

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

Einfluss von IGFBP2 auf die Invasivität und Therapie von hepatozellulären  
Karzinomen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Elisabeth Backu

2024



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

Einfluss von IGFBP2 auf die Invasivität und Therapie von hepatozellulären  
Karzinomen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Elisabeth Backu

2024

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sara Fill Malfertheiner

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2024

„We have mechanical ventilators to breathe for you if your lungs fail,  
dialysis machines if your kidneys fail,  
and the heart is mostly just a pump, so we have an artificial heart.  
But if your liver fails, there's no machine to replace all its different functions...“

Dr. Anna Lok, Präsidentin der AASLD (2017)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom .....	6
1.1.1	Epidemiologie .....	6
1.1.2	Pathophysiologie .....	6
1.1.3	Klinik und Diagnostik .....	7
1.1.4	Therapie.....	10
1.2	Die Insulin-like growth factor Familie .....	13
1.2.1	Mitglieder der Insulin-like growth factor Familie .....	13
1.2.2	Funktion der IGFBPs.....	16
1.2.3	IGFBP2 .....	17
1.2.4	IGFBP2 und Krebs .....	18
1.3	Zielsetzung .....	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material.....	21
2.1.1	Geräte und Laborbedarf .....	21
2.1.2	Software.....	23
2.2	Molekularbiologische Reagenzien.....	23
2.2.1	Zellkulturreagenzien, Chemikalien.....	23
2.2.2	Lösungen .....	24
2.2.3	Kits .....	25
2.2.4	Enzyme .....	25
2.2.5	Expressionsplasmid.....	26
2.2.6	siRNA.....	26
2.2.7	Western Blot Antikörper .....	26
2.2.8	qPCR Primer.....	27
2.2.9	FACS Antikörper.....	27
2.2.10	Chemotherapeutika und Targeted Therapies.....	27
2.3	Zelllinien .....	28
2.3.1	Hep3B-Hepatokarzinomzellen .....	28
2.3.2	Hep3B Zellkulturmedium .....	28
2.4	Methoden .....	28
2.4.1	Zellkultur .....	28

2.4.2	<i>IGFBP2</i> Expressionsplasmid .....	29
2.4.3	siRNA Transfektion.....	30
2.4.4	ELISA .....	31
2.4.5	Zelllyse.....	31
2.4.6	Western Blot .....	31
2.4.7	Quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR).....	33
2.4.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.4.9	MTS Assay.....	35
2.4.10	Wound Healing Assay .....	35
2.4.11	Milliplex Assay .....	35
2.4.12	Targeted Therapie- und Chemotherapeutikabehandlung.....	36
2.4.13	Statistische Auswertung .....	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Etablierung und Charakterisierung des <i>in vitro</i> Modells .....	37
3.1.1	Hep3B Zellen produzieren und sezernieren IGF1 und IGFII .....	37
3.1.2	Hep3B Zellen präsentieren den Insulin- und den IGF-1 Rezeptor, nicht den IGF-2 Rezeptor .....	38
3.1.3	Modifikation der intrazellulären IGFBP2 Expression.....	39
3.2	IGFBP2 beeinflusst die Apoptose von Hep3B Zellen nicht .....	42
3.3	rhIGFBP2 beeinflusst die Proliferation, die Zellviabilität und die Migration von Hep3B Zellen .....	43
3.3.1	rhIGFBP2 erhöht die Proliferation.....	43
3.3.2	rhIGFBP2 verbessert die Zellviabilität .....	45
3.3.3	rhIGFBP2 erhöht die Migration von Hep3B Zellen.....	46
3.4	rhIGFBP2 beeinflusst den IGF-Signalweg von Hep3B Zellen und führt zu weniger freiem IGF1 und IGFII .....	48
3.5	IGFBP2 beeinflusst die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Hep3B Zellen .....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
4.1	Etablierung und Validierung des Hep3B-Zellkultur-Modells .....	55
4.2	rhIGFBP2 und zellulär überexprimiertes IGFBP2 beeinflussen die Apoptose von Hep3B Zellen nicht .....	56
4.3	rhIGFBP2 beeinflusst die Proliferation, die Zellviabilität und die Migration in Hep3B Zellen .....	57

4.4	rhIGFBP2 beeinflusst den IGF-Signalweg von Hep3B Zellen und führt zu reduzierten Mengen von freiem IGF1 und IGFII .....	59
4.5	IGFBP2 beeinflusst die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Hep3B Zellen .....	61
4.6	Resümee .....	63
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>10.</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>90</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>91</b>



## 1. Einleitung

### 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

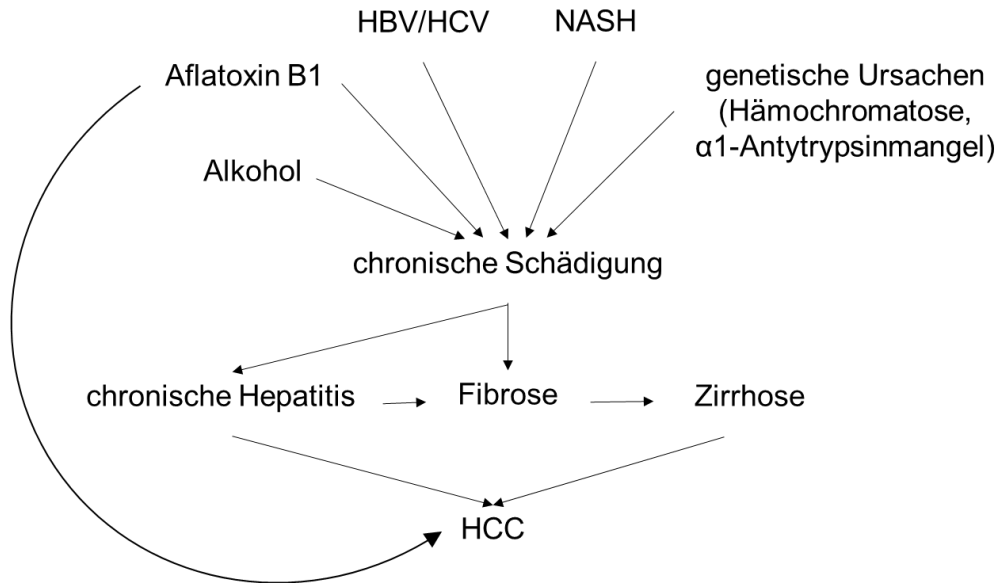
Mit weltweit 905 000 Neudiagnosen pro Jahr weist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) die fünft- (Männer) bzw. neunthöchste (Frauen) Inzidenz aller Tumorleiden auf. Zudem hat das HCC die dritthöchste tumorbedingte Mortalität und ist mit einem Anteil von 75-85% die häufigste primär maligne Neoplasie der Leber (1,2). Mehr als 80% der Malignome treten in Südostasien und in Subsahara-Afrika auf, in Industriestaaten wie Amerika und dem europäischen Kontinent lässt sich indes ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz beobachten (1,3,4).

#### 1.1.2 Pathophysiologie

Die Hepatokarzinogenese ist ein komplexer Prozess. 70-90% der HCCs treten auf der Basis einer bestehenden Leberzirrhose oder anderer chronischer Lebererkrankungen auf, wobei Hepatitis B und Hepatitis C Viruserkrankungen 78% aller HCCs bedingen. Auch andere krankheitsauslösende Faktoren wie Aflatoxin B1 Exposition, Alkoholkonsum (>50-70 g/d), nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), genetische Prädispositionen ( $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel, Hämochromatose) und Hepatitis D Virus Infektionen können ursächlich für die Entstehung eines HCCs sein (Abbildung 1) (3,5,6).

Meist entwickelt sich das HCC auf der Basis einer chronischen Entzündung. Dies resultiert zunächst in einer Fibrosierung des Lebergewebes. Aus der Fibrose kann sich nach Jahren eine Zirrhose der Leber entwickeln, welche durch die Ansammlung von epigenetischen und chromosomalen Veränderungen wie Telomerverkürzungen oder onkogenen Läsionen zu einem malignen Phänotyp führt (6–10). Überdies kann Aflatoxin B1 durch eine G zu T Transversion an Position 249 des Gens für p53, dem „Wächter des Genoms“, unmittelbar karzinogen wirken (11,12).

## Einleitung



**Abbildung 1: Überblick über den Prozess der Hepatokarzinogenese.**

Darstellung der Ursachen einer chronischen Schädigung der Leber, die in chronischer Hepatitis, Fibrose und schließlich einer Zirrhose resultieren und alle Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC darstellen (modifiziert nach (13)).

HBV Hepatitis B Virus, HCV Hepatitis C Virus, HCC hepatozelluläres Karzinom, NASH nicht alkoholische Steatohepatitis

Makroskopisch weisen HCCs ungepaarte Arterien, Blutungen, Nekrosen, Verfettungen und Subknoten innerhalb des Tumors auf. Histologisch wird eine Entdifferenzierung der Zellen, ein verdrängendes Wachstum und eine Stromainvasion in die Lebertrias und das umgebende Gewebe beobachtet. Im fortgeschrittenen Stadium können Gefäßinvasion und extrahepatische Metastasen auftreten (14,15).

Außerdem reagiert der Körper auf die zirrhotisch verringerte Lebermasse und Funktion mit einem wachstumsfördernden Milieu. So zeigt sich unter anderem eine dreifach erhöhte Insulin-like growth factor II (IGFII) Konzentration in zirrhotischen Lebern und eine neunfach erhöhte IGFII-Konzentration in HCCs. Dieses Milieu fördert auch die Tumorproliferation (3,16).

### 1.1.3 Klinik und Diagnostik

Während das HCC bei Diagnose in einem frühen Stadium als potenziell kurabel gilt, ist es im fortgeschrittenen Stadium mit einer eingeschränkten Prognose und oft nur palliativen Behandlungsmöglichkeiten verbunden. Daher sind eine frühzeitige Diagnosestellung und Behandlung für das Outcome der Patienten/Patientinnen essenziell. Leider werden die meisten Tumore erst in einem fortgeschrittenen Stadium symptomatisch (14,17).

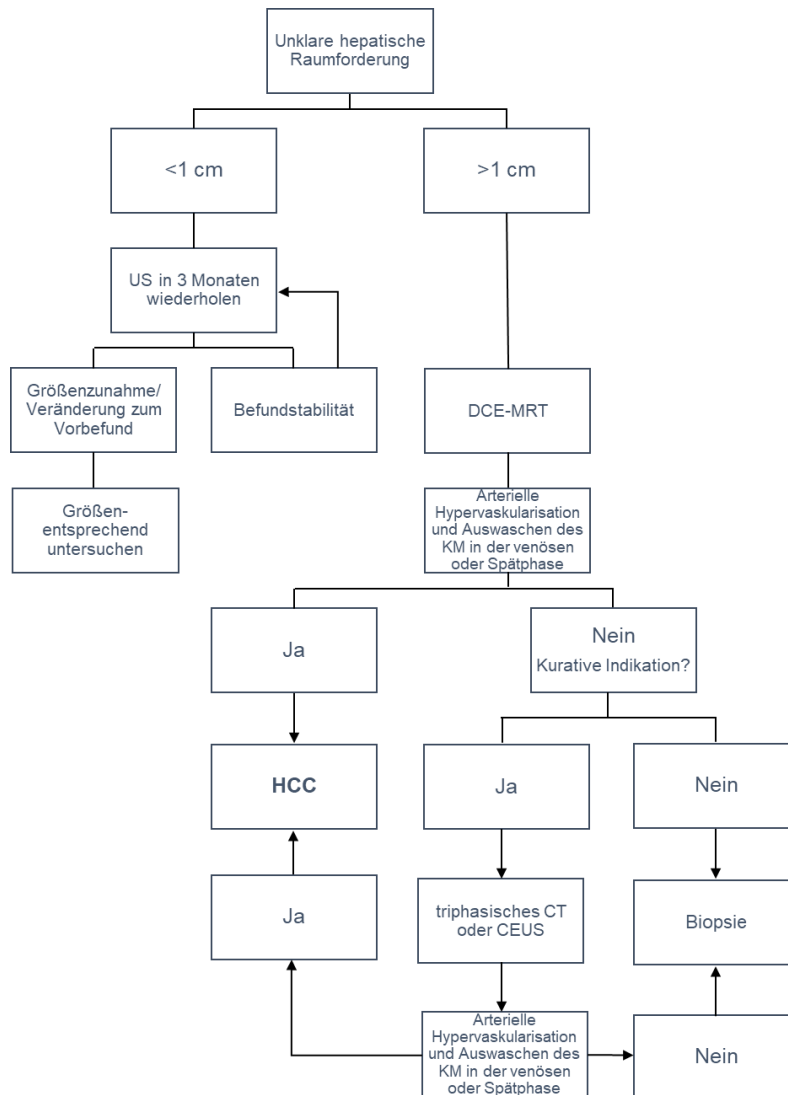
## Einleitung

So kann ein kontinuierlicher Schmerz im Epigastrium und im oberen rechten Quadranten, der teilweise bis in den Rücken ausstrahlt, das erste Symptom des HCC darstellen. Intensivieren sich die Beschwerden, ist von einer Dissemination in das Zwerchfell auszugehen (18). Zudem zeigen <12% der Patienten/Patientinnen durch intrahepatische Kompression oder Infiltration des Gallengangs einen obstruktiven Ikterus (19). Weiterhin kann das HCC mit einem paraneoplastischen Syndrom einhergehen. Dies umfasst beispielsweise die Symptome Hypercholesterinämie, Hypoglykämie und Hyperkalzämie und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (20).

Da sich das HCC in 80-90% aus einer Zirrhose oder chronischen Lebererkrankung entwickelt, sollten alle Patienten/Patientinnen mit dieser oder einer fortgeschrittenen Fibrose das Angebot einer Ultraschalluntersuchung im Sechsmonatsintervall wahrnehmen. Bei Nachweis einer Raumforderung im Ultraschall werden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dabei können sowohl nichtinvasive, bildgebende als auch invasive Verfahren eingesetzt werden (21,22).

Zunächst wird die nichtinvasive Diagnostik genutzt. Es wird eine dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) durchgeführt. Zeigt sich sowohl eine Hypervaskularität (vermehrte Durchblutung des Tumors in der arteriellen Phase) als auch ein Washout Phänomen (verminderte Anreicherung des Kontrastmittels innerhalb des Tumors in der venösen Phase) sind beide diagnostischen Merkmale des HCC erfüllt. Zeigt diese Untersuchungsmethode keinen eindeutigen Befund, wird bei kurativer Indikation eine triphasische Computertomographie (CT) oder ein kontrastmittelverstärkter Ultraschall durchgeführt. Bei Auffinden beider diagnostischer Merkmale des HCC gilt die Diagnose auch dann als gesichert. Sind sie auch hier nicht eindeutig erkennbar, wird die Raumforderung biopsiert und histologisch analysiert (Abbildung 2) (21–23).

## Einleitung



**Abbildung 2: Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf HCC gemäß der S3 Leitlinie für Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms (modifiziert nach (21,23))**

CEUS kontrastmittelverstärkter Ultraschall, CT Computertomographie, DCE-MRT dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie, HCC hepatozelluläres Karzinom, KM Kontrastmittel, US Ultraschall

Ist die Diagnose HCC gestellt, wird das Tumorstadium durch das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging System ermittelt, welches zusätzlich zur Diagnostik Behandlungsstrategien und Prognosen für jedes Stadium festlegt. Die Einteilung nach BCLC umfasst die fünf Stadien 0, A, B, C und D, die durch das Tumorausmaß (Größe, Subknoten, Portalvenenthrombose), die Leberfunktion (Child Pugh Score zur Bestimmung des Schweregrads der Leberzirrhose) und den Performance Status (PS) der World Health Organisation (Krankheitsbelastung) definiert werden (23–25).

### 1.1.4 Therapie

Ziel der Tumorthherapie ist, die Überlebenszeit zu verlängern und gleichzeitig die Lebensqualität zu erhalten. Hierfür stehen bei der Therapie des HCC sowohl kurative als auch palliative Verfahren zur Verfügung, die es in Abhängigkeit der BCLC Stadien einzusetzen gilt. Kurative Ansätze beinhalten die operative Resektion des Tumors, die Lebertransplantation und die Radiofrequenzablation (RFA), während sich palliative Verfahren der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) und der sogenannten Targeted Therapies und der Immuntherapie bedienen (Abbildung 3) (22,26).

In Stadium 0 profitieren Patienten/Patientinnen von der RFA und der operativen Resektion, die ebenfalls im Stadium A bei solitären Raumforderungen Verwendung findet. Eignet sich der Tumor nicht für eine operative Resektion, ist die bevorzugte Therapie im Stadium A die Lebertransplantation. Hierfür muss der Tumor die sogenannten Milan-Kriterien erfüllen, welche wie folgt definiert sind: eine Läsion <5 cm, bzw. bis zu drei Läsionen <3 cm, keine extrahepatische Manifestation und keine vaskuläre Invasion. Sind beide Verfahren in der Behandlung des Stadium A keine Option, wird die RFA angestrebt (24,27).

Das initial nicht mehr kurable Stadium B nutzt die TACE, um das Überleben der Patienten/Patientinnen zu verlängern. Hierbei wird zunehmend die drug eluted bead TACE angewendet (26).

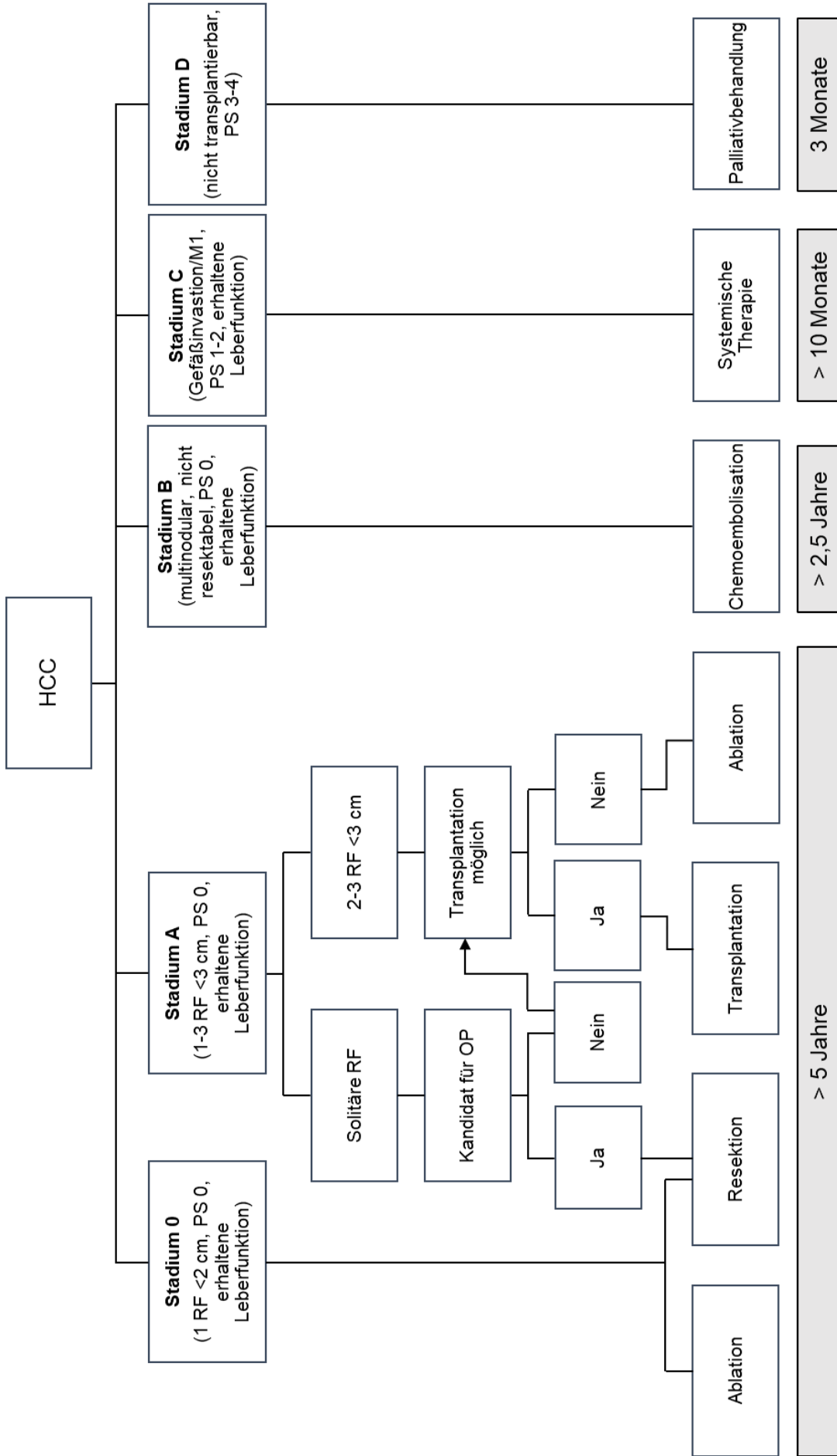
Stadium C ist die Domäne der medikamentösen Therapien. Die first line Therapie bestehend aus Sorafenib oder Lenvatinib wurde durch die Kombination der monoklonalen Antikörper Atezolizumab und Bevacizumab ersetzt (23). Jene zeigten ein höheres Gesamt- und progressionsfreies Überleben als Sorafenib (28). Atezolizumab ist ein PD-L1 (programmed death-ligand 1) Inhibitor, der eine Reaktivierung der Immunantwort gegen Tumorzellen bedingt, während Bevacizumab gegen VEGF (vascular endothelial growth factor) gerichtet ist und so die Gefäßversorgung und das Wachstum des HCC hemmt (28–31). Neue Daten der HIMALAYA-Studie zeigen zudem die Überlegenheit der Kombination von Durvalumab und Tremelimumab (STRIDE-Schema) gegenüber Sorafenib (23,32,33). Bei Unverträglichkeit dieser Targeted Therapies oder Progress des HCC besteht die Indikation zur Therapie mit Sorafenib oder Lenvatinib (23). Sorafenib ist ein oraler Multikinaseinhibitor, der antiangiogen und antiproliferativ wirkt, indem er den RAF- (rapidly accelerated fibrosarcoma) Signalweg sowie den VEGF1-3 Rezeptor und den

## Einleitung

PDGF $\beta$  Rezeptor (platelet derived growth factor Rezeptor  $\beta$ ) blockiert (34). Sorafenib verlängert die Überlebenszeit um durchschnittlich 2,8 Monate. Allerdings entwickeln die meisten Patienten/Patientinnen 5,5 Monate nach anfänglichem Therapieansprechen eine Resistenz gegenüber Sorafenib mit Progress des HCC (35). Lenvatinib, ein oraler Multikinaseinhibitor, inhibiert den VEGFR1-3 Rezeptor, den FGF1-4 Rezeptor (fibroblast growth factor 1-4 Rezeptor) und PDGF $\alpha$  Rezeptor (platelet derived growth factor Rezeptor  $\alpha$ ) sowie RET (RET-Tyrosinkinase) und KIT (KIT-Tyrosinkinase) (36). Bei Progress des HCC unter Sorafenib sind Regorafenib und Cabozantinib, ebenfalls orale Multikinaseinhibitoren, sowie bei Alpha-Fetoprotein (AFP) Werten über 400 ng/ml der VEGF2 Rezeptor Antikörper Ramucirumab, zur second line Therapie zugelassen. Auch Regorafenib inhibiert den VEGF1-3 Rezeptor, sowie den PDGF $\beta$  und FGF1 Rezeptor und die Kinasen KIT, RET und B-RAF, während Cabozantinib ein MET (MET-Tyrosinkinase), VEGF2 Rezeptor und RET-Inhibitor ist. Sie verlängern die Überlebenszeit um durchschnittlich 2,8 bzw. 2,2 Monate. Ramucirumab verlängert die Überlebenszeit um durchschnittlich 3,1 Monate (37–42).

Im Stadium D wirkt keine Therapie lebensverlängernd. Die Patienten/Patientinnen profitieren von einer palliativen Behandlung bestehend aus symptomatischer Therapie und psychologischer Unterstützung (24,43).

Zusammenfassend ist die Gesamtüberlebenszeit nach Diagnosestellung abhängig vom Krankheitsstadium, der Leberfunktion und den zur Verfügung stehenden Therapieoptionen. Während BCLC-Stadium 0 noch heilbar ist, sinkt die Überlebenszeit von durchschnittlich >5 Jahren für bis zu 70% der Patienten/Patientinnen in Stadium A auf 3-4 Monate für Patienten/Patientinnen in Stadium D. Trotz fortschreitender Forschungserkenntnisse und daraus entstehenden Behandlungsmöglichkeiten ist das Gesamtüberleben limitiert, wenn mehr Patienten/Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden als in kurablen (24).



