und diese dreimal für 15 min mit PBST gewaschen. Nun konnten die Membranen 1 h bei Raumtemperatur mit den mit Meerrettichperoxidasegekoppelten (HRP, „horseradish peroxidase“, in Blockierungspuffer mit 0,5 % Magermilch) Zweitantikörpern (siehe 2.1.8.2) inkubiert werden. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Um die Proteinbanden sichtbar machen zu können, wurden die Membranen nun für 1 min mit ECL-Lösung (Chemilumineszenz-Substrat) benetzt und inkubiert. Hiernach konnten die Membranen zunächst in Glassichtfolie und diese dann in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt werden. Durch Auflegen eines Röntgenfilms konnte die entstandene Lichtemission übertragen werden. Zuletzt wurden die Röntgenfilme in eine Entwicklermaschine (CP 1000) eingelegt, wodurch die Proteinexpression schließlich sichtbar wurde. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte nach Einscannen der Filme am Computer mit Hilfe des Programms ImageJ. Die Membranen wurden mit

PBST gewaschen und anschließen bei Raumtemperatur getrocknet, um diese erneut verwenden zu können.

2.5 Bestimmung zellulärer Parameter

2.5.1 DNA Fragmentierungs-ELISA

Apoptose, bzw. programmierter Zelltod, zeichnet sich durch die Aktivierung von einer endogenen Endonuklease sowie spezifischer Proteasen, Kondensation vom Zytoplasma und der Blasenbildung der Membran (Zeiose) aus. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose zur Zerstörung der Zellmembran welche durch das starke Anschwellen der Zellen verursacht wird. Die Nekrose tritt in der Regel nach Schädigung der Zellstruktur auf.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Cell Death Detection PLUS-Kit macht sich die endogene Endonuklease zu Nutzen. Durch deren Aktivität kommt es durch Spaltung des DNA-Doppelstrangs zur Bildung von Histon-gebundenen Mono- und Oligonukleosomen. Diese haben eine Größe von ca. 180 pb und können mit Hilfe der hier verwendeten Anti-Histon- und Anti-DNA-Antikörpern gebunden werden. Dies geschieht noch bevor die Zellmembran zerstört wird. Daher wurde für die Detektion der Apoptose die Zell-Phase verwendet während für die Detektion der Nekrose der Überstand untersucht wurde.

Für die Durchführung der Experimente wurden 5×10^3 Huh7.5 - bzw. 3×10^3 HepG2 - Zellen in einer 96- „Well“-Platte ausgelegt. Nach beendigter Stimulation (siehe 2.2.5) wurden zur Nekrose Messung 50 μ l des Mediums in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Rest abgesaugt. Zur Messung der Apoptose wurden 200 μ l Lysispuffer auf die Zelle gegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei 800 UpM für 10 min zentrifugiert um die Zellkerne, welche hochmolekulare, unfragmentierte DNA enthalten (Pellet am Boden) und die Zytoplasma-Fraktion (Überstand) zu trennen. Bei den Huh7.5 Zellen wurden nun 20 μ l des Überstandes auf die ELISA-Platte entsprechend übertragen. Bei den

HepG2 Zellen wurden 10 µl Überstand mit 10 µl „*Incubationbuffer*“ zusammen auf die Platte gegeben, um die Geschwindigkeit des Farbumschlags zu reduzieren. Um die Nekrose nachweisen zu können, wurde 20 µl der Überstände beider Zelllinien ebenfalls auf die Platte gegeben. Weiter wurden 20 µl des „*Incubationbuffer*“ als „*Blank*“ sowie eine Positivkontrolle auf die Platte gegeben, diese wurden in Folge analog der Proben behandelt.

Danach wurde in jedes Well 80 µl „*Immunoreagent*“ gegeben, welches zuvor aus „*Incubationbuffer*“, Anti-Histone-Biotin-Antikörper und Anti-DNA-Peroxidase Antikörper hergestellt wurde. Dieses wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 UpM inkubiert. In dieser Zeit konnten die Anti-DNA-Peroxidase Antikörper an den DNA-Anteil der Nukleosome und die Anti-Histone-Biotin Antikörper an der mit Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte sowie an der Histon-Komponente der Nukleosomen binden.

Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Platte dreimal mit „*Incubationbuffer*“ gewaschen, um etwaige ungebundene Antikörper zu entfernen. Durch das nun dazugegebene Substrat ABTS konnte indirekt die Menge an DNA-Fragmentierung durch eine Grün-Färbung sichtbar gemacht werden, wobei die Farbintensität mit der Menge an DNA-Fragmentierung proportional zunimmt.

Um die Reaktion abzustoppen, wurde in jedes Well 100 µl „*ABTS-Stop Solution*“ hinzugefügt. Die Absorption wurde nun am Mikroplattenlesegerät SpectraMax M5 bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen. Der Wert des Blanks musste anschließend noch vom Wert jeder Probe abgezogen werden.

2.5.2 Nachweis der Proliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau

2x10⁴ Huh7.5 und HepG2 Zellen wurden in einer 24-Well-Platte in Medium mit 0,2 µCi/ml [³H] Methyl-Thymidin und der jeweiligen Behandlung ausgelegt. Die Zellen wurden wie beschrieben für 24 h, 48 h und 72 h stimuliert (siehe 2.2.5).

Nach beendiger Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Dulbecco's Phosphate-buffered Saline ((PBS), $-Ca^{2+}$, $-Mg^{2+}$) gewaschen. Hiernach wurden die Zellen 30 min mit einer eiskalten 5-prozentigen (w/v) Trichloressigsäure (TCA)-Lösung inkubiert, danach wurden sie zweimal mit 5-prozentiger TCA gewaschen.

Um die DNA zu lösen, wurden die Zellen zum Schluss mit 500 μ l einer 1 M NaOH für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in die für die Messung benötigten Szintillationsvials übertragen. Durch Zugabe von 250 μ l Eisessig wurde die Lösung neutralisiert.

Zum Messen der Proben, wurden abschließend 3 ml Szintillationsflüssigkeit dazugegeben und durchmischt. Es Bei jeder Messung wurde eine Kontrolle, welche aus 500 μ l 1 M NaOH, 250 μ l Eisessig und 3 ml Szintillationsflüssigkeit bestand, mitgemessen.

Das Methyl-Thymidin wird von den Zellen in ihre DNA aufgenommen und mit dieser vermehrt. Somit kann anhand der radioaktiven Strahlung auf eine verstärkte oder verminderte Proliferation geschlossen werden. Die Radioaktivität wurde an einem β -Strahlenmessgerät Tri Carb 2100 TR gemessen.

2.5.3 LC-MS/MS

Die Quantifizierung der Sphingolipide erfolgte durch das Institut für Klinische Pharmakologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. Gerd Geißlinger mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Alle Referenzsubstanzen und internen Standards wurden von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA, bezogen.

Für die Analyse der Sphingoidbasen SPH d18:1, SPH d18:0; SPH d20:1, SPH d20:0, S1P d18:1 und S1P d18:0 wurden 10^6 Zellen verwendet. Die Zellpellets wurden mit 200 μ l Extraktionspuffer (Zitronensäure 30 mM, C 40 mM) resuspendiert und mit 20 μ l des

internen Standardgemisches (SPH d18:1-d7, SPH d18:0-d7, S1P d18:1-d7 und S1P d18:0-d7 in Methanol) versetzt.

Die Proben wurden mit 600 μ L Methanol:Chloroform:HCl (15:83:2, v/v/v/v) gemischt und 60 sec lang vermischt. Nachdem die Proben für 5 min bei ca. 12.500 UpM zentrifugiert wurden, wurde die untere organische Phase bei 45 °C unter einem leichten Stickstoffstrom verdampft und in 100 μ l Methanol: Ameisensäure (95:5, v/v) rekonstituiert. Für die Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden 20 μ l einer Arbeitslösung anstelle des Zellpellets wie angegeben aufgearbeitet. Qualitätskontrollproben von drei verschiedenen Konzentrationsstufen (niedrig, mittel, hoch) wurden als Erst- und Endproben jedes Analysenlaufs vermessen.

Für die chromatographische Trennung wurde ein Agilent 1290 Infinity UHPLC-System mit einer Zorbax Eclipse Plus C8 UHPLC-Säule (30 mm x 2,1 mm ID, 1,8 μ m, 100 Å; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) eingesetzt. Die mobilen Phasen der UHPLC waren Wasser:Ameisensäure (99,5:0,5, v/v) (A) und Acetonitril:Isopropylalkohol:Aceton:Ameisensäure (50:30:19:1, v/v/v/v) (B). Die anfängliche Pufferzusammensetzung des Gradienten 55 % (A)/45 % (B) wurde für 30 sec gehalten und innerhalb von 1 min linear auf 0 % (A)/100 % (B) geändert. Nachdem 100 % (B) für 1,5 min gehalten wurden, wurde die Zusammensetzung innerhalb von 6 Sekunden linear auf 55 % (A)/45 % (B) geändert und die Säule mit den Ausgangsbedingungen neu äquilibriert. Die Laufzeit für jede Probe (Injektionsvolumen von 5 μ l) betrug 4,5 min. Nach jeder Probeninjektion wurde eine Methanolprobe injiziert, um Verschleppungseffekte zu vermeiden.

Die MS/MS-Analysen wurden mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer QTRAP5500 (Sciex, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt, das mit einer Turbo-V-Quelle ausgestattet ist, die im positiven Electrospray Ionisierungs -Modus betrieben wurde.

Die Analyse wurde im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Massenübergänge von Vorläufer- und Produktion pro Analyt aufgenommen, jeweils mit einer Messzeit von 20 ms.

Die Datenerfassung erfolgte mit der Analyse-Software V 1.6.3 und die Quantifizierung mit der MultiQuant-Software V 3.0.2 (beide Sciex, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des Isotopenverdünnungsverfahrens. Der relative Fehler der gemessenen Werte der Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben betrug, bezogen auf die dotierte Nominalkonzentration, weniger als 15 % über den gesamten Kalibrierbereich. Für die untere Bestimmungsgrenze, wurde eine Genauigkeitsschwankung von 20 % akzeptiert.

Die Analyse von Sphingoidbasen und Ceramiden wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Gurke et al. 2019). Kurz zusammengefasst, wurden die Zellpellets von 10^5 Zellen mit 200 μl Extraktionspuffer (Zitronensäure 30 mM, Dinatriumhydrogenphosphat 40 mM) resuspendiert und vor der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 20 μl des internen Standards versetzt. Nach der Verdampfung bei 45 °C unter einem leichten Stickstoffstrom wurden die Proben in 100 μl Tetrahydrofuran/Wasser 9:1 (v/v) mit 0,2 % Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat rekonstituiert.

Für die chromatographische Trennung wurde ein Agilent 1290 Infinity UHPLC-System mit einer Zorbax Eclipse Plus C18 UHPLC-Säule (50 mm x 2,1 mm ID, 1,8 μm , 100 Å; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die für die Gradiententrennung der Analyten verwendeten mobilen Phasen waren Wasser mit 0,2 % Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat (A) und Acetonitril:Isopropylalkohol:Aceton:Ameisensäure (50:30:19,8:0,2, v/v/v/v) (B).

MS/MS-Analyse und Datenerfassung wurden wie zuvor beschrieben (Gurke et al. 2019) und wie oben beschrieben durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertung

Der „*unpaired*“ t-Test wurde für die statistische Analyse von zwei Gruppen verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die „*One-way*“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließender *Bonferoni Post-Hoc*-Analyse verwendet. Der „*one-sample*“ t-Test wurde bei vorheriger Normalisierung durchgeführt.

Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Alle Statistiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Sorafenib auf Enzyme des Sphingolipid Stoffwechsels

Um den Einfluss von Sorafenib auf den Sphingolipid Stoffwechsel zu untersuchen, wurde zunächst die mRNA-Expression verschiedener Enzyme mittels TaqMan bestimmt. Abbildung 6 zeigt die mRNA-Expression der HepG2 Zellen und Abbildung 7 die der Huh 7.5 Zellen. Die hier untersuchten Enzyme sind Sphingosinkinase 1 (SPHK1), Sphingosinkinase 2 (SPHK2), saure Ceramidase (ASAH1), neutrale Ceramidase (ASAH2), Dihydroceramid-Desaturase 1 (DEGS1) und Serin-Palmitoyltransferase (SPTLC1).

Bei den HepG2 Zellen führte die Behandlung mit Sorafenib zu einer Reduktion der mRNA-Expression von SPHK1, SPHK2, ASAH2 und DEGS1 im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Bei ASAH2 ist dieser Effekt nach 4 h zu sehen. Bei SPHK1 und DEGS1 konnte nach einer Behandlung von 6 h eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Nach einer Behandlung von 8 h konnte bei der SPHK2 ebenfalls eine Reduktion beobachtet werden. Alle genannten Enzyme zeigten nach 24 h die stärkste Verminderung der mRNA Expression. Sorafenib führte bei ASAH1 zu einer einmaligen Reduktion der mRNA-Expression nach 8 h und bei der SPTLC1 nach 6 h (Abbildung 6).

HepG2

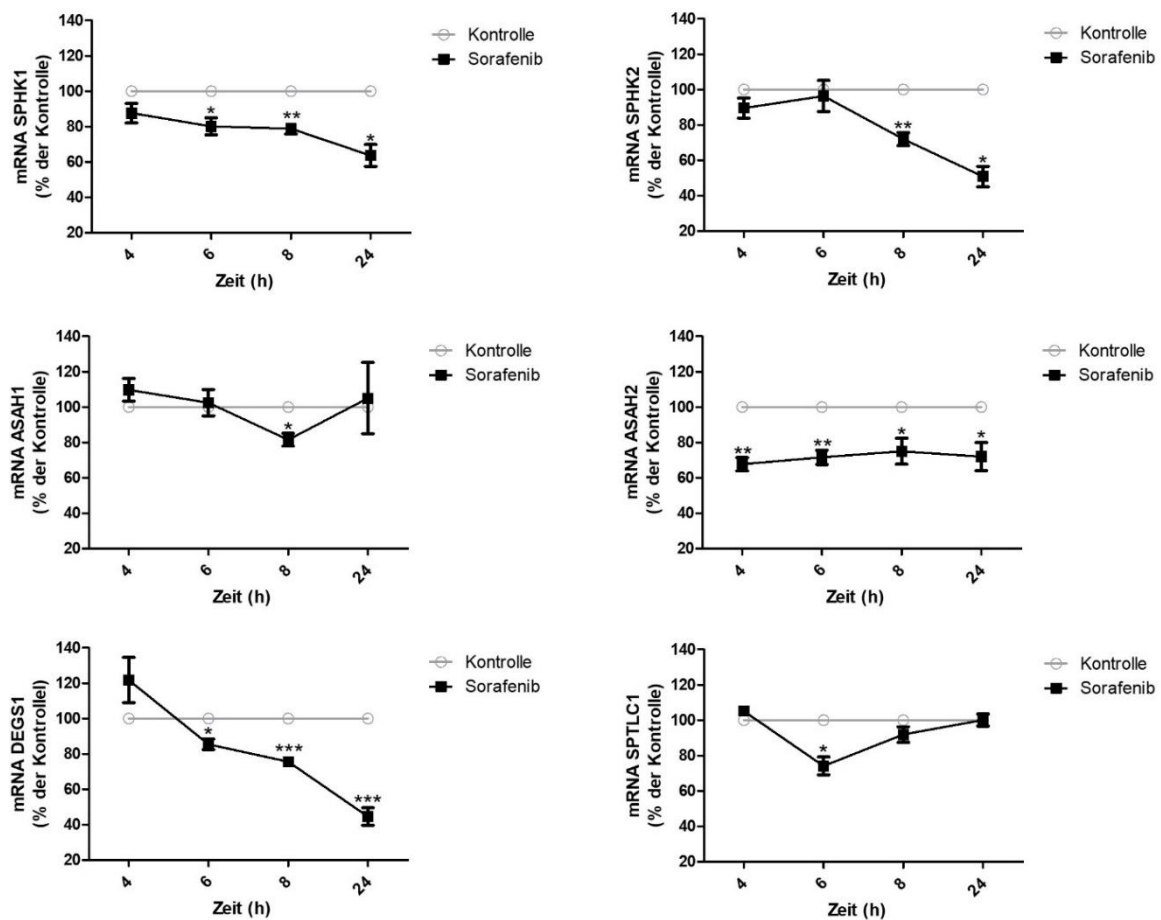


Abbildung 6: **Einfluss von Sorafenib auf die mRNA-Expression von HepG2 Zellen** mRNA Expression von Sphingosinkinase 1 (SPHK1), Sphingosinkinase 2 (SPHK2), saure Ceramidase (ASAH1), neutrale Ceramidase (ASAH2), Dihydroceramid-Desaturase 1 (DEGS 1) und Serin-Palmitoyltransferase (SPTLC1) der HepG2 Zellen nach Behandlung mit 5 μ M Sorafenib für die angegebenen Zeitpunkte. Die Daten sind relativ zu den jeweiligen Vehikel-Kontrollen (0,2 % DMSO, graue Kreise) dargestellt. Ein „one-sample“ t-Test wurde zum statistischen Vergleich mit den Kontrollen verwendet. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (n = 3-4). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Bei den Huh7.5 Zellen kam es mit Ausnahme von ASAH1 bei allen gemessenen Enzymen zu einer Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Dies war bei SPHK2 ab einer vierstündigen Behandlung zu erkennen. Bei SPHK1 und DEGS1 kam es nach 6 h und 24 h zu einer signifikanten Verminderung der mRNA-Expression. Nach 24 h konnte ebenfalls eine Reduktion der Expression bei ASAH2 und SPTLC1 beobachtet werden. Bei den Huh7.5 Zellen konnte ebenfalls nach 24 h die stärkste Reduktion der mRNA-Expression aller untersuchten Enzyme beobachtet werden (Abbildung 7).

Huh7.5

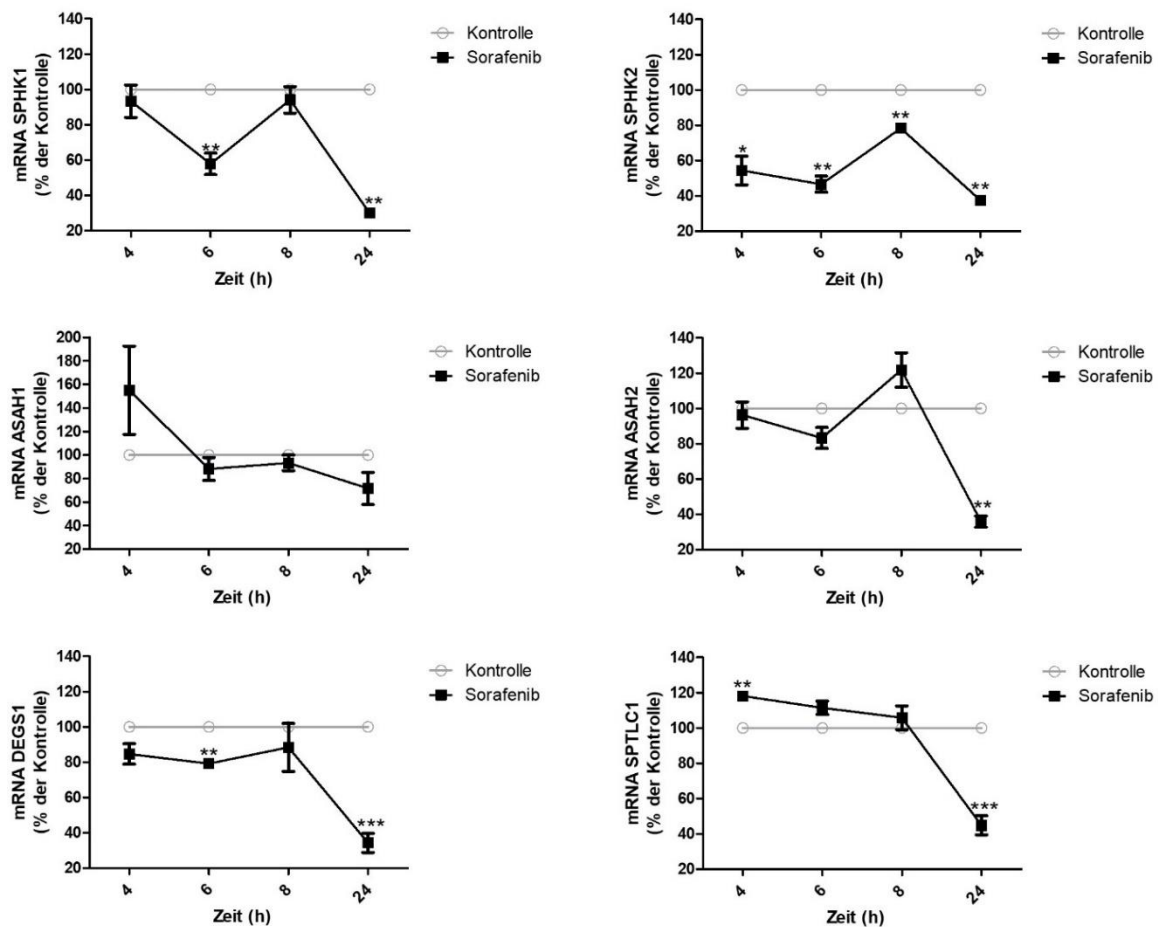


Abbildung 7: **Einfluss von Sorafenib auf die mRNA-Expression von Huh7.5 Zellen.** mRNA Expression von Sphingosinkinase 1 (SPHK1), Sphingosinkinase 2 (SPHK2), saure Ceramidase (ASAH1), neutrale Ceramidase (ASAH2), Dihydroceramid-Desaturase 1 (DEGS 1) und Serin-Palmitoyltransferase (SPTLC1) der Huh7.5 Zellen nach Behandlung mit 5 µM Sorafenib für die angegebenen Zeitpunkte. Die Daten sind relativ zu den jeweiligen Vehikel-Kontrollen (0,2 % DMSO, graue Kreise) dargestellt. Ein „one-sample“ t-Test wurde zum statistischen Vergleich mit den Kontrollen verwendet. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (n = 3-4). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2 Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die pERK-Spiegel

Sorafenib ist ein Multikinasen-Inhibitor und auch bekannt dafür, die Phosphorylierung von ERK („*Extracellular-signal Regulated Kinase*“) zu beeinflussen. Hier sollte überprüft werden, ob die Hinzugabe von FB1 ebenfalls einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK hat. Die Stimulation erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben. Die Spiegel des phosphorylierten ERK (pERK) war nach Stimulation mit Sorafenib alleine und auch in Kombination mit FB1 in beiden Zelllinien im Vergleich zur DMSO Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 8). Mit alleiniger FB1-Stimulation kam es in beiden Zelllinien zu einem verstärkten pERK-Signal im

Vergleich zur Kontrolle. Diese Steigerung der Phosphorylierungsgrade war jedoch nicht signifikant (Abbildung 8).

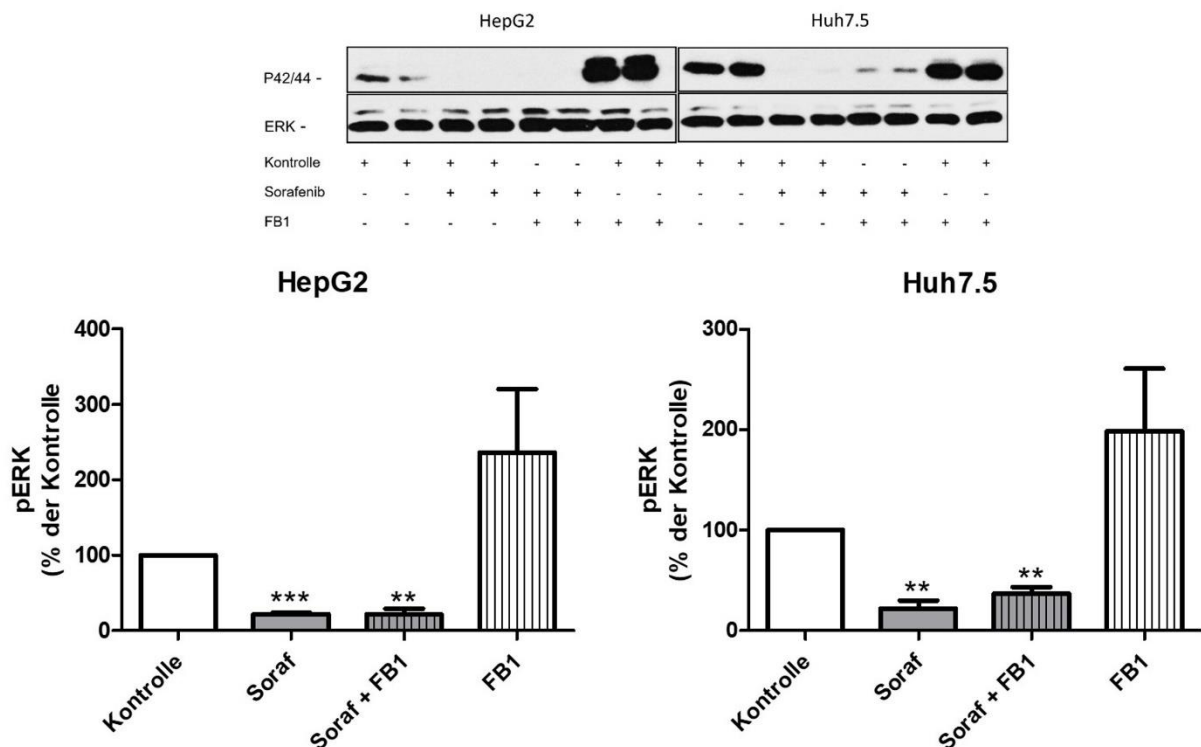


Abbildung 8: **Quantifizierung der pERK Spiegel der HepG2 und Huh7.5 Zellen.** Die Zellen wurden 1 h mit 25 μM FB1 vorbehandelt, anschließend wurde das Vehikel (Kontrolle; 0,2% DMSO) oder 5 μM Sorafenib (Soraf) für 2 h zugegeben. Weiter erfolgte die Stimulation der Zellen mit Sorafenib (5 μM) und dem Vehikel (Kontrolle; 0,2% DMSO) für 2 h alleine. Es wurden 30 μg Protein zur Analyse des phosphorylierungs Status von ERK eingesetzt. Es wurde jeweils die totale, sowie die phosphorylierte Form des Proteins analysiert. Das phosphorylierte ERK (p42/44) wurde anschließend auf das totale ERK validiert und mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert. Ein „one-sample“ t-Test nach vorheriger Normalisierung wurde zum statistischen Vergleich mit der Vehikel-Kontrollen (0,2 % DMSO) verwendet. **P < 0,01, ***P < 0,001. (n = 3-4). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.3 Beeinflussung der Proliferation der HepG2 Zellen durch Sorafenib und Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Sorafenib und die Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Hierfür wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA untersucht. Durch Neusynthese von der DNA wurde auch der Einbau von Radioaktivität stärker, was auf eine verstärkte Zellproliferation schließen lässt. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.

Durch die Sorafenib-Behandlung der HepG2 Zellen kam es nach 48 h und 72 h zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Durch die Stimulation mit FB1 oder SKI II war die Proliferation zu allen gemessenen Zeitpunkten reduziert verglichen mit der DMSO Behandlung. Bei der Behandlung mit SKI II zeigte die beobachtete Reduktion auch eine statistische Signifikanz. Bei der Stimulation der HepG2 Zellen mit SLP oder SLM kam es im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Allerdings, konnte im Vergleich zur alleinigen Sorafenib Behandlung kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abbildung 9).

Des Weiteren wurden die Zellen mit einer Kombination aus Sorafenib und dem jeweiligen Inhibitor stimuliert (siehe 2.2.5). Hierbei führte die Kombination aus FB1 und Sorafenib bei den HepG2 Zellen zu allen gemessenen Zeitpunkten zu einer Verringerung der Proliferation im Vergleich zur Stimulation mit Sorafenib alleine. Die Kombination aus Sorafenib und SKI II führte zu allen gemessenen Zeitpunkten zu einer signifikanten Verringerung der Proliferation (Abbildung 9). Die Doppelstimulation mit SLP und Sorafenib wie auch mit SLM und Sorafenib führte in den HepG2 Zellen zu keinem signifikanten Unterschied in der Proliferation im Vergleich zur alleinigen Sorafenib Stimulation (Abbildung 9).

HepG2

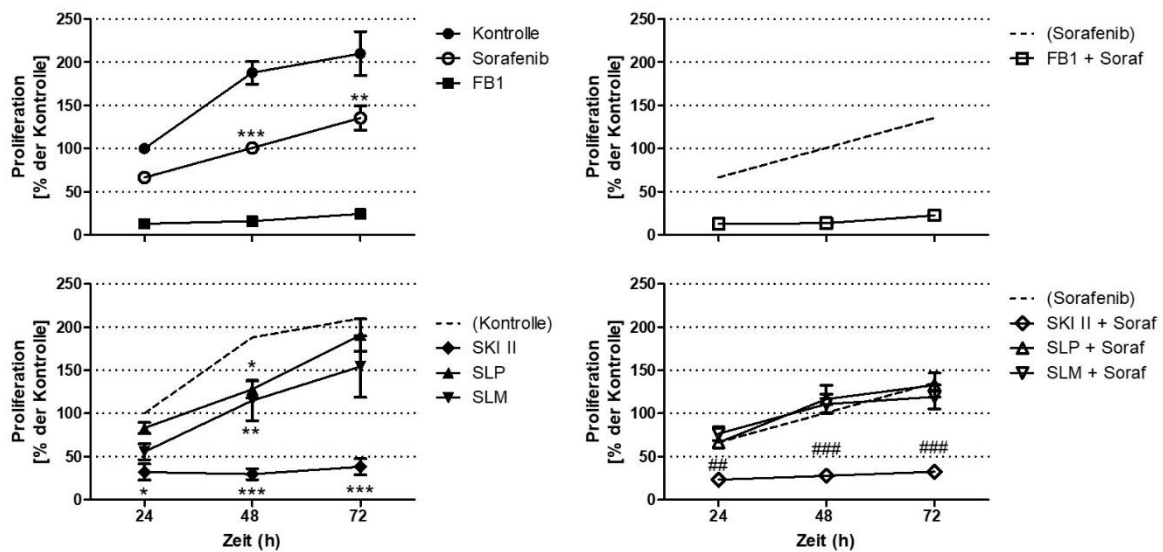


Abbildung 9: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SPHK-Inhibitoren auf die Proliferation von HepG2 Zellen. Die Proliferation wurde durch Integration von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Die Zellen wurden mit 25 μM FB1 für 1 h oder mit 10 μM SKI II, 1 μM SLP7111228 (SLP) oder 1 μM SLM6031434 (SLM) für 2 h vorbehandelt. Anschließend wurden entweder das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μM Sorafenib (Soraf) für die angegebenen Zeiträume zugegeben. Die gestrichelten Linien zeigen wiederholt die Vehikel-Kontrolle oder Sorafenib an, wie in der linken oberen Tafel dargestellt. Die Daten sind relativ zu den jeweiligen Kontrollen angegeben (0,2% DMSO, 24 h). Ein „two-way“-ANOVA-Test wurde zum statistischen Vergleich mit den Kontrollen oder Sorafenib verwendet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle und ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ im Vergleich zu Sorafenib. Mit Ausnahme von FB1 stammen alle Daten aus 3 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. FB1 wurde in zwei dieser Experimente einbezogen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.4 Beeinflussung der Proliferation der Huh7.5 Zellen durch Sorafenib in Kombination mit Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels

Die unter 2.2.5 beschriebene Stimulation mit anschließender Messung der Proliferation wurde ebenfalls bei den Huh7.5 Zellen durchgeführt. Bei diesen Zellen zeigte die Behandlung mit Sorafenib keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation (Abbildung 10). Durch die Stimulation der Zellen mit FB1 kam es zu einer Verminderung der Proliferation. Mit SKI II wurde die Proliferation im Vergleich zur DMSO Behandlung nach 72 h signifikant verringert (Abbildung 10). Die Stimulation der Huh7.5 Zellen mit SLP oder SLM konnte die Proliferation nicht signifikant beeinflussen (Abbildung 10).

Bei den Huh7.5 Zellen konnte nach der Stimulation mit Sorafenib und FB1 eine geringere Proliferation im Vergleich zur alleinigen Sorafenib Stimulation beobachtet

werden. Die Kombination aus SKI II und Sorafenib führte nach 48 h und 72 h zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib (Abbildung 10). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen sowohl mit Sorafenib als auch mit SLP sowie mit Sorafenib und SLM führten zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib (Abbildung 10).

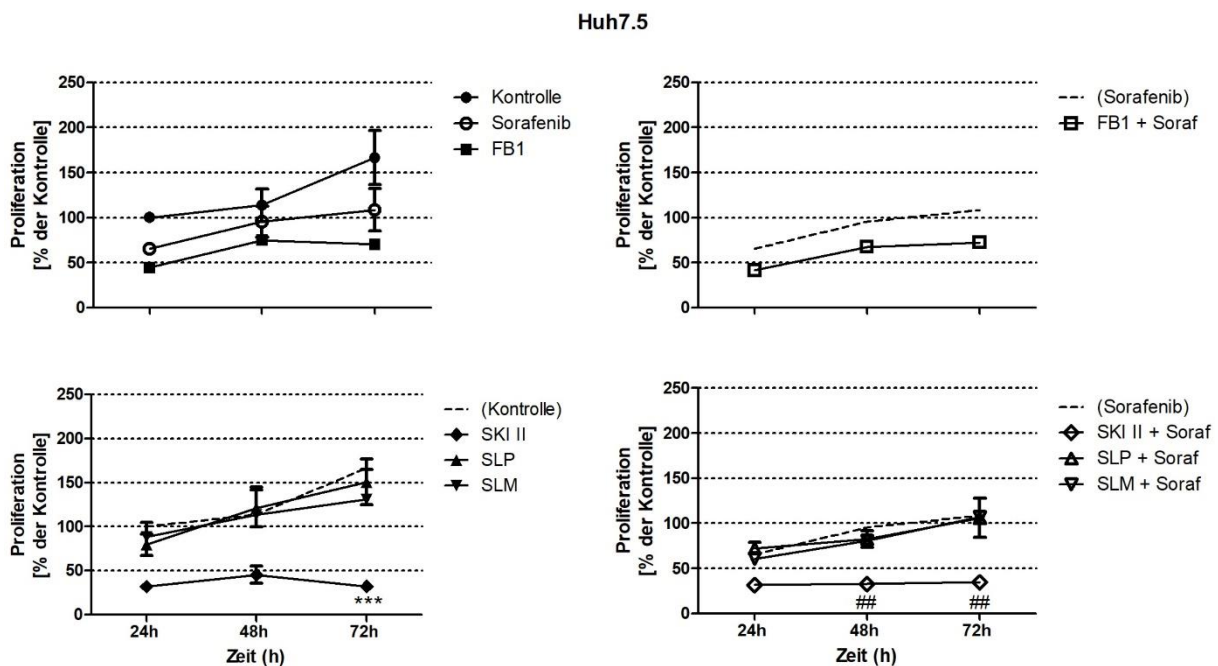


Abbildung 10: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SPHK-Inhibitoren auf die Proliferation von Huh7.5 Zellen. Die Proliferation wurde durch Integration von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Die Zellen wurden mit 25 μ M FB1 für 1 h oder mit 10 μ M SKI II, 1 μ M SLP7111228 (SLP) oder 1 μ M SLM6031434 (SLM) für 2 h vorbehandelt. Anschließend wurden entweder das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μ M Sorafenib (Soraf) für die angegebenen Zeiträume zugegeben. Die gestrichelten Linien zeigen wiederholt die Vehikel-Kontrolle oder Sorafenib an, wie in der linken oberen Tafel dargestellt. Die Daten sind relativ zu den jeweiligen Kontrollen angegeben (0,2% DMSO, 24 h). Ein „two-way“-ANOVA-Test wurde zum statistischen Vergleich mit den Kontrollen oder Sorafenib verwendet. *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle und ## $P < 0,01$ im Vergleich zu Sorafenib. Mit Ausnahme von FB1 stammen alle Daten aus 3 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. FB1 wurde in zwei dieser Experimente einbezogen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.5 Einfluss der kombinierten Inhibition der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2 auf die Proliferation

Als unspezifischer Inhibitor der SPHK1 und SPHK2 verursachte SKI II sowohl in den HepG2 als auch in den Huh7.5 Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferation (Abbildung 9 und Abbildung 10). Es sollte daher getestet werden, ob die Kombination

des spezifischen SPHK1 Inhibitors SLP und des spezifischen SPHK2 Inhibitors SLM ähnliche oder verstärkte Effekte verursacht.

Abbildung 11A zeigt, dass die Sorafenib-Behandlung der HepG2 Zellen bei allen Messzeitpunkten zu einer signifikant verringerten Proliferation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte. Weiter ist zu erkennen, dass es durch die Kombination aus SLP und SLM nach 48 h und 72 h zu einer signifikant niedrigeren Proliferationsrate kam als bei der Kontrolle. Die Sorafenib Behandlung führte im Vergleich zur Doppelstimulation mit SLP und SLM bei allen Messzeitpunkten zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Proliferation (Abbildung 11A).

Bei den Huh7.5 Zellen kam es mit der Sorafenib Behandlung an allen Messzeitpunkten zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 11B). Die Doppelstimulation mit SLP und SLM führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 48 h zu einer signifikant verringerten Proliferation (Abbildung 11B). Weiter ist in Abbildung 11B zu sehen, dass es nur nach 24 h zu einem signifikanten Unterschied in der Proliferation der Zellen zwischen der Sorafenib Behandlung und der Doppelstimulation mit SLP und SLM kam.

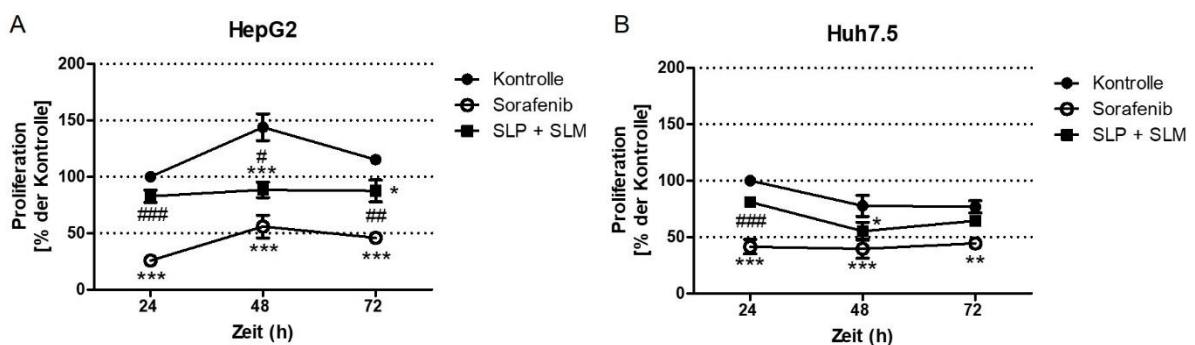


Abbildung 11: Einfluss von Sorafenib und der Kombination aus SLP und SLM auf die Proliferation von HepG2 (A) und Huh7.5 (B) Zellen. Die Proliferation wurde durch Integration von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Die Zellen wurden mit 1 μ M SLP7111228 (SLP) und 1 μ M SLM6031434 (SLM), 5 μ M Sorafenib oder Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO, 24 h) für die angegebenen Zeitpunkt stimuliert. Die Daten sind relativ zu den jeweiligen Kontrollen angegeben (0,2% DMSO, 24 h). Eine „two-way“ ANOVA wurde zum statistischen Vergleich mit den Kontrollen oder Sorafenib verwendet. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle und # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 im Vergleich zu Sorafenib., (n = 3). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.6 Einfluss von Sorafenib, Fumonisin B1 und SKI II auf Apoptose und Nekrose von HepG2 und Huh7.5 Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FB1 und vor allem SKI II in der Lage waren die Proliferation der HepG2 und Huh7.5 Zellen stärker zu vermindern als Sorafenib (Abbildung 9 und Abbildung 10). Daher wurde mittels DNA-Fragmentierungs ELISA untersucht, ob diese Effekte auf eine verstärkte Induktion von Apoptose oder Nekrose zurückzuführen sind. Hierbei wurden die Zellen wie unter 2.2.5 beschrieben stimuliert.

Wie in Abbildung 12A und Abbildung 12C zu sehen ist, kam es durch 24 h Behandlung mit Sorafenib zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose in beiden Zelllinien. Auch die Stimulation mit 10 nM Staurosporin (Stauro, positiv Kontrolle) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. FB1 alleine führte in beiden Ziellinien im Vergleich zur DMSO Kontrolle zu keinem signifikanten Effekt (Abbildung 12A und Abbildung 12C).

Im Vergleich zur Sorafenib Behandlung war die Apoptose in den HepG2 Zellen signifikant verringert, wenn die Zellen mit Sorafenib und FB1 oder Sorafenib und SKI II stimuliert wurden (Abbildung 12A). Die Stimulation mit SKI II führte im Vergleich zur DMSO Kontrolle zu einer signifikant verminderten Apoptose bei den HepG2 Zellen (Abbildung 12A). Die Stimulation mit Sorafenib und SKI II führte im Vergleich zur Sorafenib Stimulation ebenfalls zu einer signifikant verminderten Apoptose (Abbildung 12A). Wie weiter in der Abbildung 12B zu sehen ist hatte keiner der Stimulationen einen Effekt auf die Nekrose bei den HepG2 Zellen.

Bei den Huh7.5 Zellen beeinflusste weder FB1 oder SKI II alleine oder in Kombination mit Sorafenib die Apoptose (Abbildung 12C). Wie in Abbildung 12D weiter zu sehen ist führte die Kombination aus Sorafenib und FB1 sowie aus Sorafenib und SKI II im Vergleich zur alleinigen Sorafenib Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der Nekrose.

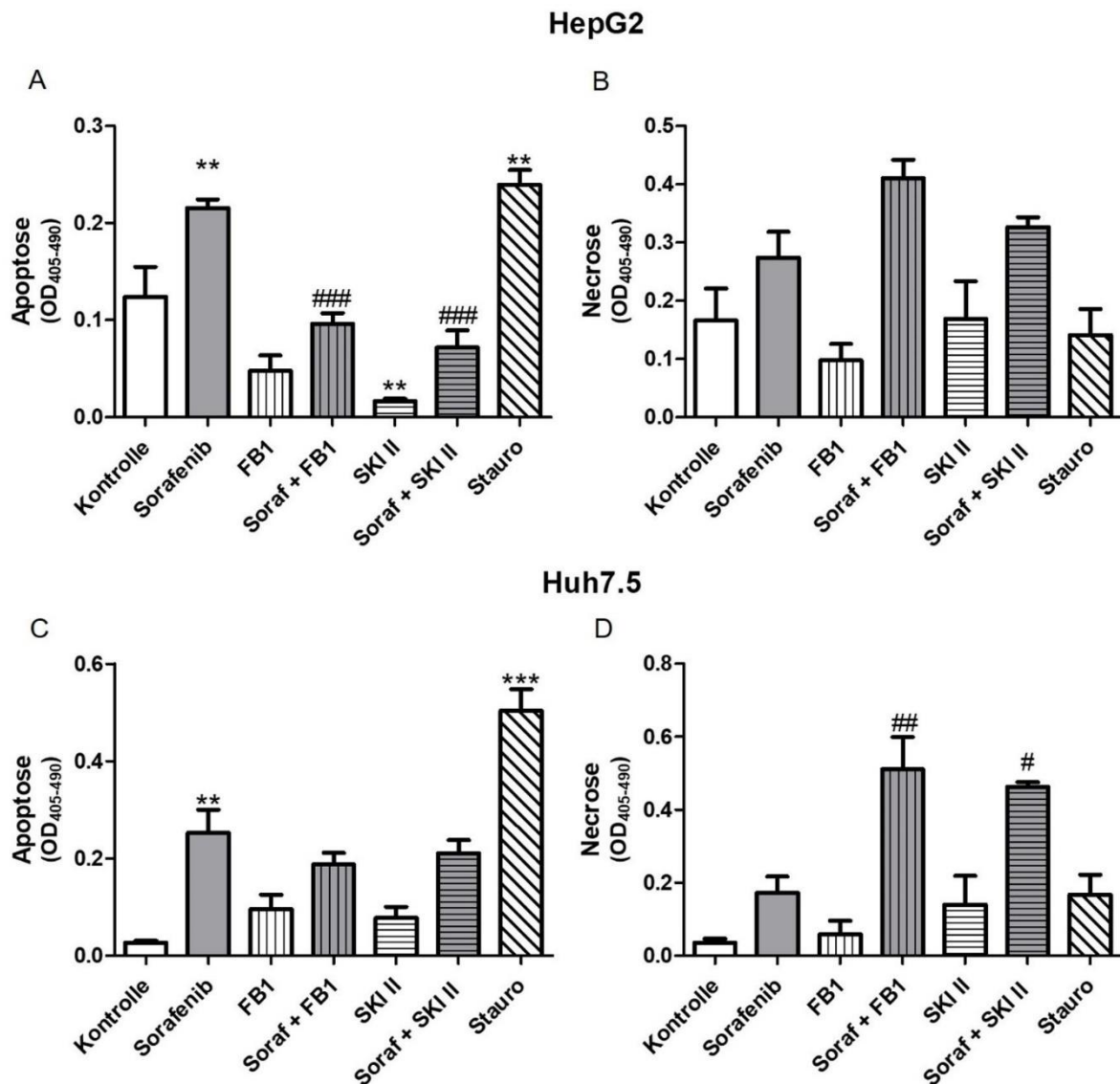


Abbildung 12: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SKI II auf die DNA-Fragmentierung der HepG2 (A,B) und Huh7.5 (C,D) Zellen. Die Zellen wurden entweder 2 h mit SKI II oder 1 h mit 25 μ M FB1 vorbehandelt, anschließend wurde das Vehikel (Kontrolle; 0,2% DMSO) oder 5 μ M Sorafenib (Soraf) zugegeben und für weitere 24 h auf den Zellen belassen. Weiter erfolgte die Stimulation der Zellen mit Sorafenib (5 μ M), dem Vehikel (Kontrolle; 0,2% DMSO) und Stauro (10 nM Staurosporin, positiv Kontrolle) für 24 h alleine. Zur statistischen Auswertung wurde eine „one-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. **P < 0,01, ***P < 0,001 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle (0,2 % DMSO) und #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 im Vergleich zu Sorafenib (n = 3). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

3.1 Beeinflussung der Sphingolipid-Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Inhibition regulierender Enzyme

Die Untersuchung der Proliferation zeigt, dass diese nicht nur durch Sorafenib beeinflusst wird, sondern auch durch die verwendeten Inhibitoren. Abschließend sollte daher untersucht werden, ob die beobachteten Effekte auf eine Beeinflussung des Sphingolipid-Stoffwechsels zurückzuführen sind. Hierzu wurden die Zellen nach

der Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren (siehe 2.2.5) mittels LC-MS/MS untersucht.

3.1.1 Beeinflussung der Dihydroceramid-Spiegel von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Zellen einzeln mit Sorafenib oder FB1 und in Kombination beider Substanzen stimuliert. Bei den HepG2 Zellen führte die Sorafenib Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramide Cer d18:0/16:0, Cer d18:0/18:0, Cer d18:0/24:0 und Cer d18:0/24:1 im Vergleich zur DMSO Kontrolle (Abbildung 13A-D). Des Weiteren kam es durch die kombinierte Stimulation mit Sorafenib und FB1 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Dihydroceramide (Abbildung 13A-D). Wie Abbildung 13A und Abbildung 13B zeigen, kam es durch die Kombination aus FB1 und Sorafenib zu einem signifikanten Anstieg von Cer d18:0/16:0 und Cer d18:0/18:0 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib.

HepG2

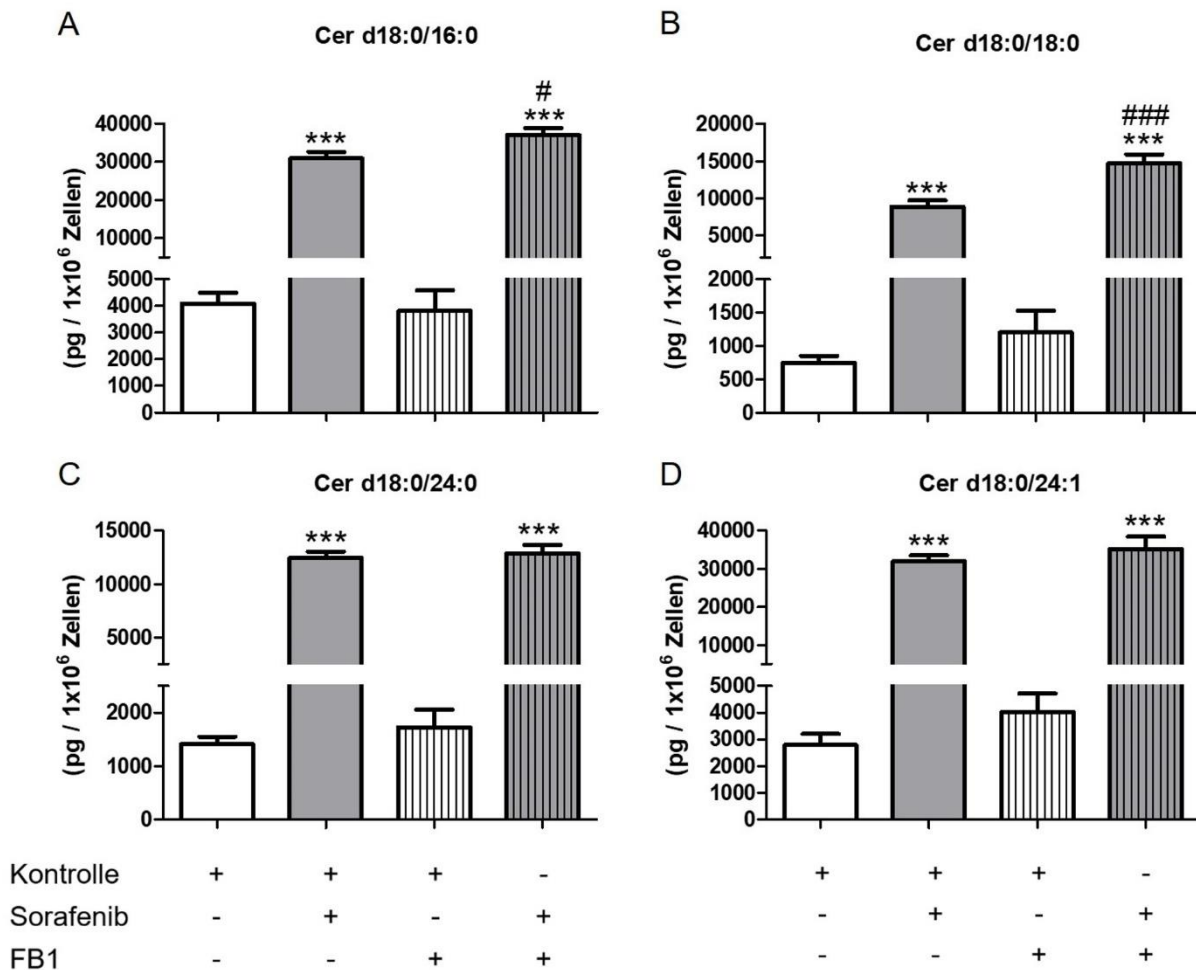


Abbildung 13: Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die Konzentration von Dihydroceramiden der HepG2 Zellen. Die Lipide wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Die Zellen wurden mit oder ohne 25 μ M FB1 für 1 h vorstimuliert, bevor das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μ M Sorafenib hinzugegeben und für weitere 24 h inkubiert wurden. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle und # P < 0,05, ### P < 0,001 im Vergleich zu Sorafenib (n = 3-6). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Bei den Huh7.5 Zellen kam es durch die Stimulation mit Sorafenib bei den Dihydroceramiden Cer d18:0/18:0, Cer d18:0/24:0 und Cer d18:0/24:1 zu einer signifikanten Akkumulation im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14B-D). Die Konzentrationen des Dihydroceramid Cer d18:0/16:0 war im Vergleich zur Kontrolle durch die Stimulation mit FB1 signifikant verringert (Abbildung 14A). Zwischen der Stimulation mit Sorafenib alleine und in Kombination mit FB1 kam es zu keinem Unterschied der Dihydroceramid-Spiegel.

Huh7.5

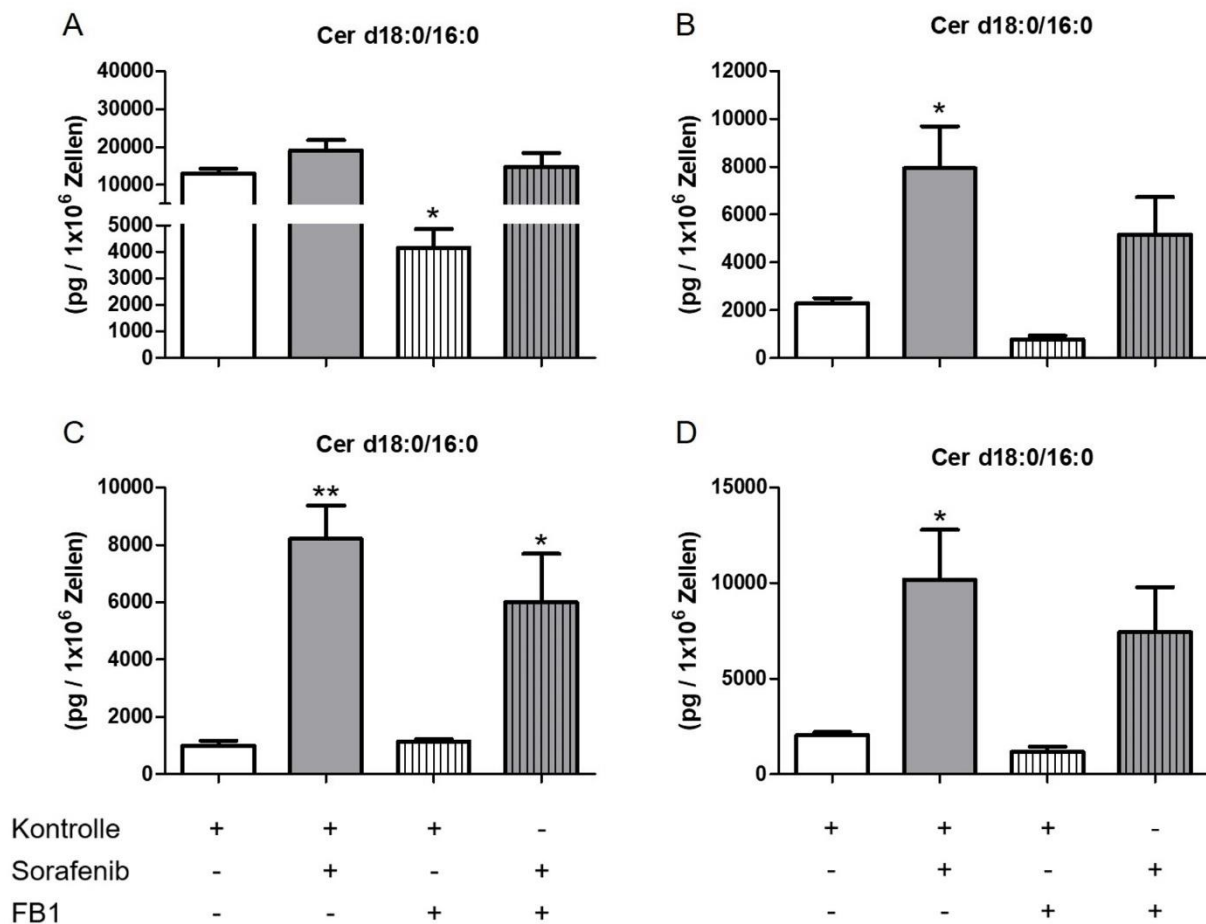


Abbildung 14: Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die Konzentration von Dihydroceramiden der Huh7.5 Zellen. Die Lipide wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Die Zellen wurden mit oder ohne 25 μ M FB1 für 1 h vorstimuliert, bevor das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μ M Sorafenib hinzugegeben und für weitere 24 h inkubiert wurden. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. * P < 0,05, ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle (n = 3-6). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.1.2 Beeinflussung der Dihydroceramid-Spiegel von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und die Sphingosinkinase-Inhibitoren

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, welchen Einfluss die Inhibition der Sphingosinkinasen auf die Spiegel der verschiedenen Sphingolipide hat. Die Stimulation mit SKI II, SLP und SLM erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben. Hierbei konnte beobachtet werden, dass es bei den HepG2 Zellen mit Ausnahme von Cer d18:0/16:0 erneut zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramide im Vergleich zu DMSO durch die Stimulation mit Sorafenib kam (Abbildung 15B-D). Weiter ist auf Abbildung 15C und Abbildung 15D zu sehen, dass die Kombination aus

Sorafenib und SKI II zu einer signifikanten Akkumulation der beiden Dihydroceramide im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib führte. Die Inhibitoren SLP und SLM hatten in Kombination mit Sorafenib keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Stimulation mit Sorafenib. Die alleinige Stimulation mit den Inhibitoren hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Bildung der Dihydroceramide im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 15A-D).