**Abbildung 3: Therapie des HCC gemäß den Leitlinien der European Association for the Study of Liver Diseases (EASL) (modifiziert nach (24)).**  
 HCC hepatozelluläres Karzinom, PS Performance Status, RF Raumforderung

## 1.2 Die Insulin-like growth factor Familie

### 1.2.1 Mitglieder der Insulin-like growth factor Familie

Die Insulin-like growth factor (IGF) Familie besteht aus den Insulin-like growth factors (IGFs), den Insulin-like growth factor Rezeptoren (IGF-Rezeptoren) und den Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). Sie aktivieren Signalwege, welche zu Proliferation, Differenzierung und Migration führen (44) und damit auch zur Tumorprogression beitragen können (Abbildung 4).

#### 1.2.1.1 IGFs

Insulin-like growth factor I (IGFI) und Insulin-like growth factor II (IGFII) bilden die Gruppe der IGFs. IGFII stellt vornehmlich den Wachstumsfaktor des fetalen, IGFI den des adulten Organismus dar. Sie werden überwiegend in der Leber gebildet; durch lokale Produktion können sie auch autokrin und parakrin wirken (45).

Das IGFI Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und kodiert für ein Protein bestehend aus 70 Aminosäuren mit einer Masse von 7,6 kDa (46–49). Das IGFII Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und kodiert für ein Protein bestehend aus 67 Aminosäuren mit einer Masse von 7,5 kDa. Mit einer Homologie von 62% weisen die Wachstumsfaktoren eine hochkonservierte Struktur auf, die einen gemeinsamen Ursprung nahelegt. Sie haben in ihrem Aufbau mit A-, B- und C-Domäne Ähnlichkeit mit dem Propeptidhormon Proinsulin, besitzen jedoch zusätzlich eine variable D-Domäne (46,49,50).

Die Serumkonzentrationen von IGFI und IGFII betragen 200 ng/ml bzw. 700 ng/ml (51). Bei Patienten/Patientinnen mit zirrhotischen Lebern kann sich durch Abnahme der Hepatozytenfunktion eine geringere IGFI-Konzentration finden (52).

#### 1.2.1.2 IGF-Rezeptoren

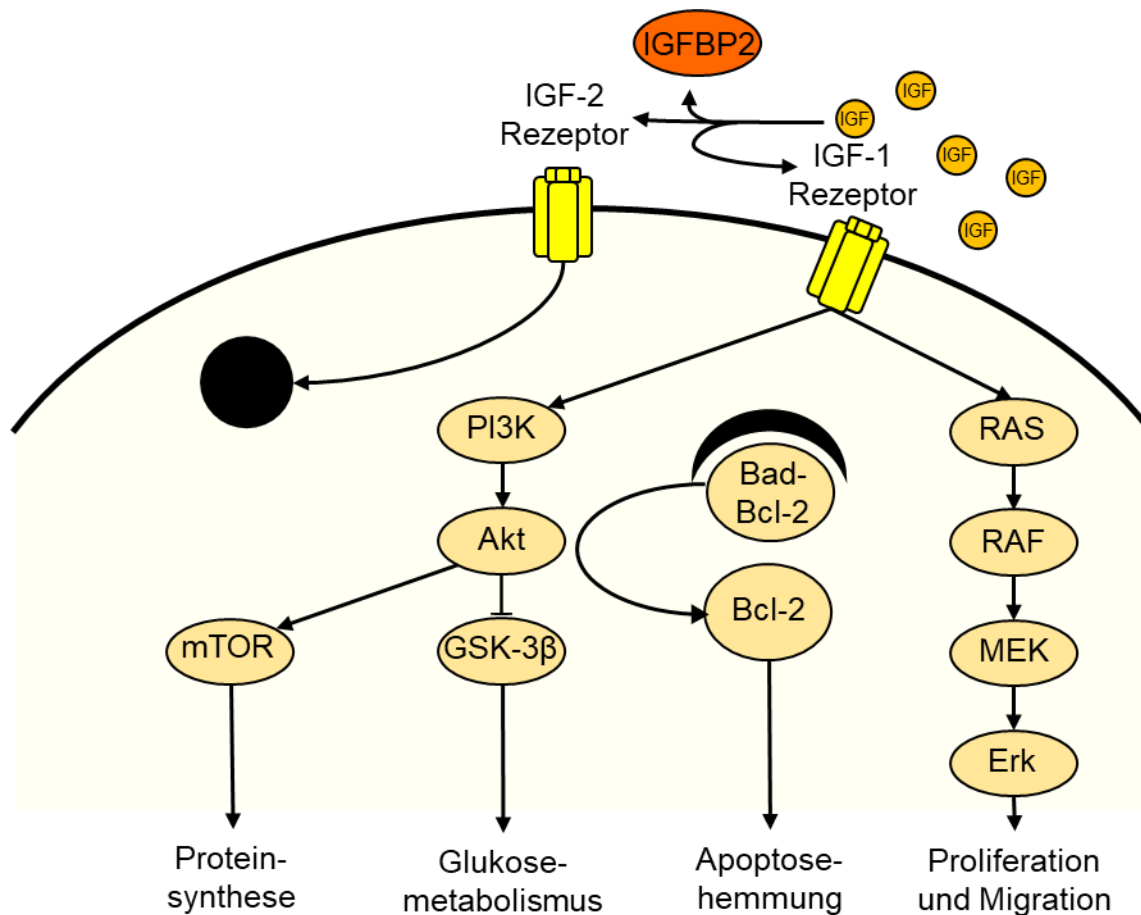
IGFI und IGFII wirken durch Bindung an IGF-Rezeptoren. Diese bestehen aus den IGF-1 Rezeptor und Insulinrezeptor (Typ A) Tyrosinkinase, sowie dem IGF-2 Rezeptor (53).

Der IGF-1 Rezeptor bindet IGFI mit einer höheren Affinität als IGFII und Insulin, der Insulinrezeptor weist eine umgekehrte Bindungsaffinität auf. Die Bindungsaffinität des IGF-2 Rezeptors ist für IGFII um ein Vielfaches höher als für IGFI (52,54–57).



## Einleitung

Der heterotetramere IGF-1 Rezeptor ist auf Chromosom 15 lokalisiert, zu 49% homolog zum Insulinrezeptor und besitzt eine  $\alpha\beta\beta$  Konfiguration. Die  $\alpha$ -Untereinheit agiert extrazellulär als Bindungsstelle für IGF I und IGF II, während die  $\beta$ -Untereinheit durch Autophosphorylierung intrazellulär Signalkaskaden einleitet (58,59). Dabei wirkt die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors proliferationsfördernd und kann gleichzeitig die Induktion der Apoptose hemmen (53,60).



**Abbildung 4: Darstellung des IGF-Signalweges**

Die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors führt durch Autophosphorylierung zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Durch Phosphorylierung von PI3K und Aktivierung von Akt wird über mTOR die Proteinsynthese und über GSK-3 $\beta$  der Glukosemetabolismus gesteigert. Durch Freisetzung von Bcl-2 aus dem Komplex mit Bad wird die Apoptose inhibiert. Die Aktivierung des RAS/RAF/Erk-Signalweges führt zur Transkription proliferativer Gene (modifiziert nach (61)).

Akt Proteinkinase B, Bad Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death, Bcl2 B-cell Lymphoma 2, Erk extracellular-signal regulated kinases, GSK-3 $\beta$  Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , IGFBP2 Insulin-like growth factor binding protein 2, MEK mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, mTOR mammalian Target of Rapamycin, PI3K Phosphoinositid-3-kinase, RAF rapidly accelerated fibrosarcoma, RAS rat sarcoma,

1. Durch Aktivierung von PI3K (Phosphoinositid-3-kinase) wird Akt (Proteinkinase B) phosphoryliert. Dies führt zur Induktion mehrerer Prozesse. Durch Aktivierung der mTOR (mammalian Target of Rapamycin) wird die Proteinsynthese, durch Inhibierung der GSK-3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ ) der Glukosemetabolismus gesteigert. Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) wird aus

## Einleitung

dem Bcl-2-Bad (Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death) Komplex freigesetzt und inhibiert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Folglich wird die Auslösung der Apoptose durch den intrinsischen Signalweg gehemmt (Abbildung 4) (60,62).

2. Durch Aktivierung des RAS/RAF/Erk- (rat sarcoma/rapidly accelerated fibrosarcoma/extracellular-signal regulated kinases) Signalweges wird unter anderem der Transkriptionsfaktor ELK1 (ETS like-1-Protein) induziert, der durch Aktivierung von Zielgenen die Proliferation fördert (Abbildung 4) (63).

Aus einem Zusammenspiel dieser Signalwege kann somit die stark anabole, mitogene und proliferationsstimulierende Wirkung der IGF Familie erklärt werden (61).

Eine hohe Oberflächenexpression des IGF-1 Rezeptors findet sich auf vielen Tumorzellen und fördert Proliferation, Invasion und Metastasierung (64). Der Tumorsuppressor p53 kann die Expression des IGF-1 Rezeptors auf DNA Ebene inhibieren. Im Gegensatz dazu aktiviert mutiertes p53 den IGF-1 Rezeptor (65).

Der IGF-2 Rezeptor ist auf Chromosom 6 lokalisiert und erfüllt bei Bindung von IGFII eine regulatorische Funktion, da durch Aufnahme und lysosomale Degradation die Konzentration des extrazellulär vorliegenden IGFII vermindert wird (Abbildung 4) (56,66,67). Bei der Karzinogenese des HCC kommt es häufig zu Mutationen mit darauffolgendem Verlust des IGF-2 Rezeptors (68). Dies erhöht die Konzentration von freiem IGFII und ermöglicht somit eine vermehrte Bindung an den IGF-1 Rezeptor und Proliferation der Tumorzellen.

### 1.2.1.3 Insulin like growth factor binding Proteine

Nur ungefähr 1% der IGFs liegen frei im Serum vor. 99% sind gebunden an Insulin-like growth factor binding Proteine (IGFBPs) (69–72).

Die Familie der IGFBPs umfasst sechs Mitglieder, IGFBP1 - IGFBP6, die in ihrer Genstruktur hochkonserviert und in der N- und C-terminalen Domäne homolog sind. Diese beiden Domänen bilden die IGF Bindestelle (73–75). Die N-terminale Region besteht aus einem Exon inklusive der spezifischen Bindungssequenz GCGCCxxC, die C-terminale Region besteht aus zwei an der Bindung beteiligten Exons. Zwischen diesen befindet sich die Linker Region. Sie hat auf die IGF Bindung wenig Einfluss (Abbildung 5) (76,77).

## Einleitung



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Genstruktur der IGFBPs.

### 1.2.2 Funktion der IGFBPs

Die bekannteste Funktion der IGFBPs besteht in der Bindung von IGFs. Dadurch limitieren IGFBPs die Verfügbarkeit von IGFs und verhindern die Bindung an den IGF-1 Rezeptor. Dabei besitzen sie eine höhere Bindungsaffinität als der IGF-1 Rezeptor. Andererseits schützen die IGFBPs IGFs vor dem Abbau durch Proteasen und verlängern folglich die Halbwertszeit der Liganden (45,70).

Die durch Metabolisierung von IGFBPs entstehenden Spaltprodukte verändern zudem ihre Affinität für IGFs. So führt die Proteolyse von IGFBPs durch Enzyme wie die Metalloprotease ADAM28, die Matrix Metalloprotease 7 (MMP7) und das pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) in Tumorzelllinien zu einer Dissoziation des IGFBP-IGF Komplexes. Die vermehrte Verfügbarkeit von IGF resultiert dann in gesteigerter Proliferation (78–80).

Weiterhin können IGFBPs IGF-unabhängig mit Zelloberflächenproteinen interagieren. Beispielsweise bindet IGFBP1 über seine RGD Sequenz an den  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin Rezeptor (Fibronectin Rezeptor) (81). Zudem wird die Existenz von spezifischen IGFBP-Rezeptoren diskutiert (82,83).

IGFBPs können intrazellulär und -nukleär lokalisiert sein. Bereits 1997 wurde die Präsenz von IGFBP3 im Nukleus postuliert (84). Im Zellkern beeinflussen IGFBPs Transkription und Transaktivierung. So besitzt IGFBP5 N-terminal Transaktivierungsaktivität in glatten Gefäßmuskelzellen (85). Auch IGFBP2 und IGFBP3 weisen diese Transaktivierungsaktivität auf (86).

Die Funktion von IGFBPs in Karzinomen wird kontrovers diskutiert. Wie Baxter et al. zusammenfassen, agieren die verschiedenen IGFBPs gewebeabhängig sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene (87). Dies soll im Folgenden beispielhaft dargestellt werden.

IGFBP1 kann in CHO-Zellen die Zellmigration erhöhen und wirkt daher onkogen (81). Demgegenüber ist eine niedrige IGFBP1 Konzentration im HCC mit einer

## Einleitung

schlechteren Prognose verbunden. Dies deutet auf eine tumorsuppressive Funktion von IGFBP1 hin (88). IGFBP3 wird in mehreren Krebsarten als tumorsuppressiv beschrieben. Durch Bindung von IGFBP3 an den Retinoid X Rezeptor  $\alpha$  konnte in Prostatakarzinomzellen Apoptose induziert, durch Aktivierung des TGF $\beta$  Rezeptors das Wachstum von Mammakarzinomzellen gehemmt werden (89,90). IGFBP4 hemmt Wachstum und Invasivität in Lungenkarzinomzellen (91). Andererseits zeigen hämatopoetischen Stammzellen unter Einfluss von IGFBP4 eine gesteigerte Migration und in Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte im Vergleich zu gesunden Frauen eine durchschnittlich höhere Konzentration von IGFBP4 gefunden werden (92,93). IGFBP6 steigert in Rhabdomyosarkomzellen durch Aktivierung des MAPK- (mitogen-activated protein kinase) Signalweges die Migration und induziert andererseits in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen Apoptose (94,95).

Selbst gleiche Tumorentitäten werden von IGFBPs unterschiedlich beeinflusst. In Brustkrebszellen reduziert IGFBP5 zum einen das Wachstum und induziert Apoptose, gleichzeitig gehen hohe IGFBP5-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose einher (96,97).

Zusammenfassend wurden die Effekte und mögliche Signalwege, über die IGFBPs wirken, bereits intensiv untersucht, ohne zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen. IGFBP1, IGFBP4 und IGFBP6 wirken nach momentanem Stand vermehrt tumorsuppressiv, während die Datenlage für IGFBP3 und IGFBP5 weiterhin unklar ist (87).

### 1.2.3 IGFBP2

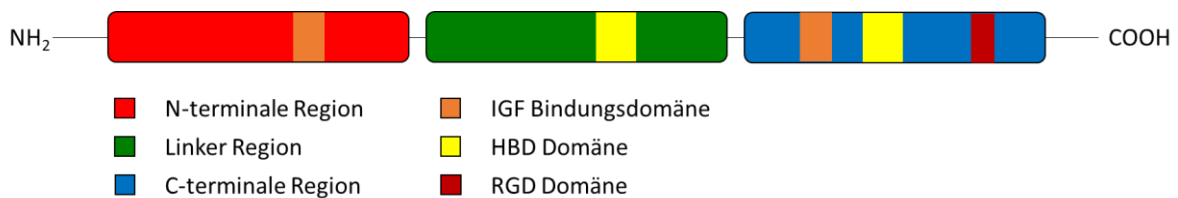
*IGFBP2* ist auf dem langen Arm von Chromosom 2 lokalisiert (73). Wie bereits erwähnt, besitzt es N- und C-terminal IGF-Bindungsdomänen (75,76). Dabei bindet IGFBP2 IGFI mit einer höheren Affinität als IGFI (98).

Außerdem wurden weitere Domänen in der Struktur von IGFBP2 identifiziert, die eine Interaktion mit seiner Umwelt ermöglichen. Dazu gehören die RGD Domäne und die Heparin Bindedomäne (Abbildung 6).

Die RGD Domäne besteht aus dem Tripeptid Arginin, Glycin und Aspartat und vermittelt seine Effekte durch Bindung an Integrine, speziell an das Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . Dies führt zu Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Aktivierung des Erk-Signalweges (99–103).

## Einleitung

IGFBP2 besitzt im Vergleich zu den anderen IGFBPs zwei statt einer Heparin-Bindedomäne, die in der Linker Region und der C-terminalen Region lokalisiert sind. Sie ermöglichen die Interaktion mit extrazellulärer Matrix und Glykosaminoglykanen. Die Bindung kann dabei IGF-abhängig und IGF-unabhängig stattfinden, wobei der IGFII/IGFBP2 Komplex eine höhere Affinität aufweist als IGFBP2 allein (104–108).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IGFBP2.**

Zusätzlich zur extrazellulären Wirkung zeigt IGFBP2 Transaktivierungsaktivität. Während die physiologische Rolle hierbei weiterhin unklar ist, konnten einige Funktionen in Krebszelllinien identifiziert werden. So führt IGFBP2 in der Neuroblastomzelllinie SHEP zu einer Erhöhung der VEGF-Expression. Dies resultiert neben der Erhöhung prometastatischer Eigenschaften auch in vermehrter Angiogenese (86,109).

Andererseits vermittelt IGFBP2 als ein Zielgen der p53 Familie die Hemmung der Erk Phosphorylierung durch IGFI. Somit zeigt sich hier eine Verbindung der wachstumshemmenden Proteine mit den wachstumsstimulierenden Signalwegen, in der IGFBP2 eine essenzielle Rolle einnimmt (110,111).

Zusammenfassend kann IGFBP2 über unterschiedliche Interaktionen die Signaltransduktion der Zelle beeinflussen. Die jeweiligen Effekte können IGF-abhängig oder IGF-unabhängig sein und intra- oder extrazellulär ausgelöst werden. Somit eröffnen sich viele Möglichkeiten, wie IGFBP2 zur Beeinflussung des Metabolismus genutzt werden kann.

### 1.2.4 IGFBP2 und Krebs

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss der p53 Familie auf das Therapieansprechen des HCC untersucht. Durch Ermittlung von p53 Zielgenexpressionsprofilen konnte eine Verknüpfung zwischen der IGF und p53 Familie hergestellt werden. Hierbei wurde IGFBP2 als prognostisch relevantes Zielgen der p53 Familie im HCC identifiziert (111,112).

## Einleitung

IGFBP2 wurde bereits in mehreren Tumorentitäten untersucht. Die Serumkonzentration von IGFBP2 ist bei Patienten/Patientinnen mit Lungen-, Ovarial-, Pankreas-, Magen-, Kolonkarzinomen und Glioblastomen erhöht (113–118). Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen IGFBP2-Konzentration und Malignitätsgrad für Kolon-, Nebennieren-, Lungen, Ovarial- und Prostatakarzinome (113,119–122). Bei Patienten/Patientinnen mit Lungen-, Magen-, und Kolonkarzinomen korreliert die IGFBP2-Serumkonzentration zudem mit einer geringeren Überlebenszeit (113,116,117).

Wie Hoeflich et al. zusammenfassen, ist nicht nur die Serumkonzentration von IGFBP2 in diesen Tumorentitäten erhöht, ferner wird IGFBP2 von Bronchial-, Kolon-, Nebennieren-, Mamma-, Ovarial-, Prostata-, ZNS- und Pankreaskarzinomen selbst gebildet und sezerniert. IGFBP2 beeinflusst dabei Proliferation, Migration und Aggressivität der Malignome (123).

Zudem wird IGFBP2 bereits als postoperativer Verlaufsparemeter zur Detektion von Rezidiven in Glioblastomen diskutiert, da ein Zusammenhang zwischen hohen IGFBP2-Serumkonzentrationen und dem Auftreten von Rezidiven gezeigt wurde (118). In Ovarialkarzinomen wird IGFBP2 als Prognosemarker untersucht, da bei erfolgreicher Therapie ein Abfall der IGFBP2-Serumkonzentration beobachtet wurde (122).

Dies macht IGFBP2 zu einem wichtigen Target in der Genese und Behandlung von Karzinomen.

Über die Rolle von IGFBP2 in Verbindung mit dem HCC ist bisher nur wenig bekannt. Ranke et al. analysierten 2003 erstmals die IGFBP2-Serumkonzentration von Patienten/Patientinnen mit HCC. Hierbei zeigten sich neben der erhöhten AFP Konzentration erhöhte IGFBP2 Werte (124). In einer Analyse von Ma et al. aus dem Jahr 2020 wiesen die Autoren eine Korrelation zwischen hohen IGFBP2-Serumkonzentrationen und niedriger Differenzierung, fortgeschrittenem Tumorstadium und einer vorliegenden Metastasierung nach (125). Guo et al. zeigten im selben Jahr eine Korrelation zwischen hoher IGFBP2 Expression in HCCs und erhöhter Rezidiv Wahrscheinlichkeit bzw. verkürztem Gesamtüberleben (126).

Ziel dieser Promotionsarbeit ist ein vertieftes Verständnis der Hepatokarzinogenese und der Bedeutung von IGFBP2 für Malignität, Invasivität und Therapie-Ansprechen. Hierdurch können neue therapeutische Angriffspunkte entwickelt und eine individualisierte Therapie des HCC ermöglicht werden.

### **1.3 Zielsetzung**

IGFBP2 gewinnt zunehmend an Bedeutung als wichtiger Faktor für das Tumorwachstum. Das HCC gehört, bedingt durch sowohl die Tumorerkrankung per se wie auch die zugrundeliegende Leberzirrhose zu den Krebsarten mit hoher Mortalität. Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von IGFBP2 auf Invasivität, Tumorprogression und Therapie-Ansprechen des HCC zu untersuchen.

Zunächst wurde ein Zellkultur-basiertes Modell etabliert, das eine Untersuchung der IGFBP2-Signaltransduktion in Hepatomzellen erlaubt. Hierzu wurden IGF und seine Rezeptoren in der HCC-Zelllinie Hep3B quantifiziert und entsprechende Konstrukte zur gezielten Expression und Hemmung des IGFBP2-Signalweges etabliert.

Anschließend wurden der Einfluss von IGFBP2 auf die Malignität und das Therapieansprechen in diesem Hep3B-basierten Zellkultur-Modell in vier Fragestellungen charakterisiert:

1. Viele Tumorzellen verlieren im Verlauf der Karzinogenese die Fähigkeit zur Apoptose. Welchen Einfluss hat IGFBP2 auf die Zelltod- bzw. Apoptoseraten von HCC-Zellen?
2. Wie beeinflusst IGFBP2 essenzielle Tumorcharakteristika wie Proliferation, Zellviabilität und Zellmigration in HCC-Zellen?
3. Welche intrazellulären Signalwege sind an der Vermittlung IGFBP2-abhängiger Effekte in HCC-Zellen beteiligt?
4. In der medikamentösen Therapie des HCC spielen vor allem Immuntherapie und Targeted Therapies eine bedeutende Rolle. Hat IGFBP2 einen Einfluss auf das Therapieansprechen?