HepG2

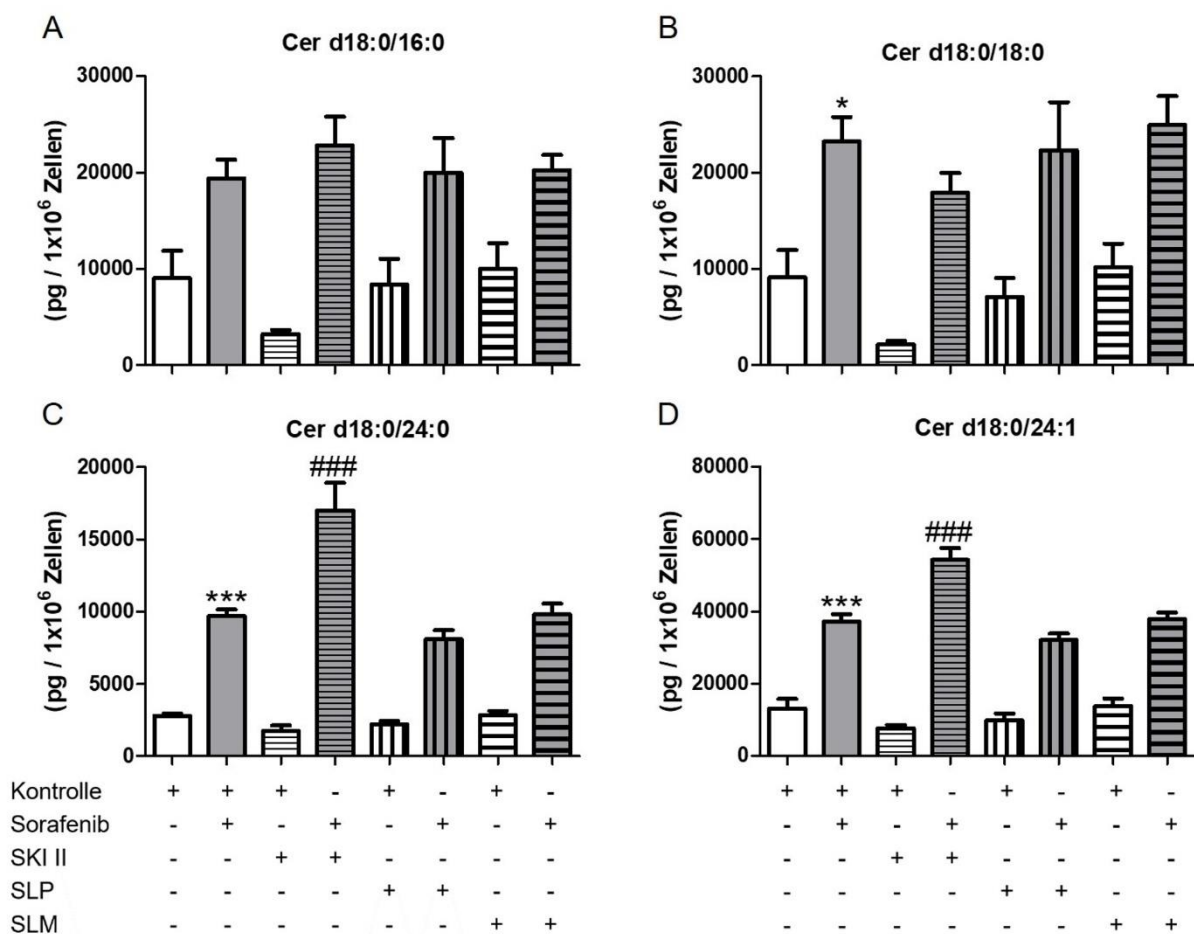


Abbildung 15: Einfluss von Sorafenib und SPHK-Inhibitoren auf die Konzentration von Dihydroceramiden der HepG2 Zellen. Die Lipide wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Die Zellen wurden mit oder ohne 10 μ M SKI II, 1 μ M SLP7111228 (SLP) oder 1 μ M SLM6031434 (SLM) für 2 h vorstimuliert, bevor das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μ M Sorafenib dazugegeben und für weitere 24 h inkubiert wurden. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. * P < 0,05, *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle und ### P < 0,001 im Vergleich zu Sorafenib, (n = 3). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

Bei den Huh7.5 Zellen konnte durch die Stimulation mit Sorafenib im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Akkumulation von Cer d18:0/18:0 und Cer d18:0/24:1

beobachtet werden (Abbildung 16B und Abbildung 16D). Beim Dihydroceramid Cer d18:0/18:0 konnte eine signifikante Reduktion der Konzentration nach Stimulation mit SKI II im Vergleich zur DMSO Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 16B). Wie auf den Abbildungen 17A bis 17D zu sehen ist, kam es bei allen Dihydroceramiden durch die Kombination von Sorafenib mit SKI II im Vergleich zur alleinigen Stimulation von Sorafenib, zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramid-Spiegel. Die Kombination von SLP und Sorafenib sowie von SLM und Sorafenib hatten im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib keinen signifikanten Effekt auf die Dihydroceramid-Spiegel.

Huh7.5

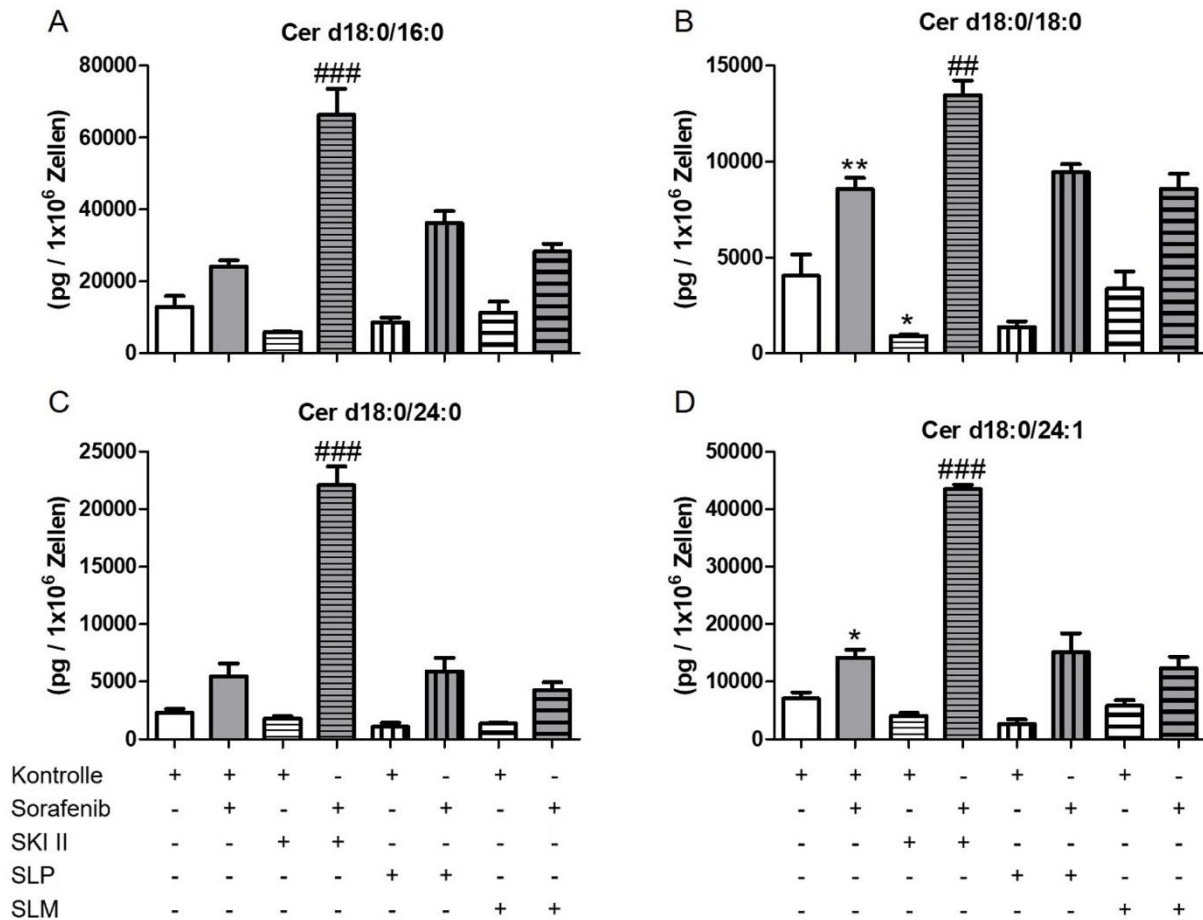


Abbildung 16: Einfluss von Sorafenib und SPHK-Inhibitoren auf die Konzentration von Dihydroceramiden der Huh7.5 Zellen. Die Lipide wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Die Zellen wurden mit oder ohne 10 μ M SKI II, 1 μ M SLP7111228 (SLP) oder 1 μ M SLM6031434 (SLM) für 2 h vorstimuliert, bevor das Vehikel (Kontrolle; 0,2 % DMSO) oder 5 μ M Sorafenib dazugegeben und für weitere 24 h inkubiert wurden. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. * P < 0,05, ** P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle und ## P < 0,01, ### P < 0,001 im Vergleich zu Sorafenib, (n = 3). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

3.1.3 Beeinflussung der Ceramid Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1

Bei den LC-MS/MS Messungen wurden auch die Ceramide Cer18:1/16:0, Cer18:1/18:0, Cer18:1/24:0 und Cer18:1/24:1 gemessen. Hierbei konnte bei den HepG2 Zellen kein Einfluss auf die Bildung dieser Ceramide durch Sorafenib und FB1 alleine beziehungsweise in Kombination festgestellt werden (Tab. 16).

Bei den Huh7.5 Zellen führte die Stimulation mit FB1 zu einer signifikant verringerten Bildung aller gemessenen Ceramide im Vergleich zur DMSO Kontrolle (Tab.: 16).

Tabelle 16: Ceramid-Spiegel (ng/1x10⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder FB1.

HepG2	Cer18:1/16:0		Cer18:1/18:0		Cer18:1/24:0		Cer18:1/24:1	
Kontrolle	22,4	± 3,24	3,32	± 0,71	31,2	± 3,17	116	± 19,6
Sorafenib	16,2	± 1,31	3,45	± 0,65	21,9	± 2,30	68,1	± 10,6
FB1	14,7	± 3,46	3,65	± 0,69	32,7	± 3,10	96,0	± 20,0
FB1 + Soraf	18,1	± 1,79	4,17	± 0,68	23,1	± 3,84	78,8	± 11,5
Huh7,5	Cer18:1/16:0		Cer18:1/18:0		Cer18:1/24:0		Cer18:1/24:1	
DMSO	19,9	± 5,81	3,37	± 0,57	11,1	± 1,17	26,9	± 6,05
Sorafenib	19,4	± 7,46	2,54	± 0,59	10,5	± 1,02	24,7	± 6,01
FB1	5,57	± 2,71 **	0,94	± 0,18 *	6,32	± 0,79	12,5	± 3,66 *
FB1 + Soraf	14,6	± 5,81	1,76	± 0,41	10,5	± 1,61	23,2	± 6,43

Konzentrationen von Ceramiden gemessen mittels LC-MS/MS nach Behandlung von HepG2- und Huh7,5-Zellen mit 5 µM Sorafenib (Soraf) und/oder 25 µM FB1 für 24 h. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM (n = 3-6) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. *P < 0,05, **P < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO).

3.1.4 Einfluss auf die S1P-, Sphingalin-1-Phosphat-, Sphingosin- und Sphingalin-Konzentrationen der HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und FB1

Des Weiteren wurden die Konzentrationen von S1P d18:1 (Sphingosin-1-Phosphat), S1P d18:0 (Sphingalin-1-Phosphat), SPH d18:1 (Sphingosin) und SPH d18:0 (Sphingalin) evaluiert. Bei den HepG2 Zellen kam es im Vergleich zur Kontrolle durch die Stimulation mit Sorafenib zu einer signifikanten Reduktion der S1P d18:1 Spiegel (Tab. 17). Durch die alleinige Stimulation mit FB1 kam es hier weiterhin zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Die gleichzeitige Stimulation mit Sorafenib und FB1 sorgte für signifikant verminderte Spiegel von S1P d18:1 im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 17). Zudem ist in Tabelle 17 zu sehen, dass es durch die Stimulation mit Sorafenib und FB1 zu einer signifikanten Steigerung im SPH d18:0 Spiegel der HepG2 Zellen kam (Tab. 17).

Bei den Huh7.5 Zellen führte die alleinige Stimulation mit FB1 zu einer signifikanten Erhöhung der S1P d18:1- und S1P d18:0 Spiegel im Vergleich zur DMSO-Stimulation (Tab.: 17). In Tabelle 17 ist außerdem zu sehen, dass die Stimulation mit Sorafenib und

FB1 zu einer signifikanten Erhöhung der SPH d18:0 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle führte.

Tabelle 17: Sphingolipid Spiegel (pg/1x10⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder FB1.

HepG2	S1P d18:1	S1P d18:0	SPH d18:1	SPH d18:0
Kontrolle	124 ± 14,2	28,6 ± 5,60	3059 ± 1509	660 ± 70
Sorafenib	50,6 ± 7,99 **	54,3 ± 11,0	1511 ± 782	1480 ± 286
FB1	182 ± 13,8 *	84,7 ± 17,9	4660 ± 2064	2048 ± 437
FB1 + Soraf	69,0 ± 11,6 *	196 ± 94,9	1864 ± 755	2842 ± 596 **
Huh7,5	S1P d18:1	S1P d18:0	SPH d18:1	SPH d18:0
Kontrolle	55,9 ± 11,1	52,8 ± 14,3	1040 ± 126	1033 ± 113
Sorafenib	64,4 ± 19,2	80,8 ± 25,4	674 ± 46,3	1339 ± 133
FB1	425 ± 79,3 ***	1898 ± 482 ***	1198 ± 159	2451 §
FB1 + Soraf	136 ± 57,7	410 ± 289	750 ± 100	2548 ± 536 *

Konzentrationen von Sphingolipiden gemessen mittels LC-MS/MS nach Behandlung von HepG2- und Huh7,5-Zellen mit 5 µM Sorafenib (Soraf) und/oder 25 µM FB1 für 24 h. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM (n = 3-6) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO). § Für SPH d18:0 in Huh7,5 Zellen, die mit FB1 behandelt wurden, konnte nur ein Experiment ausgewertet werden.

3.1.5 Einfluss auf die Ceramid-Konzentrationen von HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und den Sphingosinkinase-Inhibitoren

Die LC-MS / MS Messungen wurden ebenfalls nach der Stimulation der Zellen mit den SPHKs-Inhibitoren durchgeführt (siehe 2.2.5). Tabelle 18 zeigt, dass die gleichzeitige Stimulation mit SKI II und Sorafenib bei den HepG2 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Cer18:1/24:0 und Cer18:1/24:1 Konzentrationen im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib führte. Die Inhibitoren SLP und SLM hatten hier, ebenso wie Sorafenib, weder alleine noch in Kombination mit Sorafenib einen signifikanten Effekt auf die Ceramid-Konzentrationen der HepG2 Zellen.

Auch bei den Huh7.5 Zellen hatten SLP, SLM und das Sorafenib keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Ceramide (Tab. 18). Die Stimulation mit SKI II führte zu einer Reduktion der Cer18:1/18:0 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 18).

Die weiteren gemessenen Ceramide wurden von dieser Stimulation nicht beeinflusst, zudem hatte die gleichzeitige Stimulation mit SKI II und Sorafenib keinen Einfluss auf die Ceramide (Tab. 18).

Tabelle 18: Ceramid-Spiegel (ng/1x10⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder Inhibitoren der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2.

HepG2	Cer18:1/16:0	Cer18:1/18:0	Cer18:1/24:0	Cer18:1/24:1
Kontrolle	74.6 ± 18.7	27.5 ± 6.89	56.5 ± 4.05	162 ± 22.8
Sorafenib	89.8 ± 7.52	31.9 ± 2.57	65.6 ± 2.07	165 ± 8.27
SLP	78.6 ± 11.2	25.6 ± 5.43	54.0 ± 1.22	151 ± 10.4
Soraf + SLP	107 ± 20.7	45.5 ± 8.10	72.5 ± 13.9	183 ± 33.0
SLM	96.9 ± 14.9	35.0 ± 7.32	70.2 ± 4.97	184 ± 17.3
Soraf + SLM	101 ± 11.0	37.3 ± 1.59	69.6 ± 3.41	180 ± 9.16
SKI II	32.0 ± 1.75	8.60 ± 1.18	39.7 ± 7.42	91.5 ± 12.3
Soraf + SKI II	35.3 ± 0.93	11.9 ± 0.76	37.5 ± 2.23 #	82.9 ± 4.28 #
Huh7,5				
Kontrolle	43.8 ± 6.61	4.27 ± 0.95	20.8 ± 6.01	26.1 ± 1.46
Sorafenib	39.9 ± 6.59	3.59 ± 0.63	16.3 ± 3.02	21.2 ± 2.84
SLP	42.7 ± 11.2	2.84 ± 1.03	26.6 ± 13.8	25.7 ± 5.75
Soraf + SLP	49.1 ± 10.7	3.87 ± 0.45	18.1 ± 4.62	23.8 ± 5.47
SLM	41.7 ± 6.22	4.37 ± 1.07	19.6 ± 3.36	24.9 ± 1.39
Soraf + SLM	38.7 ± 6.20	3.06 ± 0.18	15.5 ± 2.51	19.7 ± 3.07
SKI II	23.4 ± 3.14	1.09 ± 0.12 *	19.1 ± 2.72	19.3 ± 2.05
Soraf + SKI II	44.8 ± 6.61	3.25 ± 0.48	19.8 ± 3.36	23.3 ± 2.47

Konzentrationen von Ceramiden gemessen mittels LC-MS/MS nach Behandlung von HepG2- und Huh7,5-Zellen mit 5 µM Sorafenib (Soraf) und/oder 1 µM SLP7111228 (SLP), 1 µM SLM6031434 (SLM) und 10 µM SKI II für 24 h. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM (n = 3-4) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. *P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (0,2 % DMSO); #P < 0,05 im Vergleich zu Sorafenib.

3.1.6 Einfluss auf die S1P-, Sphingalin-1-Phosphat-, Sphingosin- und Sphingalin-Konzentrationen der HepG2 und Huh7.5 Zellen durch Sorafenib und den Sphingosinkinase-Inhibitoren

Die alleinige Stimulation der HepG2 Zellen mit Sorafenib, SKI II, SLP oder SLM sowie die Kombination der Inhibitoren mit Sorafenib zeigte keine signifikante Effekte auf die Spiegel von S1P d18:1, S1P d18:0, SPH d18:1 und SPH d18:0.

Bei den Huh7.5 Zellen beeinflusste die alleinige Stimulation mit Sorafenib, SKI II, SLP oder SLM die gemessenen Sphingolipide nicht (Tab. 19). Die gleichzeitige Stimulation mit Sorafenib und SKI II führte im Vergleich zur Sorafenib-Behandlung zu einer signifikant verstärkten Akkumulation von S1P d18:0 (Tab. 19). Wie in Tabelle 19 darüber hinaus zu sehen ist, kam es durch die gleichzeitige Stimulation mit Sorafenib und SLP beziehungsweise SLM zu einer Verminderung der Bildung von S1P d18:1. Hierbei waren die Spiegel zu gering für eine Messung. Bei der Stimulation mit Sorafenib und SLP war dies ebenfalls bei der Messung des S1P d18:0 der Fall.

Tabelle 19: Sphingolipid-Spiegel (pg/1x10⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder Inhibitoren der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2.

HepG2	S1P d18:1	S1P d18:0	SPH d18:1	SPH d18:0
Kontrolle	204 ± 70.2	61.8 ± 12.4	3446 ± 73.2	1267 ± 145
Sorafenib	67.9 ± 13.3	60.8 ± 10.3	3374 ± 464	1965 ± 285
SLP	206 ± 72.1	44.5 ± 7.07	3713 ± 69.9	1266 ± 130
Soraf + SLP	44.2 ± 6.9	27.5 ± 5.51	4226 ± 659	1892 ± 274
SLM	184 ± 64.9	43.8 ± 7.56	4754 ± 177	1616 ± 71.2
Soraf + SLM	66.4 ± 14.9	51.0 ± 5.57	3783 ± 523	2037 ± 223
SKI II	284 ± 58.7	62.3 ± 11.1	4000 ± 837	1363 ± 249
Soraf + SKI II	102 ± 24.8	86.5 ± 21.1	2314 ± 60.6	1794 ± 73.3
Huh7,5				
Kontrolle	33.7 ± 15.7	60.2 ± 24.3	1555 ± 247	1533 ± 176
Sorafenib	14.6 ± 2.04	34.8 ± 9.43	1006 ± 155	1707 ± 157
SLP	21.2 ± 7.76	21.9 ± 5.58	2566 ± 655	1856 ± 368
Soraf + SLP	< LLOQ	< LLOQ	1313 ± 298	2011 ± 336
SLM	21.6 ± 8.69	30.2 ± 11.1	1525 ± 21.8	1307 ± 30.2
Soraf + SLM	< LLOQ	19.0 ± 2.99	898 ± 124	1550 ± 161
SKI II	61.2 ± 3.61	78.9 ± 4.32	1885 ± 188	2078 ± 223
Soraf + SKI II	30.4 ± 3.26	91.7 ± 7.61 #	1197 ± 153	2531 ± 264

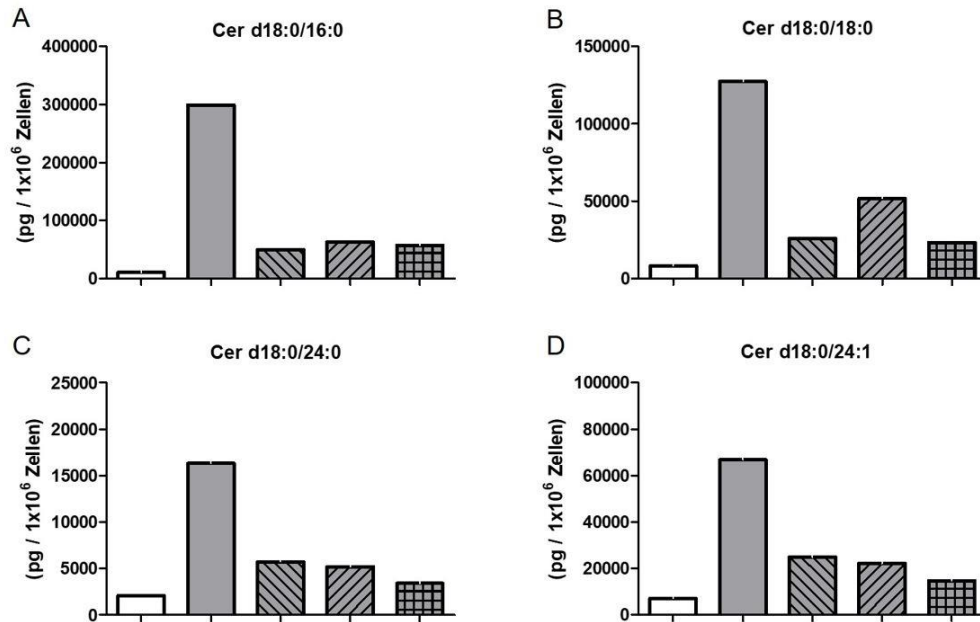
Konzentrationen von Sphingolipiden gemessen mittels LC-MS/MS nach Behandlung von HepG2- und Huh7,5-Zellen mit 5 µM Sorafenib (Soraf) und/oder 1 µM SLP7111228 (SLP), 1 µM SLM6031434 (SLM) und 10 µM SKI II für 24 h. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM (n = 3-4) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine „One-way“-Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem Bonferoni-Test durchgeführt. #P < 0,05 im Vergleich zu Sorafenib. <LLOQ, unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze.