Somit soll in dieser Doktorarbeit die Funktion von IGFBP2 im HCC detailliert charakterisiert werden, um zu determinieren, in welcher Weise IGFBP2 zu wichtigen Eigenschaften von Tumorzellen beiträgt. Durch das genaue Verständnis der IGFBP2-vermittelten Mechanismen sollte eine Basis geschaffen werden, auf der künftige individualisierte und patientenorientierte Therapieoptionen für das HCC entwickelt werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Laborbedarf

**Tabelle 1: Geräte und Laborbedarf**

Axiovert 200M MAT	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Bio-Plex <sup>®</sup> MAGPIX <sup>™</sup> Multiplex Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cell culture Flask, T-175, T-75	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
Certomat R	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ChemiDoc XRS Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Clear Microplate	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Combitips advanced 1/2,5/5/10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips plus 1/2,5/5/10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Corning <sup>™</sup> 6 Well Cell culture Cluster	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Corning <sup>™</sup> 96 Well Cell culture Plate	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Corning <sup>™</sup> Stripette <sup>™</sup> 5/10/25/50 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices GmbH, Biberach
Entsorgungsbeutel 10	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Research Plus 2/5/10/100/200/1000	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S Standard 0,5-20/50-1000	Eppendorf AG, Hamburg
EV261	Consort Medical, Hemel Hempsted, UK
Falcon <sup>®</sup> 2 ml Aspirating Pipet	Corning, Wiesbaden
Test Tube with Cell Strainer Snap Cap	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Falcon <sup>®</sup> Conical Tube 50 ml, 15 ml	Stemcell Technologies, Köln
L'2200	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co KG, Göttingen
Laminair HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Latex protective gloves Manu L	Berner International GmbH, Elmshorn
Light Cyclor 480	Roche Diagnostics GmbH, Berlin



## Material und Methoden

Light Cycler 480 Multiwell Plate 384	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microlance 3	BD Biosciences, Heidelberg
Microstar 17	VWR, Darmstadt
Mini-Spin Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multigel	Biometra GmbH, Göttingen
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
MyFuge mini	Benchmark Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Nanophotometer	Implen GmbH, München
NeoTouch Premium disposable neoprene gloves	Ansell, Richmond, Melbourne
Olympus CK2	micro optic nosch Günter Wasmer eK, Freiburg
Plastipak 1ml luer	BD Biosciences, Heidelberg
PVDF Transfer Membrane	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Quali-PCR-Tube-Streifen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Safe lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Skim Milk Powder	Fluka Analytical, Seelze
Spritzenfilter 0,22 µm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Steri Cult 200 Inkubator	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Stripette 5/10/25/50 ml	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Sorvall RC6 Plus Zentrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
TC20 automated cell counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TC-Schale 60/100, Standard	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
TE77XP	Hoefer Inc., Holliston, MA, USA
Thermo Herasafe HSP9	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
TUS 80-100	Fryka Kältetechnik, Esslingen
Vakuumfilter Rapid Filtermax 500	TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman 3mm Chr Blottingpaper	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
WT 16	Biometra GmbH, Göttingen
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht

## Material und Methoden

Zoe fluorescent cell imager

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### 2.1.2 Software

**Tabelle 2: Software**  
AxioVision Rel. 4.8

Carl Zeiss AG, Oberkochen

BD FACSDiva Software 8.0.1

BD Pharmingen, Heidelberg

BIO-1D 15.07

Vilber Lourmat Deutschland GmbH,  
Eberhardzell

Bio-Plex Manager Software 6.1.1

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Flowlogic 7.2.1

Inivai, Victoria, Australien

IBM SPSS Statistics

SPSS Inc., Chicago, USA

Image J 1.8.0\_112

Wayne Rasband, National Institutes of Health,  
Bethesda, USA

Image Lab 6.0.1

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

LightCycler 480 Software 1.5.1

Roche Diagnostics GmbH, Berlin

Microsoft Excel

Microsoft Corporation, Redmond, USA

Microsoft PowerPoint

Microsoft Corporation, Redmond, USA

Soft Max Pro 6.4.2

Molecular Devices LLC, San Jose, USA

## 2.2 Molekularbiologische Reagenzien

### 2.2.1 Zellkulturreagenzien, Chemikalien

Standard-Reagenzien wurden von laborüblichen Herstellern bezogen und sind von per analysis Qualität. Nicht Standard-Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

**Tabelle 3: Zellkulturreagenzien und Chemikalien**

10% APS

Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

2x Brilliant III Ultrafast SBYR

Agilent Technologies GmbH & Co. KG,  
Waldbronn

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)—2,5-  
diphenyltetrazolium bromid

Promega GmbH, Mannheim

Ampicillin

Ratiopharm GmbH, Ulm

Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction  
V

Biomol GmbH, Hamburg

Buffer TE

QIAGEN GmbH, Hilden

Cell proliferation Staining Reagent –

Abcam, Cambridge, UK

## Material und Methoden

### Green Fluorescence Cyto Painter

Complete Tablets, Mini EDTA free, EASY Pack	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
DAPI Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
DL-Dithiothreitol	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gene solution siRNA (1nmol)	QIAGEN GMBH, Hilden
G418 disulfate salt solution	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Gentamycin, G1264	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
TEMED	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Normal goat serum	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PhosSTOP easypack	Roche Diagnostics GmbH, Berlin
Phenazin Methosulfat	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Reblot Plus Strong Solution (10x)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Recombinant IGF1R 25 µg	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
RIPA Buffer	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Staining Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Transfectin Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypsin Lösung 10X	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

### 2.2.2 Lösungen

**Tabelle 4: Lösungen**

5% BSA	2,5 g BSA, 50 ml Waschpuffer
10x SDS Page Puffer	250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1% SDS
Anodenpuffer A (pH 10,6)	18,2 g Tris, 100 ml MeOH, 400 ml H <sub>2</sub> O
Anodenpuffer B (pH 10,4)	1,5 g Tris, 100 ml MeOH, 400 ml H <sub>2</sub> O
ECL Mix	2 ml 250 mM Luminol in DMSO, 890 µl 90 mM p-Coumarin

## Material und Methoden

	in DMSO, 20 ml Tris (pH 8,5), 177 ml H <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer C (pH: 9,4)	1,5 g Tris, 2,6 g Amino-Hexansäure, 400 ml H <sub>2</sub> O
Master Mix	5 µl SYBR green, 1 µl Primer, 3 µl H <sub>2</sub> O
MTS Assay	1000 µl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)—2,5-diphenyltetrazolium bromid, 75 µl Phenazin Methosulfat
Reagenz A	Bicinchoninsäure
Reagenz B	4% Kupfersulfat
RIPA Puffer	RIPA Buffer, 1 Tablette PHOSstop easypack, 1 Tablette Complete
RT Master Mix	1 µl RT Primer, 4 µl Quantitect 5x Buffer, 1 µl RT
Waschpuffer	Phosphate Buffered Saline (PBS), 0,05% Tween 20

### 2.2.3 Kits

**Tabelle 5: Kits**

DuoSet Human IGFI	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
DuoSet Human IGFI	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
DuoSet Human IGFBP2	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Lipofectamin LTX and Plus Reagent	Invitrogen AG, Karlsbad, CA, USA
MILLIPLEX MAP 2 Plex Phospho/Total mTOR – Cell Signaling Multiplex Assay	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
MILLIPLEX MAP Total/Phospho Akt – Cell Signaling Multiplex Assay	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
MILLIPLEX MAP Total/Phospho Erk – Cell Signaling Multiplex Assay	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Plasmid Maxi Kit (250)	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit (250)	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAfiler Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAshredder (250)	QIAGEN GmbH, Hilden
Quantitect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

### 2.2.4 Enzyme

RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
----------------------	---------------------

### 2.2.5 Expressionsplasmid

Das Plasmid zur Überexpression von *IGFBP2* und das Kontrollplasmid enthielten einen Cyomegalievirus immediate early gene Promotor, das grün fluoreszierende Protein (*GFP*) Gen sowie ein Neomycin und Ampicillin Resistenzgen. Das Expressionsplasmid beinhaltet zudem das *IGFBP2* Gen.

**Tabelle 6: IGFBP2 Expressionsplasmid und Kontrollplasmid**

Plasmid	Hersteller
IGFBP2 (NM_000597) Human Tagged ORF Clone (RG202573)	Origene Technologies GmbH, Herford
pCMV6-AC-GFP Tagged Cloning Vector (PS100010)	Origene Technologies GmbH, Herford

### 2.2.6 siRNA

Vier verschiedene small interfering RNAs (siRNAs) wurden zum Knockdown von *IGFBP2* verwendet. Die Transfektion von siRNA scrambled diente als Kontrolle ohne Auswirkung auf die Genexpression.

**Tabelle 7: IGFBP2 siRNA Konstrukte**

siRNA	Hersteller
Hs_IGFBP2_1 FlexiTube siRNA (SI00012495)	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_IGFBP2_2 FlexiTube siRNA (SI00012502)	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_IGFBP2_3 FlexiTube siRNA (SI00012509)	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_IGFBP2_4 FlexiTube siRNA (SI02623859)	QIAGEN GmbH, Hilden
Negative Control siRNA (1027310)	QIAGEN GmbH, Hilden

### 2.2.7 Western Blot Antikörper

**Tabelle 8: Primärantikörper**

Antikörper	Laufweite	Verdünnung	Hersteller
Anti-IGFBP2 (#3922)	35 kDa	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-p73 antibody (EP436Y) (#ab40658)	63 kDa	1:1000	Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 9: Sekundärantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit IgG (A0545)	1:10000	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Anti-β-Aktin (A2228)	1:10000	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

### 2.2.8 qPCR Primer

Alle Primer für die quantitative SYBR green basierte Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurden von der Firma QIAGEN bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in 1,1 ml Puffer TE auf eine 10X Lösung verdünnt.

Tabelle 10: qPCR Primer

Primer	Katalognummer
Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00079247
Hs_IGFBP2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00066115
Hs_TP73_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00030240

### 2.2.9 FACS Antikörper

Tabelle 11: FACS Antikörper

Antikörper	Volumen	Hersteller
BV421 Mouse Anti Human CD222	5 µl	BD Biosciences, Heidelberg
BV421 Mouse IgG1k Isotype Control	5 µl	BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse IgG1k Isotype Control	20 µl	BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti Human CD220	10 µl	BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti Human CD221	20 µl	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.2.10 Chemotherapeutika und Targeted Therapies

Tabelle 12: Chemotherapeutika und Targeted Therapies

Chemotherapeutikum	Serum-konzentration	Hersteller
Bleomycin Sulfat 1000 µl/10mM	2 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Cabozantinib 1000 µl/10mM	1 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Doxorubicin 1000 µl/10mM	0,04 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Lenvatinib 1000 µl/10mM	1,17 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Sorafenib 1000 µl/10mM	4,5 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Regorafenib 1000 µl/10mM	5,1 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA
Tivantinib 1000 µl/10mM	5,4 µM	Targetmol, Wellesly Hills, MA, USA

## 2.3 Zelllinien

### 2.3.1 Hep3B-Hepatokarzinomzellen

Die 1976 dem Tumorgewebe eines 8-jährigen Jungen entnommene Zelllinie Hep3B wächst adhärent bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Monoschichten und ist der Sicherheitsstufe 1 (S1) zugeteilt, da es keine infektiösen Viruspartikel abgibt (127,128).

### 2.3.2 Hep3B Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der Hep3B Zellen wurde Minimum Essential Medium (MEM) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum verwendet.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Zellkultur

Hep3B Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz kultiviert und zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert.

Hierfür wurde das MEM basierte Zellkulturmedium abgenommen und Mediumreste von den adhärennten Zellen mittels sterilem PBS entfernt. Nach Zugabe von Trypsin folgte die erneute Inkubation bei 37°C für 5 min. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 9 ml Zellkulturmedium antagonisiert. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung auf Kulturflaschen unter Zugabe von 20 ml Zellkulturmedium aufgeteilt oder für Folgeexperimente in ein 50 ml Falcon überführt.

In den Folgeexperimenten wurde die Zellzahl durch Zugabe von 17 µl Zellsuspension in den TC20 automated cell counter bestimmt. Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 und 100 mm sowie Kulturplatten im 6-, 24- und 96-Well Format wurden anschließend mit einer definierten Zellzahl kultiviert.

**Tabelle 13: Petrischalen und Zellkulturplatten wurden mit einer bestimmten Zellzahl kultiviert**

	<b>Zellen</b>	<b>Wachstumsfläche (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Arbeitsvolumen (ml)</b>
60 mm	5 x 10 <sup>5</sup>	28,2	4
100 mm	1 x 10 <sup>6</sup>	78,5	10
6 Well	2 x 10 <sup>5</sup>	9,5	2

	Zellen	Wachstumsfläche (cm <sup>2</sup> )	Arbeitsvolumen (ml)
24 Well	35 x 10 <sup>3</sup>	1,9	0,4
96 Well	7,5 x 10 <sup>3</sup>	0,32	0,1

## 2.4.2 *IGFBP2* Expressionsplasmid

### 2.4.2.1 Plasmidisolierung

Das *IGFBP2* Expressionsplasmid (pCMV-AC-GFP *IGFBP2*) und das entsprechende Kontrollplasmid (pCMV-AC-GFP) wurden mithilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerprotokoll isoliert und die Konzentration der Plasmide photometrisch bestimmt. Hierfür wurde 1 µl des Produktes in 50-facher Verdünnung in eine Quarzküvette pipettiert und bei 260 nm gemessen. 1 µl nukleasefreies Wasser diente als Kontrolle. Anschließend wurde die Plasmidlösung auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

### 2.4.2.2 Herstellung einer stabilen, *IGFBP2* überexprimierenden Zelllinie

Hep3B Zellen wurden 24 h vor Transfektion in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Lipofectamine LTX & PLUS Reagent Kits. OptiMEM wurde zum einen mit Lipofectamin, zum anderen mit Expressions- oder Kontrollplasmid und PLUS Reagent versetzt.

500 µl OptiMEM	
+	
12 µl Lipofectamin	12 µl PLUS Reagent 15 µl Plasmid

Im Anschluss wurden die Lösungen vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde die Lösung durch Schwenken auf dem Zellrasen verteilt. Die transfizierten Zellen wurden mit Zellkulturmedium bedeckt und über Nacht inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel unter der Zugabe von 250 ng/ml Geneticin (G418). Geneticin tötet nicht-transfizierte Zellen. Die Zellen wurden für weitere zwei Wochen ohne Passagierung unter zweimal wöchentlichem Mediumwechsel mit G418 kultiviert und



## Material und Methoden

anschließend in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Anschließend erfolgte die Kultivierung nach dem gleichen Protokoll wie für untransfizierte Zellen (vgl. 2.4.1).

### 2.4.2.3 Transiente Plasmidtransfektion

Hep3B Zellen wurden 24 h vor Transfektion in 6-Well Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Lipofectamine LTX & PLUS Reagent Kits. OptiMEM wurde zum einen mit Lipofectamin, zum anderen mit Expressions- oder Kontrollplasmid und PLUS Reagent versetzt.

250 µl OptiMEM	
+	
15 µl Lipofectam	3,25 µl PLUS Reagent 6 µl Plasmid

Im Anschluss wurden die beiden Lösungen vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde die Lösung durch Schwenken auf dem Zellrasen verteilt. Die transfizierten Zellen wurden mit Zellkulturmedium bedeckt und über Nacht inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, worauf die transfizierten Zellen in Folgeexperimenten mit Zytostatika behandelt wurden.

### 2.4.3 siRNA Transfektion

Die Aussaat der Hep3B Zellen erfolgte 24 h vor der siRNA Transfektion, welche mithilfe des Transfektionsreagenz Transfektin gelöst in OptiMEM durchgeführt wurde. Hierbei wurde OptiMEM zum einen mit der siRNA, zum anderen mit Transfektin versetzt.

400 µl OptiMEM	
+	
7 µl Transfektin	20 µl siRNA

Im Anschluss wurden die beiden Lösungen vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die siRNA Lösung durch Schwenken auf dem Zellrasen verteilt. Die transfizierten Zellen wurden

## Material und Methoden

mit Zellkulturmedium bedeckt und für Folgeexperimente im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter kultiviert.

### **2.4.4 ELISA**

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISAs) zur Bestimmung der IGFI, IGFII und IGFBP2-Konzentration wurden mithilfe der DuoSet Human IGFI, DuoSet Human IGFII und DuoSet Human IGFBP2 Kits nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden photometrisch bei 450 nm und mithilfe der EMAX Plus Software bestimmt.

### **2.4.5 Zelllyse**

Hep3B Zellen wurden in Petrischalen ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie entsprechend des jeweiligen Versuchsaufbaus behandelt und für weitere 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h kultiviert. Für die Protein- und RNA-Extraktion wurde zunächst das Zellkulturmedium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und – in 900 µl PBS resuspendiert – ebenfalls in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. 1 ml des Mediums wurde für die anschließende Analyse mittels ELISA in Eppendorfgefäße überführt, während der restliche Überstand entfernt wurde. Nach Resuspension in 900 µl PBS wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 auf Eppendorfgefäße aufgeteilt und für 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen. Nun wurden die Zellen für die RNA-Extraktion in RLT Puffer, für Proteinanalysen mittels Western Blot in RIPA Puffer und für Proteinanalysen mittels Milliplex Assay in Milliplex Lysepuffer 2 lysiert. Die Proben der Proteinanalysen wurden 1 h auf Eis gelagert und erneut für 1 h bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zuletzt in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei -20°C.

### **2.4.6 Western Blot**

#### **2.4.6.1 Proteinmengenbestimmung und Probenvorbereitung**

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte durch einen Bicinchonic acid (BCA) Test mithilfe des Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kits. Hierfür wurden die Proteinlysate (vgl. 2.4.5) schonend auf Eis aufgetaut, mit RIPA-Puffer in einem

## Material und Methoden

Verhältnis von 1:4 – 1:5 verdünnt und in Doppelbestimmungen auf eine 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit Werten zwischen 200 µg/ml und 2000 µg/ml Rinderserumalbumin ebenfalls in Doppelbestimmungen pipettiert. 200 µl eines 1:50 Gemischs der Reagenzien A und B des Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kits wurde zu den Proben hinzugefügt und die Platte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben erfolgte photometrisch und mithilfe der EMAX Plus Software. Zwischen 15 µg und 25 µg Protein der jeweiligen Proben wurden mit PBS auf 20 µl verdünnt. Nun wurden 4 µl 6x Laemmlipuffer + Dithiothreitol hinzugefügt und das Gemisch bei 95°C für 5 min gekocht. Zuletzt wurden die hergestellten Proben 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

### 2.4.6.2 Western Blot

Zunächst erfolgte die Herstellung von 15% Lauf- und 5% Sammelgelen.

Tabelle 14: Herstellung von Lauf- und Sammelgelen

Flüssigkeit	15% Laufgel Volumen (ml)	5% Sammelgel Volumen (ml)
H <sub>2</sub> O	2,3	3,4
30% Acrylamid	5	0,83
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	0,63
10% SDS	0,1	0,05
10% Ammoniumpersulfat	0,1	0,05
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	0,004	0,005

Die Taschen der Gele wurden mit je 24 µl der Proben oder 7 µl einer Ladekontrolle beladen und mittels Gelelektrophorese 20 min bei 25 mA und 40 min bei 50 mA nach ihrer Größe aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine im Semi-Dry Verfahren bei 80 V auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blockierung freier Bindestellen erfolgte unter Schwenken für 1 h in 5% BSA. Anschließend wurde der Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 min wurde der Sekundärantikörper zugegeben und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurden die Membranen mit einer Chemilumineszenzlösung behandelt. Das Signal wurde anschließend mittels Chemilumineszenzmessung detektiert. Zuletzt wurde die

## Material und Methoden

Membran in nukleasefreiem Wasser gewaschen und verbliebene Antikörper durch 20- minütiges Waschen in Reblot Plus Strong Lösung entfernt. Nun konnte der Prozess mit dem nächsten zu testenden Antikörper durchgeführt werden.

### **2.4.7 Quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR)**

#### 2.4.7.1 RNA-Extraktion

Die RNA Lysate (vgl. 2.4.5) wurden schonend auf Eis aufgetaut und die Gesamt-RNA gemäß dem Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kit und des RNase-Free DNase Set isoliert.

Die Bestimmung der Gesamt-RNA Konzentration erfolgte photometrisch. Hierzu wurde 1 µl Gesamt-RNA in 50-facher Verdünnung in eine Quarzküvette pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Kontrolle diente 1 µl nukleasefreies Wasser.

#### 2.4.7.2 Reverse Transkription

Komplementäre DNA wurde durch Reverse Transkription mittels des Quantitect Reverse Transcription Kits aus isolierter Gesamt-RNA synthethisiert. Hierfür wurde 1 µg RNA in 12 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O gelöst und 2 µl Wipeout Puffer hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 2 min bei 42°C inkubiert und im Anschluss sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 6 µl des RT Master Mixes wurde die Lösung zunächst für 15 min bei 42°C und dann für 5 min bei 95°C inkubiert. Die entstandene komplementäre DNA wurde mit sterilem nukleasefreiem Wasser 1:2 - 1:3 verdünnt und bei -20°C gelagert.

#### 2.4.7.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) Analyse wurden 3,5 µl komplementäre DNA (vgl. 2.4.7.2) und 31,5 µl hergestellter Master Mix in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl in Dreifachbestimmungen pipettiert. Als Negativkontrolle diente nukleasefreies Wasser. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 15: PCR Zyklus zur Bestimmung von *IGFBP2* und *GAPDH***

Präinkubation		Amplifikation (40-50 Zyklen)	
Temperatur (°C)	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zeit (sec)
95	15	95	40
		65	30
		70	60

Als Referenzgen wurde die nicht-regulierte und homogen exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) benutzt, anhand derer die Expressionsergebnisse ausgewertet wurden.

### 2.4.8 Durchflusszytometrie (FACS)

#### 2.4.8.1 Oberflächenfärbung

Für den Nachweis des Insulin-, IGF-1 und IGF-2 Rezeptors wurden 1 Million (Mio) Hep3B Zellen in ein Eppendorfgesäß überführt und für 4 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl steril filtriertem Färbepuffer resuspendiert. Nach Zugabe der Antikörper und Inkubation der Zellen auf Eis für 1 h wurden die Proben erneut für 4 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und abschließend in 500 µl Staining Buffer gelöst. Zuletzt wurden die Zellen durch ein Filtrationssieb in FACS-Reaktionsgefäße überführt. Die Analyse des Insulin- und IGF-1 Rezeptors erfolgte durchflusszytometrisch im PE-Kanal, während der IGF-2 Rezeptor mit Hilfe des Antikörpers BV421 quantifiziert wurde.

#### 2.4.8.2 Apoptosemessung

Die Messung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Das Medium der kultivierten Zellen wurde abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Mediumreste wurden durch Waschen mit PBS von den Zellen entfernt. 0,5 ml Accutase wurde auf den Zellrasen gegeben und nach 5-minütiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durch Zugabe von Medium antagonisiert. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von DAPI mit anschließender Inkubation bei 4°C in Dunkelheit für 10 min.

## Material und Methoden

Zuletzt wurden die Proben durch ein Filtrationssieb in FACS-Reaktionsgefäße überführt und im Pacific Blue Kanal gemessen.

### 2.4.8.3 Proliferationsfärbung

Zur Messung der Proliferation wurde eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen hergestellt,  $0,5 \mu\text{M}$  Cell Proliferation Staining Reagent hinzugefügt und jeweils 2 ml der Suspension in 6-Well Platten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  für mindestens 4 h inkubiert, bis die Zellen adhärent waren. Nun wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen, um das überschüssige Färbereagenz zu entfernen. Die Zellen wurden mit Zellkulturmedium, welches rekombinantes IGFBP2 (rhIGFBP2) enthielt, entsprechend ihrer Zeitkinetik inkubiert. Zur Analyse der Proliferation wurden die Zellen nach Zellkulturprotokoll (vgl. 2.4.1) abgelöst und durch ein Filtrationssieb in FACS-Reaktionsgefäße überführt. Die Färbeintensität wurde im FITC-Kanal bestimmt.

### 2.4.9 MTS Assay

Die Zellviabilität wurde mithilfe des MTS Assays gemessen. Hierbei wurden Zellen in 96-Well Platten ausgesät, mit rhIGFBP2 behandelt und entsprechend ihrer Zeitkinetik bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden  $10 \mu\text{l}$  MTS+PMS auf die Zellen gegeben und die optische Dichte bei 450 nm nach weiteren 4 h Inkubation mittels EMax Plus Software bestimmt.

### 2.4.10 Wound Healing Assay

Die Migration wurde mithilfe eines Wound Healing Assays bestimmt. Hierbei wurden Zellen in 24-Well Platten mit Wound Healing Assay Inserts ausgesät und für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das Insert entfernt und die Zellen mit rhIGFBP2 stimuliert. Mikroskopisch wurde zum Zeitpunkt 0 h, 16 h und 22 h die Migration der Hep3B Zellen in die zellfreie Fläche beobachtet.

### 2.4.11 Milliplex Assay

Milliplex Assays zur Bestimmung der Phosphorylierung von Akt, Erk und mTOR wurden nach Herstellerprotokoll mithilfe der MILLIPLEX MAP 2 Plex Phospho/Total mTOR – Cell Signaling Multiplex Assay, MILLIPLEX MAP Total/Phospho Akt – Cell

Signaling Multiplex Assay und MILLIPLEX MAP Total/Phospho Erk – Cell Signaling Multiplex Assay Kits durchgeführt. Die Quantifizierung der Phosphorylierung erfolgte mithilfe der Bio-Plex Manager Software.