3.2 Einfluss von oxidativem Stress auf die Dihydroceramid-Konzentrationen

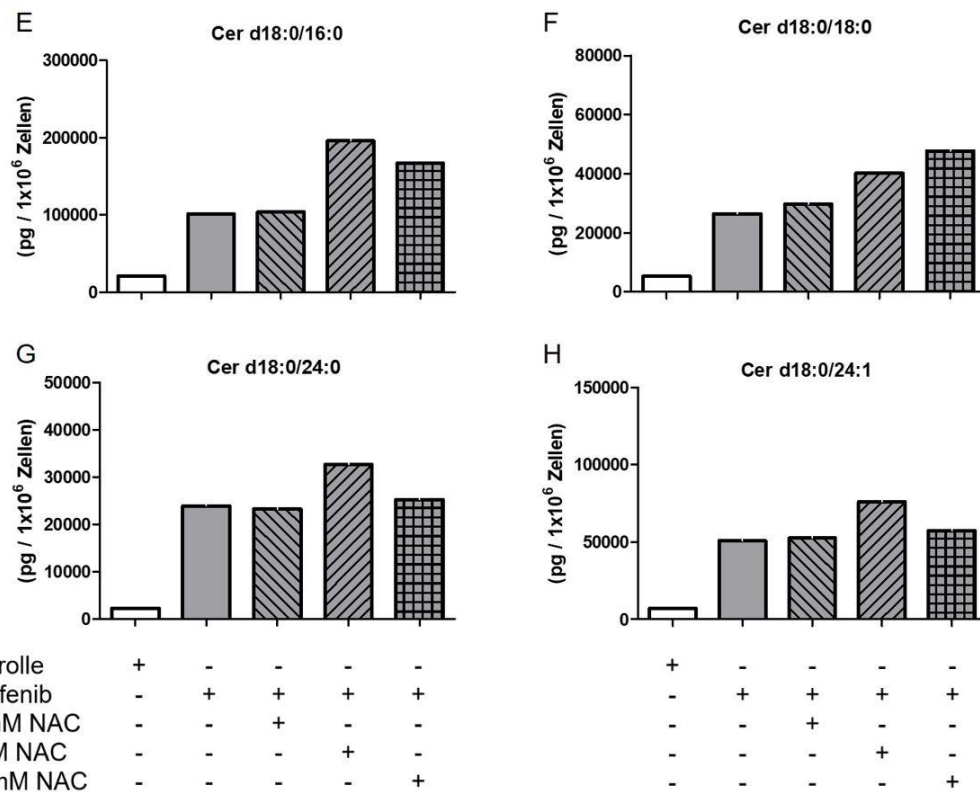
Um zu untersuchen, ob oxidativer Stress eine Rolle bei der Akkumulation der Dihydroceramide spielt, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) für 1 h vorstimuliert.

Die Vorbehandlung der Zellen konnte den Dihydroceramid Spiegel der Zellen nicht signifikant verändern (Abbildung 17A-H). Bei den HepG2 Zellen scheint es eine nicht signifikante Tendenz für eine verminderte Bildung von Dihydroceramiden mit NAC Vorstimulation zu geben (Abbildung 17A-D).

HepG2



Huh7.5



Kontrolle	+	-	-	-	-
Sorafenib	-	+	+	+	+
10 mM NAC	-	-	+	-	-
1 mM NAC	-	-	-	+	-
0,1 mM NAC	-	-	-	-	+

+	-	-	-	-
-	+	+	+	+
-	-	+	-	-
-	-	-	+	-
-	-	-	-	+

Abbildung 17: Einfluss von NAC auf die durch Sorafenib vermittelte Dihydroceramid-Akkumulation in HepG2- und Huh7,5-Zellen. Die Lipide wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Die Zellen wurden mit 10 mM, 1 mM oder 0,1 mM NAC für 1 h vorstimuliert, bevor 5 μ M Sorafenib dazugegeben und für weitere 24 h inkubiert wurde. Die Daten stammen aus 1-2 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Für d18:0/16:0 in HepG2-Zellen, die mit Sorafenib behandelt wurden, 10 mM + Sorafenib, 0,1 mM + Sorafenib. Für d18:0/16:0 in Huh7,5-Zellen, die mit 10 mM + Sorafenib behandelt wurden, und d18:0/18:0, die mit 10 mM + Sorafenib behandelt wurden, konnte nur ein Experiment ausgewertet werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der HCC Zelllinien HepG2 und Huh7.5 mit Sorafenib den Sphingolipid-Stoffwechsel beeinflusst. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass FB1 und SKI II in der Lage sind die Proliferation der Zellen stärker zu beeinflussen als die Sorafenib-Behandlung. Sowohl die beobachteten Effekte von Sorafenib auf die Proliferation, scheinen jedoch unabhängig von den beobachteten Einflüssen auf den Sphingolipid-Stoffwechsel zu sein. Auch die starken Effekte von FB1 und SKI II auf die Proliferation konnten nicht mit Veränderungen der jeweils entsprechenden Sphingolipid-Metabolite in kausale Verbindung gebracht werden.

4.1 Verminderte mRNA-Expression durch Sorafenib-Stimulation

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Sorafenib-Stimulation in HepG2 und Huh7.5 Zellen zu einer verminderten mRNA-Expression verschiedener regulierender Enzyme des Sphingolipid Stoffwechsels führte. Dieser Effekt war nach 24 h am stärksten ausgeprägt (Abbildung 6 und Abbildung 7).

Bei beiden Zelllinien kam es nach 24 h Sorafenib-Stimulation zu einer verminderten DEGS-1 mRNA-Expression. Passend zu diesem Ergebnis waren auch bei beiden Zelllinien die massenspektrometrisch gemessenen Dihydroceramid-Konzentrationen erhöht (Abbildung 14 und Abbildung 15). Da die DEGS-1 die Bildung von Ceramiden aus Dihydroceramide über den *de novo* Syntheseweg katalysiert, könnten die eben erwähnten Beobachtungen der mRNA-Expression eine mögliche Erklärung hierfür sein.

Allerdings zeigen die Daten unserer Studie Unterschiede zwischen der beobachteten Verminderung der mRNA-Expression und den gemessenen Konzentrationen der bioaktiven Sphingolipid-Metabolite. Obwohl es in beiden Zelllinien zu einer verminderten mRNA-Expression von SPHK1 und SPHK2 kam, spiegelte sich dies nicht in den S1P-Konzentrationen wider.

Obwohl die mRNA-Expression von ASA2 ist in beiden Zelllinien vermindert ist, kommt es jedoch zu keinem Einfluss auf die Ceramid-Spiegel. Dies könnte auch dadurch erklärt werden, dass die mRNA-Expression von ASA1, einer Isoform des Enzyms, nicht verändert wird und es somit über ASA1 zur Degradation von Ceramid zu Sphingosin kommen könnte. Allerdings sind auch die Sphingosin-Konzentrationen der mit Sorafenib stimulierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich zur DMSO Kontrolle.

Cervello et al. (2012) untersuchten den Einfluss von Sorafenib auf die Genexpression von HepG2- und Huh7-Zellen. Hierbei wurde jedoch nicht explizit auf die Enzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels eingegangen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Expression von S1C1 in beiden Zelllinien hochreguliert wird. Bei der vorliegenden Arbeit war die mRNA-Expression dieses Gens in den HepG2 Zellen jedoch nach 24 h unverändert. Bei den Huh7.5 Zellen war die mRNA Expression nach 24 h sogar signifikant herunterreguliert. Diese Unterschiede beider Arbeiten könnten dadurch zu erklären sein, dass Cervello et al. eine Sorafenib Konzentration von 7,5 μM verwendeten und die Zellen für 48 h stimulierten. In dieser Arbeit wurden die Zellen hingegen für 24 h mit 5 μM Sorafenib stimuliert.

Des Weiteren muss bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden, dass Sorafenib ein bekannter Multikinasen-Inhibitor ist (Llovet et al. 2008), und unter anderem auch die Phosphorylierung von ERK hemmt (Liu et al. 2006; Zhang et al. 2017). ERK wird jedoch benötigt, um die SPHK1 aus dem Zytosol an die Plasmamembran zu verlagern, wodurch diese erst phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Pitson et al. 2003). Somit könnte der Einfluss von Sorafenib auch auf die mRNA-Expression der anderen Enzyme nicht direkt, sondern über weitere Signalwege vermittelt werden. Dies wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Es ist außerdem nach 24 h zu beobachten, dass die mRNA-Expression der meisten gemessenen Enzyme signifikant herunterreguliert war. Die Ergebnisse des DNA-Fragmentierungs ELISA und der Proliferation zeigen jedoch, dass die Zellen generell

in keinem guten Allgemeinzustand sind. Es ist dadurch nicht eindeutig, ob die mRNA Expression zu diesem Zeitpunkt noch einen Einfluss auf den Sphingolipid-Stoffwechsel hat. Weiter wäre es denkbar, dass die verminderte mRNA-Expression nicht direkt durch die Stimulation mit Sorafenib ausgelöst wird. Der verminderte Stoffwechsel und der schlechte Allgemeinzustand der Zellen könnten sich auch negativ auf die mRNA-Expression auswirken.

In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob sich der Einfluss von Sorafenib auf die mRNA-Expression auch auf Protein- und Aktivitätsebene nachweisen lässt. Es ist daher denkbar, dass sich die Veränderungen der mRNA-Expression dieser Enzyme nicht zwangsläufig auf ihre Proteinexpression oder Aktivität auswirken. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung dafür sein, dass sich die hier beobachteten Effekte nicht eindeutig auf die Produktmessung mit LC-MS/MS Messungen ausgewirkt haben.

4.2 Hemmung der Phosphorylierung von ERK durch Sorafenib

In der vorliegenden Arbeit konnte in beiden Zelllinien bestätigt werden, dass Sorafenib die Phosphorylierung von ERK hemmt (Abbildung 8). Dies ist bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden (Liu et al. 2006; Zhang et al. 2017). Es wurde weiter von Zhang et al. (2009b) postuliert, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsstatus von ERK und der Effizienz der Sorafenib Stimulation gibt. Dies konnten die Autoren in den vier HCC Zelllinien SMMC-7721, MHCC97-L, MHCC97-H und HCCLM6 nachweisen.

Es gibt jedoch auch Arbeiten die zeigen, dass Sorafenib auch unabhängig von pERK über andere Signalwege wirken kann z.B. über den HIF-1 α /VEGFA Signalweg (Xu et al. 2014) oder über Inhibition von Akt (Serrano-Oviedo et al. 2018).

Interessanterweise kam es in den von mir untersuchten beiden Zelllinien durch die Stimulation mit FB1 zu einer starken Erhöhung von pERK (Abbildung 8). Dass FB1 in der Lage ist, ERK zu phosphorylieren, wurde bereits von Wattenberg et al. (1996) in Maus Fibroblasten (3T3 Zellen) gezeigt. Hier kam es bereits nach 10 Minuten zu einer

gesteigerten Phosphorylierung. Weiter postulierten die Autoren, dass FB1 unabhängig von der Akkumulation von Sphingosin und Sphinganin in der Lage ist, direkt die beobachtete Phosphorylierung von ERK zu induzieren. Ähnliches konnten Pinelli et al. (1999) in menschlichen bronchialen Epithel Zellen (W126 VA) zeigen. Hier kam es ebenfalls 5 Minuten nach der FB1-Stimulation zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK. Diese hatte nach einer Stunde ihr Maximum erreicht und wurde bis 24 h nach der Stimulation kontinuierlich weniger. Interessanterweise konnten die Autoren hier nach 2 h auch einen intra- und extrazellulären Anstieg von Sphingosin und Sphinganin feststellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die FB1 Stimulation nach 24 h zu einer Akkumulation von S1P gekommen ist (Tab. 17). Da (Pinelli et al. 1999) bereits nach 2 h einen signifikanten Anstieg von Sphingosin gemessen hatten, wäre es möglich, dass es in den HepG2- und Huh7.5-Zellen ebenfalls zu diesem früheren Zeitpunkt zu einer Akkumulation von S1P gekommen ist. Dies könnte ebenfalls Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK gehabt haben. Es ist bekannt, dass S1P nicht nur intrazellulär wirkt, sondern auch als „*second messenger*“ über 5 G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren (S1PR1-5) Einfluss auf Zellen haben kann (Payne et al. 2002; Sanchez und Hla 2004). Es gibt bereits Arbeiten, die postuliert haben, dass die ERK-Aktivierung vor allem über den S1PR2 vermittelt wird. Dies konnte in primären Nagetier-Hepatozyten (Studer et al. 2012), BDEsp-TDE_{H10} und CCLP1 Zellen (Gallengangkarzinom-Zellen, (Liu et al. 2014) sowie auch in IEC-6 Zellen (Darmepithelzellen) gezeigt werden (Chen et al. 2017). Interessanterweise konnten Sato et al. (2016) nachweisen, dass die Expression der mRNA des S1PR2 in Patienten mit HCC erhöht war. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die vermehrte Bildung von S1P nach FB1-Stimulation auch zu einem erhöhten Transport von S1P aus der Zelle führte. Dies könnte wiederum zu einer verstärkten Bindung an die S1PR und damit auch an den S1PR2 führen. Was wiederum zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK führen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass Sorafenib die Phosphorylierung von ERK signifikant hemmt. Dies scheint jedoch keine Auswirkung auf die S1P-Konzentrationen in den Zellen zu haben, da diese nicht signifikant verringert waren. Somit konnte nicht aufgezeigt werden, dass Sorafenib über die Hemmung der Phosphorylierung von ERK einen Einfluss auf die S1P-Konzentration hat.

Ob es schon nach 2 h zu einer Akkumulation von S1P durch FB1 sowie dessen verstärkter Ausschleusung gekommen ist, wurde in dieser Arbeit nicht näher betrachtet. Durch Messung der S1P-Transporter-Aktivitäten könnte der Einfluss von FB1 auf diese untersucht werden. Des Weiteren könnte der Zusammenhang zwischen dem S1PR2 und der Phosphorylierung von ERK ermittelt werden. Eine Möglichkeit diesen Zusammenhang zu untersuchen, wäre die Stimulation mit dem S1PR2-Antagonisten JTE-013. Ob der Effekt von FB1 Sphingolipid abhängig war, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Um dies zu testen, könnten die Zellen mit Miryocin vorstimuliert werden. Durch Miryocin wird SPT (Serin-Palmitoyltransferase) inhibiert, welches das erste Enzym der Sphingolipid Biosynthese ist. Durch dessen Hemmung könnte der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von ERK durch FB1 und dem Sphingolipid-Stoffwechsel näher untersucht werden.

4.3 Zusammenhänge zwischen Proliferation und Apoptose- Nekrose- Rate der HepG2 und Huh7.5 Zellen

4.3.1 Sorafenib

Es war zu erwarten, dass Sorafenib Apoptose induziert (Abbildung 12A und Abbildung 12B), da dies bereits mehrfach gezeigt wurde (Liu et al. 2006; Tomizawa et al. 2010; Garten et al. 2019). Diese Ergebnisse konnten mit dem hier durchgeführten DNA-Fragmentierungs ELISA für beide Zelllinien bestätigt werden (Abbildung 12).

Anhand der Apoptose-Daten wäre es zu erwarten gewesen, dass Sorafenib die Proliferation in beiden Zelllinien signifikant reduziert. Dies konnte jedoch bei den

ersten Messungen nur in den HepG2 Zellen festgestellt werden (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dies könnte durch die bekannte intratumorale Heterogenität vom HCC erklärt werden (Xue et al. 2016), wobei bereits gezeigt wurde, dass diese signifikante Heterogenität der HCCs auch für das unterschiedliche Ansprechen auf eine Sorafenib-Behandlung verantwortlich sein kann (Xu et al. 2019).

Zusammenfassend könnte die in dieser Arbeit gezeigten Effekte von Sorafenib sich auf dessen verschiedene Wirkmechanismen zurückführen lassen:

Zum einen ist Sorafenib dafür bekannt die Phosphorylierung von ERK zu hemmen, was in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte (Abbildung 8A und Abbildung 8B). Der Phosphorylierungs-Status von ERK kann entscheidend sein, da der Raf/Ras-Signalweg gerade auch in Krebszellen eine wichtige Rolle in der Zellviabilität spielt und dieser von Sorafenib gehemmt wird (Leicht et al. 2007; Newell et al. 2009; Whittaker et al. 2010). Es konnte weiter gezeigt werden, dass Sorafenib direkt am „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) bindet und diesen blockiert, wodurch es zu einer Verminderung der gesamte RAF/RAS/MEK/ERK Signalkaskade kommt (Wilhelm et al, 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Sorafenib in der Lage ist die ROS-Produktion in HepG2 Zellen (Chiou et al. 2009) und Huh7.5 Zellen zu verstärken (Louandre et al. 2013). Weiter scheint Sorafenib auch eine toxische Wirkung auf Mitochondrien zu haben (Will et al. 2008; Zhang et al. 2017).

Es konnte weiter gezeigt werden, dass Sorafenib einen unterschiedlichen Effekt auf den Zellzyklus von verschiedenen Tumorzelllinien hat. So führte es zu einem Zellzyklus-Arrest in PC3, Hela, Calu6 und U205 Zellen, während es in Bax^{-/-}HCT116, HT29, SKOV3 und H460 Zellen den Zellzyklus nicht beeinflusste (Plastaras et al. 2007). Tomizawa et al. (2010) konnten weiter zeigen, dass die Stimulation von HLF Zellen mit Sorafenib ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest führt. Hierbei verwendeten die Autoren jedoch 10 μ M Sorafenib. In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob 5 μ M Sorafenib ausreichen, um in den HepG2 und Huh7,5 einen Zellzyklus-Arrest auszulösen.

4.3.2 Fumonisin B1

Die Ergebnisse der Apoptose- und Proliferation-Messungen nach FB1 Stimulation stimmen nicht vollständig mit den Erwartungen überein. So konnte gezeigt werden, dass FB1 die Proliferation der Zellen (Abbildung 9 und Abbildung 10) negativ beeinflusst. Der DNA-Fragmentierungs-ELISA konnte jedoch keine vermehrte Apoptose oder Nekrose in den Zellen nachweisen (Abbildung 12).

Es gibt jedoch bereits Studien, die gezeigt haben, dass FB1 in der Lage ist, die Apoptose in verschiedenen Zelllinien zu induzieren. Seefelder (2003) konnte dies an IHKE-Zellen (menschliche proximale Tubulus Zellen) nachweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von SNO-Zellen mit 1,25 μM FB1 zur Induktion von Apoptose führt (Khan et al. 2018). Auch die Stimulation von Ges-1-Zellen mit FB1 führt zu einer erhöhten Apoptose (Yu et al. 2020). Es ist ebenfalls bekannt, dass FB1 in der Lage ist, oxidativen Stress sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu induzieren. So konnten Kim et al. (2018) eine Induktion von oxidativem Stress durch FB1 im Darm von Mäusen nachweisen. Auch in Schweine-Iliaca-Endothelzellen (PIEC) konnte dieser Effekt von FB1 nachgewiesen werden (Yuan et al. 2019).

Eine mögliche Erklärung für die hier beobachtenden Effekte von FB1 könnte weiter sein, dass FB1 einen Zellzyklus-Arrest bewirkt hat. So konnten Ciacci-Zanella et al. (1998) zeigen, dass die Stimulation mit 5 μM FB1 bereits ausreichte, um einen Zellzyklus-Arrest in CV-1 Zellen zu bewirken. Weiter konnten Bondy et al. (2000) zeigen, dass die Gabe von FB1 bei SD-Ratten zu Veränderungen in der Expression von Genen führt, welche mit dem Zellzyklus assoziiert sind. Auch die Stimulation der Ratten Hirngliom-Zelllinie C6 mit FB1 führte zu einem Zellzyklus-Arrest (Mobio et al. 2000). Da wir in dieser Arbeit eine Reduktion der Proliferation (Abbildung 9) beobachten konnten, ist ein Zellzyklus-Arrest in den HepG2 und Huh7.5 Zellen durchaus möglich.

Neben einem Zellzyklus-Arrest könnten auch andere Einflüsse von FB1 Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen haben. So konnte unter anderem gezeigt

werden, dass FB1 die Expression von Cytochrom P450 wesentlich beeinflusst, was wiederum Einfluss auf wichtige funktionelle Signalwege im HCC *in vitro* hat (Mary et al. 2017). Somit könnten die Effekte von FB1 auf das Cytochrom P450 sowie auf den Zellzyklus eine stärkere Auswirkung auf die Zellen gehabt haben, als die von Sorafenib vermittelten Auswirkungen. Weiter könnte dies zu einer verminderten Zellzahl zum Messzeitpunkt geführt haben. Somit könnten die geringere Apoptoserate auch von einer geringeren Zellzahl verursacht worden sein.

Die hier beobachteten Ergebnisse schienen zunächst auch widersprüchlich zur ursprünglichen Annahme gewesen zu sein, dass FB1 durch Hemmung der Ceramidsynthese eher eine protektive Wirkung auf die Zellen hätte. Wang et al. (1991) konnten in Ratten-Hepatozyten zeigen, dass FB1 ein Ceramid-Synthase-Inhibitor ist. Dies konnte unter anderem von Merrill et al. (1993) in kultivierten Maus Neuronen *in Situ* bestätigt werden, wobei eine verminderte Ceramid-Bildung beobachtet wurde. Es ist weiter bekannt, dass Ceramide in der Lage sind, die Apoptose und den Zelltod zu induzieren. So konnten (Barak et al. 2001) zeigen, dass es durch die Induktion von Apoptose in menschlichen retinalen Pigmentepithelzellen zu einer vermehrten Bildung von Ceramiden kommt. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit synthetischem C2- und C6-Ceramid ebenfalls zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen führt. Ähnliches konnten Taniwaki et al. (1999) in unreifen zerebellaren Körnerzellen zeigen. Daher wurde bei meiner Arbeit zunächst davon ausgegangen, dass die Stimulation mit FB1 eher einen protektiven Effekt auf die HepG2 und Huh7.5 Zellen hat. Was jedoch nicht der Fall zu sein scheint.

Wie man anhand der LC/MS-MS Messungen sehen kann, kam es in den HepG2 Zellen zu keiner Beeinflussung der Ceramid-Konzentration durch FB1. In den Huh7.5 Zellen führte FB1 zum Teil zu einer signifikanten Reduzierung der Ceramid-Konzentration. Dies könnte bedeuten, dass die hier verwendete Konzentration von FB1 gegebenenfalls nicht ausreichend hoch war, um zumindest bei den HepG2 Zellen einen Effekt zu verursachen.

Weiter zu beachten ist, dass in der vorliegenden Arbeit nur 2 Proliferationsversuche mit FB1 ausgewertet wurden und daher kein statistischer Test durchgeführt werden konnte. Nichts desto weniger zeigen die Ergebnisse, vor allem bei den HepG2 Zellen, eine klare Tendenz. In den HepG2 Zellen hat FB1 einen stärkeren Effekt auf die Proliferation als Sorafenib, was in den Huh7.5 Zellen nicht eindeutig zu erkennen ist (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dieser Effekt könnte ebenfalls durch die bereits erwähnte Heterogenität erklärt werden. Es konnte weiter beobachtet werden, dass es keinen Unterschied machte, ob die Zellen mit FB1 alleine oder in Kombination mit Sorafenib stimuliert wurden. Bei den HepG2 Zellen könnte es auf eine bereits maximale Hemmung der Proliferation durch FB1 alleine zurückzuführen sein, sodass Sorafenib keine weitere Inhibition auslösen konnte. Bei den Huh7.5 Zellen hingegen könnte dies implizieren, dass FB1 und Sorafenib über verschiedene Signalwege wirken, die sich nicht gegenseitig beeinflussen. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

4.3.3 SKI II

Auch der unspezifische SPHK-Inhibitor SKI II zeigte nicht immer die erwarteten Wirkungen. Die starken Effekte von SKI II auf die Proliferation der Zellen (Abbildung 9 und Abbildung 10) waren zwar zu erwarten gewesen, schienen aber zunächst widersprüchlich zu den Apoptose -Messungen zu sein.

Die Stimulation der HepG2 und Huh7.5 Zellen mit SKI II führte zu einer stärkeren Verminderung der Proliferation als mit Sorafenib (Abbildung 9 und Abbildung 10). Wie French et al. (2003) bereits bei der Synthese von SKI II zeigen konnten, induziert SKI II Apoptose in Harnblasenkarzinom-Zellen (T24) und vermindert das Tumorwachstum und Tumolvolumen in einem Adenokarzinom Mausmodell ohne die Tiere weiter zu belasten. (French et al. 2006) konnten diese Ergebnisse in einer erweiterten Versuchsreihe nochmals bestätigen. Hierbei zeigten sie, dass die intraperitoneale Gabe von SKI II sowohl im Blut als auch im Tumor effektive Konzentrationen erreichte. Ähnliches konnten Bhat et al. (2019) in Merkelzell

Karzinomzellen (MKL-1 und WaGa) sowie auch in Mausmodellen beider Zelllinien beobachten. SKI II zeigte in dieser Studie ebenfalls einen stärkeren Effekt auf die Proliferation als Sorafenib.

Interessanterweise konnte SKI II in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte Apoptose oder Nekrose in den Zelllinien induzieren (Abbildung 12). Dies kontrastiert mit den Befunden, dass SKI II Apoptose in HL-60- und U937-Zellen (Yang et al. 2015), in RNK-16 und NKL-Zellen (LeBlanc et al. 2015) sowie in HeLa- und SiHa-Zellen (Kim et al. 2015) induziert. Auch konnten (Li et al. 2014) zeigen, dass die Stimulation von SGC7901, einer Magenkarzinomzelllinie, mit SKI II zu einer verringerten Zellviabilität und vermehrter Apoptose führt. Dies konnte ebenfalls in Mamakarzinomzellen nachgewiesen werden (Antoon et al. 2012).

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchliche Beobachtungen könnte sein, dass SKI II einen Zellzyklus-Arrest induziert. Li et al. (2014) konnten dies in SGC7901-Zellen nachweisen. Es konnte weiter gezeigt werden, dass SKI II in der Lage ist, einen Zellzyklus-Arrest auch in A498-Zellen zu induzieren (Gao et al. 2012).

Neben einem Zellzyklus-Arrest könnten auch andere Einflüsse von SKI II Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen gehabt haben.

So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von HepG2-Zellen mit 5 μ M SKI II die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 5-Fluorouracil erhöhen kann. Zusätzlich führt die gleichzeitige Verabreichung von 5-Fluorouracil und SKI II zu einer reduzierten Expression von Sirtuin-1 (Sirt1), dem phosphorylierten insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor β (IGF1R β , „*insulin-like growth factor 1 receptor beta*“) und von Osteopontin (Grbčić et al. 2017).

Diese Proteine scheinen für Krebszellen wichtige Mediatoren für das Zellwachstum, die Chemoresistenz, die Metastasierung und die Invasion zu sein. So konnten Tian et al. (2013) zeigen, dass der „*Knockdown*“ des IGF1 („*insulin-like growth factor 1*“) zur Induktion der Apoptose, verminderter Proliferation und Koloniebildung in

Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellen führt. Weiter konnten die Autoren in einem Xenograft-Model zeigen, dass die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin zu einer verbesserten Hemmung des Tumorwachstums führt, wenn den Mäusen die „*Knockdown*“ Zellen injiziert wurden. Weiter konnten Wang et al. (2018) zeigen, dass die Kombination aus Sorafenib und dem IGF1-Inhibitor Ceritinib die Effekte von Sorafenib auf das Zellwachstum und das Überleben von Hep3B, HepG2 und Huh7 Zellen verstärkte. Auch *in vivo* kam es hierbei ohne Einfluss auf das Gewicht der Mäuse zu einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums durch die Kombination aus Sorafenib und Ceritinib. Osteopontin scheint ebenfalls eine wichtige Rolle für das HCC zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Osteopontin verstärkt in HCC Biopsien exprimiert wird. Es wurde in dieser Studie weiter gezeigt, dass der Gehalt an Osteopontin in Metastasen höher ist, als in nicht metastasierendem HCC. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verminderung von Osteopontin mittels siRNA in HCC-LM3-Zellen zu einer verminderten Koloniebildung sowie Invasionsfähigkeit führt (Lin et al. 2011). Ähnliches konnten Zhao et al. (2008) in HCC-LM3 und HepG2 Zellen zeigen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Verminderung von Osteopontin mittels shRNA („*short-hairpin RNA*“) zu einer mitochondrial vermittelten Apoptose führt und es *in vivo* zusammen mit 5-FU zu einem stark verminderten Tumorwachstum kommt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch Sirt1 eine wichtige Rolle im HCC zu spielen scheint. Choi et al. (2011) konnten nachweisen, dass Sirt1 in 56% der Leberbiopsien von HCC-Patienten überexprimiert ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Sirt1-Expression nach siRNA-Behandlung zu einer verminderten Proliferation und zu vermindertem Wachstum von HepG2-Zellen, über einen Zellzyklus-Arrest, führt. Chen et al. (2011) konnten ähnliche Effekte eines Sirt1-„*Knockdown*“ auf das Zellwachstum in verschiedenen HCC-Zelllinien nachweisen. Zudem waren die Zellen hierbei sensibler gegenüber der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass SKI II eine Reduktion der β -Catenin-Expression verursacht, welche wiederum zu einer verminderten

Transkription der Protoonkogene c-Myc und Cyclin D1 in HCC-Zellen führt (Liu et al. 2016a). Somit könnte der Einfluss von SKI II auf diese Signalwege einen stärkeren Effekt auf das Wachstum der Zellen gehabt haben als der von Sorafenib vermittelte Zellzyklus-Arrest. Dies könnte ähnlich wie bei FB1 auch zu einer veränderten Zellzahl geführt haben was sich auf die Apoptose-Messung ausgewirkt haben könnte.

4.3.4 SLP und SLM

Unsere Untersuchungen zeigten, dass SLP und SLM die Proliferation von HepG2 Zellen leicht vermindern und die gleichzeitige Stimulation mit Sorafenib diesen Effekt nicht verstärkt (Abbildung 9). In den Huh7.5 Zellen konnten die Inhibitoren alleine die Proliferation nicht beeinflussen (Abbildung 10). Somit scheint die Stimulation mit SPHK1- und SPHK2-Inhibitoren keine Verbesserung der Sorafenib-Therapie zu bewirken. Diese Ergebnisse passen nicht zu der Annahme, dass SPHK1 und SPHK2 wichtige Mediatoren des Wachstums und der Proliferation der HepG2 und Huh7.5 Zellen sind.

Es ist bekannt, dass sowohl die SPHK1 als auch die SPHK2 in Tumoren überexprimiert werden können, was wiederum Einfluss auf das Tumorwachstum haben kann. Zhang et al. (2016) konnten zeigen, dass sowohl die mRNA als auch der Proteingehalt der SPHK2 im Darmkrebsgewebe stärker exprimiert wurden, als im gesunden Gewebe. Auch in der Darmkrebszelllinie LoVo konnte hier eine Überexpression festgestellt werden. Weiter führte in dieser Studie eine Verminderung der Expression mittels siRNA zu einem verringerten Wachstum und reduzierter Koloniebildung. Es konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die SPHK2 in peripheren mononukleären Blutzellen („*peripheral blood mononuclear cells*“ PBMCs) von großkörniger-Lymphozyten-Leukämie (LGL)-Patienten erhöht war. Ebenfalls führte hier der „*Knockdown*“ der SPHK2 mittels siRNA zu einer verminderten Proliferation in den LGL-Zelllinien NKL und TL-1 (LeBlanc et al. 2020). Im HCC scheint hingegen besonders die SPHK1 eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Bao et al. (2012) zeigen, dass die mRNA der SPHK1 in HCC-Patienten hochreguliert ist und durch

Überexpression in SMMC-7721-Zellen die Invasions- und Migrationsfähigkeiten gefördert werden. In Gegensatz hierzu konnten die Autoren zeigen, dass in SK-Hep1- und MHCCLM3-Zellen die Hemmung der SPHK1 zu einer verminderten Migration und Invasion führt. Chen et al. (2018) untersuchten den Einfluss von SPHK1 auf das HCC Tumorwachstum, indem sie in SPHK1-„*Knockout*“-Mäusen durch Gabe von Diethylnitrosamin das Lebertumorwachstum induzierten. Hierbei zeigte sich, dass das Tumorwachstum in den „*Knockout*“-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen um 60% reduziert war. Auch bildeten die isolierten Zellen der SPHK1-„*Knockout*“-Tiere gegenüber den Zellen der Wildtyp-Tiere kleinere und auch weniger Kolonien.

Es ist daher nicht verwunderlich, dass es bereits mehrere Studien gibt, die den Effekt von SPHK-Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten von Krebszellen untersucht haben.

So konnten French et al. (2010) zeigen, dass der SPHK2 Inhibitor ABC294640 die Proliferation und Migration verschiedener Krebszellen hemmte. Einen ähnlichen Effekt konnte in einer anderen Studie mit ABC294640 in drei verschiedenen Darmkrebszelllinien (HT-29, HCT-116 und DLD-1) festgestellt werden. (Xun et al. 2015). Song et al. (2019) konnten ebenfalls in den epithelialen Eierstockkrebs (EOC) Zelllinien SKOV3 und HO8910 nachweisen, dass ABC294640 in der Lage ist, die Proliferation zu hemmen und die Apoptose der Zellen zu induzieren.

Dick et al. (2015) konnten weiter zeigen, dass die Inhibition der SPHK1 durch SKI-178 Apoptose in verschiedenen AML- (akute myeloische Leukämie) Zelllinien auslöste. Weiter konnte in einer anderen Studie in den beiden Nephroblastom-Zelllinien SK-NEP-1 und G401 gezeigt werden, dass die Hemmung der SPHK1 durch SKI-5C zu einer Proliferationshemmung und zur Induktion von Apoptose führt (Li et al. 2016). Des Weiteren konnte bei vier verschiedenen Melanomkrebs-Zelllinien gezeigt werden, dass der SPHK1-Inhibitor SKI-I in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Madhunapantula et al. 2012). Interessanterweise konnten Li et al. (2016) und Madhunapantula et al. (2012) zeigen, dass die SPHK1 in den verwendeten Zelllinien

hochreguliert war. Es ist bekannt das die SPHK1 auch in HCC Zelllinien sowie in Patienten hochreguliert ist. In HCC-Patienten wurde dies weiter mit einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht (Cai et al. 2017).

Die in meiner Arbeit verwendeten Inhibitoren SLP7111228 und SLM6031434 sind beide hochspezifisch. So beträgt die K_i (Inhibitionskonstante) für SLP7111228 für SPHK1 48 nM und für SPHK2 hingegen $> 10 \mu\text{M}$ (Patwardhan et al. 2015). Weiter verminderte hier bereits die Stimulation mit $0,1 \mu\text{M}$ SLP den S1P Gehalt von U937 deutlich. Bei dem SLM6031434 beträgt die K_i für SPHK2 $0,4 \mu\text{M}$ und für SPHK1 $> 20 \mu\text{M}$ (Kharel et al. 2015). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit $0,1 \mu\text{M}$ SLM in U937 Zellen zu verminderten S1P-Spiegel führt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die hier verwendete Konzentration beider Inhibitoren von jeweils $1 \mu\text{M}$ auch jeweils nur eine der Sphingosinkinasen inhibierte und es zu einer Verminderung des S1P-Gehalts kommt. Die hier verwendeten Inhibitoren hätten somit ein interessanter Ansatz zur Verbesserung der Behandlung des HCCs sein können.

Es kam jedoch überraschenderweise mit keinem der Inhibitoren zu der erwarteten verminderten Proliferation.

Wie Patwardhan et al. (2015) zeigen konnten, hatte die durch SLP7111228 vermittelte Reduktion von S1P keinen Effekt auf die Zellviabilität von U937 Zellen. Somit stimmt diese Studie mit den in dieser Arbeit beobachteten Effekten überein. Ob SLM in anderen Zellen einen Einfluss auf die Proliferation hatte, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen. Die hier verwendeten Inhibitoren SLP und SLM sind noch nicht sehr lange frei zu erwerben, daher gab es zum Zeitpunkt dieser Arbeit lediglich die oben bereits erwähnten Studien. Es gibt jedoch bereits mehrere Studien mit anderen Inhibitoren (z.B. ABC294640, SKI-178), welche nicht so selektiv sind wie SLP und SLM. Hierbei hatte die Inhibition unterschiedlich starke Einflüsse auf die Zellviabilität, Proliferation und auch das Tumorwachstum *in vivo*. Möglicherweise reichte die von mir eingesetzte Konzentration von $1 \mu\text{M}$, obwohl sie jeweils über dem spezifischen K_i

liegt, trotzdem nicht aus, um die SPHKs erfolgreich zu hemmen. Hierfür spricht auch, dass es in beiden Zelllinien zu keiner Verminderung der S1P-Spiegel gekommen ist (Tab. 19). Somit wäre interessant zu prüfen, ob höhere Konzentrationen einen Einfluss auf die Zellen und ihren S1P Gehalt haben.

Es ist auch möglich, dass die verwendeten HCC Zelllinien über Sphingolipid-unabhängige Signalwege ihr Wachstum steuern. So sind für das Wachstum und Überleben von HCC-Zellen auch verschiedene Wachstumsfaktoren verantwortlich. So konnten Wei et al. (2014) zeigen, dass eine Überexpression von PDGFR α in HCC Zelllinien deren Proliferations-, Migrations- und Invasionsfähigkeiten verstärkt. Weiter konnten sie zeigen, dass Patienten, die PDGFR α stärker exprimieren, eine schlechtere Überlebenschance haben, als Patienten mit niedrigerer Expressionsrate. Es konnte weiter nachgewiesen werden, dass auch HDGF („*hepatoma-derived growth factor*“, Hepatom-abgeleiteter Wachstumsfaktor) eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Metastasierung von HCC Zellen spielt. Yang et al. (2016) konnten zeigen, dass die verminderte Bildung des HDGF zu einem verringerten Wachstum von HCC Zellen *in vitro* und *in vivo* führt. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von HDGF in HCC Patienten hochreguliert ist und dabei mit dem Metastasierungsgrad korreliert. Somit könnten Wachstumsfaktoren einen größeren Einfluss auf die Zellproliferation gehabt haben, als zum Beispiel die SPHK1 oder SPHK2. Auch ist nicht auszuschließen, dass Inhibitoren wie zum Beispiel ABC294640, ähnlich wie SKI II, Einfluss auf Signalwege haben, die nicht mit dem Sphingolipid-Stoffwechsel in Verbindung stehen.

4.4 Die von SKI II vermittelte Inhibition der Proliferation scheint von Sphingolipiden unabhängig zu sein

In den HepG2 Zellen kam es mit der Kombination aus SLP und SLM im Vergleich zur DMSO Kontrolle zu einer signifikant verminderten Proliferation, jedoch war die Gabe von Sorafenib effektiver (Abbildung 11).

Wenn man nun die Proliferationsrate der HepG2 Zellen unter SKI II Stimulation mit der kombinierten Stimulation aus SLP und SLM vergleicht, fällt auf, dass SKI II einen stärkeren Einfluss (ca. 60 % Verminderung) auf die Proliferation hat, als SLP und SLM zusammen (ca. 20% Verminderung, Abbildung 9 und Abbildung 11). Bei den Huh7.5 Zellen kam es mit SKI II zu einer Verringerung der Proliferation von ca. 50 % - 60 % und mit SLP und SLM zusammen im Mittel von ca. 40 % (Abbildung 10 und Abbildung 11).

Wenn die von SKI II vermittelte Proliferations-Verminderung über die Hemmung der Sphingosin-Kinasen vermittelt würde, hätte die Kombination aus SLP und SLM somit einen ähnlichen, wenn nicht sogar stärkeren Effekt auf die Proliferation haben müssen. Dies war jedoch nicht Fall, wobei der Unterschied in den HepG2 Zellen deutlicher zu sehen ist, als bei den Huh7.5 Zellen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die von SKI II vermittelte Verminderung der Proliferation nicht über den Einfluss auf die SPHKs vermittelt wird. Somit scheint SKI II auch Sphingolipid-unabhängig die Proliferation der untersuchten Zelllinien zu beeinflussen, da zudem auch keine entsprechenden Unterschiede der Konzentrationen bioaktiver Sphingolipide beobachtet wurden (Abbildung 15 und Abbildung 16). Dies könnte z.B. durch die bereits erwähnten Effekte auf die β -Catenin-Expression (Liu et al. 2016a) sowie die reduzierten Expressionen von Sirt1, pIGF1R β und Osteopontin (Grbčić et al. 2017) verursacht sein. Dass SKI II keinen Einfluss auf die S1P-Konzentrationen der Zellen hatte (Tab.19), unterstützt diese These.

4.5 Sphingolipide spielen eine untergeordnete Rolle bei der Proliferation von HepG2- und Huh7.5-Zellen

4.5.1 Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Dihydroceramid-Akkumulation und Einfluss auf die Proliferation

Es konnte in beiden verwendeten Zelllinien gezeigt werden, dass Sorafenib die Akkumulation der Dihydroceramide induzierte (Abbildung 13 bis Abbildung 16). Wie

es dort weiter zu sehen ist, kam es bei der Kombination aus FB1 und Sorafenib sowie SKI II und Sorafenib ebenfalls zu einer Akkumulation von Dihydroceramiden. Bei alleiniger Stimulation der Zellen mit FB1 bzw. SKI II konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Dihydroceramid-Desaturase sein. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass Sorafenib in der Lage ist, oxidativen Stress zu induzieren (Chiou et al. 2009; Louandre et al. 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Induktion von oxidativem Stress zu einer vermehrten Dihydroceramid-Bildung führte. Idkowiak-Baldys et al. (2010) konnten dies in HEK293, MCF7, A549 und SMS-KCNR Zellen zeigen. Hierbei führte sowohl die direkte Stimulation der Zellen mit H_2O_2 als auch die Induktion von H_2O_2 mittels Menadion und tertiärem-Butylhydroperoxid zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramide. Weiter konnten die Autoren feststellen, dass dies durch eine Verminderung der Dihydroceramid-Desaturase-Aktivität vermittelt wird. In der Arbeit von Idkowiak-Baldys et al. (2010) wurde jedoch nicht untersucht, ob andere Oxidantien ebenfalls Einfluss auf die Dihydroceramid-Desaturase haben.

In meinen Experimenten, wurden HepG2 und Huh7.5 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von N-Acetylcystein (NAC) für 1 h vorstimuliert, bevor 5 μM Sorafenib für weitere 24 h auf die Zellen gegeben und schließlich die Konzentrationen von Dihydroceramiden mittels LC-MS/MS bestimmt wurde (Abbildung 17A bis H).

Da diese Experimente zwar in Triplikaten durchgeführt wurden, jedoch nur 1 bis 2 Experimente ausgewertet werden konnten, konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Daher kann hier leider keine Aussage getroffen werden.

Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Sorafenib-vermittelten ROS-Produktion und der Akkumulation von Dihydroceramiden geht aus der Arbeit von Coriat et al. (2012) hervor. Hierbei konnten die Autoren in den zwei HCC Zelllinien HepG2, Hepa 1.6 und einer Endothelzelllinie aus der Umbilicalvene (Huvec) zeigen, dass die Stimulation mit Sorafenib zu einem Anstieg von H_2O_2 , NO und O_2^-

führt. Dieser Anstieg war jedoch in den Zelllinien verschieden stark ausgeprägt. Somit besteht die Möglichkeit, dass es in den HepG2 und Huh7.5 Zellen durch die Sorafenib Stimulation zu einem unterschiedlich starken Anstieg von H_2O_2 , NO und O_2^- gekommen ist. Ein möglicher Anstieg von H_2O_2 bei den HepG2-Zellen könnte somit die Dihydroceramid-Desaturase und auch die Dihydroceramid-Spiegel modifizieren. Wie Coriat et al. (2012) weiter zeigen konnten, wirkt Sorafenib wohl vor allem durch die von O_2^- -vermittelte Induktion von oxidativem Stress. Dies könnte bedeuten, dass Sorafenib zwar den Anstieg von H_2O_2 bewirkt – was wiederum zur Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase führen könnte – dies jedoch nicht in Verbindung zur Effektivität der Sorafenib-Stimulation steht. Ein weiterer Hinweis, dass Dihydroceramid-Akkumulation und Proliferation in keinem direkten Zusammenhang stehen, sind die Ergebnisse der LC-MS/MS Messung nach Stimulation mit FB1 und SKI II.

Die Stimulation mit FB1 und SKI II führte weder in den HepG2 noch in den Huh7.5 Zellen zu einem Anstieg der Dihydroceramide (Abbildung 13 bis Abbildung 16). Es kam jedoch im Vergleich zur Sorafenib Stimulation in den HepG2 zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramide, wenn die Zellen mit FB1 und Sorafenib zusammen stimuliert wurden (Abbildung 13). Die Kombination aus SKI II und Sorafenib führte in beiden Zelllinien im Vergleich zur alleinigen Sorafenib-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Dihydroceramide (Abbildung 15 und Abbildung 16). Gleichzeitig konnten die Effekte von FB1 und SKI II auf die Proliferation durch zusätzliche Stimulation mit Sorafenib nicht wesentlich verstärkt werden (Abbildung 9 und Abbildung 10).

Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Akkumulation der Dihydroceramide in keinem direkten Zusammenhang mit der Proliferation der Zellen steht. Würde es hier einen Zusammenhang geben, hätte die alleinige Stimulationen mit FB1 bzw. SKI II aufgrund ausbleibender Akkumulation nicht derartig effektiv gewesen sein dürfen. Weiter hätte der

Unterschied zwischen den Stimulationen mit FB1 bzw. SKI II alleine und in Kombination mit Sorafenib stärker sein müssen. Hier konnte mittels LC-MS/MS teilweise ein signifikanter Unterschied in den Dihydroceramid-Level durch die Stimulation mit Sorafenib und in Kombination mit FB1 bzw. SKI II festgestellt werden.

Die verstärkte Akkumulation der Dihydroceramide bei Stimulation mit FB1 und Sorafenib könnte ebenfalls aufgrund der durch ROS vermittelten Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase ausgelöst worden sein. Durch ROS wird weiter ein über Nrf2 („*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*“) vermittelter antioxidativer Mechanismus zum Schutz der Zellen aktiviert (Itoh et al. 1999; Bellezza et al. 2018). FB1 kann jedoch Zellen über eine verstärkte Aktivierung von Nrf2 vor oxidativen Stress schützen (Arumugam et al. 2019). Dies könnte die Bildung von Dihydroceramiden bei alleiniger Stimulation mit FB1 gehemmt haben. Wenn die Zellen jedoch mit Sorafenib und FB1 zusammen stimuliert wurden, könnte die ROS induzierende Fähigkeit von Sorafenib stärker gewesen sein, als die schützende Funktion von Nrf2. Somit kam es wieder zur Akkumulation von Dihydroceramiden. Dies könnte auch ein Hinweis dafür sein, dass die scheinbar von FB1 vermittelte Hemmung der Proliferation in den HepG2 Zellen nicht über die Induktion von oxidativem Stress vermittelt wurde.

Auch SKI II kann Zellen durch erhöhte Nrf2 Stabilisierung vor oxidativem Stress schützen (Mercado et al. 2014). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass SKI II die Aktivität der Dihydroceramid-Desaturase in einer Magenkarzinom-Zelllinie (HGC 27) vermindert und somit zu einer Akkumulation von Dihydroceramiden führen kann (Cingolani et al. 2014). Es scheint, als ob die alleinige Stimulation mit SKI II keinen Effekt auf die Aktivität der Dihydroceramid-Desaturase hätte. Anders sieht es bei der Kombination aus Sorafenib und SKI II aus. Hierbei könnte die von Sorafenib vermittelte ROS-Induktion auch die Dihydroceramid-Desaturase hemmende Wirkung von SKI II verstärkt haben. Dies könnte wiederum eine Erklärung dafür sein, dass es durch Kombination von Sorafenib und SKI II zum Teil zu einer signifikant verstärkten

Akkumulation der Dihydroceramide im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Sorafenib kam. Interessanterweise war dieser Effekt in den Huh7.5 Zellen stärker ausgeprägt als in den HepG2 Zellen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Dies könnte ein Indikator dafür sein, dass es in den Huh7.5 Zellen durch verminderte ROS Induktion auch zu einer weniger starken Dihydroceramid-Desaturase-Hemmung gekommen ist. Die Kombination aus Sorafenib und SKI II könnte die jeweilige Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase jedoch potenziert haben, weshalb es hier zu einem stärkeren Effekt gekommen ist.

SLP und SLM zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation von Dihydroceramiden (Abbildung 15 und Abbildung 16), möglicherweise durch einen fehlenden Einfluss auf die ROS-Produktion. Dies wiederum könnte eine Erklärung sein, weshalb beide Inhibitoren keinen starken Effekt auf die Proliferation der Zellen hatten (Abbildung 9 und Abbildung 10)

4.5.2 Einfluss von S1P auf die Proliferation der Zellen

Es ist bekannt, dass S1P ein wichtiger Mediator für die Proliferation von Zellen sein kann. Unter anderem konnten Lockman et al. (2004) dies in glatten Muskelzellen von Ratten zeigen. Auch in der Ratten-HCC Zelllinie HTC4 konnte gezeigt werden, dass S1P die Proliferation der Zellen fördert (An et al. 2000). Auch in menschlichen Aortenendothelzellen hat S1P eine proliferative Wirkung (Kimura et al. 2000). Die Bildung des S1P ist von der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2 abhängig (Kohama et al. 1998; Maceyka et al. 2005). Daher ist es nicht verwunderlich, dass es bereits Studien gibt, die nachweisen konnten, dass es durch die Hemmung der Sphingosinkinasen zu einer verminderten Proliferation von Tumorzellen kommen kann (Ju et al. 2016; Dai et al. 2018; Liu et al. 2013; Antoon et al. 2011).

Der direkte Einfluss von Sorafenib auf S1P in HCC-Zelllinien wurde bis jetzt noch nicht ausführlich untersucht. Park et al. (2008) konnten jedoch zeigen, dass die Stimulation von HepG2 mit Sorafenib und den Histon-Deacetylase Inhibitor Vorinostat (Afifi et al. 2015) zu keiner signifikanten Veränderung der S1P-Spiegel im

Vergleich zur Kontrolle führt. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Kombination die Konzentrationen von Cer18:1/14:0 und Cer18:1/16:0 signifikant erhöht. Da jedoch nur die Kombination der Therapeutika und nicht die einzelnen Substanzen getestet wurde, konnte nicht unterschieden werden, welchen Einfluss Sorafenib hatte. In dieser Hinsicht ist es interessant, dass Sorafenib in der vorliegenden Arbeit die S1P-Spiegel der Huh7.5 Zellen nicht beeinflusste und in den HepG2 Zellen nur in der ersten Messung in der Lage war diese signifikant zu reduzieren (Tab. 17 und 19). Bei Park et al. (2008) kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der S1P Spiegel. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die von Sorafenib vermittelte Hemmung der Proliferation nicht von S1P abhängig ist. Interessanterweise konnten Park et al. (2010) weiter zeigen, dass der durch Sorafenib und Vorinostat verursachte Zelltod von HepG2 Zellen unter anderem von Ceramid abhängig war. Dies könnte weiter die Hypothese einer S1P-unabhängigen Beeinflussung der Proliferation durch Sorafenib unterstützen. Da es in der vorliegenden Arbeit nach Sorafenib-Stimulation zu keiner Veränderung der Ceramidspiegel kam (Tab. 16 und 18), könnte dies bedeuten, dass die von Park et al. beschriebene Effekte eher von Vorinostat vermittelt wurde.

Ding et al. (2016) konnten zeigen, dass die Stimulation von HuCCT1 und WITT Zellen (Gallengangskarzinom-Zelllinien) mit ABC294640 zu einer verminderten Proliferation führt und gleichzeitig die Apoptose induziert. Wenn die Zellen zusätzlich mit Sorafenib stimuliert wurden, kam es zu einer synergistischen Verstärkung dieser Effekte. Die Autoren postulierten, dass der synergistische Effekt durch die verminderte Phosphorylierung von STAT3 erfolgte, welche bekannterweise durch S1P gefördert wird (Liang et al. 2013). Die Autoren untersuchten jedoch nicht den genauen S1P-Gehalt der Zellen vor und nach der Behandlung mit Sorafenib. Weiter konnten Martin del Campo et al. (2015) zeigen, dass Sorafenib ebenfalls in der Lage ist, den JAK-STAT (Januskinase-„*Signal Transducers and Activators of Transcription*“) Signalweg direkt zu hemmen. Somit könnte der synergetische Effekt von ABC294640 und Sorafenib von S1P unabhängig gewesen sein. Weiter konnten Beljanski et al. (2011a) zeigen, dass die Stimulation von menschlichen Pankreas-Adenokarzinom- (Bxpc-3)

und Nierenkarzinom-Zellen (A-498) mit ABC294640 (SPHK2 Inhibitor) oder ABC294735 (SPHK1 und SPHK2 Inhibitor) in Kombination mit Sorafenib zu einer synergistischen Steigerung der Apoptose und vermindertem Zellwachstum führt. Auch die orale Gabe der Kombinationen war im Mausmodell effektiver, als die jeweiligen Inhibitoren alleine. Hier gingen die Autoren davon aus, dass der synergistische Effekt damit erklärt werden kann, dass sich sowohl beide Inhibitoren als auch Sorafenib negativ auf den MAPK-Signalweg auswirken. Ob die verringerte Bildung von S1P ebenfalls eine Rolle spielt, wurde nicht untersucht. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Kombination aus ABC294640 und Sorafenib auf die drei HCC Zelllinien SK-HEP-1, Hep G2 and Hep 3b2.1-7 ebenfalls einen stärkeren Effekt hat, als die einzelnen Substanzen. Auch in einem Xenograft-Mausmodell der SK-HEP-1 Zellen war die Kombination von ABC294640 und Sorafenib effektiver als ABC294640 und Sorafenib alleine. Auch hier gingen die Autoren davon aus, dass die verbesserte Wirksamkeit der Kombination aus Sorafenib und ABC294640 durch eine verstärkte Hemmung des MAP/ERK-Signalweg vermittelt wurde (Beljanski et al. 2011b). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Sorafenib nicht über die Beeinflussung des Sphingolipid-Metabolismus wirkt, sondern eher z.B. über die bereits beschriebene Hemmung von MAPK-Signalwegen.

Diese Hypothese wird zum Teil weiter durch die in dieser Arbeit gesammelten Daten der SPHK Inhibitoren SLP und SLM unterstützt. Sowohl SLP als auch SLM führten bei alleiniger Stimulation in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Reduktion von S1P (Tab. 19). Jedoch wurde die Bildung von S1P in den Huh7.5 Zellen durch die Kombination aus SLP und Sorafenib bzw. SLM und Sorafenib so stark gehemmt, dass S1P nicht mehr in den Zellen nachgewiesen werden konnte (Tab. 19). Ob SLP und SLM auch weitere Signalwege hemmen können, ist derzeit noch nicht bekannt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob SLP auch Auswirkungen auf die Phosphorylierung von ERK hat. Falls dies der Fall wäre, könnte es den verminderten S1P-Gehalt in den Huh7.5 Zellen erklären. Es ist bekannt, dass für die Aktivierung der SPHK1 pERK benötigt wird (Pitson et al. 2003). Somit könnten sich die hemmenden Wirkungen von

Sorafenib und SLP gegenseitig verstärken und zu einer stark verminderten Bildung von S1P führen. Dies wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Ob SLM auch andere Signalwege hemmt, wurde ebenfalls nicht untersucht.

Es ist jedoch bemerkenswert, dass gerade die gemeinsame Stimulation mit SLP oder SLM und Sorafenib in den Huh7.5 Zellen keine verstärkte Hemmung der Proliferation verursachte (Abbildung 11). Dies ist insofern interessant, da das scheinbare Fehlen von S1P die Proliferation deutlich vermindert könnte. Da dies jedoch nicht der Fall war, scheint S1P nicht ausschlaggebend für die Proliferation der Zellen zu sein. Dies wiederum deutet darauf hin, dass die von Sorafenib verursachte Hemmung der Proliferation über andere Signalwege als über den Sphingolipid-Stoffwechsel vermittelt wird.