### **2.4.12 Targeted Therapie- und Chemotherapeutikabehandlung**

Hep3B Zellen wurden ausgesät und 24 h nach Vorbehandlung mit siRNA oder Expressions- bzw. Kontrollplasmid mit den Therapeutika behandelt. Die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe basierten auf der durchschnittlichen Plasmakonzentration beim Menschen. Mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle, da die Chemotherapeutika und Targeted Therapies in DMSO gelöst waren. Die Behandlung mit Chemotherapeutika und Targeted Therapies erfolgte für 48 h mit anschließender Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie.

### **2.4.13 Statistische Auswertung**

Metrische Daten sind in Balkendiagrammen als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Sämtliche Versuchsergebnisse wurden in SPSS mittels Shapiro Wilk Test oder Q-Q-Diagramm auf Normalverteilung geprüft. Die Varianzen wurden mittels F-Test auf Gleichheit getestet. Die statistische Signifikanz wurde anschließend in Excel mittels zweiseitigem T-Test berechnet.

### 3. Ergebnisse

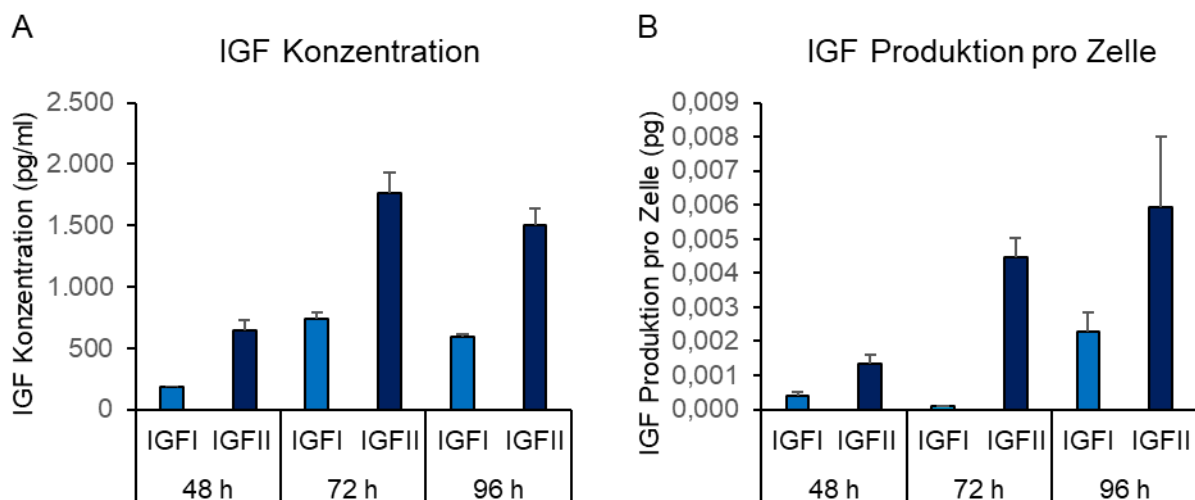
#### 3.1 Etablierung und Charakterisierung des *in vitro* Modells

Um IGFBP2-abhängige Effekte auf essenzielle Charakteristika von Hepatomzellen präzise analysieren zu können, etablierten wir ein *in vitro* Modell mit Hep3B Zellen. Es wurde zunächst getestet, ob Hep3B Zellen alle weiteren wichtigen Komponenten des IGF-Systems exprimieren. Hierzu zählen die IGF-Rezeptoren und die Liganden IGFI und IGFI<sup>II</sup>.

##### 3.1.1 Hep3B Zellen produzieren und sezernieren IGFI und IGFI<sup>II</sup>

Um die IGF-Produktion und Sekretion nachzuweisen, wurden mittels ELISA die IGFI- und IGFI<sup>II</sup>-Konzentrationen bestimmt und auf die Zellzahl normiert.

Abbildung 7 zeigt die Produktion und Sekretion von IGFI und IGFI<sup>II</sup> über alle Zeitintervalle. Beide Wachstumsfaktoren wurden von den Zellen produziert. Dabei war die IGFI<sup>II</sup>-Konzentration nach 96 h um das ~2,5-fache höher als die IGFI-Produktion (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Hep3B Zellen produzieren und sezernieren IGFI und IGFI<sup>II</sup>.**

**A:** Hep3B Zellen wurden bis zu 96 h kultiviert. Im Kulturüberstand wurden nach 48, 72 und 96 h mittels ELISA die Konzentrationen von IGFI und IGFI<sup>II</sup> bestimmt. Zu jedem Messzeitpunkt wiesen die Zellen eine stabile IGFI und IGFI<sup>II</sup> Produktion auf, n=3.

**B:** Die IGFI<sup>II</sup>-Produktion pro Zelle stieg kontinuierlich zu einer maximalen Produktion von 0,00593 pg pro Zelle nach 96 h an, die IGFI-Produktion pro Zelle war nach 96 h mit 0,00228 pg am höchsten, n=3.

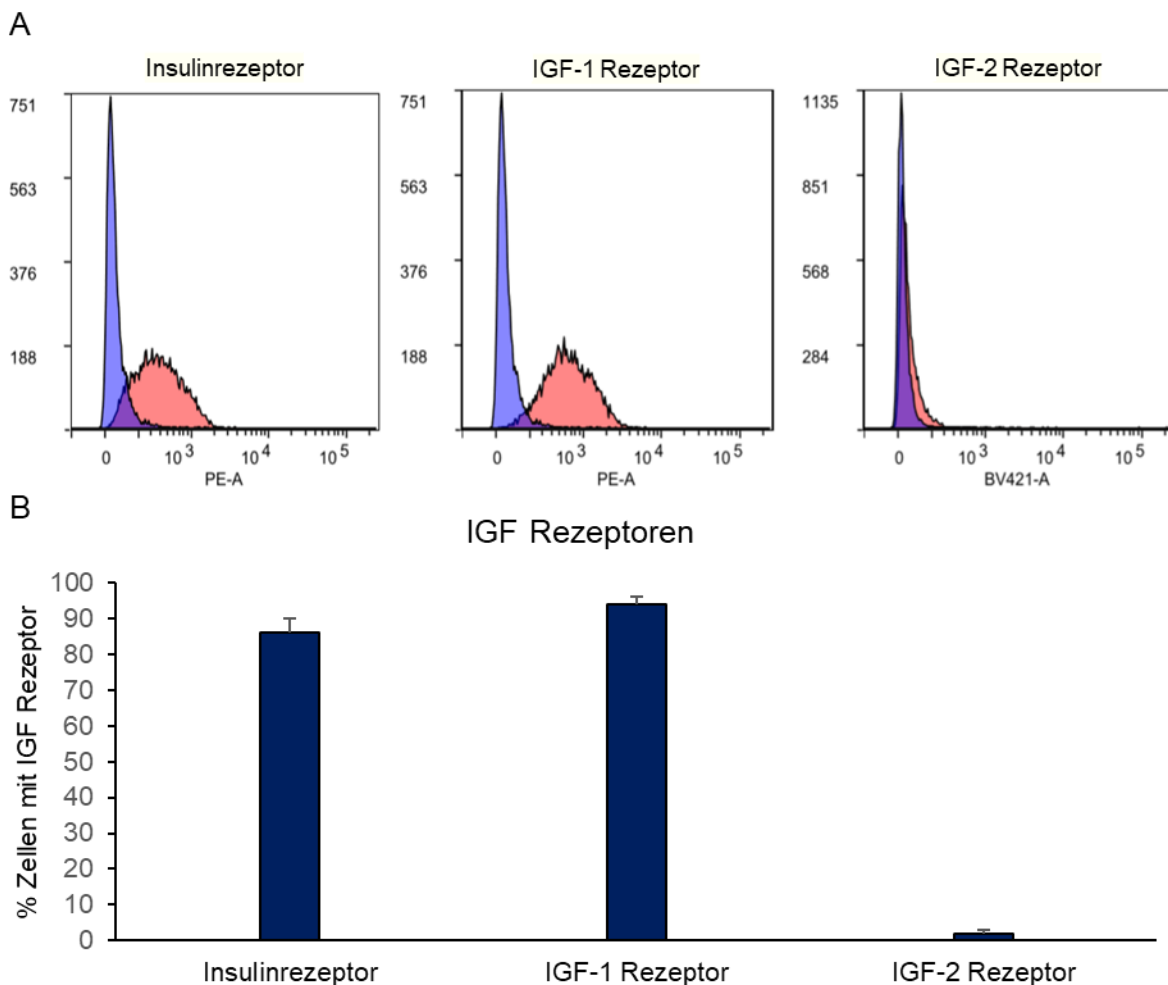


## Ergebnisse

### 3.1.2 Hep3B Zellen präsentieren den Insulin- und den IGF-1 Rezeptor, nicht den IGF-2 Rezeptor

Mittels Oberflächenfärbung und anschließender FACS-Analyse wurde überprüft, ob die IGF-Rezeptoren – Insulinrezeptor, IGF-1 Rezeptor und IGF-2 Rezeptor – auf der Zelloberfläche von Hep3B Zellen vorhanden sind.

Der Insulin- und IGF-1 Rezeptor wurde auf 86% bzw. 94% der Hep3B Zellen nachgewiesen, der IGF-2 Rezeptor wurde auf 2% der Zellen präsentiert (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Hep3B Zellen präsentieren den Insulin- und den IGF-1 Rezeptor, nicht den IGF-2 Rezeptor.**

**A:** Die Analyse der Oberflächenrezeptoren erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Isotyp-Kontrolle ist in blau dargestellt, die Rezeptorfärbung wird durch die rote Kurve gezeigt. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten, n=3.

**B:** Die Quantifizierung der FACS-Analyse zeigte, dass 86% der Zellen den Insulinrezeptor, 94% der Zellen den IGF-1 Rezeptor und 2% der Zellen den IGF-2 Rezeptor besitzen, n=3.

Zusammenfassend zeigen wir, dass Hep3B Zellen mit der Oberflächenpräsentation von IGF-Rezeptoren und der Produktion von IGFI und IGFI ein intaktes IGF-System aufweisen und somit für die Untersuchung der Effekte von IGFBP2 geeignet sind.

## Ergebnisse

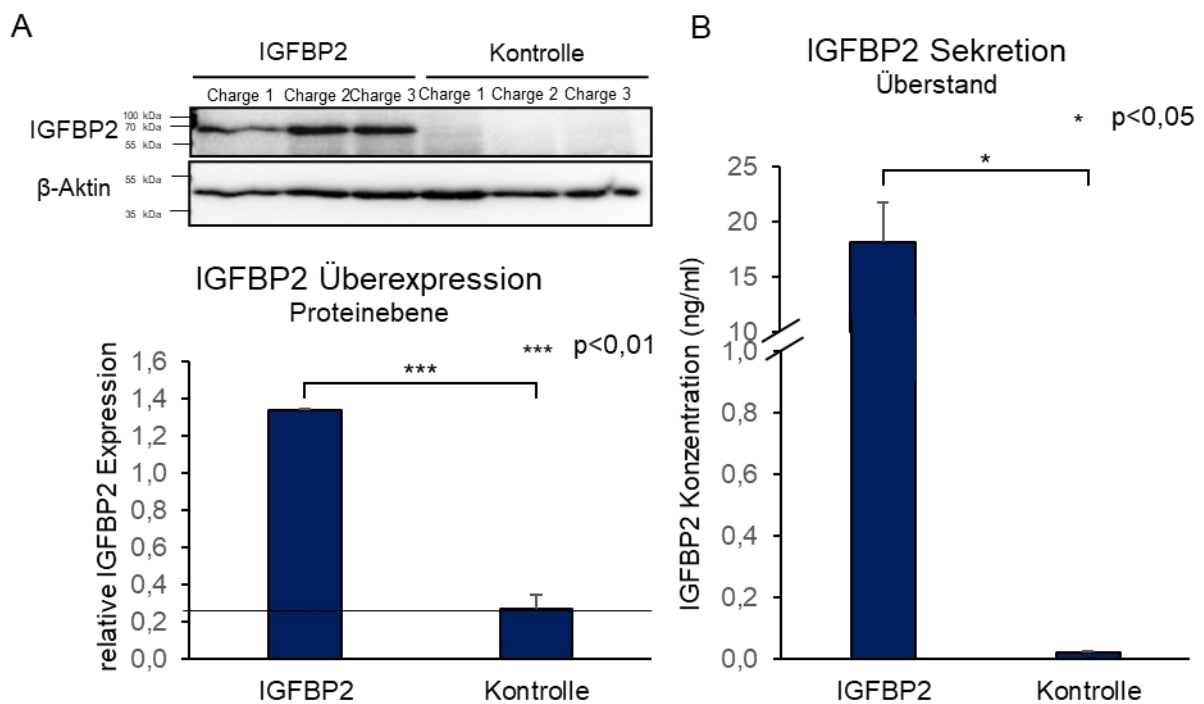
### 3.1.3 Modifikation der intrazellulären IGFBP2 Expression

Um IGFBP2-abhängige Effekte auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies zu determinieren (vgl. 3.5), wurden Strategien etabliert, um IGFBP2 intrazellulär zu regulieren.

#### 3.1.3.1 Überexpression von IGFBP2 in Hep3B Zellen mittels p-CMV6-AC-GFP IGFBP2 Plasmid

Native Hep3B-Zellen weisen nur geringe Mengen an IGFBP2 auf (Abbildung 9A). Die Expression von IGFBP2 wurde mittels Plasmid-Transfektion in Hep3B Zellen induziert.

In Abbildung 9 ist die erfolgreiche Induktion von IGFBP2 dargestellt. 48 h nach Transfektion mit dem Expressionsplasmid p-CMV6-AC-GFP IGFBP2 war die intrazelluläre Menge an IGFBP2 Protein signifikant auf das mehr als 5-fache gesteigert (Abbildung 9A). Dabei weist IGFBP2 durch das gekoppelte GFP eine molekulare Masse von ~70 kDa auf. Eine intakte Sekretion von IGFBP2 wurde durch die signifikante Erhöhung der extrazellulären Konzentration von IGFBP2 von 0,02 ng/ml bei Transfektion des Kontrollplasmids auf >18 ng/ml bei Transfektion des Expressionsplasmids belegt.



**Abbildung 9: Induktion von IGFBP2 in Hep3B Zellen mittels Plasmidtransfektion.**

**A:** 48 h nach Transfektion eines für IGFBP2 kodierenden Plasmids zeigten Hep3B Zellen eine signifikante Steigerung der IGFBP2 Proteinmenge. Dargestellt sind die Western Blots dreier repräsentativer Experimente und deren densitometrische Auswertung mit Normierung auf die  $\beta$ -Aktinmenge, n=3.

**B:** Die Induktion von IGFBP2 führte auch zu einer signifikanten Steigerung der IGFBP2-Sekretion, n=3.

## Ergebnisse

### 3.1.3.2 siRNA-vermittelter knock-down von *IGFBP2* in Hep3B Zellen

Um umgekehrt die *IGFBP2*-Expression in Hep3B-Zellen zu unterdrücken, wurden knockdown-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde die Effektivität von vier siRNA Konstrukten sowie eine Kombination aller in Hep3B Zellen getestet. Mit siRNA scrambled (siRNA scr) transfizierte Zellen dienten als Kontrolle.

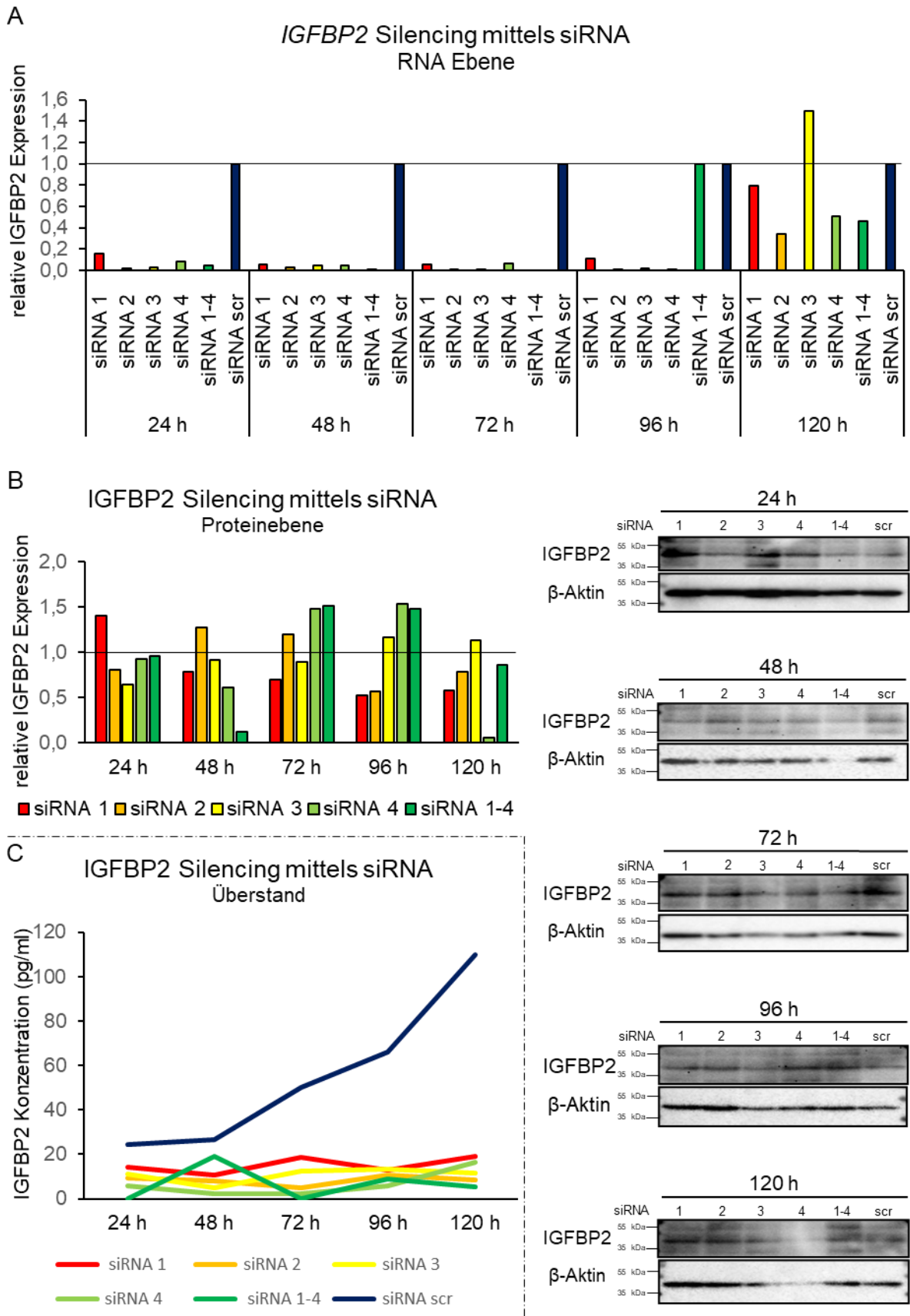
Die relative *IGFBP2* Expression nach 24 – 120 h wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Die Funktionalität aller Konstrukte bestätigte sich durch die Abnahme der *IGFBP2* Expression um >84% und konnte über 96 h aufrechterhalten werden. Hierbei führte siRNA2 zu der größten Abnahme der *IGFBP2* Expression mit einer >97% Reduktion. Nach 120 h erhöhte sich die Expression von *IGFBP2* in allen Ansätzen. Während siRNA1, siRNA2, siRNA4 und siRNA1-4 noch nicht auf die Konzentration der siRNA scrambled anstiegen, überstieg siRNA3 diese (Abbildung 10A).

Intrazelluläre IGFBP2 Mengen wurden mittels Western Blot bestimmt. siRNA1 zeigte nach 48 h eine Abnahme von IGFBP2 auf Proteinebene, welche nach 96 h eine maximale Reduktion von 42% aufwies. Auch alle anderen Konstrukte erreichten zeitweise eine Herunterregulation von IGFBP2, dieser Effekt war jedoch jeweils nur transient zu beobachten (Abbildung 10B).

Alle siRNA-Konstrukte führten zu einer Abnahme der IGFBP2 Sekretion mit darauffolgend konstant niedrigen IGFBP2-Konzentrationen im Vergleich zu siRNA scr. Zellen, die mit der Kontroll-siRNA scr transfiziert wurden, wiesen nach 120 h eine IGFBP2-Konzentration von >109 pg/ml im Überstand auf, während die maximale Konzentration von IGFBP2 120 h nach *IGFBP2* knockdown <20 pg/ml betrug. Prozentual ließ sich die Konzentration von IGFBP2 im Überstand mittels aller Konstrukte nach 24 h auf <58%, nach 120 h auf <18% im Vergleich zur Kontrolle senken. Alle Target-Konstrukte zeigten zu allen Messzeitpunkten Konzentrationen <20 pg/ml. siRNA2, siRNA4 und die Kombination aller vier siRNAs bewirkten zwischen 72 h und 120 h eine maximale Abnahme der IGFBP2 Sekretion von >84% (Abbildung 10C).

Somit zeigten alle Konstrukte für den Zeitraum zwischen 24 h und 96 h eine konstante Reduktion der IGFBP2 Produktion.

# Ergebnisse



**Abbildung 10:** *IGFBP2* knockdown mittels siRNA führt zu einer verminderten Expression von *IGFBP2* und reduzierter *IGFBP2*-Sekretion.

Die horizontalen Linien in Abbildung A und B beschreiben die normierte Höhe der Kontrollen (scrambled siRNA) auf eine relative *IGFBP2* bzw. *IGFBP2* Expression von 1.

## Ergebnisse

**A:** RT-qPCR Analysen von Hep3B Zellen nach Transfektion mit vier verschiedenen siRNA Konstrukten sowie einer Kombination aller, aus welchen nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, und 120 h Lysate hergestellt und auf die Expression von *IGFBP2* untersucht wurden. Es zeigte sich eine Reduktion der *IGFBP2* Expression zwischen 24 h und 96 h,  $n \geq 1$ .

**B:** Western Blot Analysen von siRNA-transfizierten Hep3B Zellen und deren densitometrische Auswertung. Nach 48 h führte siRNA1 zu einer stabilen Herunterregulation von IGFBP2 um mindestens 21%. Alle anderen Konstrukte zeigten eine geringere, nicht andauernde Reduktion von IGFBP2,  $n=1$ .

**C:** ELISA Analyse des Zellkulturmediums von Hep3B Zellen 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion mit siRNA. Es zeigte sich eine kontinuierliche Verminderung der IGFBP2-Konzentration, welche einer prozentualen Reduktion von IGFBP2 von mindestens 42% nach 24 h entspricht,  $n \geq 1$ .

Durch die erfolgreiche Regulation der IGFBP2 Expression sollte im Verlauf der weiteren Arbeit die Wirkung des Proteins auf die Effektivität der Chemotherapeutika und Targeted Therapies determiniert werden (vgl. 3.5.). Bevor wir den Einfluss von IGFBP2 auf die Therapie von Hepatomzellen untersuchten, wurde der Einfluss auf wichtige Charakteristika von Tumorzellen - nämlich Apoptoseverhalten, Invasivität und Wachstum - getestet.

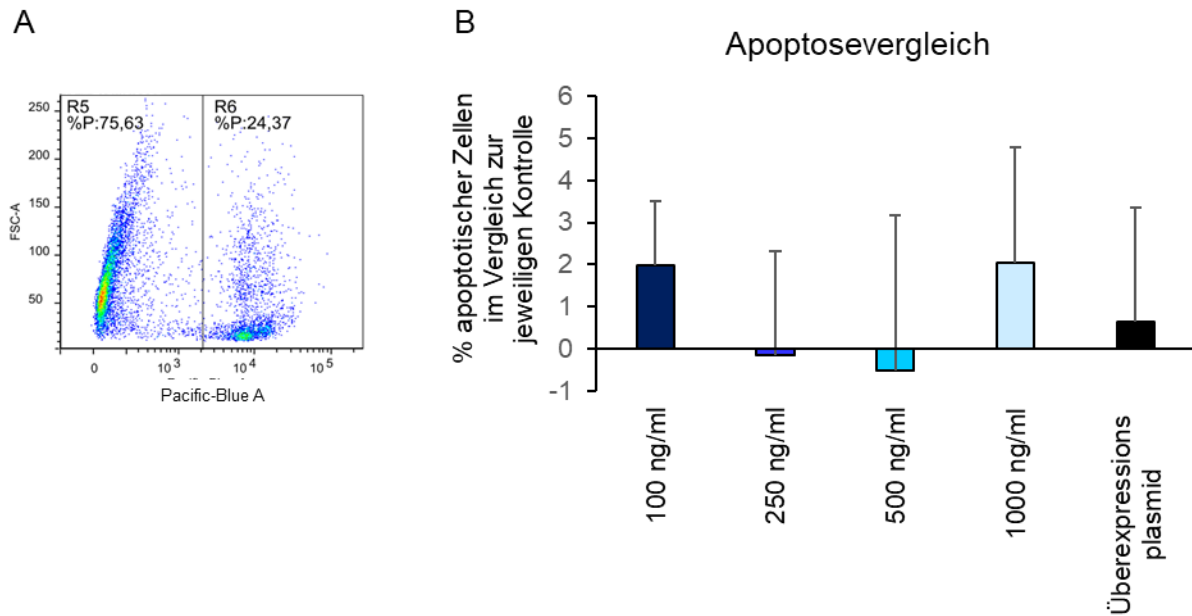
### **3.2 IGFBP2 beeinflusst die Apoptose von Hep3B Zellen nicht**

In Vorarbeiten identifizierte unsere Arbeitsgruppe IGFBP2 als Zielgen der p53 Familie (111). Als Tumorsuppressor kann die p53 Familie Apoptose induzieren (129–134). Um zu untersuchen, ob IGFBP2 in zelltodregulierende Prozesse involviert ist, führten wir Apoptosemessungen durch. Hierfür wurden IGFBP2-überexprimierende Zellen (vgl. 3.1.3) und mit rhIGFBP2-behandelte Zellen (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml) kultiviert und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die stabile Zelllinie des Kontrollplasmids und die rhIGFBP2-unbehandelten Zellen dienten als Kontrollen. Durch den Vergleich von IGFBP2-überexprimierenden Zellen mit rhIGFBP2-behandelten Zellen sollte zudem zwischen der intra- und extrazellulären Wirkung von IGFBP2 differenziert werden.

Die Modifikation der IGFBP2 Expression resultierte in keiner Veränderung der Apoptoseraten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Apoptoserate zwischen den mit rhIGFBP2-behandelten Zellen, den IGFBP2-überexprimierenden Zellen und den Kontrollen (Abbildung 11).

Somit führte IGFBP2 in Hep3B Zellen weder zu einer Hemmung noch zu einer Induktion der Apoptose. Durch Vergleich der IGFBP2-überexprimierenden und mit rhIGFBP2-behandelten Zellen wird zudem deutlich, dass IGFBP2 weder intra- noch extrazellulär Apoptose auslösende Effekte besitzt.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: rhIGFBP2 und zellulär überexprimiertes IGFBP2 haben keinen Einfluss auf die Apoptoseraten von Hep3B Zellen.**

**A:** Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse von Hep3B Zellen 48 h nach Behandlung mit rhIGFBP2 oder nach Transduktion des Expressionsplasmids. Dargestellt ist das Ergebnis einer Probe aus einem von drei unabhängigen Experimenten, n=3. R5: lebende Zellen, R6: tote Zellen

**B:** Differenz der Apoptoserate verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate der mit rhIGFBP2-behandelten Zellen, IGFBP2-überexprimierenden Zellen und den Kontrollen, n=3.

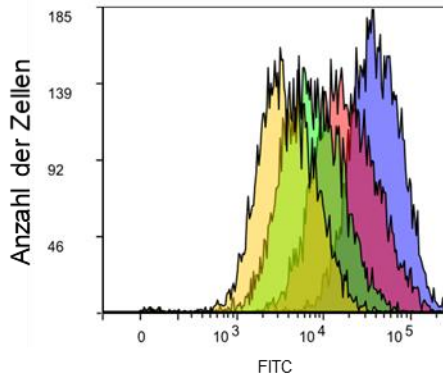
### 3.3 rhIGFBP2 beeinflusst die Proliferation, die Zellviabilität und die Migration von Hep3B Zellen

Wie bereits beschrieben, sind Viabilität, Proliferation und Migration wichtige Charakteristika von Tumorzellen. Um zu untersuchen, wie IGFBP2 auf diese für Wachstum und Invasivität essenziellen Prozesse Einfluss nimmt, wurden Hep3B-Zellen mit rhIGFBP2 stimuliert. In allen Experimenten wurden die folgenden Konzentrationen von rhIGFBP2 verwendet: 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml. Als Kontrolle dienten rhIGFBP2-unbehandelte Zellen.

#### 3.3.1 rhIGFBP2 erhöht die Proliferation

Die Effekte von rhIGFBP2 auf die Proliferation von Hep3B Zellen wurden in einem fluoreszenzbasierten Assays analysiert. Hierfür wurden Hep3B Zellen mit einem Proliferationsfärbereagenz behandelt, das sich pro Zellteilung auf die entstehenden Tochterzellen aufteilt. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Proliferation und wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 12).

## Ergebnisse



**Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Proliferationsfärbung von Hep3B Zellen im FITC Kanal.**

Verlauf des Experiments: der Shift der Kurve nach links zeigt eine Abnahme der Färbintensität der Hep3B Zellen im 24 h Intervall. Dargestellt ist das Ergebnis einer Probe aus einem von sechs unabhängigen Experimenten, n=6. blau: 24 h, rot: 48 h, grün: 72 h, orange: 96 h.

Es wurde eine zeit- und dosisabhängige Wirkung von rhIGFBP2 auf die Proliferation beobachtet (Abbildung 13).

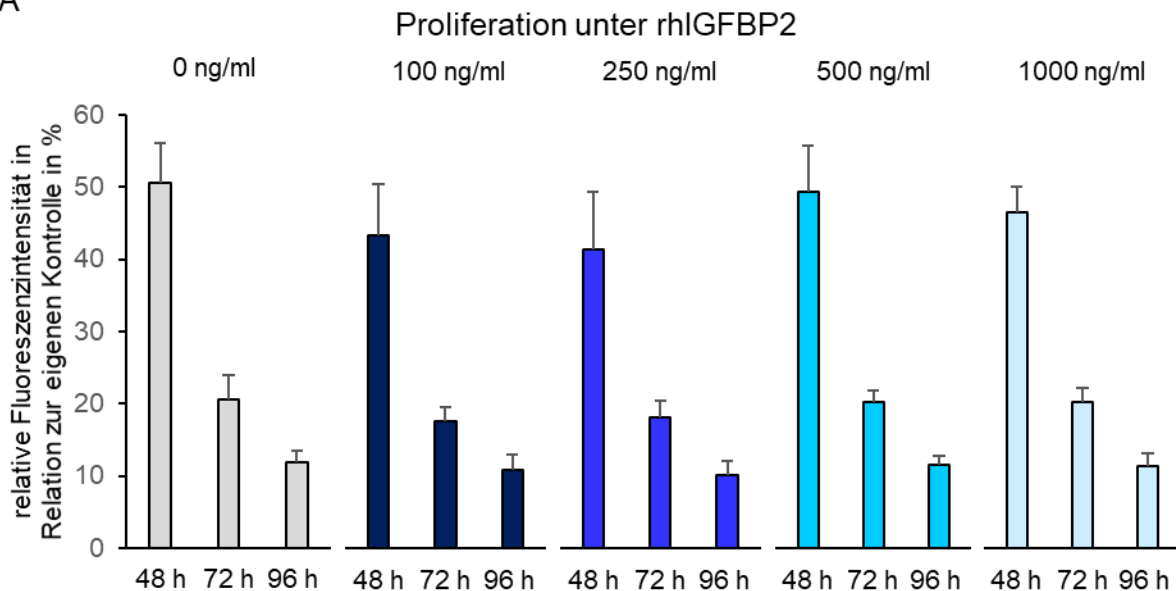
### Zeitabhängige Wirkung

rhIGFBP2 zeigte bereits nach 48 h eine maximale Wirkung auf die Proliferation (Abbildung 13B).

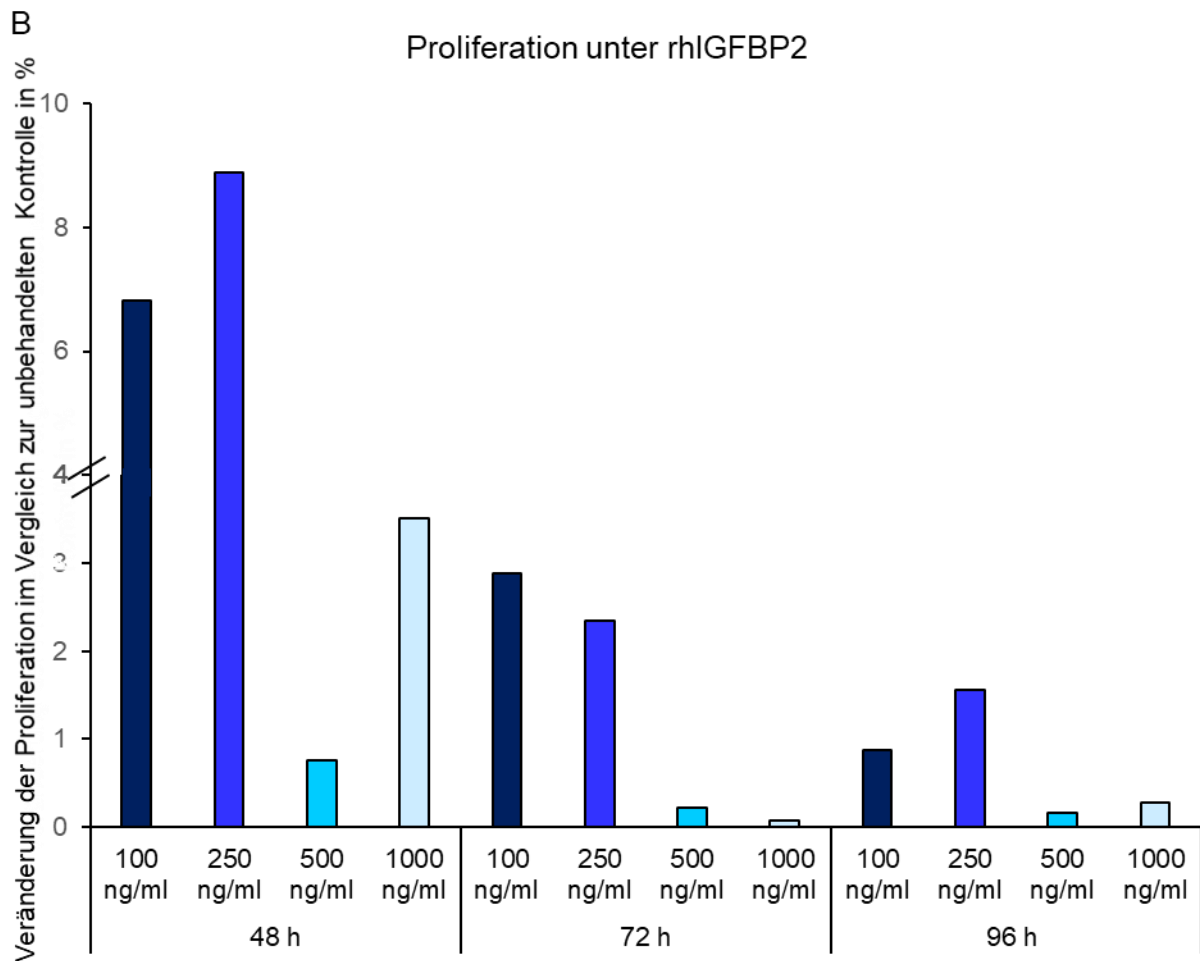
### Dosisabhängige Wirkung

Die relative Fluoreszenzintensität verglichen mit der jeweiligen Konzentration von rhIGFBP2 zu Beginn des Experiments war unter rhIGFBP2 Stimulation niedriger, so dass rhIGFBP2 die Proliferation zu jedem Messzeitpunkt erhöht (Abbildung 13A). rhIGFBP2 250 ng/ml führte nach 48 h und 96 h zur maximalen Steigerung der Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13B).

A



## Ergebnisse



**Abbildung 13: rhIGFBP2 führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Zunahme der Proliferation.**

**A:** Hep3B Zellen wurden mit einem Proliferationsmarker gefärbt und mit ansteigenden Konzentrationen rhIGFBP2 behandelt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde zu Beginn des Experiments und nach 48, 72 und 96 h durchflusszytometrisch bestimmt und korrelierte mit der Proliferation. Die relative Fluoreszenzintensität nahm mit zunehmender Versuchsdauer und unter rhIGFBP2 Stimulation ab. Somit zeigte rhIGFBP2 proliferative Effekte. n=6.

**B:** Zusammenfassende Darstellung: rhIGFBP2 veränderte die Proliferation zeit- und dosisabhängig. Gezeigt ist die Differenz der Mittelwerte der rhIGFBP2 stimulierten Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Nach 48 h war die Proliferation maximal gesteigert, wobei sie unter Zugabe von rhIGFBP2 zu jedem Messzeitpunkt höher war als die Kontrolle, n=6.

### 3.3.2 rhIGFBP2 verbessert die Zellviabilität

Anschließend wurde untersucht, ob rhIGFBP2 die Zellviabilität verändert. Hierfür wurden Hep3B Zellen mit rhIGFBP2 stimuliert und die Veränderung der Zellviabilität im 24 h Intervall mittels MTS Assay bestimmt. Die gemessene optische Dichte korreliert dabei mit der Stoffwechselaktivität der Zellen.

rhIGFBP2 hatte eine zeit- und dosisabhängige Wirkung auf die Zellviabilität (Abbildung 14).

#### Zeitabhängige Wirkung

Nach 72 h wiesen alle Proben unabhängig von der rhIGFBP2-Konzentration maximale Stoffwechselaktivität auf. Mit zunehmender Versuchsdauer verbesserte

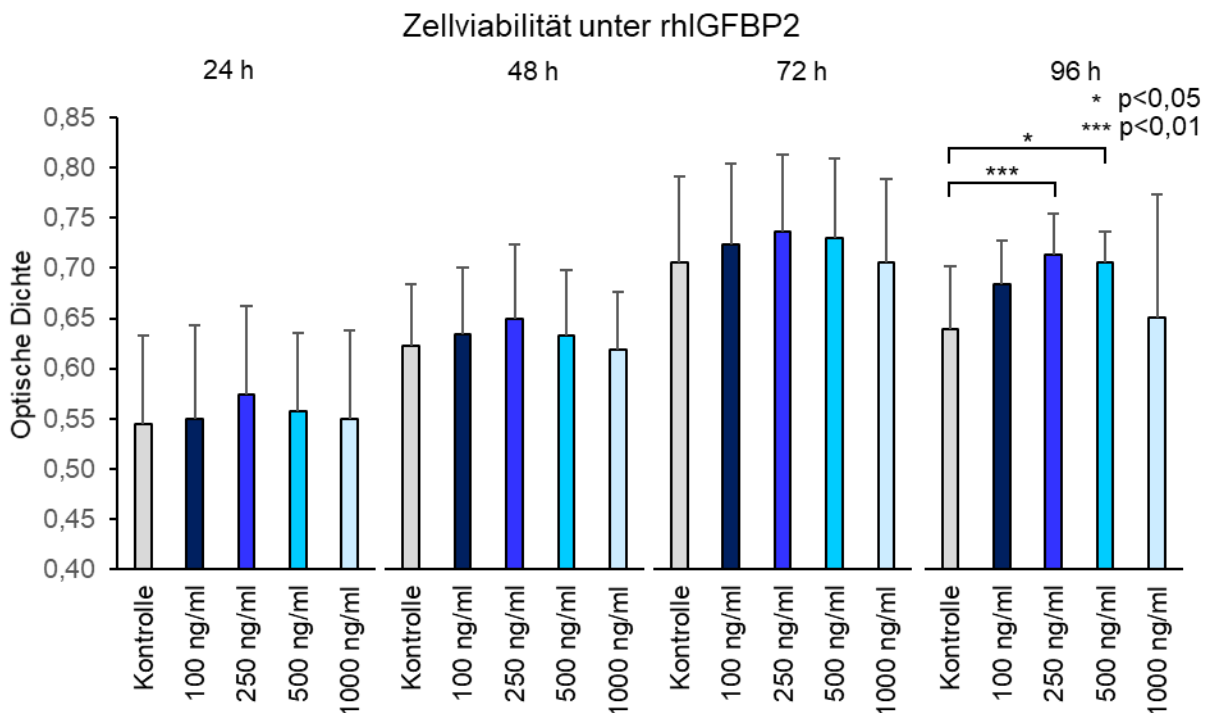


## Ergebnisse

rhIGFBP2 die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Dabei erreichten rhIGFBP2 250 ng/ml und rhIGFBP2 500 ng/ml nach 96 h eine signifikante Steigerung der Zellviabilität verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 14).

### Dosisabhängige Wirkung

rhIGFBP2 250 ng/ml führte zu jedem Messzeitpunkt zur maximalen Steigerung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle, gefolgt von rhIGFBP2 500 ng/ml, rhIGFBP2 100 ng/ml und rhIGFBP2 1000 ng/ml. rhIGFBP2 1000 ng/ml führte einmalig nach 48 h Inkubation zu einer Verschlechterung der Zellviabilität um 0,5% (Abbildung 14).



**Abbildung 14: rhIGFBP2 führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Zunahme der Zellviabilität.**

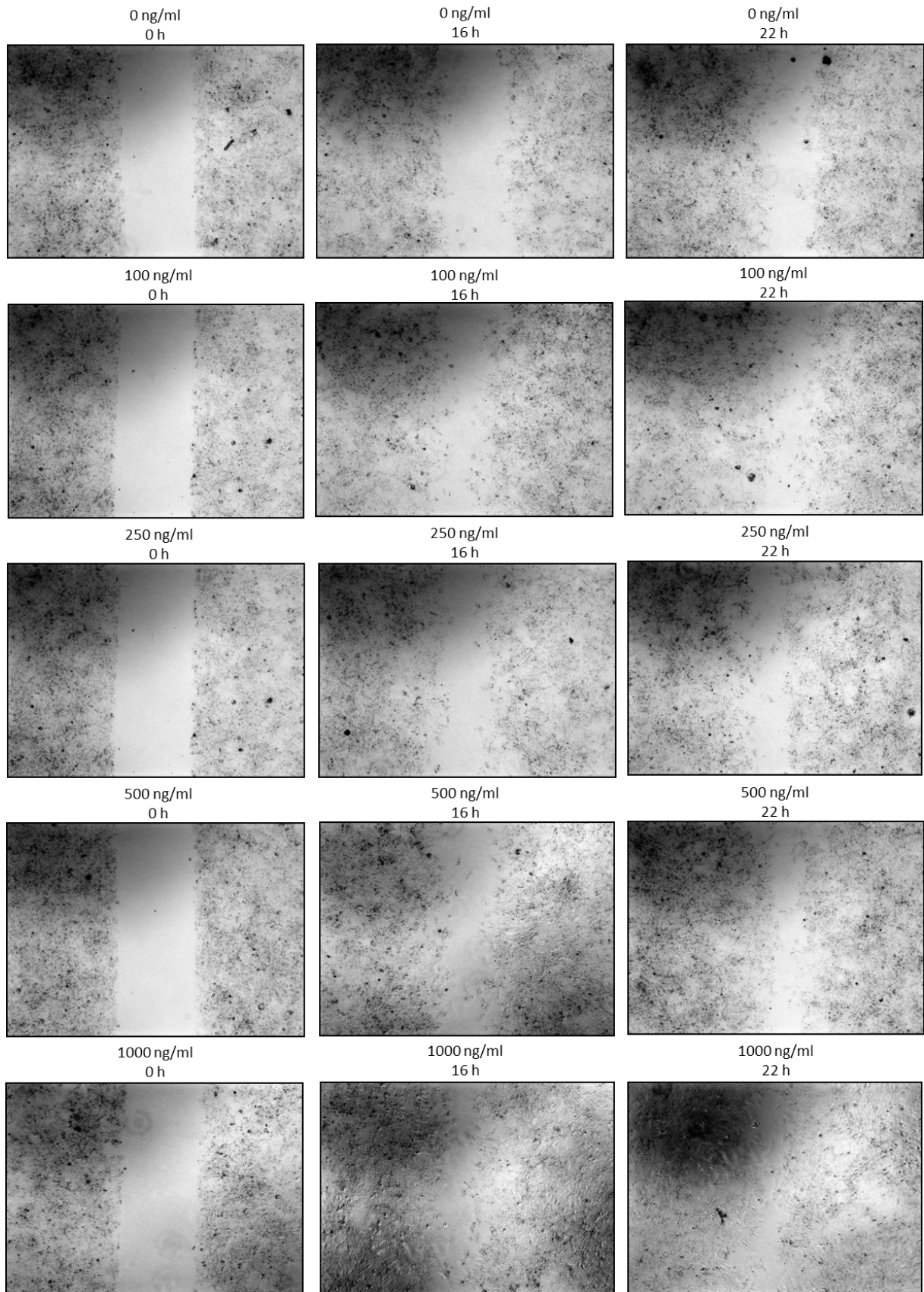
Hep3B Zellen wurden mit rhIGFBP2 für 24-96 h stimuliert. Zur Messung der Zellviabilität wurde die Zunahme der optischen Dichte im MTS Assay bestimmt. Je größer die optische Dichte, desto höher ist die Stoffwechselaktivität der Zellen. Die Stoffwechselaktivität zeigte für alle Proben ein Maximum nach 72 h. rhIGFBP2 erhöhte die Stoffwechselaktivität zu jedem Messzeitpunkt außer rhIGFBP2 1000 ng/ml nach 48 h. Nach 96 h zeigte sich eine maximale Verbesserung der Zellviabilität für alle getesteten Konzentrationen, rhIGFBP2 250 ng/ml und rhIGFBP2 500 ng/ml steigerten die Viabilität signifikant, n=10.

### **3.3.3 rhIGFBP2 erhöht die Migration von Hep3B Zellen**

Zuletzt wurde untersucht, ob rhIGFBP2 neben Proliferation und Viabilität auch die Migration von Hep3B Zellen beeinflusst. Hierfür wurde in einem Wound Healing Assay die Migration der Hep3B Zellen in die zellfreie Fläche beobachtet.

rhIGFBP2 erhöhte die Migration im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 16 h. Nach 22 h zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von rhIGFBP2 mit maximaler Migration der Hep3B Zellen bei rhIGFBP2 1000 ng/ml. Die zellfreie Fläche reduzierte sich mit zunehmender Konzentration von rhIGFBP2 (Abbildung 15).

## Ergebnisse



**Abbildung 15: rhIFGBP2 führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Migration.**

In einen Zellrasen aus Hep3B Zellen wurde eine Wunde eingebracht. Die Zellen wurden anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen von rhIFGBP2 für bis zu 22 h inkubiert.

**0 h:** Auf den mikroskopischen Bildern zeigten alle Versuchsansätze eine scharf begrenzte freie Fläche.

## Ergebnisse

**16 h und 22 h:** Zugabe von rhIGFBP2 erhöhte die Migration. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt mit maximaler Migration der Hep3B Zellen bei rhIGFBP2 1000 ng/ml. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten, n=4.

Zusammenfassend zeigen wir, dass rhIGFBP2 die Proliferation, Zellviabilität und Migration zeit- und dosisabhängig beeinflusst.