In dieser Arbeit wurden die HepG2 und Huh7.5 Zellen ebenfalls mit dem Ceramid Synthase Inhibitor FB1 stimuliert. Dies führte in den HepG2 und Huh7.5 Zellen zu einer signifikanten Akkumulation von S1P (Tab.17). FB1 ist ein bekannter Ceramid-Synthase-Inhibitor, was auch die verminderte Bildung von Ceramiden aus Sphingosin und dessen Akkumulation zur Folge haben kann. He et al. (2006) konnten zeigen, dass die Gabe von FB1 bei Mäusen zu einer signifikant verstärkten Expression von Sphingosin und Sphinganin in der Leber der Tiere führt. Weiter konnten sie beobachten, dass die Aktivität der SPHK1 in der Leber der Tiere signifikant durch FB1 gesteigert wird. Dies wird auch von Kim et al. (2007) unterstützt, welche erhöhte S1P-Werte im Plasma als auch in der Leber von FB1-behandelten Mäusen nachweisen konnten. Weiter konnten die Autoren ebenfalls eine erhöhte Expression der SPHK1 nachweisen. Außerdem konnte eine Verminderung der Sphingosin-1-Phosphat-Lyase (S1PL)-Expression nachgewiesen werden, welche die Umwandlung von S1P in Hexadecanal und Ethanolaminphosphat katalysiert. Ob die Expression der SPHK1 und der S1PL in den HepG2 und Huh7.5 Zellen verändert war, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Da beide Enzyme einen Einfluss auf die Bildung bzw. den Abbau von S1P haben, könnte dies eine mögliche Erklärung für die

beobachtete Akkumulation von S1P sein. Interessanterweise konnten Sharma et al. (2004) zeigen, dass HEK-293 Zellen vor der durch FB1-induzierten Apoptose geschützt sind, wenn sie zusätzlich mit S1P stimuliert werden. Auf der anderen Seite reagierten die Zellen sensibler auf die FB1-Stimulation, wenn sie zusätzlich mit DL-threo-Dihydrosphingosin (SPHK-Inhibitor) stimuliert wurden. Diese Studie zeigt somit, dass S1P Zellen vor der FB1-induzierten Apoptose schützen kann. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, weshalb es in der vorliegenden Arbeit zu keiner vermehrten Induktion der Apoptose nach FB1-Stimulation in den HepG2- und Huh7.5-Zellen gekommen ist.

Es gibt bereits Studien, die zeigen konnten, dass SKI II in der Lage ist den Gehalt von S1P bei gleichzeitiger gesteigerter Ceramid-Akkumulation zu vermindern. Dies konnten unter anderem LeBlanc et al. (2015) in NKZ Zellen und Gao et al. (2012) in A498 Zellen zeigen. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Effekte in den HepG2 als auch in den Huh7.5 Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 15 und Abbildung 16). Hier kam es tendenziell eher zu gesteigerten S1P- und verminderten Ceramid-Spiegel (Tab. 18 und 19). Die Ergebnisse entsprachen daher nicht den Erwartungen was ein Hinweis dafür sein könnte, dass die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 10 μ M nicht ausreichend war, um die Sphingosinkinasen in den HepG2- und Huh7.5-Zellen zu hemmen. Die Ergebnisse sprechen allerdings erneut dafür, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte von SKI II auf die Zellen tendenziell eher nicht über die Beeinflussung des Sphingolipid-Stoffwechsels vermittelt wurden. Dass es durch die Stimulation mit SKI II in den Zellen eher zu einem Anstieg des S1P kam, könnte ebenfalls darauf hinweisen, dass die Proliferation der HCC-Zellen von anderen Signalwegen stärker beeinflusst wird als von den Sphingolipiden.

5 Schlussfolgerungen

Der Sphingolipid-Stoffwechsel spielt in den HepG2- und Huh7.5-Zellen bei der Proliferation eher eine untergeordnete Rolle. Sorafenib beeinflusste den Sphingolipid-Stoffwechsel hauptsächlich durch die gesteigerte Akkumulation der Dihydroceramide (Abbildung 13 bis Abbildung 16). Durch die Stimulation mit FB1 und SKI II kam es jedoch zu keiner Akkumulation der Dihydroceramide (Abbildung 13 bis Abbildung 16). Hier war der Einfluss auf die Proliferation jedoch stärker, als mit Sorafenib (Abbildung 9 und Abbildung 10). Somit erschließt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Akkumulation der Dihydroceramiden und der verminderten Proliferation.

Diese Schlussfolgerung kann anhand der S1P Daten weiter unterstützt werden. Die Stimulation mit SKI II führte tendenziell eher zu mehr S1P, mit FB1 war diese Akkumulation sogar signifikant (Tab. 17 und 19). Trotzdem hemmten beide Substanzen die Proliferation. Auf der anderen Seite konnte nach der Stimulation der Huh7.5-Zellen mit Sorafenib und SLP bzw. Sorafenib und SLM das S1P nicht mehr nachgewiesen werden (Tab. 19). Diese Kombinationen hatten wiederum keinen stärkeren Einfluss auf die Proliferation, als die alleinige Stimulation mit Sorafenib (Abbildung 11).

Hätten diese Veränderungen der Sphingolipide einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen gehabt, so hätten FB1 und SKI II einen schwächeren Effekt auf die Proliferation haben müssen. Auf der anderen Seite hätte die Stimulation mit Sorafenib und SLP bzw. SLM zu einer starken Verminderung der Proliferation führen müssen.

Es scheint, dass die Hemmung der Proliferation der Zellen durch Sorafenib, FB1 und SKI II über andere Signalwege vermittelt wird. Sorafenib könnte hierbei über die bekannte Hemmung des RAF/RAS/MEK/ERK wirken (Leicht et al. 2007; Newell et al. 2009; Wilhelm et al. 2004). Auch die Hemmung des JAK-STAT durch Sorafenib (Martin del Campo et al. 2015) könnte hierbei eine Rolle spielen.

FB1 kann zu einem Zellzyklus-Arrest führen (Ciacci-Zanella et al. 1998; Bondy et al. 2000; Mobio et al. 2000), sowie das Cytochrom P450 beeinflussen (Mary et al. 2017). Diese Effekte scheinen eine größere Auswirkung auf die Zellen zu haben als die Auswirkungen auf die Sphingolipide. Ob FB1 noch weitere Signalkaskaden beeinflusst, bleibt ebenfalls zu klären.

Bei SKI II spricht vieles dafür, dass der Einfluss auf Sirt1, pIGF1R β und Osteopontin (Grbčić et al. 2017) eine wichtige Rolle spielt, da unter anderem gezeigt werden konnte, dass diese beim Zellwachstum, der Chemoresistenz, der Metastasierung und der Invasion eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Tian et al. 2013; Wang et al. 2018; Lin et al. 2011; Zhao et al. 2008; Choi et al. 2011; Chen et al. 2011). Dass der Einfluss von SKI II auf die Sphingolipide ebenfalls eine Rolle spielt, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, scheint aber nach meinen Ergebnissen nicht bedeutsam zu sein.

6 Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die sechsthäufigste Krebsart mit der zweithäufigsten krebsbedingten Letalität. Sorafenib ist bereits seit über 10 Jahren die einzige verfügbare und zugelassene systemische Chemotherapie. Allerdings zeigen Patienten oft eine Resistenz gegenüber Sorafenib.

In zahlreichen Krebsarten konnte bereits gezeigt werden, dass Sphingolipide bei der Tumorentwicklung und Chemoresistenz eine wichtige Rolle spielen. Sphingolipide sind bioaktive Lipidmoleküle, welche unter anderem für die Beeinflussung verschiedener Signalwege intra- und extrazellulär verantwortlich sind. So konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ceramiden eine wichtige Rolle für das Überleben von Zellen spielt, wobei eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des S1P meist eine proliferative Wirkung auf Zellen hat. Für die Phosphorylierung des Sphingosins zu S1P sind die zwei Enzyme Sphingosinkinase 1 und 2 (SPHK1/2) verantwortlich.

Es gibt bereits Studien, die nachweisen konnten, dass diese Enzyme gerade in Tumorzellen verstärkt exprimiert werden. Auf der anderen Seite kann eine verstärkte Bildung von Ceramiden die Apoptose der Tumorzellen verstärken. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Sphingolipid-Stoffwechsel einen interessanten Angriffspunkt für die Krebstherapie darstellt. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, ob Sorafenib einen Einfluss auf den Sphingolipid Stoffwechsel hat. Weiter sollte untersucht werden, ob die Beeinflussung des Sphingolipid-Stoffwechsels die Effekte von Sorafenib potenzieren könnte.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Sorafenib die mRNA-Expression verschiedener Enzyme, die das Verhältnis zwischen Ceramiden und S1P regulieren, beeinflussen kann. Es wurde weiter untersucht, wie sich der Ceramidsynthase Inhibitor FB1 auf die Proliferation und die Induktion der Apoptose auswirkt. Dies wurde ebenfalls mit SLP (SPHK1 Inhibitor), SLM (SPHK2 Inhibitor) und SKI II, einem unspezifischen Inhibitor beider Sphingosinkinasen, untersucht. Es wurden weiter die

Einflüsse aller verwendeten Substanzen auf die Bildung verschiedener Sphingolipide untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass Sorafenib in der Lage ist, die Proliferation der Zellen zu hemmen und die Apoptose-Induktion zu fördern. Weiter führte Sorafenib zu einer Akkumulation der Dihydroceramide. Was wiederum weder mit SKI II, FB1; SLP noch SLM beobachtet werden konnte. Der signifikante Anstieg der Dihydroceramid-Konzentrationen konnte mit dem durch Sorafenib induzierten oxidativen Stress in Verbindung gebracht werden.

SLP und SLM waren nicht in der Lage, die Effekte von Sorafenib auf die Proliferation zu potenzieren. Die Kombination von Sorafenib mit SLP oder SLM führte jedoch in den Huh7.5 Zellen zu einer drastischen Reduktion des S1P-Spiegel.

FB1 und SKI II führten zu einer stärkeren Hemmung der Proliferation als Sorafenib. Wobei gezeigt werden konnte, dass beide Substanzen die Ceramid-Spiegel tendenziell eher vermindern und die S1P-Spiegel erhöhen. Durch die Stimulation mit FB1 kam es sogar zu einer signifikanten Erhöhung der S1P-Spiegel. Es scheint, dass der Einfluss von FB1 und SKI II auf die Proliferation der Zellen unabhängig vom Sphingolipid-Stoffwechsel ist. Diese scheinen eher über andere Mechanismen zu wirken. Es könnte von Interesse sein, gerade diese Signalwege von SKI II im HCC weiter zu untersuchen, da SKI II bereits in Mausmodellen anderer Krebsarten vielversprechende Ergebnisse zeigte.

7 Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer and the second leading cause of cancer-related mortality. Sorafenib has been the only available and approved systemic chemotherapy for over 10 years. Yet, unfortunately patients often show resistance to sorafenib treatment.

In distinct cancer types, it has already been shown that sphingolipids can play an important role in tumor growth and chemoresistance. Sphingolipids constitute bioactive lipid molecules, able to regulate substantially intra- and extracellular signal transduction pathways. It has been shown that the ratio of sphingosine-1-phosphate (S1P) to ceramide plays an important role in cell survival, whereby a shift to S1P accumulation exerts in most cases a pro-proliferative effect. Two enzyme-isoforms sphingosine kinase 1 and 2 (SPHK1/2) are responsible for the formation of S1P from sphingosine.

There already exist studies that have been able to show that these enzymes are increasingly expressed, particularly in tumor cells. On the other hand, an increased formation of ceramides can enhance the apoptosis of tumor cells. Hence, the sphingolipid rheostat is an interesting target for cancer therapy. Therefore, the present study investigates whether sorafenib has an influence on the sphingolipid metabolism. Furthermore, it should be investigated whether modulation of the sphingolipid metabolism is able to sensitize HCC cell lines to sorafenib.

Initially it could be shown that sorafenib is able to influence the mRNA expression of various enzymes regulating the sphingolipid metabolism. It was further investigated how the ceramide synthase inhibitor FB1 affects cell proliferation and apoptosis induction. This was also investigated with SLP (SPHK1 inhibitor), SLM (SPHK2 inhibitor) and SKI II, a non-specific inhibitor of both sphingosine kinases. We also investigated the influence of the metabolites used on concentrations of distinct sphingolipid metabolites

It could be shown that sorafenib is able to inhibit cell proliferation and promote apoptosis induction. Furthermore, sorafenib stimulation of HCC cell lines led to an accumulation of dihydroceramides. This however could not be observed with any of the other inhibitors targeting the sphingolipid metabolism used. The significant increase in dihydroceramide-levels was associated with sorafenib-induced oxidative stress.

SLP and SLM were not able to aggravate the antiproliferative effects of sorafenib. However, the combination of sorafenib with SLP or SLM led to a complete reduction of S1P levels in Huh7.5 cells.

FB1 and SKI II led to a stronger inhibition of proliferation than sorafenib alone. It was shown that both substances tend to decrease ceramide levels and increase S1P levels. FB1 stimulation even led to a significant increase in S1P levels. This reduces the importance of S1P in the proliferation of these cells. Finally, the influence of FB1 and SKI II on cell proliferation seems to be independent of their influence on sphingolipids. It might be of interest to further investigate the signaling pathways of SKI II in HCC, as SKI II has already shown promising results in mouse models of other types of cancer.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
ALD	„alcoholic liver disease“
APS	Ammoniumpersulfat
ASAH1	saure Ceramidase
ASAH2	neutrale Ceramidase
ATM	„ataxia telangiectasia mutated“
ATP	Adenosintriphosphat
BCLC	Barcelona-Clinic-Liver-Cancer
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CerS	Ceramidsynthasen
CHILD	Child-Pugh-Score
DEGS1	Dihydroceramid-Desaturase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	„deoxyribonucleic acid“
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNR	Daunorubicin
dNTP	2´-Desoxynucleosidtriphosphat
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N-N-N´-N´-tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	endoplasmatischen Retikulums
ERK	„extracellular signal regulated kinase“
FB1	Fumonisin B1
FCS	fötales Kälberserum
FGF	„fibroblast growth factor receptor“
h	„hour“
H ₂ O	Wasser
HCC	„Hepatocellular carcinoma“
HCl	Salzsäure
HDGF	„hepatoma-derived growth factor“
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HRP	„horseradish peroxidase“

iCCA	<i>„intrahepatic cholangiocarcinoma“</i>
IL3	Interleukin-3
IGF1	<i>“insuline-like growth factor-1”</i>
IGF1R β	<i>„insulin-like growth factor 1 receptor beta“</i>
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LGL	Lymphozyten-Leukämie
LC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
JAK-STAT	Januskinase- <i>„Signal Transducers and Activators of Transcription“</i>
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimolar
MOC	<i>„mechanisms of chemoresistance“</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	<i>„nonalcoholic fatty liver disease“</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	<i>„nonalcoholic steatohepatitis“</i>
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
nM	Nanomolar
NOE	N-Oleylethanolamin
Nrf2	<i>„Nuclear factor erythroid 2-related factor 2“</i>
OATP	<i>„Organic Anion Transporting Polypeptide“</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>„peripheral blood mononuclear cells“</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>“platelet-derived growth factor”</i>
PDGFR	<i>“platelet-derived growth factor receptor”</i>
PEI	<i>„percutaneous ethanol injection“</i>
PKC	Proteinkinase C
PST	<i>„Performance Status Test“</i>
RAF	<i>„rapidly accelerated fibrosarcoma“</i>
RAS	<i>„Rat sarcoma“</i>
RFA	<i>“radiofrequency ablation”</i>
RNA	<i>„ribonucleic acid“</i>
ROS	<i>„reactive oxygen species“</i>
RT-PCR	<i>“reverse transcriptase polymerase chain reaction“</i>

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>„short-hairpin RNA“</i>
siRNA	<i>„small interfering RNA“</i>
Sirt1	Sirtuin-1
SLM	SLM6031434
SLP	SLP7111228
Soraf	Sorafenib
SPHK1	Sphingosinekinase 1
SPHK2	Sphingosinekinase 2
SPT oder SPTLC1	Serin-Palmitoyl-Transferase
Stauro	Staurosporin
SKI II	Sphingosinkinase-Inhibitor II
Tab.	Tabelle
TACE	<i>„Transcatheter arterial chemoembolization“</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	<i>„tumor necrosis factor“</i>
TP	Thymidinphosphorylase
TSC2	<i>„tuberous sclerosis complex“</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor “</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor“</i>
μM	Micromolar
μl	Microliter

Englische Sprache

Englische Fachbegriffe wurden durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet und in Anführungszeichen gesetzt

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Leberläppchen (A) mit detailliertem Ausschnitt (B)	4
Abbildung 2.: Übersicht zur Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC)	7
Abbildung 3. Übersicht der Behandlungsoptionen des hepatozellulären Karzinom (HCC) nach der Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation	12
Abbildung 4: Struktur von Ceramid und S1P	15
Abbildung 5: Sphingolipid Stoffwechsel	16
Abbildung 6: Einfluss von Sorafenib auf die mRNA-Expression von HepG2 Zellen	51
Abbildung 7: Einfluss von Sorafenib auf die mRNA-Expression von Huh7.5 Zellen	52
Abbildung 8: Quantifizierung der pERK Spiegel der HepG2 und Huh7.5 Zellen	53
Abbildung 9: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SPHK-Inhibitoren auf die Proliferation von HepG2 Zellen	55
Abbildung 10: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SPHK-Inhibitoren auf die Proliferation von Huh7.5 Zellen	56
Abbildung 11: Einfluss von Sorafenib und der Kombination aus SLP und SLM auf die Proliferation von HepG2 (A) und Huh7.5 (B) Zellen	57
Abbildung 12: Einfluss von Sorafenib, FB1 und SKI II auf die DNA-Fragmentierung der HepG2 (A,B) und Huh7.5 (C,D) Zellen	59
Abbildung 13: Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die Konzentration von Dihydroceramiden der HepG2 Zellen	61
Abbildung 14: Einfluss von Sorafenib und FB1 auf die Konzentration von Dihydroceramiden der Huh7.5 Zellen	62
Abbildung 15: Einfluss von Sorafenib und SPHK-Inhibitoren auf die Konzentration von Dihydroceramiden der HepG2 Zellen	63
Abbildung 16: Einfluss von Sorafenib und SPHK-Inhibitoren auf die Konzentration von Dihydroceramiden der Huh7.5 Zellen	65
Abbildung 17: Einfluss von NAC auf die durch Sorafenib vermittelte Dihydroceramid-Akkumulation in HepG2- und Huh7,5-Zellen	72

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien	27
Tabelle 4: Zellkulturreagenzien – und Stimulanzen	28
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Medien	29
Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Reagenzien	30
Tabelle 7: Verwendete TaqMan Sonden	30
Tabelle 8: Verwendete Erst-Antikörper	31
Tabelle 9: Verwendete Zweit-Antikörper	31
Tabelle 10: Verwendete Puffer.....	31
Tabelle 11: Verwendete Lösungen und Puffer für die RNA-Analyse	32
Tabelle 12: Verwendete Lösungen und Puffer für die Protein-Analysen.....	32
Tabelle 13: Pipettierschema für die BSA Standardreihe	41
Tabelle 14: Pipettierschema für das Sammelgel“	42
Tabelle 15: Pipettierschema für Trenngele.....	42
Tabelle 16: Ceramid-Spiegel (ng/1x10 ⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder FB1.	66
Tabelle 17: Sphingolipid Spiegel (pg/1x10 ⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder FB1.	67
Tabelle 18: Ceramid-Spiegel (ng/1x10 ⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder Inhibitoren der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2.....	68
Tabelle 19: Sphingolipid-Spiegel (pg/1x10 ⁶ Zellen) von HepG2 und Huh7.5 Zellen nach Stimulation mit Sorafenib und/oder Inhibitoren der Sphingosinkinase 1 und Sphingosinkinase 2.....	70

9 Literaturverzeichnis

- Afifi, Salma; Michael, Angela; Azimi, Mahshid; Rodriguez, Mabel; Lendvai, Nikoletta; Landgren, Ola (2015): Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Focus on Vorinostat and Panobinostat. In: *Pharmacotherapy* 35 (12), S. 1173–1188. DOI: 10.1002/phar.1671.
- An, S.; Zheng, Y.; Bleu, T. (2000): Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (1), S. 288–296. DOI: 10.1074/jbc.275.1.288.
- Anstee, Quentin M.; Reeves, Helen L.; Kotsiliti, Elena; Govaere, Olivier; Heikenwalder, Mathias (2019): From NASH to HCC: current concepts and future challenges. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16 (7), S. 411–428. DOI: 10.1038/s41575-019-0145-7.
- Antoon, James W.; White, Martin D.; Burow, Matthew E.; Beckman, Barbara S. (2012): Dual inhibition of sphingosine kinase isoforms ablates TNF-induced drug resistance. In: *Oncology reports* 27 (6), S. 1779–1786. DOI: 10.3892/or.2012.1743.
- Antoon, James W.; White, Martin D.; Slaughter, Evelyn M.; Driver, Jennifer L.; Khalili, Hafez S.; Elliott, Steven et al. (2011): Targeting NFκB mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2. In: *Cancer biology & therapy* 11 (7), S. 678–689. DOI: 10.4161/cbt.11.7.14903.
- Arumugam, Thilona; Pillay, Yashodani; Ghazi, Terisha; Nagiah, Savania; Abdul, Naeem Sheik; Chuturgoon, Anil A. (2019): Fumonisin B1-induced oxidative stress triggers Nrf2-mediated antioxidant response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. In: *Mycotoxin research* 35 (1), S. 99–109. DOI: 10.1007/s12550-018-0335-0.
- Bao, Meiyang; Chen, Zhiao; Xu, Yongfen; Zhao, Yingjun; Zha, Ruopeng; Huang, Shenglin et al. (2012): Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma. In: *Liver international* :

official journal of the International Association for the Study of the Liver 32 (2), S. 331–338.

DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02666.x.

Barak, A.; Morse, L. S.; Goldkorn, T. (2001): Ceramide: a potential mediator of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 42 (1), S. 247–254.

Beljanski, Vladimir; Knaak, Christian; Zhuang, Yan; Smith, Charles D. (2011a): Combined anticancer effects of sphingosine kinase inhibitors and sorafenib. In: *Investigational new drugs* 29 (6), S. 1132–1142. DOI: 10.1007/s10637-010-9452-0.

Beljanski, Vladimir; Lewis, Clayton S.; Smith, Charles D. (2011b): Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts. In: *Cancer biology & therapy* 11 (5), S. 524–534. DOI: 10.4161/cbt.11.5.14677.

Bellezza, Ilaria; Giambanco, Ileana; Minelli, Alba; Donato, Rosario (2018): Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1865 (5), S. 721–733. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

Bhat, Vishwanath Kumble; Bernhart, Eva; Plastira, Ioanna; Fan, Kaiji; Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, Nassim; Wadsack, Christian et al. (2019): Pharmacological Inhibition of Serine Palmitoyl Transferase and Sphingosine Kinase-1/-2 Inhibits Merkel Cell Carcinoma Cell Proliferation. In: *The Journal of investigative dermatology* 139 (4), S. 807–817. DOI: 10.1016/j.jid.2018.10.024.

Bondy, G.S; Barker, M.G; Lombaert, G.A; Armstrong, C.L; Fernie, S.M; Gurofsky, S. et al. (2000): A comparison of clinical, histopathological and cell-cycle markers in rats receiving the fungal toxins fumonisin B1 or fumonisin B2 by intraperitoneal injection. In: *Food and Chemical Toxicology* 38 (10), S. 873–886. DOI: 10.1016/S0278-6915(00)00084-3.

Bosetti, Cristina; Turati, Federica; La Vecchia, Carlo (2014): Hepatocellular carcinoma epidemiology. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 28 (5), S. 753–770. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.08.007.

Bruix, Jordi; Llovet, Josep M. (2002): Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (3), S. 519–524. DOI: 10.1053/jhep.2002.32089.

Bruix, Jordi; Qin, Shukui; Merle, Philippe; Granito, Alessandro; Huang, Yi-Hsiang; Bodoky, György et al. (2017): Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *The Lancet* 389 (10064), S. 56–66. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.

Bruix, Jordi; Reig, Maria; Sherman, Morris (2016): Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology* 150 (4), S. 835–853. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.12.041.

Bruix, Jordi; Sherman, Morris (2005): Management of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (5), S. 1208–1236. DOI: 10.1002/hep.20933.

Buczak, Katarzyna; Ori, Alessandro; Kirkpatrick, Joanna M.; Holzer, Kerstin; Dauch, Daniel; Roessler, Stephanie et al. (2018): Spatial Tissue Proteomics Quantifies Inter- and Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma (HCC). In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 17 (4), S. 810–825. DOI: 10.1074/mcp.RA117.000189.

Cai, Huajie; Xie, Xuemeng; Ji, Ling; Ruan, Xiaojiao; Zheng, Zhihai (2017): Sphingosine kinase 1: A novel independent prognosis biomarker in hepatocellular carcinoma. In: *Oncology letters* 13 (4), S. 2316–2322. DOI: 10.3892/ol.2017.5732.

Castro, Bruno M.; Prieto, Manuel; Silva, Liana C. (2014): Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. In: *Progress in lipid research* 54, S. 53–67. DOI: 10.1016/j.plipres.2014.01.004.

Cervello, Melchiorre; Bachvarov, Dimcho; Lampiasi, Nadia; Cusimano, Antonella; Azzolina, Antonina; McCubrey, James A.; Montalto, Giuseppe (2012): Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (15), S. 2843–2855. DOI: 10.4161/cc.21193.

Cha, Charles H.; Ruo, Leyo; Fong, Yuman; Jarnagin, William R.; Shia, Jinru; Blumgart, Leslie H.; DeMatteo, Ronald P. (2003): Resection of hepatocellular carcinoma in patients otherwise eligible for transplantation. In: *Annals of surgery* 238 (3), 315-21; discussion 321-3. DOI: 10.1097/01.sla.0000086548.84705.ef.

Chatzakos, V.; Rundlöf, A. K.; Ahmed, D.; Verdier, P. J. de; Flygare, J. (2012): Inhibition of sphingosine kinase 1 enhances cytotoxicity, ceramide levels and ROS formation in liver cancer cells treated with selenite. In: *Biochemical pharmacology* 84 (5), S. 712–721. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.06.009.

Chen, Jinbiao; Qi, Yanfei; Zhao, Yang; Kaczorowski, Dominik; Couttas, Timothy A.; Coleman, Paul R. et al. (2018): Deletion of sphingosine kinase 1 inhibits liver tumorigenesis in diethylnitrosamine-treated mice. In: *Oncotarget* 9 (21), S. 15635–15649. DOI: 10.18632/oncotarget.24583.

Chen, Juan; Zhang, Bin; Wong, Nathalie; Lo, Anthony W. I.; To, Ka-Fai; Chan, Anthony W. H. et al. (2011): Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. In: *Cancer research* 71 (12), S. 4138–4149. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4274.

Chen, Tanzhou; Huang, Zhiming; Liu, Runping; Yang, Jing; Hylemon, Phillip B.; Zhou, Huiping (2017): Sphingosine-1 phosphate promotes intestinal epithelial cell proliferation via S1PR2. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 22, S. 596–608. DOI: 10.2741/4505.

Chen, Yanfeng; Liu, Ying; Sullards, M. Cameron; Merrill, Alfred H. (2010): An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies. In: *Neuromolecular medicine* 12 (4), S. 306–319. DOI: 10.1007/s12017-010-8132-8.

Cheng, Ann-Lii; Kang, Yoon-Koo; Chen, Zhendong; Tsao, Chao-Jung; Qin, Shukui; Kim, Jun Suk et al. (2009): 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. In: *The Lancet Oncology* 10 (1), S. 25–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7.

Chiou, Jeng-Fong; Tai, Cheng-Jeng; Wang, Yu-Huei; Liu, Tsan-Zon; Jen, Yee-Min; Shiau, Chia-Yang (2009): Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. In: *Cancer biology & therapy* 8 (20), S. 1904–1913. DOI: 10.4161/cbt.8.20.9436.

Choi, Ha Na; Bae, Jun Sang; Jamiyandorj, Urangoo; Noh, Sang Jae; Park, Ho Sung; Jang, Kyu Yun et al. (2011): Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma. In: *Oncology reports* 26 (2), S. 503–510. DOI: 10.3892/or.2011.1301.

Choi, Ji Woong; Lee, Chang-Wook; Chun, Jerold (2008): Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. In: *Biochimica et biophysica acta* 1781 (9), S. 531–539. DOI: 10.1016/j.bbali.2008.03.004.

Ciacchi-Zanella, J. R.; Merrill, A. H.; Wang, E.; Jones, C. (1998): Characterization of Cell-cycle Arrest by Fumonisin B1 in CV-1 Cells. In: *Food and Chemical Toxicology* 36 (9-10), S. 791–804. DOI: 10.1016/S0278-6915(98)00034-9.

Cingolani, Francesca; Casasampere, Mireia; Sanllehí, Pol; Casas, Josefina; Bujons, Jordi; Fabrias, Gemma (2014): Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. In: *Journal of lipid research* 55 (8), S. 1711–1720. DOI: 10.1194/jlr.M049759.

Coriat, Romain; Nicco, Carole; Chéreau, Christiane; Mir, Olivier; Alexandre, Jérôme; Ropert, Stanislas et al. (2012): Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. In: *Molecular cancer therapeutics* 11 (10), S. 2284–2293. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0093.

Curley, S. A.; Izzo, F.; Delrio, P.; Ellis, L. M.; Granchi, J.; Vallone, P. et al. (1999): Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. In: *Annals of surgery* 230 (1), S. 1–8. DOI: 10.1097/00000658-199907000-00001.

- Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P. G.; Coso, O. A.; Gutkind, S.; Spiegel, S. (1996): Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. In: *Nature* 381 (6585), S. 800–803. DOI: 10.1038/381800a0.
- Dai, Lu; Smith, Charles D.; Foroozesh, Maryam; Miele, Lucio; Qin, Zhiqiang (2018): The sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 displays anti-non-small cell lung cancer activities in vitro and in vivo. In: *International journal of cancer* 142 (10), S. 2153–2162. DOI: 10.1002/ijc.31234.
- Dasgupta, Paramita; Henshaw, Chloe; Youlden, Danny R.; Clark, Paul J.; Aitken, Joanne F.; Baade, Peter D. (2020): Global Trends in Incidence Rates of Primary Adult Liver Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 171. DOI: 10.3389/fonc.2020.00171.
- Dayon, Audrey; Brizuela, Leyre; Martin, Claire; Mazerolles, Catherine; Pirot, Nelly; Doumerc, Nicolas et al. (2009): Sphingosine kinase-1 is central to androgen-regulated prostate cancer growth and survival. In: *PloS one* 4 (11), e8048. DOI: 10.1371/journal.pone.0008048.
- Desai, Jasmin Radhika; Ochoa, Sebastian; Prins, Petra Alexandra; He, Aiwu Ruth (2017): Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: an update. In: *Journal of gastrointestinal oncology* 8 (2), S. 243–255. DOI: 10.21037/jgo.2017.02.01.
- Dick, Taryn E.; Hengst, Jeremy A.; Fox, Todd E.; Colledge, Ashley L.; Kale, Vijay P.; Sung, Shen-Shu et al. (2015): The apoptotic mechanism of action of the sphingosine kinase 1 selective inhibitor SKI-178 in human acute myeloid leukemia cell lines. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 352 (3), S. 494–508. DOI: 10.1124/jpet.114.219659.
- Ding, Xiwei; Chaiteerakij, Roongruedee; Moser, Catherine D.; Shaleh, Hassan; Boakye, Jeffrey; Chen, Gang et al. (2016): Antitumor effect of the novel sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 is enhanced by inhibition of autophagy and by sorafenib in human cholangiocarcinoma cells. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 20080–20092. DOI: 10.18632/oncotarget.7914.

El-Serag, Hashem B. (2012): Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. In: *Gastroenterology* 142 (6), 1264-1273.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.12.061.

Estes, Chris; Anstee, Quentin M.; Arias-Loste, Maria Teresa; Bantel, Heike; Bellentani, Stefano; Caballeria, Joan et al. (2018): Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. In: *Journal of hepatology* 69 (4), S. 896–904. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.036.

Faivre, Sandrine; Rimassa, Lorenza; Finn, Richard S. (2020): Molecular therapies for HCC: Looking outside the box. In: *Journal of hepatology* 72 (2), S. 342–352. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.09.010.

French, Kevin J.; Schrecengost, Randy S.; Lee, Brian D.; Zhuang, Yan; Smith, Staci N.; Eberly, Justin L. et al. (2003): Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. In: *Cancer research* 63 (18), S. 5962–5969.

French, Kevin J.; Upson, John J.; Keller, Staci N.; Zhuang, Yan; Yun, Jong K.; Smith, Charles D. (2006): Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318 (2), S. 596–603. DOI: 10.1124/jpet.106.101345.

French, Kevin J.; Zhuang, Yan; Maines, Lynn W.; Gao, Peng; Wang, Wenxue; Beljanski, Vladimir et al. (2010): Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333 (1), S. 129–139. DOI: 10.1124/jpet.109.163444.

Friemel, Juliane; Rechsteiner, Markus; Frick, Lukas; Böhm, Friederike; Struckmann, Kirsten; Egger, Michèle et al. (2015): Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (8), S. 1951–1961. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0122.

- Fugio, Lais Brigliadori; Coeli-Lacchini, Fernanda B.; Leopoldino, Andréia Machado (2020): Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic. In: *Cells* 9 (3). DOI: 10.3390/cells9030581.
- Futerman, Anthony H.; Hannun, Yusuf A. (2004): The complex life of simple sphingolipids. In: *EMBO reports* 5 (8), S. 777–782. DOI: 10.1038/sj.embor.7400208.
- Futerman, Anthony H.; Riezman, Howard (2005): The ins and outs of sphingolipid synthesis. In: *Trends in cell biology* 15 (6), S. 312–318. DOI: 10.1016/j.tcb.2005.04.006.
- Gao, Peng; Peterson, Yuri K.; Smith, Ryan A.; Smith, Charles D. (2012): Characterization of isoenzyme-selective inhibitors of human sphingosine kinases. In: *PloS one* 7 (9), e44543. DOI: 10.1371/journal.pone.0044543.
- Garcia-Tsao, Guadalupe (2016): The Child-Turcotte Classification: From Gestalt to Sophisticated Statistics and Back. In: *Digestive diseases and sciences* 61 (11), S. 3102–3104. DOI: 10.1007/s10620-016-4319-7.
- Garten, Antje; Grohmann, Theresa; Kluckova, Katarina; Lavery, Gareth G.; Kiess, Wieland; Penke, Melanie (2019): Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Is Reversed by SIRT1. In: *International journal of molecular sciences* 20 (16). DOI: 10.3390/ijms20164048.
- Ghosh, T. K.; Bian, J.; Gill, D. L. (1990): Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 248 (4963), S. 1653–1656. DOI: 10.1126/science.2163543.
- Gomes, Marcos António; Priolli, Denise Gonçalves; Tralhão, José Guilherme; Botelho, Maria Filomena (2013): Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. In: *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992) 59 (5), S. 514–524. DOI: 10.1016/j.ramb.2013.03.005.
- Grammatikos, Georgios; Ferreiròs, Nerea; Waidmann, Oliver; Bon, Dimitra; Schroeter, Sirkka; Koch, Alexander et al. (2015): Serum Sphingolipid Variations

- Associate with Hepatic Decompensation and Survival in Patients with Cirrhosis. In: *PloS one* 10 (9), e0138130. DOI: 10.1371/journal.pone.0138130.
- Grammatikos, Georgios; Schoell, Niklas; Ferreirós, Nerea; Bon, Dimitra; Herrmann, Eva; Farnik, Harald et al. (2016): Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16-ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. In: *Oncotarget* 7 (14), S. 18095–18105. DOI: 10.18632/oncotarget.7741.
- Grbčić, Petra; Tomljanović, Ivana; Klobučar, Marko; Kraljević Pavelić, Sandra; Lučin, Ksenija; Sedić, Mirela (2017): Dual sphingosine kinase inhibitor SKI-II enhances sensitivity to 5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells via suppression of osteopontin and FAK/IGF-1R signalling. In: *Biochemical and biophysical research communications* 487 (4), S. 782–788. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.100.
- Grösch, Sabine; Schiffmann, Susanne; Geisslinger, Gerd (2012): Chain length-specific properties of ceramides. In: *Progress in lipid research* 51 (1), S. 50–62. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.11.001.
- Gurke, Robert; Etyemez, Semra; Prvulovic, David; Thomas, Dominique; Fleck, Stefanie C.; Reif, Andreas et al. (2019): A Data Science-Based Analysis Points at Distinct Patterns of Lipid Mediator Plasma Concentrations in Patients With Dementia. In: *Frontiers in psychiatry* 10, S. 41. DOI: 10.3389/fpsy.2019.00041.
- Hait, Nitai C.; Bellamy, Andrea; Milstien, Sheldon; Kordula, Tomasz; Spiegel, Sarah (2007): Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (16), S. 12058–12065. DOI: 10.1074/jbc.M609559200.
- Hait, Nitai C.; Oskeritzian, Carole A.; Paugh, Steven W.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2006): Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1758 (12), S. 2016–2026. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.08.007.
- Hannun, Y. A. (1994): The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (5), S. 3125–3128.

Hannun, Y. A.; Loomis, C. R.; Merrill, A. H.; Bell, R. M. (1986): Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (27), S. 12604–12609.

Hartmann, Daniela; Lucks, Jessica; Fuchs, Sina; Schiffmann, Susanne; Schreiber, Yannick; Ferreirós, Nerea et al. (2012): Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (4), S. 620–628. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.

Hasanifard, Leili; Sheervalilou, Roghayeh; Majidinia, Maryam; Yousefi, Bahman (2019): New insights into the roles and regulation of SphK2 as a therapeutic target in cancer chemoresistance. In: *Journal of cellular physiology* 234 (6), S. 8162–8181. DOI: 10.1002/jcp.27612.

Hatoum, Diana; Haddadi, Nahal; Lin, Yiguang; Nassif, Najah T.; McGowan, Eileen M. (2017): Mammalian sphingosine kinase (SphK) isoenzymes and isoform expression: challenges for SphK as an oncotarget. In: *Oncotarget* 8 (22), S. 36898–36929. DOI: 10.18632/oncotarget.16370.

He, Quanren; Suzuki, Hirofumi; Sharma, Neelesh; Sharma, Raghubir P. (2006): Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 treatment activates sphingolipid-metabolizing systems in mouse liver. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 94 (2), S. 388–397. DOI: 10.1093/toxsci/kfl102.

Huwiler, Andrea; Kolter, Thomas; Pfeilschifter, Josef; Sandhoff, Konrad (2000): Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1485 (2-3), S. 63–99. DOI: 10.1016/S1388-1981(00)00042-1.

Idkowiak-Baldys, Jolanta; Apraiz, Aintzane; Li, Li; Rahmaniyan, Mehrdad; Clarke, Christopher J.; Kravka, Jacqueline M. et al. (2010): Dihydroceramide desaturase activity is modulated by oxidative stress. In: *The Biochemical journal* 427 (2), S. 265–274. DOI: 10.1042/BJ20091589.

Itoh, K.; Ishii, T.; Wakabayashi, N.; Yamamoto, M. (1999): Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. In: *Free radical research* 31 (4), S. 319–324. DOI: 10.1080/10715769900300881.

Jafari, Naser; Drury, James; Morris, Andrew J.; Onono, Fredrick O.; Stevens, Payton D.; Gao, Tianyan et al. (2019): De Novo Fatty Acid Synthesis-Driven Sphingolipid Metabolism Promotes Metastatic Potential of Colorectal Cancer. In: *Molecular cancer research : MCR* 17 (1), S. 140–152. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0199.

Ju, TongFa; Gao, DaQuan; Fang, Zheng-Yu (2016): Targeting colorectal cancer cells by a novel sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543. In: *Biochemical and biophysical research communications* 470 (3), S. 728–734. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.053.

Kawahara, Atsuo; Nishi, Tsuyoshi; Hisano, Yu; Fukui, Hajime; Yamaguchi, Akihito; Mochizuki, Naoki (2009): The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. In: *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913), S. 524–527. DOI: 10.1126/science.1167449.

Kawamori, Toshihiko; Osta, Walid; Johnson, Korey R.; Pettus, Benjamin J.; Bielawski, Jacek; Tanaka, Takuji et al. (2006): Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (2), S. 386–388. DOI: 10.1096/fj.05-4331fje.

Keating, Gillian M. (2017): Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. In: *Targeted oncology* 12 (2), S. 243–253. DOI: 10.1007/s11523-017-0484-7.

Khan, R. B.; Phulukdaree, A.; Chuturgoon, A. A. (2018): Concentration-dependent effect of fumonisin B1 on apoptosis in oesophageal cancer cells. In: *Human & experimental toxicology* 37 (7), S. 762–771. DOI: 10.1177/0960327117735570.

Kharel, Yugesh; Morris, Emily A.; Congdon, Molly D.; Thorpe, Steven B.; Tomsig, Jose L.; Santos, Webster L.; Lynch, Kevin R. (2015): Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 355 (1), S. 23–31. DOI: 10.1124/jpet.115.225862.

- Kim, Dong-Hyun; Lee, Youn-Sun; Lee, Yong-Moon; Oh, Seikwan; Yun, Yeo-Pyo; Yoo, Hwan-Soo (2007): Elevation of sphingoid base 1-phosphate as a potential contributor to hepatotoxicity in fumonisin B1-exposed mice. In: *Archives of pharmacal research* 30 (8), S. 962–969. DOI: 10.1007/BF02993964.
- Kim, Hyun-Soo; Yoon, Gun; Ryu, Ji-Yoon; Cho, Young-Jae; Choi, Jung-Joo; Lee, Yoo-Young et al. (2015): Sphingosine kinase 1 is a reliable prognostic factor and a novel therapeutic target for uterine cervical cancer. In: *Oncotarget* 6 (29), S. 26746–26756. DOI: 10.18632/oncotarget.4818.
- Kim, Sang Ho; Singh, Mahendra Pal; Sharma, Chanchal; Kang, Sun Chul (2018): Fumonisin B1 actuates oxidative stress-associated colonic damage via apoptosis and autophagy activation in murine model. In: *Journal of biochemical and molecular toxicology*, e22161. DOI: 10.1002/jbt.22161.
- Kimura, T.; Watanabe, T.; Sato, K.; Kon, J.; Tomura, H.; Tamama, K. et al. (2000): Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. In: *Biochemical Journal* 348 Pt 1 (Pt 1), S. 71–76.
- Klintmalm, G. B. (1998): Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of tumor characteristics on outcome. In: *Annals of surgery* 228 (4), S. 479–490. DOI: 10.1097/00000658-199810000-00005.
- Kohama, T.; Olivera, A.; Edsall, L.; Nagiec, M. M.; Dickson, R.; Spiegel, S. (1998): Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (37), S. 23722–23728. DOI: 10.1074/jbc.273.37.23722.
- Kohno, Masataka; Momoi, Michiko; Oo, Myat Lin; Paik, Ji-Hye; Lee, Yong-Moon; Venkataraman, Krishnan et al. (2006): Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. In: *Molecular and cellular biology* 26 (19), S. 7211–7223. DOI: 10.1128/MCB.02341-05.

- Kudo, Masatoshi; Finn, Richard S.; Qin, Shukui; Han, Kwang-Hyub; Ikeda, Kenji; Piscaglia, Fabio et al. (2018): Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. In: *The Lancet* 391 (10126), S. 1163–1173. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
- Kumar, Ramesh; Priyadarshi, Rajeev Nayan; Anand, Utpal (2020): Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Growing Burden, Adverse Outcomes and Associations. In: *Journal of clinical and translational hepatology* 8 (1), S. 76–86. DOI: 10.14218/JCTH.2019.00051.
- Kurz, Jennifer; Parnham, Michael J.; Geisslinger, Gerd; Schiffmann, Susanne (2019): Ceramides as Novel Disease Biomarkers. In: *Trends in molecular medicine* 25 (1), S. 20–32. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.10.009.
- Lahiri, S.; Futerman, A. H. (2007): The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (17), S. 2270–2284. DOI: 10.1007/s00018-007-7076-0.
- LeBlanc, Francis R.; Liu, Xin; Hengst, Jeremy; Fox, Todd; Calvert, Valerie; Petricoin, Emanuel F. et al. (2015): Sphingosine kinase inhibitors decrease viability and induce cell death in natural killer-large granular lymphocyte leukemia. In: *Cancer biology & therapy* 16 (12), S. 1830–1840. DOI: 10.1080/15384047.2015.1078949.
- LeBlanc, Francis R.; Pearson, Jennifer M.; Tan, Su-Fern; Cheon, HeeJin; Xing, Jeffrey C.; Dunton, Wendy et al. (2020): Sphingosine kinase-2 is overexpressed in large granular lymphocyte leukaemia and promotes survival through Mcl-1. In: *British journal of haematology*. DOI: 10.1111/bjh.16530.
- Leicht, Deborah T.; Balan, Vitaly; Kaplun, Alexander; Singh-Gupta, Vinita; Kaplun, Ludmila; Dobson, Melissa; Tzivion, Guri (2007): Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), S. 1196–1212. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.05.001.

- Levy, Michal; Futerman, Anthony H. (2010): Mammalian ceramide synthases. In: *IUBMB life* 62 (5), S. 347–356. DOI: 10.1002/iub.319.
- Lewis, Alexander C.; Wallington-Beddoe, Craig T.; Powell, Jason A.; Pitson, Stuart M. (2018): Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies. In: *Cell death discovery* 4, S. 4. DOI: 10.1038/s41420-018-0075-0.
- Li, Guangfu; Liu, Dai; Kimchi, Eric T.; Kaifi, Jussuf T.; Qi, Xiaoqiang; Manjunath, Yariswamy et al. (2018): Nanoliposome C6-Ceramide Increases the Anti-tumor Immune Response and Slows Growth of Liver Tumors in Mice. In: *Gastroenterology* 154 (4), 1024-1036.e9. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.10.050.
- Li, Jun; Guan, Hong-Yu; Gong, Li-Yun; Song, Li-Bing; Zhang, Nu; Wu, Jueheng et al. (2008): Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (21), S. 6996–7003. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0754.
- Li, Pei-Hua; Wu, Jin-Xia; Zheng, Jun-Nian; Pei, Dong-Sheng (2014): A sphingosine kinase-1 inhibitor, SKI-II, induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer cells. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15 (23), S. 10381–10385. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.23.10381.
- Li, Zhi-Heng; Tao, Yan-Fang; Xu, Li-Xiao; Zhao, He; Li, Xiao-Lu; Fang, Fang et al. (2016): A novel sphingosine kinase 1 inhibitor (SKI-5C) induces cell death of Wilms' tumor cells in vitro and in vivo. In: *American Journal of Translational Research* 8 (11), S. 4548–4563.
- Liang, Jie; Nagahashi, Masayuki; Kim, Eugene Y.; Harikumar, Kuzhuvelil B.; Yamada, Akimitsu; Huang, Wei-Ching et al. (2013): Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. In: *Cancer cell* 23 (1), S. 107–120. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.11.013.

- Lin, Fan; Li, Yuyuan; Cao, Jie; Fan, Shaofeng; Wen, Jifeng; Zhu, Guanghui et al. (2011): Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma and its relationships with metastasis, invasion of tumor cells. In: *Molecular biology reports* 38 (8), S. 5205–5210. DOI: 10.1007/s11033-010-0671-4.
- Liu, Guanglin; Zheng, Haiqing; Zhang, Zhibing; Wu, Zhiqiang; Xiong, Huaping; Li, Jun; Song, Libing (2010): Overexpression of sphingosine kinase 1 is associated with salivary gland carcinoma progression and might be a novel predictive marker for adjuvant therapy. In: *BMC cancer* 10, S. 495. DOI: 10.1186/1471-2407-10-495.
- Liu, H.; Sugiura, M.; Nava, V. E.; Edsall, L. C.; Kono, K.; Poulton, S. et al. (2000): Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (26), S. 19513–19520. DOI: 10.1074/jbc.M002759200.
- Liu, Hong; Toman, Rachele E.; Goparaju, Sravan K.; Maceyka, Michael; Nava, Victor E.; Sankala, Heidi et al. (2003): Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (41), S. 40330–40336. DOI: 10.1074/jbc.M304455200.
- Liu, Hong; Zhang, Cai-Xia; Ma, Yan; He, Hong-Wei; Wang, Jia-Ping; Shao, Rong-Guang (2016a): SphK1 inhibitor SKI II inhibits the proliferation of human hepatoma HepG2 cells via the Wnt5A/ β -catenin signaling pathway. In: *Life sciences* 151, S. 23–29. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.098.
- Liu, Kai; Guo, Tai L.; Hait, Nitai C.; Allegood, Jeremy; Parikh, Hardik I.; Xu, Wenfang et al. (2013): Biological characterization of 3-(2-amino-ethyl)-5-3-(4-butoxyphenyl)-propylidene-thiazolidine-2,4-dione (K145) as a selective sphingosine kinase-2 inhibitor and anticancer agent. In: *PloS one* 8 (2), e56471. DOI: 10.1371/journal.pone.0056471.
- Liu, Li; Cao, Yichen; Chen, Charles; Zhang, Xiaomei; McNabola, Angela; Wilkie, Dean et al. (2006): Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model

PLC/PRF/5. In: *Cancer research* 66 (24), S. 11851–11858. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377.

Liu, Runping; Zhao, Renping; Zhou, Xiqiao; Liang, Xiuyin; Campbell, Deanna J. W.; Zhang, Xiaoxuan et al. (2014): Conjugated bile acids promote cholangiocarcinoma cell invasive growth through activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (3), S. 908–918. DOI: 10.1002/hep.27085.

Liu, Wei; Ning, Jinfeng; Li, Chunhong; Hu, Jing; Meng, Qingwei; Lu, Hailing; Cai, Li (2016b): Overexpression of Sphk2 is associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (5), S. 6331–6336. DOI: 10.1007/s13277-015-4480-1.

Llovet, J. M.; Brú, C.; Bruix, J. (1999a): Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. In: *Seminars in liver disease* 19 (3), S. 329–338. DOI: 10.1055/s-2007-1007122.

Llovet, J. M.; Fuster, J.; Bruix, J. (1999b): Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30 (6), S. 1434–1440. DOI: 10.1002/hep.510300629.

Llovet, Josep M.; Ricci, Sergio; Mazzaferro, Vincenzo; Hilgard, Philip; Gane, Edward; Blanc, Jean-Frédéric et al. (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 359 (4), S. 378–390. DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.

Lockman, Kshelle; Hinson, Jeremiah S.; Medlin, Matt D.; Morris, Dionne; Taylor, Joan M.; Mack, Christopher P. (2004): Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (41), S. 42422–42430. DOI: 10.1074/jbc.M405432200.

Lok, Anna S.; Sterling, Richard K.; Everhart, James E.; Wright, Elizabeth C.; Hoefs, John C.; Di Bisceglie, Adrian M. et al. (2010): Des-gamma-carboxy prothrombin and

alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma.

In: *Gastroenterology* 138 (2), S. 493–502. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.031.

Louandre, Christophe; Ezzoukhry, Zakaria; Godin, Corinne; Barbare, Jean-Claude; Mazière, Jean-Claude; Chauffert, Bruno; Galmiche, Antoine (2013): Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. In: *International journal of cancer* 133 (7), S. 1732–1742. DOI: 10.1002/ijc.28159.

Lyons, J. F.; Wilhelm, S.; Hibner, B.; Bollag, G. (2001): Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. In: *Endocrine-related cancer* 8 (3), S. 219–225. DOI: 10.1677/erc.0.0080219.

Maceyka, Michael; Payne, Shawn G.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2002): Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1585 (2-3), S. 193–201. DOI: 10.1016/S1388-1981(02)00341-4.

Maceyka, Michael; Sankala, Heidi; Hait, Nitai C.; Le Stunff, Hervé; Liu, Hong; Toman, Rachelle et al. (2005): SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (44), S. 37118–37129. DOI: 10.1074/jbc.M502207200.

Maceyka, Michael; Spiegel, Sarah (2014): Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. In: *Nature* 510 (7503), S. 58–67. DOI: 10.1038/nature13475.

Madhunapantula, SubbaRao V.; Hengst, Jeremy; Gowda, Raghavendra; Fox, Todd E.; Yun, Jong K.; Robertson, Gavin P. (2012): Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. In: *Pigment cell & melanoma research* 25 (2), S. 259–274. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2012.00970.x.

Maiti, Aparna; Takabe, Kazuaki; Hait, Nitai C. (2017): Metastatic triple-negative breast cancer is dependent on SphKs/S1P signaling for growth and survival. In: *Cellular signalling* 32, S. 85–92. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.01.021.

- Marí, Montserrat; Fernández-Checa, José C. (2007): Sphingolipid signalling and liver diseases. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27 (4), S. 440–450. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01475.x.
- Marin, Jose J. G.; Briz, Oscar; Herraez, Elisa; Lozano, Elisa; Asensio, Maitane; Di Giacomo, Silvia et al. (2018): Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. In: *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 42 (3), S. 182–192. DOI: 10.1016/j.clinre.2017.12.006.
- Marquardt, Jens U.; Thorgeirsson, Snorri S. (2014): SnapShot: Hepatocellular carcinoma. In: *Cancer cell* 25 (4), 550.e1. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.04.002.
- Marrero, Jorge A.; Feng, Ziding; Wang, Yinghui; Nguyen, Mindie H.; Befeler, Alex S.; Roberts, Lewis R. et al. (2009): Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. In: *Gastroenterology* 137 (1), S. 110–118. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.005.
- Martin del Campo, Sara E.; Levine, Kala M.; Mundy-Bosse, Bethany L.; Grignol, Valerie P.; Fairchild, Ene T.; Campbell, Amanda R. et al. (2015): The Raf Kinase Inhibitor Sorafenib Inhibits JAK-STAT Signal Transduction in Human Immune Cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (5), S. 1995–2005. DOI: 10.4049/jimmunol.1400084.
- Mary, Verónica S.; Arias, Silvina L.; Otaiza, Santiago N.; Velez, Pilar A.; Rubinstein, Héctor R.; Theumer, Martín G. (2017): The aflatoxin B1 -fumonisin B1 toxicity in BRL-3A hepatocytes is associated to induction of cytochrome P450 activity and arachidonic acid metabolism. In: *Environmental toxicology* 32 (6), S. 1711–1724. DOI: 10.1002/tox.22395.
- Matsumura, Hiroshi; Nirei, Kazushige; Nakamura, Hitomi; Higuchi, Teruhisa; Arakawa, Yasuo; Ogawa, Masahiro et al. (2013): Histopathology of type C liver disease for determining hepatocellular carcinoma risk factors. In: *World journal of gastroenterology* 19 (30), S. 4887–4896. DOI: 10.3748/wjg.v19.i30.4887.