### **3.4 rhIGFBP2 beeinflusst den IGF-Signalweg von Hep3B Zellen und führt zu weniger freiem IGF1 und IGFII**

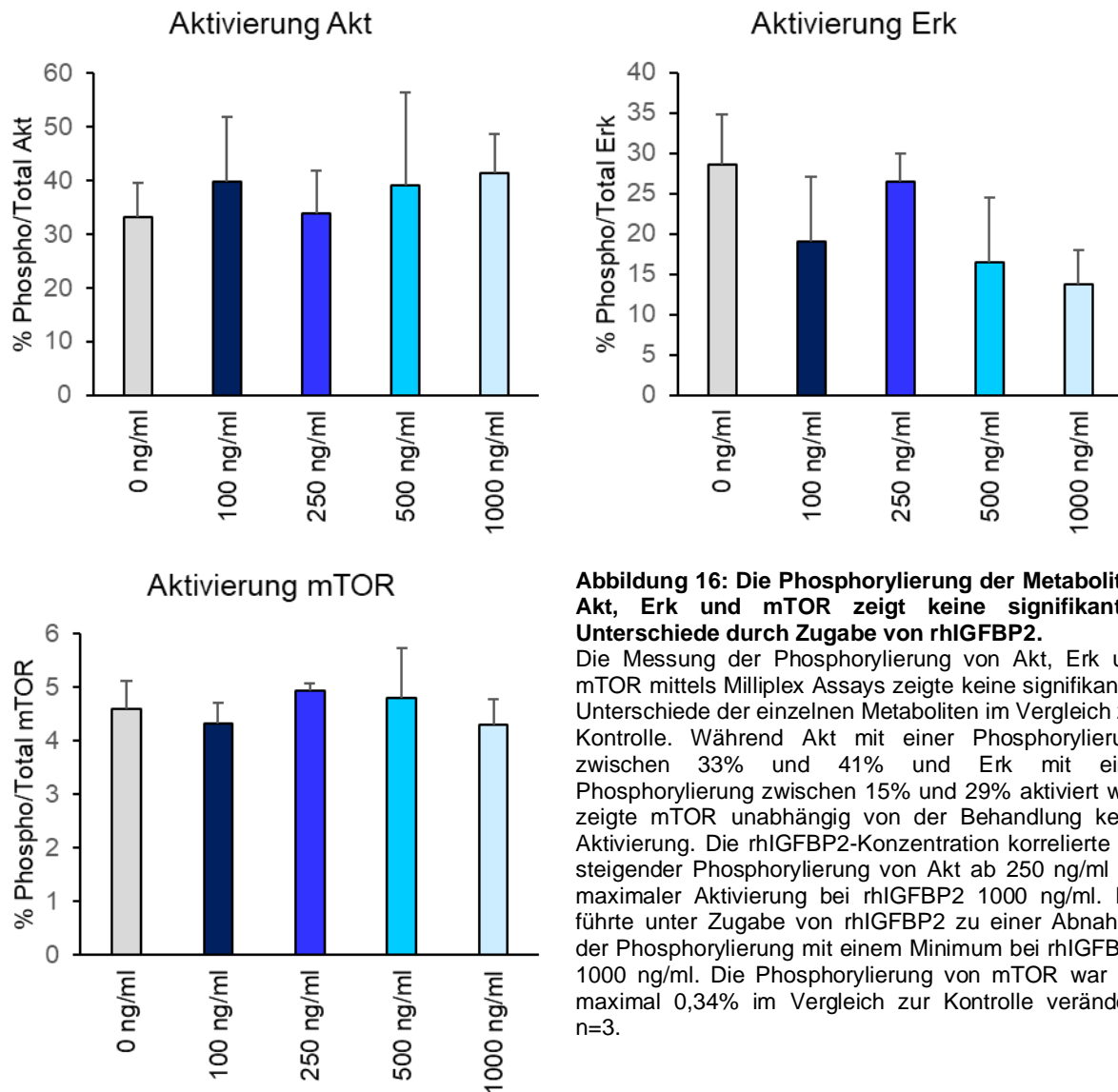
Im nächsten Schritt wurde untersucht, über welchen Signalweg die IGFBP2-abhängigen Effekte auf Proliferation, Zellviabilität und Migration vermittelt werden. Hierfür wurden Hep3B Zellen mit rhIGFBP2 (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml) stimuliert und die Aktivierung der Enzyme Akt, mTOR und Erk, die unter anderem Bestandteile des proliferativen IGF-Signalweges sind (vgl. 1.2.1.2), mittels Milliplex Assay analysiert. rhIGFBP2-unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. rhIGFBP2 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivierung von Akt, mTOR und Erk (Abbildung 16).

Akt war in allen Proben aktiviert und zeigte eine Phosphorylierung zwischen 33% und 41%. Dabei erhöhte rhIGFBP2 die Phosphorylierung von Akt, wobei ab rhIGFBP2 250 ng/ml ein dosisabhängiger Trend zu beobachten war.

Eine Aktivierung des downstream von Akt gelegenen Proteins mTOR wurde in keiner Probe beobachtet. Die Phosphorylierung des Metaboliten unterschied sich um maximal 0,34% von der Kontrolle. rhIGFBP2 zeigte hierauf keinen Effekt.

Erk war in allen Proben aktiviert und zeigte eine Phosphorylierung zwischen 14% und 29%. Hierbei resultierte die Applikation von rhIGFBP2 in einer Reduktion der Phosphorylierung des Proteins. Die Aktivierung von Erk war minimal bei rhIGFBP2-Konzentrationen von 1000 ng/ml mit einer Abnahme um 15%.

## Ergebnisse



**Abbildung 16: Die Phosphorylierung der Metaboliten Akt, Erk und mTOR zeigt keine signifikanten Unterschiede durch Zugabe von rhIGFBP2.**

Die Messung der Phosphorylierung von Akt, Erk und mTOR mittels Milliplex Assays zeigte keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Metaboliten im Vergleich zur Kontrolle. Während Akt mit einer Phosphorylierung zwischen 33% und 41% und Erk mit einer Phosphorylierung zwischen 15% und 29% aktiviert war, zeigte mTOR unabhängig von der Behandlung keine Aktivierung. Die rhIGFBP2-Konzentration korrelierte mit steigender Phosphorylierung von Akt ab 250 ng/ml mit maximaler Aktivierung bei rhIGFBP2 1000 ng/ml. Erk führte unter Zugabe von rhIGFBP2 zu einer Abnahme der Phosphorylierung mit einem Minimum bei rhIGFBP2 1000 ng/ml. Die Phosphorylierung von mTOR war um maximal 0,34% im Vergleich zur Kontrolle verändert, n=3.

Um die IGF-bindende Wirkung von IGFBP2 zu verifizieren, wurde die Konzentration an freiem IGF1 und IGFII nach Zugabe von rhIGFBP2 (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml) mittels ELISA untersucht. Zudem wurde die Konzentration von freiem IGFBP2 gemessen. rhIGFBP2-unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Die Konzentration von freiem IGF1, IGFII und IGFBP2 korrelierte mit der zugegebenen Konzentration rhIGFBP2 (Abbildung 17).

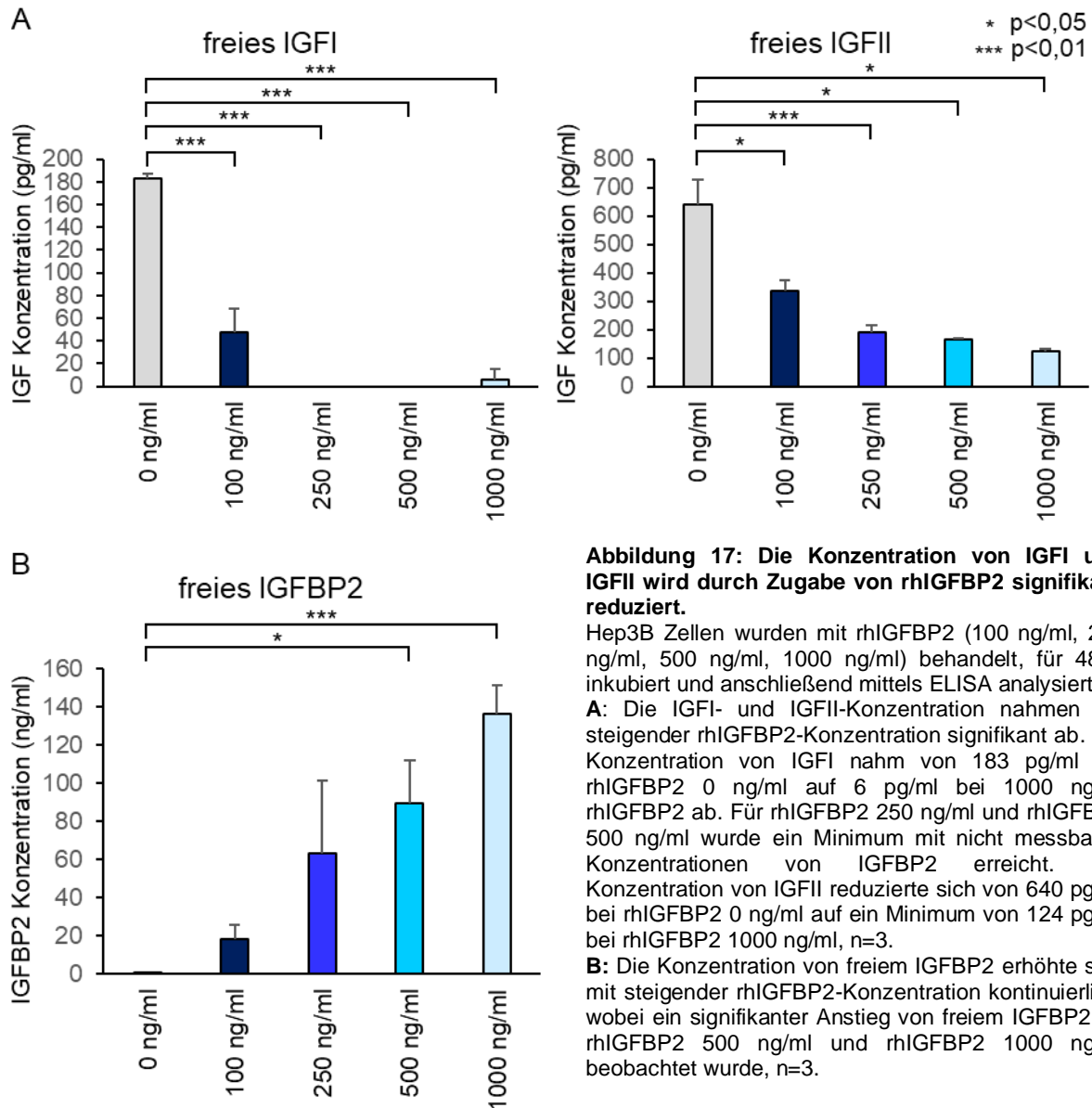
### IGFI und IGFII

Die IGF1-Konzentration sank unter Zugabe von rhIGFBP2 signifikant auf teils nicht messbare Konzentrationen ab. Auch die IGFII-Konzentration nahm mit steigender rhIGFBP2-Konzentration signifikant ab. Die niedrigste IGFII-Konzentration war mit 124 pg/ml bei rhIGFBP2 1000 ng/ml messbar, während die Kontrolle bei 640 pg/ml lag (Abbildung 17A).

## Ergebnisse

### IGFBP2

Die IGFBP2-Konzentration korrelierte mit der applizierten Konzentration von rhIGFBP2. Dabei nahm die Konzentration an freiem IGFBP2 stets um 75% - 86% der applizierten rhIGFBP2-Konzentration ab. Die freie IGFBP2-Konzentration erreichte maximal 136 ng/ml bei rhIGFBP2 1000 ng/ml (Abbildung 17B).



**Abbildung 17: Die Konzentration von IGF I und IGF II wird durch Zugabe von rhIGFBP2 signifikant reduziert.**

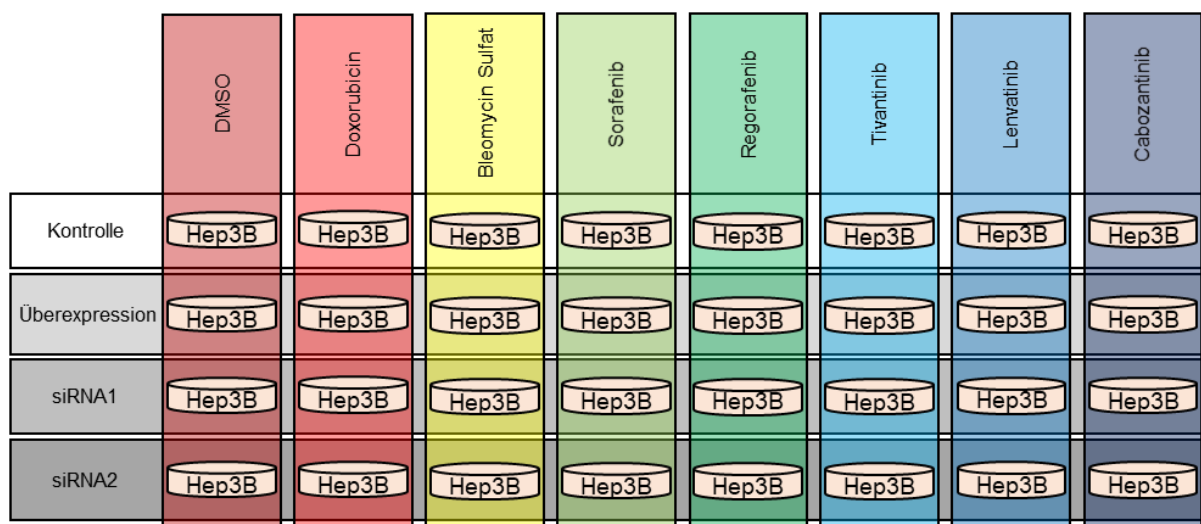
Hep3B Zellen wurden mit rhIGFBP2 (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml) behandelt, für 48 h inkubiert und anschließend mittels ELISA analysiert.

**A:** Die IGF I- und IGF II-Konzentration nahmen mit steigender rhIGFBP2-Konzentration signifikant ab. Die Konzentration von IGF I nahm von 183 pg/ml bei rhIGFBP2 0 ng/ml auf 6 pg/ml bei 1000 ng/ml rhIGFBP2 ab. Für rhIGFBP2 250 ng/ml und rhIGFBP2 500 ng/ml wurde ein Minimum mit nicht messbaren Konzentrationen von IGFBP2 erreicht. Die Konzentration von IGF II reduzierte sich von 640 pg/ml bei rhIGFBP2 0 ng/ml auf ein Minimum von 124 pg/ml bei rhIGFBP2 1000 ng/ml, n=3.

**B:** Die Konzentration von freiem IGFBP2 erhöhte sich mit steigender rhIGFBP2-Konzentration kontinuierlich, wobei ein signifikanter Anstieg von freiem IGFBP2 für rhIGFBP2 500 ng/ml und rhIGFBP2 1000 ng/ml beobachtet wurde, n=3.

### 3.5 IGFBP2 beeinflusst die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Hep3B Zellen

Unsere Daten zeigen, dass IGFBP2 Einfluss auf Wachstum und Invasivität von Hep3B Zellen hat. Im Folgenden sollte nun im etablierten und charakterisierten Hep3B-Zellkulturmodell der Einfluss von IGFBP2 auf die Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika und Targeted Therapies, die beim hepatozellulären Karzinom in klinischer Anwendung und / oder in klinischen Studien sind, getestet werden. Hierfür wurde die *IGFBP2* Expression mittels siRNA knockdown und Plasmidexpression modifiziert (vgl. 3.1.3). siRNA scrambled und ein Kontrollplasmid dienten als Kontrollen. Nach Behandlung mit den Chemotherapeutika und Targeted Therapies (Doxorubicin, Bleomycin-Sulfat, Sorafenib, Regorafenib, Tivantinib, Lenvatinib, Cabozantinib) wurde der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Versuchsmodell zur Bestimmung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Abhängigkeit von der IGFBP2-Konzentration.**

In Hep3B Zellen wurde die IGFBP2 Expression durch *IGFBP2* Expressionsplasmid-, *IGFBP2* siRNA 1- und *IGFBP2* siRNA 2-Transfektion modifiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Chemotherapeutika und Targeted Therapies behandelt und für 48 h inkubiert. Die Bestimmung der apoptotischen Zellen erfolgte durchflusszytometrisch.

Die Modifikation der IGFBP2 Expression resultierte in einer veränderten Wirkung der Chemotherapeutika und Targeted Therapies (Abbildung 19):

Für siRNA2 und das Expressionsplasmid bestand kein signifikanter Unterschied zu den Apoptoseraten in den Kontrollversuchen (DMSO siRNA scr und DMSO siRNA2 bzw. DMSO Kontrollplasmid und DMSO Expressionsplasmid). Für siRNA1 wurde ein Unterschied der Apoptoseraten zwischen den Gruppen DMSO siRNA scr und DMSO siRNA1 von 3,8% beobachtet. Um diesen Effekt zu kompensieren, wurde die

## Ergebnisse

antiapoptotische Grundaktivität von DMSO siRNA1 bei der Auswertung der anderen Ansätze mit siRNA1 und Chemotherapeutika und Targeted Therapies abgezogen.

### IGFBP2 Knockdown

Alle Chemotherapeutika und Targeted Therapies führten in siRNA2-transfizierten Zellen zu einer Steigerung der Apoptose. In siRNA1-transfizierten Zellen zeigten sich ähnliche Effekte für alle Chemotherapeutika und Targeted Therapies außer Doxorubicin. Regorafenib resultierte in einer signifikanten Steigerung der Apoptose von 61% auf 78%. Somit hatte die Abwesenheit von IGFBP2 den größten Einfluss auf den Regorafenib-induzierten Zelltod (Abbildung 19A).

### IGFBP2 Überexpression

Wie in 3.2 beschrieben, hatte das *IGFBP2* Expressionsplasmid allein keinen antiapoptotischen Effekt. Allerdings wurde die Wirkung aller Chemotherapeutika und Targeted Therapies außer Cabozantinib durch Expression von *IGFBP2* vermindert. Eine maximale Abnahme der Apoptose von 47% auf 38% wurde durch Sorafenib in *IGFBP2*-überexprimierenden Zellen beobachtet (Abbildung 19A).

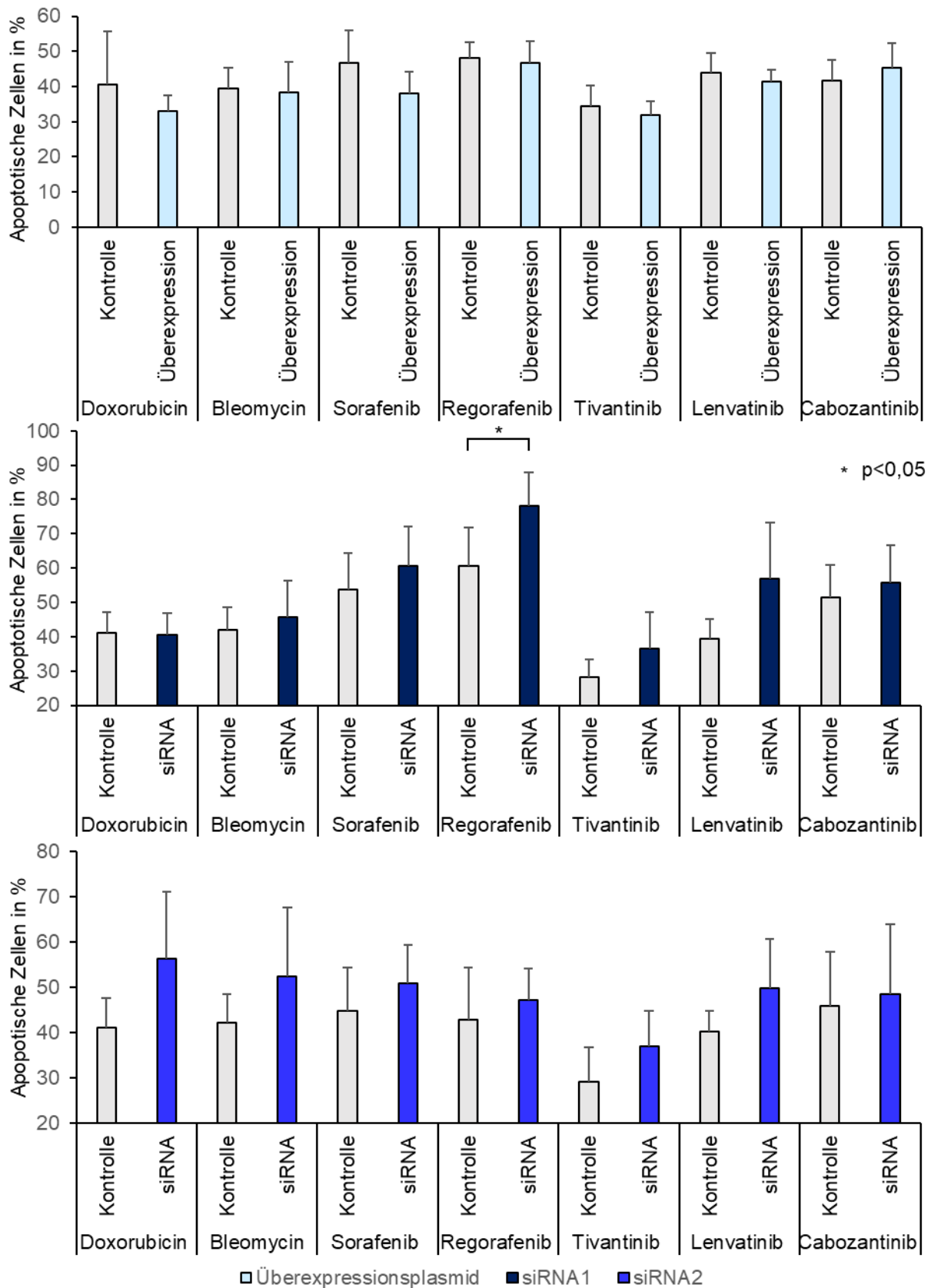
Cabozantinib und Doxorubicin erzielten bei *IGFBP2* Überexpression und Knockdown keine eindeutigen Ergebnisse (Abbildung 19A und 19B).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Wirkung der HCC-Therapeutika **Bleomycin-Sulfat, Sorafenib, Regorafenib, Tivantinib und Lenvatinib** durch IGFBP2 beeinflusst wird. Niedrige IGFBP2-Konzentrationen erhöhten die Effektivität der Chemotherapeutika und Targeted Therapies, hohe IGFBP2-Konzentrationen reduzierte diese - die Parameter Apoptose und IGFBP2-Konzentration verhielten sich also invers (Abbildung 19B).

# Ergebnisse

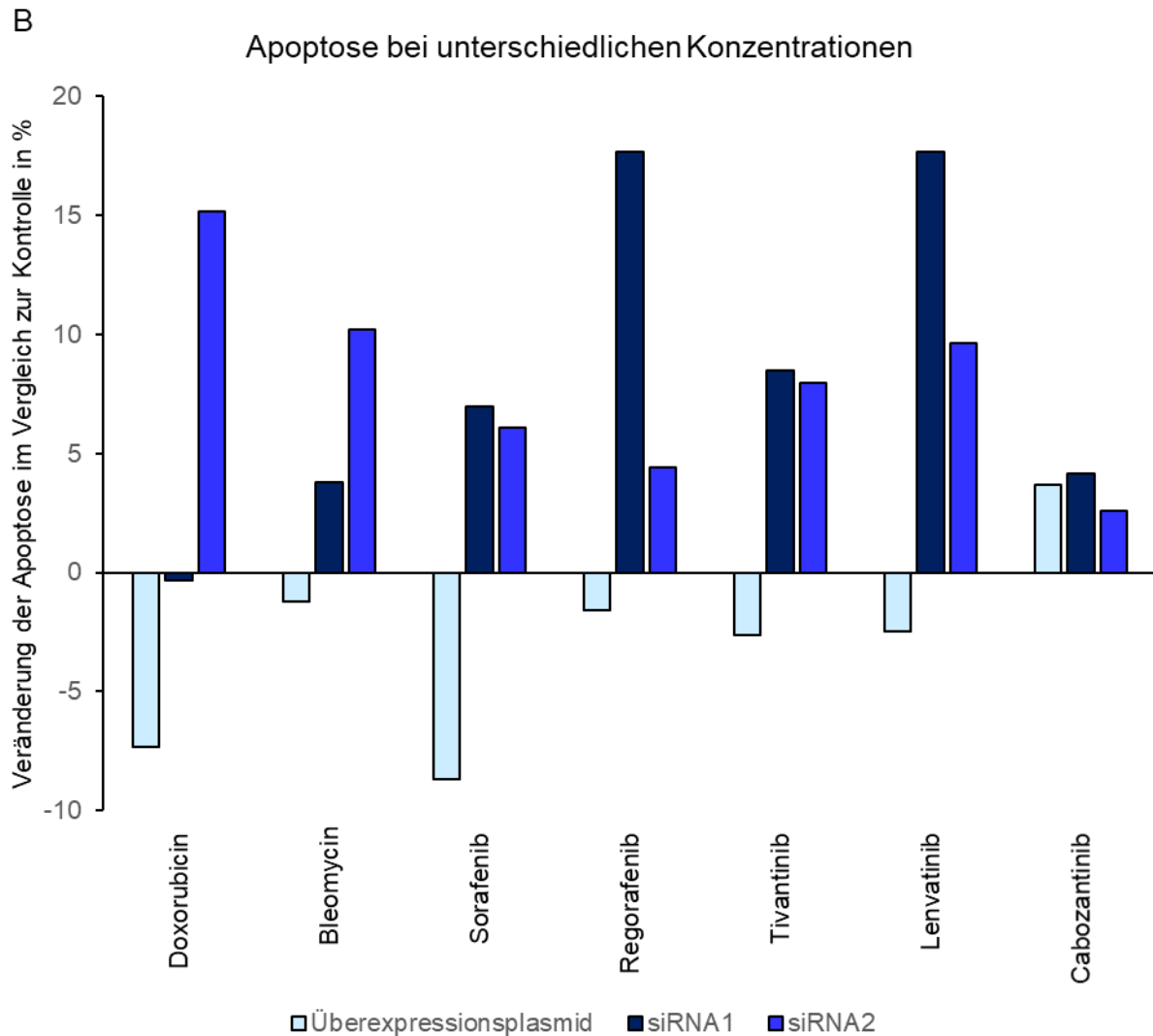
A

## Apoptose durch Chemotherapeutika und Targeted Therapies





## Ergebnisse



### Abbildung 19: IGFBP2 beeinflusst die Effizienz von Chemotherapeutika und Targeted Therapies.

**A:** In Hep3B Zellen wurde die *IGFBP2* Expression mittels *IGFBP2* Expressionsplasmid und *IGFBP2* siRNA modifiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte die Inkubation mit den Chemotherapeutika und Targeted Therapies für weitere 48 h. Dargestellt ist der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Nach Behandlung mit dem Expressionsplasmid führten alle getesteten Chemotherapeutika und Targeted Therapies außer Cabozantinib zu einer Reduktion der Apoptose,  $n \geq 4$ . Nach Behandlung mit siRNA 1 zeigen alle getesteten Chemotherapeutika und Targeted Therapies außer Doxorubicin eine Steigerung der Apoptose. Hierbei erhöhte sich die Apoptose signifikant von 61% auf 78% für Regorafenib,  $n=5$ . Nach Behandlung mit siRNA 2 zeigen alle getesteten Chemotherapeutika und Targeted Therapies eine Steigerung der Apoptose,  $n=3$ .