- Mazzaferro, V.; Regalia, E.; Doci, R.; Andreola, S.; Pulvirenti, A.; Bozzetti, F. et al. (1996): Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. In: *The New England journal of medicine* 334 (11), S. 693–699. DOI: 10.1056/NEJM199603143341104.
- McMahon, B. J.; Alberts, S. R.; Wainwright, R. B.; Bulkow, L.; Lanier, A. P. (1990): Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. In: *Archives of internal medicine* 150 (5), S. 1051–1054. DOI: 10.1001/archinte.150.5.1051.
- Menche, Nicole (2016): *Biologie Anatomie Physiologie*. 8. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher.
- Mercado, Nicolas; Kizawa, Yasuo; Ueda, Keitaro; Xiong, Yeping; Kimura, Genki; Moses, Audric et al. (2014): Activation of transcription factor Nrf2 signalling by the sphingosine kinase inhibitor SKI-II is mediated by the formation of Keap1 dimers. In: *PloS one* 9 (2), e88168. DOI: 10.1371/journal.pone.0088168.
- Merrill, A. H.; van Echten, G.; Wang, E.; Sandhoff, K. (1993): Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (36), S. 27299–27306.
- Merrill, Alfred H. (2002): De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (29), S. 25843–25846. DOI: 10.1074/jbc.R200009200.
- Meyer, Tim; Fox, Richard; Ma, Yuk Ting; Ross, Paul J.; James, Martin W.; Sturgess, Richard et al. (2017): Sorafenib in combination with transarterial chemoembolisation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (TACE 2): a randomised placebo-controlled, double-blind, phase 3 trial. In: *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2 (8), S. 565–575. DOI: 10.1016/S2468-1253(17)30156-5.

- Meyer zu Heringdorf, Dagmar; Jakobs, Karl H. (2007): Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1768 (4), S. 923–940. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.09.026.
- Mitra, Poulami; Oskeritzian, Carole A.; Payne, Shawn G.; Beaven, Michael A.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2006): Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44), S. 16394–16399. DOI: 10.1073/pnas.0603734103.
- Mobio, T. A.; Anane, R.; Baudrimont, I.; Carratú, M. R.; Shier, T. W.; Dano, S. D. et al. (2000): Epigenetic properties of fumonisin B(1): cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 164 (1), S. 91–96. DOI: 10.1006/taap.2000.8893.
- Morales, A.; París, R.; Villanueva, A.; Llacuna, L.; García-Ruiz, C.; Fernández-Checa, J. C. (2007a): Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. In: *Oncogene* 26 (6), S. 905–916. DOI: 10.1038/sj.onc.1209834.
- Morales, Albert; Lee, Hyunmi; Goñi, Felix M.; Kolesnick, Richard; Fernandez-Checa, José C. (2007b): Sphingolipids and cell death. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12 (5), S. 923–939. DOI: 10.1007/s10495-007-0721-0.
- Mu, Xueru; Español-Suñer, Regina; Mederacke, Ingmar; Affò, Silvia; Manco, Rita; Sempoux, Christine et al. (2015): Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (10), S. 3891–3903. DOI: 10.1172/JCI77995.
- Mullen, Thomas D.; Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2012): Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. In: *The Biochemical journal* 441 (3), S. 789–802. DOI: 10.1042/BJ20111626.
- Mullen, Thomas D.; Obeid, Lina M. (2012): Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell

death. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12 (4), S. 340–363. DOI: 10.2174/187152012800228661.

Nault, Jean-Charles (2014): Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 28 (5), S. 937–947. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.08.006.

Negro, Francesco (2020): Natural history of NASH and HCC. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 40 Suppl 1, S. 72–76. DOI: 10.1111/liv.14362.

Newell, Pippa; Toffanin, Sara; Villanueva, Augusto; Chiang, Derek Y.; Minguez, Beatriz; Cabellos, Laia et al. (2009): Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. In: *Journal of hepatology* 51 (4), S. 725–733. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.03.028.

Newton, Jason; Lima, Santiago; Maceyka, Michael; Spiegel, Sarah (2015): Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. In: *Experimental cell research* 333 (2), S. 195–200. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.02.025.

Olivera, A.; Kohama, T.; Edsall, L.; Nava, V.; Cuvillier, O.; Poulton, S.; Spiegel, S. (1999): Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. In: *The Journal of cell biology* 147 (3), S. 545–558. DOI: 10.1083/jcb.147.3.545.

Olivera, A.; Kohama, T.; Tu, Z.; Milstien, S.; Spiegel, S. (1998): Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (20), S. 12576–12583. DOI: 10.1074/jbc.273.20.12576.

Orman, Eric S.; Odena, Gemma; Bataller, Ramon (2013): Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 28 Suppl 1, S. 77–84. DOI: 10.1111/jgh.12030.

- Oskouian, Babak; Saba, Julie D. (2010): Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. In: *Advances in experimental medicine and biology* 688, S. 185–205. DOI: 10.1007/978-1-4419-6741-1_13.
- Pan, Jian; Tao, Yan-Fang; Zhou, Zhuan; Cao, Bang-Rong; Wu, Shui-Yan; Zhang, Yan-Lan et al. (2011): An novel role of sphingosine kinase-1 (SPHK1) in the invasion and metastasis of esophageal carcinoma. In: *Journal of translational medicine* 9, S. 157. DOI: 10.1186/1479-5876-9-157.
- Park, Margaret A.; Mitchell, Clint; Zhang, Guo; Yacoub, Adly; Allegood, Jeremy; Häussinger, Dieter et al. (2010): Vorinostat and sorafenib increase CD95 activation in gastrointestinal tumor cells through a Ca(2+)-de novo ceramide-PP2A-reactive oxygen species-dependent signaling pathway. In: *Cancer research* 70 (15), S. 6313–6324. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0999.
- Park, Margaret A.; Zhang, Guo; Martin, Aditi Pandya; Hamed, Hossein; Mitchell, Clint; Hylemon, Philip B. et al. (2008): Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation. In: *Cancer biology & therapy* 7 (10), S. 1648–1662. DOI: 10.4161/cbt.7.10.6623.
- Patwardhan, Neeraj N.; Morris, Emily A.; Kharel, Yugesh; Raje, Mithun R.; Gao, Ming; Tomsig, Jose L. et al. (2015): Structure-activity relationship studies and in vivo activity of guanidine-based sphingosine kinase inhibitors: discovery of SphK1- and SphK2-selective inhibitors. In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (4), S. 1879–1899. DOI: 10.1021/jm501760d.
- Payne, Shawn G.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2002): Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. In: *FEBS Letters* 531 (1), S. 54–57. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03480-4.
- Pchejetski, Dimitri; Doumerc, Nicolas; Golzio, Muriel; Naymark, Maria; Teissié, Justin; Kohama, Takafumi et al. (2008): Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. In: *Molecular cancer therapeutics* 7 (7), S. 1836–1845. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2322.

- Peter R. Galle; Alejandro Forner; Josep M. Llovet; Vincenzo Mazzaferro; Fabio Piscaglia; Jean-Luc Raoul et al. (2018): EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. In: *Journal of hepatology* 69 (1), S. 182–236. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.
- PetruzzIELLO, Arnolfo (2018): Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. In: *The open virology journal* 12, S. 26–32. DOI: 10.2174/1874357901812010026.
- Piñeiro-Carrero, Víctor M.; Piñeiro, Eric O. (2004): Liver. In: *Pediatrics* 113 (4 Suppl), S. 1097–1106.
- Pinelli, E.; Poux, N.; Garren, L.; Pipy, B.; Castegnaro, M.; Miller, D. J.; Pfohl-Leszkowicz, A. (1999): Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B(1) stimulates cPLA(2) phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. In: *Carcinogenesis* 20 (9), S. 1683–1688. DOI: 10.1093/carcin/20.9.1683.
- Pitson, Stuart M. (2011): Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. In: *Trends in biochemical sciences* 36 (2), S. 97–107. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.08.001.
- Pitson, Stuart M.; Moretti, Paul A. B.; Zebol, Julia R.; Lynn, Helen E.; Xia, Pu; Vadas, Mathew A.; Wattenberg, Binks W. (2003): Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. In: *The EMBO journal* 22 (20), S. 5491–5500. DOI: 10.1093/emboj/cdg540.
- Plano, Daniel; Amin, Shantu; Sharma, Arun K. (2014): Importance of sphingosine kinase (SphK) as a target in developing cancer therapeutics and recent developments in the synthesis of novel SphK inhibitors. In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (13), S. 5509–5524. DOI: 10.1021/jm4011687.
- Plastaras, John P.; Kim, Seok-Hyun; Liu, Yingqiu Y.; Dicker, David T.; Dorsey, Jay F.; McDonough, James et al. (2007): Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation. In: *Cancer research* 67 (19), S. 9443–9454. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1473.

- Pruett, Sarah T.; Bushnev, Anatoliy; Hagedorn, Kerri; Adiga, Madhura; Haynes, Christopher A.; Sullards, M. Cameron et al. (2008): Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. In: *Journal of lipid research* 49 (8), S. 1621–1639. DOI: 10.1194/jlr.R800012-JLR200.
- Pugh, R. N.; Murray-Lyon, I. M.; Dawson, J. L.; Pietroni, M. C.; Williams, R. (1973): Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. In: *The British journal of surgery* 60 (8), S. 646–649. DOI: 10.1002/bjs.1800600817.
- Rosa, Roberta; Marciano, Roberta; Malapelle, Umberto; Formisano, Luigi; Nappi, Lucia; D'Amato, Claudia et al. (2013): Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (1), S. 138–147. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1050.
- Ruvolo, P. (2003): Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. In: *Pharmacological Research* 47 (5), S. 383–392. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00050-1.
- Sanchez, Teresa; Hla, Timothy (2004): Structural and functional characteristics of S1P receptors. In: *Journal of cellular biochemistry* 92 (5), S. 913–922. DOI: 10.1002/jcb.20127.
- Sarkar, Sukumar; Maceyka, Michael; Hait, Nitai C.; Paugh, Steven W.; Sankala, Heidi; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2005): Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. In: *FEBS Letters* 579 (24), S. 5313–5317. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.055.
- Sato, Koichi; Malchinkhuu, Enkhzol; Horiuchi, Yuta; Mogi, Chihiro; Tomura, Hideaki; Tosaka, Masahiko et al. (2007): Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. In: *Journal of neurochemistry* 103 (6), S. 2610–2619. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04958.x.
- Sato, Masaya; Ikeda, Hitoshi; Uranbileg, Baasanjav; Kurano, Makoto; Saigusa, Daisuke; Aoki, Junken et al. (2016): Sphingosine kinase-1, S1P transporter spinster

homolog 2 and S1P2 mRNA expressions are increased in liver with advanced fibrosis in human. In: *Scientific reports* 6, S. 32119. DOI: 10.1038/srep32119.

Schwalm, Stephanie; Pfeilschifter, Josef; Huwiler, Andrea (2013): Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1831 (1), S. 239–250. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2012.07.022.

Seefelder, W. (2003): Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 192 (2), S. 146–153. DOI: 10.1016/S0041-008X(03)00262-X.

Serrano-Oviedo, Leticia; Ortega-Muelas, Marta; García-Cano, Jesús; Valero, María Ll; Cimas, Francisco J.; Pascual-Serra, Raquel et al. (2018): Autophagic cell death associated to Sorafenib in renal cell carcinoma is mediated through Akt inhibition in an ERK1/2 independent fashion. In: *PloS one* 13 (7), e0200878. DOI: 10.1371/journal.pone.0200878.

Setshedi, Mashiko; Wands, Jack R.; La Monte, Suzanne M. de (2010): Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 3 (3), S. 178–185. DOI: 10.4161/oxim.3.3.12288.

Sharma, Neelesh; He, Quanren; Sharma, Raghubir P. (2004): Sphingosine kinase activity confers resistance to apoptosis by fumonisin B1 in human embryonic kidney (HEK-293) cells. In: *Chemico-biological interactions* 151 (1), S. 33–42. DOI: 10.1016/j.cbi.2004.10.003.

Shi, Wen-Na; Cui, Shu-Xiang; Song, Zhi-Yu; Wang, Shu-Qing; Sun, Shi-Yue; Yu, Xin-Feng et al. (2017): Overexpression of SphK2 contributes to ATRA resistance in colon cancer through rapid degradation of cytoplasmic RXR α by K48/K63-linked polyubiquitination. In: *Oncotarget* 8 (24), S. 39605–39617. DOI: 10.18632/oncotarget.17174.

Sia, Daniela; Villanueva, Augusto; Friedman, Scott L.; Llovet, Josep M. (2017): Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. In: *Gastroenterology* 152 (4), S. 745–761. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.11.048.

Silva, Mauricio F.; Sherman, Morris (2011): Criteria for liver transplantation for HCC: what should the limits be? In: *Journal of hepatology* 55 (5), S. 1137–1147. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.05.012.

Song, Keqi; Dai, Lan; Long, Xiaoran; Cui, Xiaojuan; Liu, Yixuan; Di, Wen (2019): Sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 displays anti-epithelial ovarian cancer activities in vitro and in vivo. In: *OncoTargets and therapy* 12, S. 4437–4449. DOI: 10.2147/OTT.S208519.

Song, Pei-Pei; Xia, Ju-Feng; Inagaki, Yoshinori; Hasegawa, Kiyoshi; Sakamoto, Yoshihiro; Kokudo, Norihiro; Tang, Wei (2016): Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. In: *World journal of gastroenterology* 22 (1), S. 262–274. DOI: 10.3748/wjg.v22.i1.262.

Sørensen, J. B.; Klee, M.; Palshof, T.; Hansen, H. H. (1993): Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study. In: *British journal of cancer* 67 (4), S. 773–775. DOI: 10.1038/bjc.1993.140.

Spiegel, Sarah; Milstien, Sheldon (2000): Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. In: *FEBS Letters* 476 (1-2), S. 55–57. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01670-7.

Stancevic, Branka; Kolesnick, Richard (2010): Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. In: *FEBS Letters* 584 (9), S. 1728–1740. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.026.

Strub, Graham M.; Maceyka, Michael; Hait, Nitai C.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2010): Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. In: *Advances in experimental medicine and biology* 688, S. 141–155. DOI: 10.1007/978-1-4419-6741-1_10.

Studer, Elaine; Zhou, Xiqiao; Zhao, Renping; Wang, Yun; Takabe, Kazuaki; Nagahashi, Masayuki et al. (2012): Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (1), S. 267–276. DOI: 10.1002/hep.24681.

- Tagaram, Hephzibah Rani S.; Divittore, Nicole A.; Barth, Brian M.; Kaiser, James M.; Avella, Diego; Kimchi, Eric T. et al. (2011): Nanoliposomal ceramide prevents in vivo growth of hepatocellular carcinoma. In: *Gut* 60 (5), S. 695–701. DOI: 10.1136/gut.2010.216671.
- Taha, Tarek A.; Mullen, Thomas D.; Obeid, Lina M. (2006): A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. In: *Biochimica et biophysica acta* 1758 (12), S. 2027–2036. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.10.018.
- Takabe, Kazuaki; Paugh, Steven W.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2008): "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. In: *Pharmacological reviews* 60 (2), S. 181–195. DOI: 10.1124/pr.107.07113.
- Taniwaki, T.; Yamada, T.; Asahara, H.; Ohyagi, Y.; Kira, J. (1999): Ceramide induces apoptosis to immature cerebellar granule cells in culture. In: *Neurochemical research* 24 (5), S. 685–690. DOI: 10.1023/a:1021008626887.
- Tian, Xiaodong; Hao, Kun; Qin, Changfu; Xie, Kun; Xie, Xuehai; Yang, Yinmo (2013): Insulin-like growth factor 1 receptor promotes the growth and chemoresistance of pancreatic cancer. In: *Digestive diseases and sciences* 58 (9), S. 2705–2712. DOI: 10.1007/s10620-013-2673-2.
- Tomizawa, Minoru; Shinozaki, Fuminobu; Sugiyama, Takao; Yamamoto, Shigenori; Sueishi, Makoto; Yoshida, Takanobu (2010): Sorafenib suppresses the cell cycle and induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines in serum-free media. In: *Experimental and therapeutic medicine* 1 (5), S. 863–866. DOI: 10.3892/etm.2010.131.
- Torre, Lindsey A.; Bray, Freddie; Siegel, Rebecca L.; Ferlay, Jacques; Lortet-Tieulent, Joannie; Jemal, Ahmedin (2015): Global cancer statistics, 2012. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 65 (2), S. 87–108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- Trefts, Elijah; Gannon, Maureen; Wasserman, David H. (2017): The liver. In: *Current biology : CB* 27 (21), R1147-R1151. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.

- Trevisani, Franco; D'Intino, Paola Emanuela; Morselli-Labate, Antonio Maria; Mazzella, Giuseppe; Accogli, Esterita; Caraceni, Paolo et al. (2001): Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. In: *Journal of hepatology* 34 (4), S. 570–575. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)00053-2.
- Tunissioli, Nathalia Martines; Castanhole-Nunes, Márcia Maria Urbanin; Biselli-Chicote, Patrícia Matos; Pavarino, Érika Cristina; da Silva, Renato Ferreira; da Silva, Rita de Cássia Martins Alves; Goloni-Bertollo, Eny Maria (2017): Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18 (4), S. 863–872. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.4.863.
- Ueda, Norishi (2015): Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. In: *International journal of molecular sciences* 16 (3), S. 5076–5124. DOI: 10.3390/ijms16035076.
- Ueno, Y.; Moriyama, M.; Uchida, T.; Arakawa, Y. (2001): Irregular regeneration of hepatocytes is an important factor in the hepatocarcinogenesis of liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (2), S. 357–362. DOI: 10.1053/jhep.2001.21902.
- van Brocklyn, J. R.; Lee, M. J.; Menzeleev, R.; Olivera, A.; Edsall, L.; Cuvillier, O. et al. (1998): Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the G_i-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. In: *The Journal of cell biology* 142 (1), S. 229–240. DOI: 10.1083/jcb.142.1.229.
- Varela, M.; Sala, M.; Llovet, J. M.; Bruix, J. (2003): Review article: natural history and prognostic prediction of patients with hepatocellular carcinoma. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 17 Suppl 2, S. 98–102. DOI: 10.1046/j.1365-2036.17.s2.11.x.
- Wang, E.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Riley, R. T.; Merrill, A. H. (1991): Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (22), S. 14486–14490.

Wang, Fang; Bank, Thomas; Malnassy, Gregory; Arteaga, Maribel; Shang, Na; Dalheim, Annika et al. (2018): Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor enhances the efficacy of sorafenib in inhibiting hepatocellular carcinoma cell growth and survival. In: *Hepatology communications* 2 (6), S. 732–746. DOI: 10.1002/hep4.1181.

Wang, Fangping; Wu, Zhiming (2018): Sphingosine kinase 1 overexpression is associated with poor prognosis and oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma. In: *Experimental and therapeutic medicine* 15 (6), S. 5371–5376. DOI: 10.3892/etm.2018.6086.

Wang, Qiushi; Li, Jingyuan; Li, Guanghua; Li, Yinghong; Xu, Chunlin; Li, Ming et al. (2014): Prognostic significance of sphingosine kinase 2 expression in non-small cell lung cancer. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (1), S. 363–368. DOI: 10.1007/s13277-013-1051-1.

Wattenberg, E. V.; Badria, F. A.; Shier, W. T. (1996): Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. In: *Biochemical and biophysical research communications* 227 (2), S. 622–627. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1555.

Wei, Tao; Zhang, Li-Na; Lv, Yi; Ma, Xiao-Ya; Zhi, Lei; Liu, Chang et al. (2014): Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. In: *Oncotarget* 5 (21), S. 10307–10317. DOI: 10.18632/oncotarget.2537.

Weiskirchen, Ralf; Tacke, Frank (2016): Liver fibrosis: Which mechanisms matter? In: *Clinical liver disease* 8 (4), S. 94–99. DOI: 10.1002/cld.581.

Whittaker, S.; Marais, R.; Zhu, A. X. (2010): The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Oncogene* 29 (36), S. 4989–5005. DOI: 10.1038/onc.2010.236.

Wilhelm, Scott M.; Carter, Christopher; Tang, Liya; Wilkie, Dean; McNabola, Angela; Rong, Hong et al. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases

involved in tumor progression and angiogenesis. In: *Cancer research* 64 (19), S. 7099–7109. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1443.

Will, Yvonne; Dykens, James A.; Nadanaciva, Sashi; Hirakawa, Brad; Jamieson, Joseph; Marroquin, Lisa D. et al. (2008): Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106 (1), S. 153–161. DOI: 10.1093/toxsci/kfn157.

Xia, Pu; Gamble, Jennifer R.; Wang, Lijun; Pitson, Stuart M.; Moretti, Paul A.B.; Wattenberg, Binks W. et al. (2000): An oncogenic role of sphingosine kinase. In: *Current Biology* 10 (23), S. 1527–1530. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00834-4.

Xu, L. X.; He, M. H.; Dai, Z. H.; Yu, J.; Wang, J. G.; Li, X. C. et al. (2019): Genomic and transcriptional heterogeneity of multifocal hepatocellular carcinoma. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (6), S. 990–997. DOI: 10.1093/annonc/mdz103.

Xu, Ming; Zheng, Yan-ling; Xie, Xiao-yan; Liang, Jin-yu; Pan, Fu-shun; Zheng, Shu-guang; Lü, Ming-de (2014): Sorafenib blocks the HIF-1 α /VEGFA pathway, inhibits tumor invasion, and induces apoptosis in hepatoma cells. In: *DNA and cell biology* 33 (5), S. 275–281. DOI: 10.1089/dna.2013.2184.

Xue, Ruidong; Li, Ruoyan; Guo, Hua; Guo, Lin; Su, Zhe; Ni, Xiaohui et al. (2016): Variable Intra-Tumor Genomic Heterogeneity of Multiple Lesions in Patients With Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology* 150 (4), S. 998–1008. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.12.033.

Xun, Cai; Chen, Min-Bin; Qi, Li; Tie-Ning, Zhang; Peng, Xue; Ning, Li et al. (2015): Targeting sphingosine kinase 2 (SphK2) by ABC294640 inhibits colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 34, S. 94. DOI: 10.1186/s13046-015-0205-y.

Yang, Guang-Yun; Zhang, Ai-Qun; Wang, Jing; Li, Chong-Hui; Wang, Xian-Qiang; Pan, Ke et al. (2016): Hepatoma-derived growth factor promotes growth and

metastasis of hepatocellular carcinoma cells. In: *Cell biochemistry and function* 34 (4), S. 274–285. DOI: 10.1002/cbf.3189.

Yang, Li; Weng, Wei; Sun, Zhi-Xin; Fu, Xian-Jie; Ma, Jun; Zhuang, Wen-Fang (2015): SphK1 inhibitor II (SKI-II) inhibits acute myelogenous leukemia cell growth in vitro and in vivo. In: *Biochemical and biophysical research communications* 460 (4), S. 903–908. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.114.

Yao, F. Y.; Ferrell, L.; Bass, N. M.; Watson, J. J.; Bacchetti, P.; Venook, A. et al. (2001): Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (6), S. 1394–1403. DOI: 10.1053/jhep.2001.24563.

Yin, Xiaolan; Xiao, Yanan; Han, Leiqiang; Zhang, Bo; Wang, Tianqi; Su, Zhihui; Zhang, Na (2018): Ceramide-Fabricated Co-Loaded Liposomes for the Synergistic Treatment of Hepatocellular Carcinoma. In: *AAPS PharmSciTech* 19 (5), S. 2133–2143. DOI: 10.1208/s12249-018-1005-4.

Yu, Song; Jia, Bingxuan; Yang, Yunxia; Liu, Na; Wu, Aibo (2020): Involvement of PERK-CHOP pathway in fumonisin B1- induced cytotoxicity in human gastric epithelial cells. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 136, S. 111080. DOI: 10.1016/j.fct.2019.111080.

Yuan, Qiaoling; Jiang, Yancheng; Fan, Ying; Ma, Yingfeng; Lei, Hongyu; Su, Jianming (2019): Fumonisin B1 Induces Oxidative Stress and Breaks Barrier Functions in Pig Iliac Endothelium Cells. In: *Toxins* 11 (7). DOI: 10.3390/toxins11070387.

Zhang, H.; Desai, N. N.; Olivera, A.; Seki, T.; Brooker, G.; Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. In: *The Journal of cell biology* 114 (1), S. 155–167. DOI: 10.1083/jcb.114.1.155.

Zhang, Jun; Salminen, Alec; Yang, Xi; Luo, Yong; Wu, Qianguan; White, Matthew et al. (2017): Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated

rat liver mitochondria. In: *Archives of toxicology* 91 (8), S. 2921–2938. DOI: 10.1007/s00204-016-1918-1.

Zhang, Lan; Liu, Xuezheng; Zuo, Zhongfu; Hao, Chunyan; Ma, Yanmei (2016): Sphingosine kinase 2 promotes colorectal cancer cell proliferation and invasion by enhancing MYC expression. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (6), S. 8455–8460. DOI: 10.1007/s13277-015-4700-8.

Zhang, Yang; Li, Xiang; Becker, Katrin Anne; Gulbins, Erich (2009a): Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1788 (1), S. 178–183. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.07.030.

Zhang, Yunjie; Li, Gangcan; Liu, Xin; Song, Yanping; Xie, Jia; Li, Guang et al. (2018): Sorafenib inhibited cell growth through the MEK/ERK signaling pathway in acute promyelocytic leukemia cells. In: *Oncology letters* 15 (4), S. 5620–5626. DOI: 10.3892/ol.2018.8010.

Zhang, Zhe; Zhou, Xiaoyun; Shen, Hujia; Wang, Dexing; Wang, Yanhong (2009b): Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an in vitro study. In: *BMC medicine* 7, S. 41. DOI: 10.1186/1741-7015-7-41.

Zhao, Jian; Dong, Li; Lu, Bin; Wu, Guobin; Xu, Dongmei; Chen, Jingjing et al. (2008): Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. In: *Gastroenterology* 135 (3), S. 956–968. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.025.

Zhu, Ya-Jing; You, Hua; Tan, Jin-Xiang; Li, Fan; Qiu, Zhu; Li, Hong-Zhong et al. (2017): Overexpression of sphingosine kinase 1 is predictive of poor prognosis in human breast cancer. In: *Oncology letters* 14 (1), S. 63–72. DOI: 10.3892/ol.2017.6134.

9.1 Veröffentlichung

9.1.1 Veröffentlichung aus dieser Arbeit

Katja Jakobi, Sandra Beyer, Alexander Koch, Dominique Thomas, Stephanie Schwalm, Stefan Zeuzem, Josef Pfeilschifter, Georgios Grammatikos

Sorafenib treatment and modulation of the sphingolipid pathway affect proliferation and viability of hepatocellular carcinoma in vitro. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 31;21(7):2409

9.1.2 Sonstige Veröffentlichungen

Mücke VT, **Jakobi K**, Knop V, Thomas D, Mücke MM, Peiffer KH, Zeuzem S, Sarrazin C, Pfeilschifter J, Grammatikos G

Serum sphingolipid levels associate with upcoming virologic events and HBV genotype D in a cohort of patients with HBeAg-negative HBV infection. *PLoS One.* 2018 Nov 15;13(11):e0207293

Mücke VT, Gerharz J, **Jakobi K**, Thomas D, Ferreirós Bouzas N, Mücke MM, Trötschler S, Weiler N, Welker MW, Zeuzem S, Pfeilschifter J, Grammatikos G

Low Serum Levels of (Dihydro-)Ceramide Reflect Liver Graft Dysfunction in a Real-World Cohort of Patients Post Liver Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 26;19(4). pii: E991

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die ich wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen habe, sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient. Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht worden.

Ort, Datum

Unterschrift