**B:** Zusammenfassende Darstellung: Gezeigt ist die Differenz der Mittelwerte zwischen Kontrolle und den Chemotherapeutika und Targeted Therapies. Die Steigerung der Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle ist für Bleomycin, Sorafenib, Regorafenib, Tivantinib und Lenvatinib IGFBP2-abhängig. Hohe IGFBP2-Konzentrationen reduzierten die Wirksamkeit der Chemotherapeutika und Targeted Therapies, niedrige Konzentrationen verbesserten diese.

## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung und Validierung des Hep3B-Zellkultur-Modells

Um die Effekte von IGFBP2 präzise analysieren zu können, wurde die Integrität des IGF-Systems in Hep3B Zellen getestet.

Während der Insulin- und IGF-1 Rezeptor auf Hep3B Zellen nachgewiesen werden konnte, wird der IGF-2 Rezeptor nicht präsentiert. Bereits Yamada et al. stellten fest, dass dieser in der Karzinogenese des HCC mutiert und bei fortgeschrittenen HCCs oft nicht mehr exprimiert wird (68,135). Die Zellkultur zeigte außerdem eine ~2,5-fach höhere IGFI- als IGFI-Konzentration. Auch in Serumproben von gesunden Erwachsenen ist die IGFI-Konzentration höher als die IGFI-Konzentration, hier findet sich ein 3,2:1 Verhältnis (136).

Die Hep3B Zellen bilden somit ein gutes Modell-System und eine akkurate Basis *in vitro*, um die Wirkung von IGFBP2 im HCC in den Folgeexperimenten zu erfassen.

Die *IGFBP2* Expression in Hep3B Zellen wurde in unserem Modell mittels Expressionsplasmid und siRNA gezielt reguliert, um den Einfluss von IGFBP2 auf Proliferation, Apoptose-Verhalten und Therapie-Ansprechen zu untersuchen.

Die IGFBP2-Konzentration der Kontrollen (siRNA scr und Kontrollplasmid) betrug 48 h nach Transfektion 26 pg/ml bzw. 22 pg/ml. Diese Ergebnisse legen nahe, dass weder die scr siRNA noch das Kontrollplasmid die zelleigene IGFBP2 Produktion beeinflussen. Das Expressionsplasmid hingegen resultierte in einer 900-fachen Erhöhung der extrazellulären IGFBP2-Konzentration 48 h nach Transfektion.

Während der Knockout eines Gens die vollständige Eliminierung des Genproduktes intendiert, gilt der Knockdown eines Gens als erfolgreich, wenn die Genexpression um >70% gesenkt wird (137). Somit sind alle getesteten Konstrukte als funktionell zu werten. siRNA2 zeigte in der qPCR und in der IGFBP2 Sekretion die wirksamste, andauernde Hemmung von IGFBP2 zwischen 24 h und 96 h. Auf RNA-Ebene stieg *IGFBP2* nach 120 h erneut an, wobei der Trend extrazellulär nicht beobachtet wurde. Dies mag durch die Latenz der Translation von messenger RNA (mRNA) zu Protein bedingt sein, so dass Messungen zu späteren Zeitintervallen im Überstand aufschlussreich gewesen wären (138).

Im Vergleich zu den Resultaten der qPCR und des ELISA, zeigte im Western Blot allein siRNA1 eine anhaltende Herunterregulation von IGFBP2 zwischen 48 h und 120 h. Auch wenn die Nachweisgrenze von Proteinen im Western Blot im Picogrammbereich liegt, ist die Quantifizierung mittels Western Blot in knockdown Zellen mit niedrigeren Konzentrationen möglicherweise nicht ausreichend sensitiv (139,140).

Aufgrund der Ergebnisse aus qPCR, Elisa und Western Blot wurden alle weiteren Experimente jeweils mit den Konstrukten der *IGFBP2* siRNA1, *IGFBP2* siRNA2 und dem *IGFBP2* Expressionsplasmid durchgeführt.

### **4.2 rhIGFBP2 und zellulär überexprimiertes IGFBP2 beeinflussen die Apoptose von Hep3B Zellen nicht**

Wie bereits erwähnt (vgl. 1.2.2), können IGFBPs sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken. IGFBP3, IGFBP5 und IGFBP6 sind hier nochmals beispielhaft zu nennen. Gewebeabhängig erhöhen sie die Migration, führen zu einer schlechteren Prognose oder induzieren Apoptose (89,94,95,97). Daher prüften wir, ob IGFBP2 die Apoptose von Hep3B Zellen beeinflusst.

Apoptose kann durch verschiedene Mechanismen initiiert werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei die p53 Familie. Die p53 Familienmitglieder p53 („Wächter des Genoms“), p63 und p73 agieren als starke Tumorsuppressoren und sind an der Regulation essenzieller Prozesse wie Zellzyklus, Seneszenz und Zelltod beteiligt. Weiterhin können sie durch Aktivierung intrinsischer und extrinsischer Signalwege Apoptose induzieren. Als Transkriptionsfaktoren können sie spezifische Zielgene aktivieren und inaktivieren (129–133).

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals IGFBP2 als ein Zielgen der p53 Familie, insbesondere von p73 identifizieren (111). Dennoch können wir in Hep3B Zellen weder durch intra- noch durch extrazelluläres IGFBP2 apoptotische Effekte hervorrufen. IGFBP2 hat also keinen downstream Effekt auf die Apoptose, auch wenn es ein Zielgen der p53 Familie ist.

### **4.3 rhIGFBP2 beeinflusst die Proliferation, die Zellviabilität und die Migration in Hep3B Zellen**

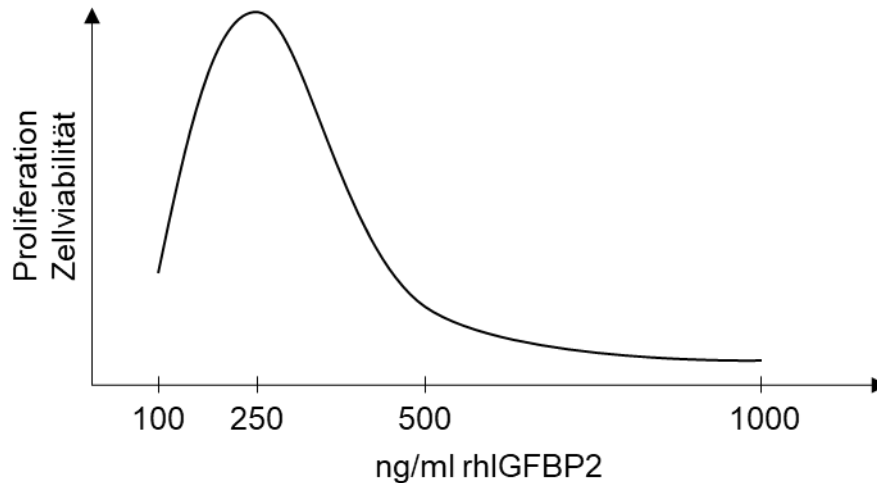
Wichtige Parameter, die die Malignität eines Tumors beeinflussen, sind die Proliferations- und Migrationskapazität der Zellen.

#### Proliferation und Zellviabilität

Während IGFBP2 im benignen Kontext zumeist wachstumshemmend wirkt, fanden sich in malignen transformierten Zellen proliferative Effekte. So zeigen beispielsweise Prostatazellen *in vitro* unter IGFBP2 Stimulation ein vermindertes Wachstum während in der Prostatakrebszelllinie LAPC-4 eine vermehrte Proliferation über Aktivierung des MAP-Signalweges beschrieben wird (141).

Gao et al. veröffentlichten 2020 erste Ergebnisse zu den Effekten von IGFBP2 in HCC-Zelllinien. Bei Beobachtung der Proliferation korrelierte die Überexpression von IGFBP2 mit einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen (126). Diesen Effekt konnten wir ebenfalls nachweisen. Im Gegensatz zu Gao et al. nutzten wir rhIGFBP2, welches extrazellulär appliziert wurde. Hierbei beobachteten wir nicht nur eine Zunahme der Proliferation, sondern auch eine Verbesserung der Zellviabilität. Zudem konnten wir zeigen, dass dieser Effekt dosisabhängig ist. Es wurde bereits postuliert, dass steigende rhIGFBP2-Konzentrationen durch Aktivierung von Integrin $\beta$ 1, FAK und Erk die Proliferation verbessern. Dabei wurden allerdings bisher nur Konzentrationen bis maximal 250 ng/ml untersucht (125). Auch wir beobachteten eine kontinuierliche Steigerung sowohl der Proliferation als auch der Zellviabilität mit steigender rhIGFBP2-Konzentration bis 250 ng/ml. Bei weiterer Steigerung der Konzentration nahmen Proliferation und Zellviabilität ab, die besten Bedingungen für jene wurde in unseren Experimenten mit rhIGFBP2 250 ng/ml erreicht (Abbildung 20). Wir konnten somit nachweisen, dass für IGFBP2 und Proliferation bzw. Zellviabilität kein linearer Zusammenhang besteht, vielmehr scheint es ein IGFBP2-Konzentrationsoptimum zu geben.

## Diskussion



**Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung der dosisabhängigen Wirkung von rhIGFBP2 auf Proliferation und Zellviabilität.**

Die Proliferation und Zellviabilität verbesserten sich unter Zugabe von rhIGFBP2. Ein maximaler Effekt zeigte sich in unseren Experimenten bei rhIGFBP2 250 ng/ml.

Zudem verbesserte sich die Zellviabilität mit zunehmender Versuchsdauer, während die Proliferation abnahm. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen durch die zunehmende Behandlungsdauer mit rhIGFBP2 vitaler werden, auf der anderen Seite aber mit zunehmender Versuchsdauer weniger Platz haben, um weiter zu proliferieren. Ein Indiz hierfür ist die Veränderung der Abnahme des Farbsignals, die von 30% zwischen 48 h und 72 h auf 9% zwischen 72 h und 96 h fällt. Die Zellen teilen sich im Zeitrahmen zwischen 72 h und 96 h demnach bereits langsamer als zwischen 48 h und 72 h.

### Migration

In verschiedenen Tumorentitäten – unter anderem in Glioblastomzelllinien, Ewing Sarkoma Zelllinien, Blasenkrebszelllinien, dem Pankreas- und adenoidzystischen Karzinom – ist die invasive Wirkung von IGFBP2 bereits untersucht. Die Migration wird dabei durch Hochregulation der Matrix Metalloprotease 2 (MMP2), durch Bindung des Integrin  $\alpha 5$  oder  $\beta 1$  und durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges initiiert. (100,101,142–146)

Unsere Ergebnisse zum Einfluss von IGFBP2 auf das Migrationsverhalten bestätigen Resultate anderer Untersuchungen, aber auch hier ergeben sich zusätzliche Erkenntnisse aus unseren Arbeiten. Im HCC konnte zuletzt im Hep3B Zellmodell gezeigt werden, dass die Überexpression von IGFBP2 die Migration steigert. Ursächlich für die erhöhte Invasivität ist die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges mit

resultierender Hochregulation von ZEB1 (126). In unseren Experimenten finden wir unter Inkubation mit rhIGFBP2 eine dosisabhängige Zunahme der Migration.

Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass rhIGFBP2 die Proliferation, die Zellviabilität und die Migration steigert. Hierbei gibt es eine optimale IGFBP2-Konzentration von 250 ng/ml für die maximale Proliferation und maximale Zellviabilität, während die Migration linear mit zunehmender IGFBP2-Konzentration ansteigt. Folglich könnte die Messung der IGFBP2-Serumkonzentration oder der immunhistochemische Nachweis in Leberbiopsien von Patienten mit HCC einen Hinweis auf die Aggressivität des Tumors geben.

Weiterhin bietet sich IGFBP2 nach unseren Erkenntnissen als prognostischer Marker zur Abschätzung der Progress- und Überlebenswahrscheinlichkeit an. Diese sind abhängig von Wachstum und Metastasierung der Tumoren. In Pankreaskarzinomen und Glioblastomen wurde IGFBP2 bereits als prognostischer Marker evaluiert. Dort korreliert eine hohe IGFBP2 Expression in der immunhistochemischen Färbung mit einer verminderten Überlebenszeit (102,142). Daher planen wir die Analyse von Leberbiopsien von Patienten mit HCC im Hinblick auf die IGFBP2 Expression, um den prognostischen Nutzen im HCC weiter zu determinieren.

#### **4.4 rhIGFBP2 beeinflusst den IGF-Signalweg von Hep3B Zellen und führt zu reduzierten Mengen von freiem IGFI und IGFI**

Es wurden bereits mehrere Signalwege dargestellt, durch die IGFBP2 in anderen Tumorentitäten wirkt. Diese sollen im Folgenden zusammengefasst und der eigene Beitrag dargestellt werden:

1. Häufig interagiert die RGD Domäne von IGFBP2 mit Integrin  $\alpha 5\beta 1$  (100,145).
  - Durch Aktivierung von FAK wird GSK3 $\beta$  phosphoryliert und inaktiviert, was zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt. Dieser Mechanismus wird als Faktor für die kürzere Überlebenszeit bei Patienten/Patientinnen mit hohen IGFBP2 Spiegeln diskutiert (102).
  - Durch Aktivierung des Erk-Signalweges wird die Zelladhäsion reduziert und die Proliferation gesteigert (101).
2. Durch Aktivierung von Akt, des NF $\kappa$ B-Signalweges und von ZEB1 wird die Zellmigration erhöht (142,144).

## Diskussion

3. Die Erhöhung der MMP2 führt durch Überexpression von IGFBP2 in einer Blasenkrebszelllinie zu gesteigertem invasivem Wachstum und Metastasierung im Mausmodell (143).
4. Neben der extrazellulären Lokalisation konnte IGFBP2 auch im Nukleus lokalisiert und eine Transaktivierungsaktivität aufgezeigt werden (86). Hierbei erhöhte IGFBP2 die *VEGF* Expression. Dies resultierte in vermehrter Angiogenese (109). Somit erhöhten sich die prometastatischen Eigenschaften (147).
5. In Tumoren entsteht durch das schnelle Wachstum ein Sauerstoffdefizit, welchem sich die Zellen durch verschiedene Mechanismen anpassen. So wird beispielsweise der hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) induziert. IGFBP2 ist ein Zielgen von HIF-1 $\alpha$ , so dass eine vermehrte Expression von HIF-1 $\alpha$  zu einer Hochregulation von IGFBP2 führt (147).
6. Hochregulation von p53 durch IGFBP2 fördert die Apoptose (148). Dass in einigen Zelllinien wachstumshemmende Effekte durch IGFBP2 beschrieben werden, lässt sich nach Russo et al. möglicherweise durch fehlende Komponenten der IGF Familie in diesen Zelllinien erklären (147).

Wir analysierten die Schlüsselenzyme Akt und Erk, die an Proliferation und Migration von Zellen beteiligt sind. Es wird postuliert, dass in HCC Zelllinien steigende rhIGFBP2-Konzentrationen durch Aktivierung von Integrin  $\beta$ 1, FAK und Erk die Proliferation verbessern, wobei in bisherigen Studien Konzentrationen bis maximal 250 ng/ml untersucht wurden (125). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse eine verminderte Aktivierung von Erk im Vergleich zur Kontrolle, obwohl auch wir eine Verbesserung der Proliferation nachweisen konnten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Bindung von rhIGFBP2 an IGF. Dadurch kann weniger IGF den IGF-1 Rezeptor aktivieren, der ebenfalls eine Phosphorylierung von Erk induzieren kann. Betrachten wir den IGFBP2-abhängigen Verlauf der Aktivierung von Erk, dem Induktor proliferativer Effekte, so ähnelt er dem der IGFBP2-abhängigen Proliferation der Hep3B Zellen (vgl. Abbildung 20, Abbildung 21). Sowohl die Ergebnisse zur Proliferation als auch zur Aktivierung von Erk zeigten unter rhIGFBP2 250 ng/ml maximale Werte.

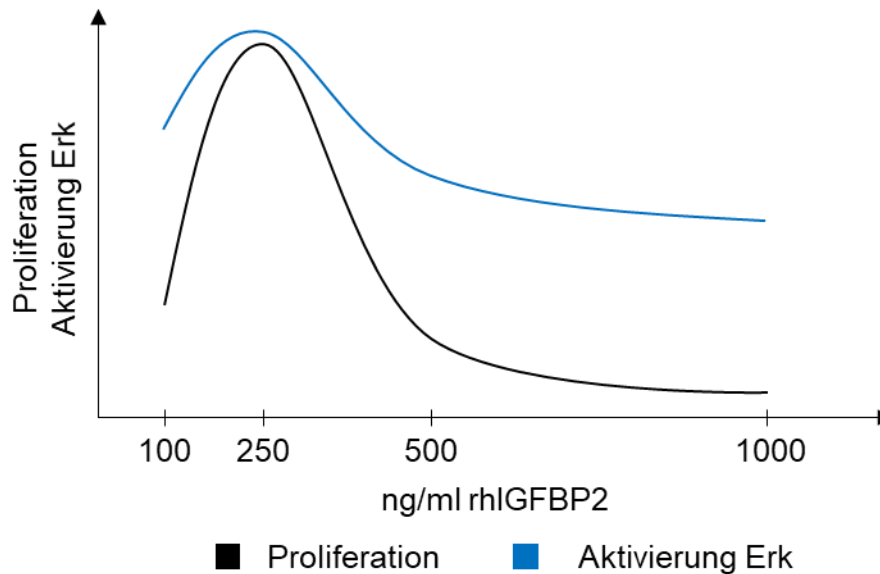


Abbildung 21: rhIGFBP2 wirkt dosisabhängig auf Proliferation und Aktivierung von Erk.

Die Aktivierung von Akt hingegen zeigte mit zunehmender rhIGFBP2-Konzentration einen weiteren Anstieg, wie wir ihn bereits für die Migration beobachten.

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass IGFBP2 in seiner wachstumshemmenden Funktion IGF1 und IGFII bindet. Die beobachteten induktiven Effekte auf Proliferation und Migration sind daher nicht auf die Wirkung von IGF1 oder IGFII zurückzuführen. Demnach reguliert IGFBP2 in unseren Experimenten sowohl wachstumshemmende als auch proliferative Funktionen.

Daher gilt es nun herauszufinden, ob die wachstumshemmende Wirkung von IGFBP2 durch Bindung von IGF genutzt werden und gleichzeitig die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und proliferativen Signalwegen verhindert werden kann. In diesem Fall könnte IGFBP2 zukünftig als neues „Target“ in der Therapie des HCC diskutiert werden.

#### **4.5 IGFBP2 beeinflusst die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Hep3B Zellen**

In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise, dass IGFBP2 Einfluss auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies hat. So zeigt Docetaxel in IGFBP2-knockdown Zellen von Prostatakarzinomen eine höhere Wirksamkeit (149), bei akut myeloischer Leukämie ist eine hohe *IGFBP2*-Konzentration mit einer Chemotherapieresistenz assoziiert (150). In



## Diskussion

Ovarialkarzinomen wird IGFBP2 mit einer schlechteren Wirkung von Platin-basierten Therapien verbunden und als Prädiktor für die Effektivität von Chemotherapeutika postuliert (151,152).

Außerdem wurden im HCC verschiedene Mechanismen beschrieben, die zu einer Resistenz gegenüber Targeted Therapies, insbesondere Sorafenib führen. Hierzu zählen unter anderem die Hochregulation von HIF1- $\alpha$  und NF $\kappa$ B, die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors, die MAPK14-abhängige Aktivierung von MEK (mitogen-aktivierte Proteinkinase-kinase)-Erk und die Aktivierung von PI3K/Akt (153–156). In dieser Arbeit wird IGFBP2 als neuer Faktor identifiziert, der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Targeted Therapies induzieren kann. Sorafenib und Lenvatinib bzw. Regorafenib waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung die first- bzw. second-line Therapeutika in der Therapie des HCC, weshalb die aktuellen first-line Therapeutika Atezolizumab und Bevacizumab in unseren Experimenten nicht berücksichtigt werden konnten (24,37).

Erstmals konnten wir den Einfluss von IGFBP2 auf die Wirkung von Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib, Bleomycin-Sulfat und Tivantinib in HCC Zelllinien darstellen: Niedrige IGFBP2-Konzentrationen erhöhen die Effektivität der Chemotherapeutika und Targeted Therapies, hohe IGFBP2-Konzentrationen reduzieren diese signifikant (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Die Parameter IGFBP2 und die Wirkung der Chemotherapeutika und Targeted Therapies verhalten sich invers.

Zukünftig gilt es, die Signalwege, durch die IGFBP2 diese Wirkung erzielt, weiter zu charakterisieren. Durch Aktivierung von Erk induziert IGFBP2 beispielsweise die Resistenz gegen Temozolomid in Glioblastomzellen (101). In unseren Experimenten führten hohe IGFBP2-Konzentrationen hingegen zu einer geringeren Aktivierung von Erk. Dies ist ein Hinweis darauf, dass IGFBP2 in HCC Zellen möglicherweise über andere Signalwege agiert. Exemplarisch hierfür ist der FAK-Signalweg. Die Wirksamkeit von Dasatinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor wie Sorafenib, wurde bereits in Abhängigkeit der IGFBP2-Konzentration in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen untersucht. Hohe IGFBP2-Konzentrationen resultieren hier in einer Resistenz gegenüber Dasatinib durch Aktivierung des FAK-Signalweges, der unter anderem durch Dasatinib inhibiert wird (157,158).

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass IGFBP2 im HCC eine bedeutende Rolle im Therapie-Ansprechen einnimmt. Während die Wirkung von Sorafenib, Lenvatinib und Regorafenib bei hohen IGFBP2-Konzentration reduziert wird, bleibt sie für Cabozantinib, einem weiteren second-line Therapeutikum, unbeeinflusst. Dies liegt womöglich an der Hemmung unterschiedlicher Signalwege durch die Targeted Therapies. Sorafenib, Regorafenib und Lenvatinib sind Tyrosin- oder Multikinaseinhibitoren, die überwiegend hemmend auf Komponenten des RAF und VEGF-Signalweges wirken, während Cabozantinib hauptsächlich die Tyrosinkinase cMET inhibiert (34,36,39,42). Wie bereits diskutiert, kann IGFBP2 den RAF-Signalweg und folglich die Wirkung von Sorafenib, Lenvatinib und Regorafenib antagonisieren. Die Messung der IGFBP2-Serumkonzentration kann demnach die Therapieentscheidung zugunsten eines Chemotherapeutikums oder einer Targeted Therapie beeinflussen. Sorafenib, Lenvatinib und Regorafenib sind bei niedrigen IGFBP2-Konzentrationen wirksamer als bei hohen Konzentrationen, für Cabozantinib zeigt sich diese Einschränkung nicht. Hierbei müssen noch genaue cut-off Werte für IGFBP2 determiniert werden.

Zukünftig kann dies eine individualisierte, patientenorientierte Therapie für Patienten/Patientinnen mit HCC ermöglichen.

### 4.6 Resümee

Zuletzt soll auf die in der Zielsetzung genannten Fragestellungen und die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser Promotionsarbeit eingegangen werden.

1. IGFBP2 beeinflusste die Apoptose der Hep3B Zellen nicht.
2. Die Proliferation und die Zellviabilität verändern sich dosisabhängig mit einem Wirkmaximum bei rhIGFBP2 250 ng/ml. Für die Aktivierung von Erk findet sich ein ähnlicher, von der IGFBP2-Konzentration abhängiger Verlauf.

Die Migration erhöht sich mit zunehmender rhIGFBP2-Konzentration. Die Aktivierung von Akt zeigt mit zunehmender rhIGFBP2-Konzentration einen deutlichen Anstieg.

3. IGFBP2 bindet freies IGF1 und IGFII und reduziert die Mengen an freiem IGF.
4. IGFBP2 reduziert die Wirkung von Sorafenib, Lenvatinib und Regorafenib.

Auf der Grundlage dieser Daten ergeben sich neue Erkenntnisse und Möglichkeiten der Therapie des HCC:

## Diskussion

- Durch seine wachstumsfördernden und invasiven Eigenschaften bietet sich IGFBP2 als prognostischer Marker zur Abschätzung der Progress- und Überlebenswahrscheinlichkeit an.
- Die Messung der IGFBP2-Serumkonzentration kann die Therapieentscheidung zugunsten eines Chemotherapeutikums oder einer Targeted Therapie beeinflussen.
- Die Nutzung der wachstumshemmenden, IGF-bindenden Wirkung von IGFBP2 und die Antagonisierung der proliferativen und invasiven Effekte des Proteins bieten sich als neue Targets in der Therapie des HCC an.

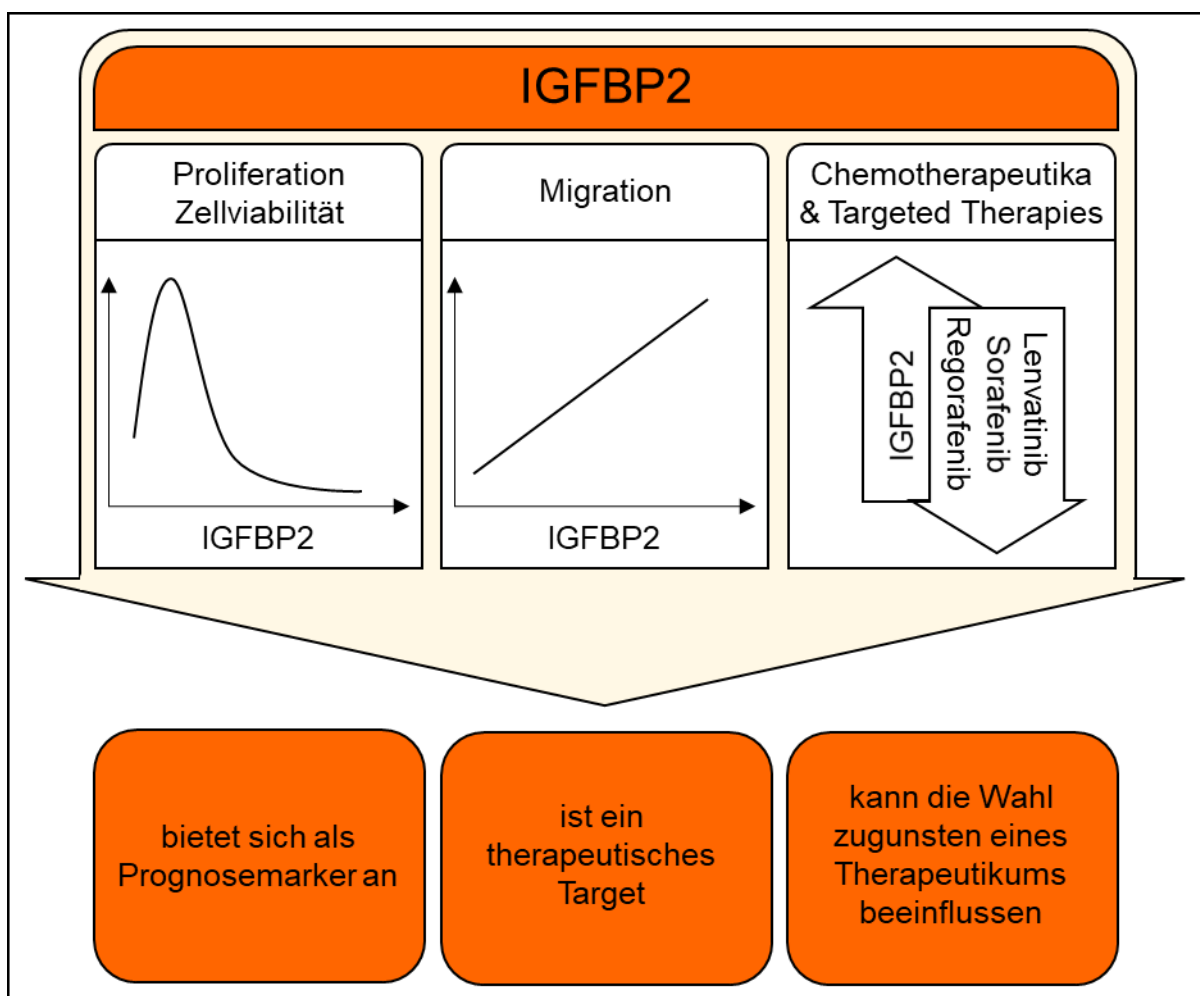


Abbildung 23: Effekte von IGFBP2 auf Hep3B Zellen und daraus resultierende Folgen für die weitere Diagnostik und Therapie des HCC.

## 5. Zusammenfassung

Durch die weltweite Zunahme der Inzidenz von Krebserkrankungen ist deren Erforschung so wichtig wie nie zuvor. In Deutschland lassen sich ca. ¼ der Todesfälle auf maligne Erkrankungen zurückführen; das HCC zählt zu den Krebsarten mit hoher Mortalität. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des zu der IGF Familie gehörenden Proteins IGFBP2 im HCC untersucht. IGFBP2 kann die Signaltransduktion und somit den Metabolismus von Zellen beeinflussen, wobei eine Korrelation zwischen IGFBP2-Konzentration und Malignitätsgrad, geringerer Überlebenszeit, Proliferation und Migration hergestellt wurde. Diese Erkenntnisse machen IGFBP2 zu einem bedeutsamen Ziel in der Genese und Therapie des HCC. Diese Dissertation untersucht den Einfluss von IGFBP2 auf Proliferation, Invasivität, Migration, Apoptose-Verhalten und Therapie-Ansprechen des HCC.

Nach Etablierung eines *in vitro* Modells mit Oberflächenpräsentation von IGF-Rezeptoren und Produktion der Liganden IGF1 und IGFII, konnten die Effekte von IGFBP2 in Hepatomzellen untersucht werden. Während Krebszellen häufig die Fähigkeit zur Apoptose verlieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass IGFBP2 nicht in zelltodregulierende Prozesse involviert ist. Weitere Charakteristika von Krebszellen, nämlich Viabilität, Proliferations- und Migrationsfähigkeit, wiederum beeinflusste IGFBP2 zeit- und dosisabhängig. Für die Zellproliferation und -viabilität determinierten wir erstmals ein IGFBP2-Konzentrationsoptimum, während die Migration linear mit zunehmender IGFBP2-Konzentration ansteigt. Um die beobachteten Effekte auf Zellebene weiterführend zu untersuchen, analysierten wir Komponenten des proliferativen IGF-Signalweges (Akt, Erk, mTOR). Die Aktivierung von Erk verhielt sich analog zu Proliferation und Zellviabilität. Die Aktivierung von Akt zeigte einen der Migration ähnlichen Trend. Von unmittelbarer klinischer Relevanz sind die Ergebnisse dieser Arbeit, die sich mit dem Einfluss von IGFBP2 auf das Therapie-Ansprechen des HCC beschäftigen. Erstmals gelang der Nachweis einer IGFBP2-abhängigen Wirksamkeit von Therapeutika beim HCC: niedrige IGFBP2-Konzentrationen erhöhen deren Effektivität, während hohe IGFBP2-Konzentrationen ihre therapeutische Wirksamkeit signifikant verringern. Insbesondere Sorafenib, Lenvatinib und Regorafenib waren bei niedrigen IGFBP2-Konzentrationen deutlich wirksamer als bei hohen Konzentrationen.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend bietet sich die Antagonisierung der proliferativen und invasiven Effekte des Proteins als neues Target in der Therapie des HCC an. Weiterhin kann die Messung der IGFBP2-Serumkonzentration als prognostischer Marker zur Abschätzung der Progress- und Überlebenswahrscheinlichkeit genutzt werden und die Therapieentscheidung zugunsten eines spezifischen Chemotherapeutikums oder einer Targeted Therapie unterstützen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AFP	Alpha-Fetoprotein
AKT	Proteinkinase B
BCA	Bicinchoninic acid
BCLC	Barcelona Clinic for Liver Cancer
BSA	Bovine Serum Albumin
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCE-MRT	dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	European Association for the Study of the Liver
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ELK1	ETS like-1-Protein
Erk	extracellular-signal regulated kinases
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	fokale Adhäsionskinase
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IGF-Rezeptor	Insulin-like growth factor Rezeptor
KIT	KIT-Tyrosinkinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-aktivierte Proteinkinase-kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MET	MET-Tyrosinkinase
min	Minute(n)

## Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
PAPP-A	pregnancy associated plasma protein A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFβ	platelet derived growth factor β
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	quantitative real-time PCR
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RET	RET-Tyrosinkinase
RFA	Radiofrequenz-Ablation
rhIGFBP2	rekombinantes Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription bzw. Real Time
s	Sekunde(n)
siRNA	small interfering RNA
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
°C	Grad Celsius

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über den Prozess der Hepatokarzinogenese. ....	7
Abbildung 2: Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf HCC gemäß der S3 Leitlinie für Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms (modifiziert nach (21,23))	9
Abbildung 3: Therapie des HCC gemäß den Leitlinien der European Association for the Study of Liver Diseases (EASL) (modifiziert nach (24)). ....	12
Abbildung 4: Darstellung des IGF-Signalweges .....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Genstruktur der IGFBPs. ....	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IGFBP2. ....	18
Abbildung 7: Hep3B Zellen produzieren und sezernieren IGF1 und IGFII. ....	37
Abbildung 8: Hep3B Zellen präsentieren den Insulin- und den IGF-1 Rezeptor, nicht den IGF-2 Rezeptor. ....	38
Abbildung 9: Induktion von IGFBP2 in Hep3B Zellen mittels Plasmidtransfektion. ...	39
Abbildung 10: <i>IGFBP2</i> knockdown mittels siRNA führt zu einer verminderten Expression von <i>IGFBP2</i> und reduzierter IGFBP2-Sekretion. ....	41
Abbildung 11: rhIGFBP2 und zellulär überexprimiertes IGFBP2 haben keinen Einfluss auf die Apoptoseraten von Hep3B Zellen. ....	43
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Proliferations-färbung von Hep3B Zellen im FITC Kanal. ....	44
Abbildung 13: rhIGFBP2 führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Zunahme der Proliferation. ....	45
Abbildung 14: rhIGFBP2 führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Zunahme der Zellviabilität. ....	46
Abbildung 15: rhIGFBP2 führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Migration. ....	47
Abbildung 16: Die Phosphorylierung der Metaboliten Akt, Erk und mTOR zeigt keine signifikanten Unterschiede durch Zugabe von rhIGFBP2. ....	49
Abbildung 17: Die Konzentration von IGF1 und IGFII wird durch Zugabe von rhIGFBP2 signifikant reduziert. ....	50
Abbildung 18: Versuchsmodell zur Bestimmung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Targeted Therapies in Abhängigkeit von der IGFBP2-Konzentration. ....	51
Abbildung 19: IGFBP2 beeinflusst die Effizienz von Chemotherapeutika und Targeted Therapies. ....	54



Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung der dosisabhängigen Wirkung von rhIGFBP2 auf Proliferation und Zellviabilität. ....	58
Abbildung 21: rhIGFBP2 wirkt dosisabhängig auf Proliferation und Aktivierung von Erk. ....	61
Abbildung 22: Die Parameter IGFBP2 und die Wirkung der Chemotherapeutika und Targeted Therapies verhalten sich invers.....	62
Abbildung 23: Effekte von IGFBP2 auf Hep3B Zellen und daraus resultierende Folgen für die weitere Diagnostik und Therapie des HCC.....	64

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Laborbedarf .....	21
Tabelle 2: Software .....	23
Tabelle 3: Zellkulturreagenzien und Chemikalien .....	23
Tabelle 4: Lösungen .....	24
Tabelle 5: Kits .....	25
Tabelle 6: IGFBP2 Expressionsplasmid und Kontrollplasmid.....	26
Tabelle 7: IGFBP2 siRNA Konstrukte .....	26
Tabelle 8: Primärantikörper .....	26
Tabelle 9: Sekundärantikörper .....	26
Tabelle 10: qPCR Primer.....	27
Tabelle 11: FACS Antikörper.....	27
Tabelle 12: Chemotherapeutika und Targeted Therapies .....	27
Tabelle 13: Petrischalen und Zellkulturplatten wurden mit einer bestimmten Zellzahl kultiviert .....	28
Tabelle 14: Herstellung von Lauf- und Sammelgelen .....	32
Tabelle 15: PCR Zyklus zur Bestimmung von <i>IGFBP2</i> und <i>GAPDH</i> .....	34

## 9. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [08.12.2022]. [Internet].
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49. doi:10.3322/caac.21660
3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557–76. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
4. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, Bray F. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;159(1):335-349.e15. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.068
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529–38. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013
6. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog*. 2017;161. doi:10.4103/jcar.JCar\_9\_16
7. Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Curr Genomics*. 2011;12(2):130–7. doi:10.2174/138920211795564359
8. Urabe Y, Nouse K, Higashi T, Nakatsukasa H, Hino N, Ashida K, Kinugasa N, Yoshida K, Uematsu S, Tsuji T. Telomere length in human liver diseases. *Liver*. 1996;16(5):293–7. doi:10.1111/j.1600-0676.1996.tb00748.x
9. Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;93(1):56–62.

10. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(4):339–46. doi:10.1038/ng0802-339
11. Villar S, Ortiz-Cuaran S, Abedi-Ardekani B, Gouas D, Nogueira da Costa A, Plymoth A, Khuhaprema T, Kalalak A, Sangrajrang S, Friesen MD, Groopman JD, Hainaut P, Bouchard M. Aflatoxin-Induced TP53 R249S Mutation in HepatoCellular Carcinoma in Thailand: Association with Tumors Developing in the Absence of Liver Cirrhosis. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e37707. doi:10.1371/journal.pone.0037707
12. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature.* 1991;350(6317):429–31. doi:10.1038/350429a0
13. Coleman WB. Mechanisms of Human Hepatocarcinogenesis. *curr mol med.* 2003;3(6):573–88. doi:10.2174/1566524033479546
14. Choi J-Y, Lee J-M, Sirlin CB. CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: Part I. Development, growth, and spread: key pathologic and imaging aspects. *Radiology.* 2014;272(3):635–54. doi:10.1148/radiol.14132361
15. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology.* 2009;49(2):658–64. doi:10.1002/hep.22709
16. Sarkar A. *Human Cancer Encyclopaedia of Cancer-IV.* New Delhi: Discovery Publishing House PVT. LTD.; 2009.
17. Momin BR, Pinheiro PS, Carreira H, Li C, Weir HK. Liver cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer.* 2017;123 Suppl 245059–78. doi:10.1002/cncr.30820
18. Attwa MH, El-Etreby SA. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(12):1632–51. doi:10.4254/wjh.v7.i12.1632
19. Qin L-X, Tang Z-Y. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: Diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol.* 2003;9(3):385–91. doi:10.3748/wjg.v9.i3.385

## Literaturverzeichnis

20. Luo J-C, Hwang S-J, Wu J-C, Lai C-R, Li C-P, Chang F-Y, Chiang J-H, Lui W-Y, Chu C-W, Lee S-D. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma patients with paraneoplastic syndromes. *Hepatogastroenterology*. 2002;49(47):1315–9.
21. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020–2. doi:10.1002/hep.24199
22. Soldera J, Balbinot SS, Balbinot RA, Cavalcanti AG. Diagnostic and Therapeutic Approaches to Hepatocellular Carcinoma: Understanding the Barcelona Clínic Liver Cancer Protocol. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2016;967–71. doi:10.4137/CGast.S30190
23. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 4.01, 2023, AWMF-Registernummer: 032-053OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>; Zugriff am [20.08.2023] [Internet].
24. European Association for the Study of Liver Diseases. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;69(1):182–236. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019
25. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329–38. doi:10.1055/s-2007-1007122
26. Forner A, Reig ME, Lope CR de, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: The BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):61–74. doi:10.1055/s-0030-1247133
27. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334(11):693–9. doi:10.1056/NEJM199603143341104
28. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu D-Z, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng A-L. Atezolizumab plus

- Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1894–905. doi:10.1056/NEJMoa1915745
29. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(2):328–35. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.132
30. Finn RS, Bentley G, Britten CD, Amado R, Busuttil RW. Targeting vascular endothelial growth factor with the monoclonal antibody bevacizumab inhibits human hepatocellular carcinoma cells growing in an orthotopic mouse model. *Liver Int*. 2009;29(2):284–90. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01762.x
31. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HEK, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7. doi:10.1038/nature14011
32. Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, Chan SL, Kelley RK, Furuse J, Sukeepaisarnjaroen W, Kang Y-K, van Dao T, Toni EN de, Rimassa L, Breder V, Vasilyev A, Heurgué A, Tam VC, Mody K, Thungappa SC, Ostapenko Y, Yau T, Azevedo S, Varela M, Cheng A-L, Qin S, Galle PR, Ali S, Marcovitz M, Makowsky M, He P, Kurland JF, Negro A, Sangro B. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evidence*. 2022;1(8). doi:10.1056/EVIDoa2100070
33. Rimassa L, Finn RS, Sangro B. Combination immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2023. doi:10.1016/j.jhep.2023.03.003
34. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(10):835–44. doi:10.1038/nrd2130
35. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, Oliveira AC de, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857

36. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park J-W, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng A-L. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*. 2018;391(10126):1163–73. doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1
37. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 3.0, 2022, AWMF-Registernummer: 032/053OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>; Zugriff am [08.12.2022] [Internet].
38. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki J-P, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng A-L, Llovet JM, Finn RS, LeBerre M-A, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;389(10064):56–66. doi:10.1016/S0140-6736(16)32453-9
39. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, Cicin I, Merle P, Chen Y, Park J-W, Blanc J-F, Bolondi L, Klumpen H-J, Chan SL, Zagonel V, Pressiani T, Ryu M-H, Venook AP, Hessel C, Borgman-Hagey AE, Schwab G, Kelley RK. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(1):54–63. doi:10.1056/NEJMoa1717002
40. Zhu AX, Kang Y-K, Yen C-J, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, Assenat E, Brandi G, Pracht M, Lim HY, Rau K-M, Motomura K, Ohno I, Merle P, Daniele B, Shin DB, Gerken G, Borg C, Hiriart J-B, Okusaka T, Morimoto M, Hsu Y, Abada PB, Kudo M. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased  $\alpha$ -fetoprotein concentrations (REACH-2): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(2):282–96. doi:10.1016/S1470-2045(18)30937-9
41. Kelley RK, Verslype C, Cohn AL, Yang T-S, Su W-C, Burris H, Braitheh F, Vogelzang N, Spira A, Foster P, Lee Y, van Cutsem E. Cabozantinib in

- hepatocellular carcinoma: Results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. *Ann Oncol.* 2017;28(3):528–34.  
doi:10.1093/annonc/mdw651
42. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch K-H, Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer.* 2011;129(1):245–55.  
doi:10.1002/ijc.25864
43. Kumar M, Panda D. Role of supportive care for terminal stage hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol.* 2014;4(Suppl 3):S130-9.  
doi:10.1016/j.jceh.2014.03.049
44. Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res.* 2003;4(4):205–12. doi:10.1155/EDR.2003.205
45. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000;21(3):215–44. doi:10.1210/edrv.21.3.0399
46. Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature.* 1984;310(5980):784–6. doi:10.1038/310784a0
47. Höppener JW, Pagter-Holthuizen P de, van Geurts Kessel AH, Jansen M, Kittur SD, Antonarakis SE, Lips CJ, Sussenbach JS. The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum Genet.* 1985;69(2):157–60.
48. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978;253(8):2769–76.
49. Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature.* 1984;310(5980):781–4. doi:10.1038/310781a0
50. Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 1978;89(2):283–6. doi:10.1016/0014-5793(78)80237-3



51. Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1321–30. doi:10.1172/JCI110379
52. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990;190(3):445–62. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15595.x
53. LeRoith D, Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003;195(2):127–37.
54. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem.* 1988;263(23):11486–92.
55. Rechler MM, Nissley SP. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:425–42. doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.002233
56. Czech MP. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell.* 1989;59(2):235–8. doi:10.1016/0092-8674(89)90281-x
57. Matthew M . Rechler, Masato Kasuga, Norio Sasaki, Monique A. PROPERTIES OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR SUBTYPES. In: *Insulin-Like Growth Factors. Somatomedins.* p. 459–90.
58. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: Comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986;5(10):2503–12.
59. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995;16(2):143–63. doi:10.1210/edrv-16-2-143
60. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res.* 2002;12(4):193–7.
61. Denduluri SK, Idowu O, Wang Z, Liao Z, Yan Z, Mohammed MK, Ye J, Wei Q, Wang J, Zhao L, Luu HH. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis.* 2015;2(1):13–25. doi:10.1016/j.gendis.2014.10.004

62. Zha J, Lackner MR. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16(9):2512–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2232
63. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85–96. doi:10.1038/nrm1837
64. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1472–89. doi:10.1093/jnci/92.18.1472
65. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8318–23. doi:10.1073/pnas.93.16.8318
66. Brown J, Jones EY, Forbes BE. Keeping IGF-II under control: Lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(12):612–9. doi:10.1016/j.tibs.2009.07.003
67. Braulke T. Type-2 IGF receptor: A multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res.* 1999;31(2-3):242–6. doi:10.1055/s-2007-978725
68. Yamada T, Souza AT de, Finkelstein S, Jirtle RL. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(19):10351–5. doi:10.1073/pnas.94.19.10351
69. Jehle PM, Schulten K, Schulz W, Jehle DR, Stracke S, Manfras B, Boehm BO, Baylink DJ, Mohan S. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein (IGFBP)-1 to -6 and their relationship to bone metabolism in osteoporosis patients. *Eur J Intern Med.* 2003;14(1):32–8. doi:10.1016/s0953-6205(02)00183-8
70. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16(1):3–34. doi:10.1210/edrv-16-1-3
71. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocr Rev.* 1997;18(6):801–31. doi:10.1210/edrv.18.6.0321

## Literaturverzeichnis

72. Rechler MM. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm.* 1993;471–114. doi:10.1016/s0083-6729(08)60444-6
73. Daza DO, Sundström G, Bergqvist CA, Duan C, Larhammar D. Evolution of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family. *Endocrinology.* 2011;152(6):2278–89. doi:10.1210/en.2011-0047
74. LeRoith D, Holly JMP, Forbes BE. Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors. *Mol Metab.* 2021;52101245. doi:10.1016/j.molmet.2021.101245
75. Carrick FE, Forbes BE, Wallace JC. BIAcore analysis of bovine insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27120–8. doi:10.1074/jbc.M101317200
76. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20(6):761–87. doi:10.1210/edrv.20.6.0382
77. Bach LA, Headey SJ, Norton RS. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(5):228–34. doi:10.1016/j.tem.2005.05.005
78. Mitsui Y, Mochizuki S, Kodama T, Shimoda M, Ohtsuka T, Shiomi T, Chijiwa M, Ikeda T, Kitajima M, Okada Y. ADAM28 Is Overexpressed in Human Breast Carcinomas: Implications for Carcinoma Cell Proliferation through Cleavage of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3. *Cancer Res.* 2006;66(20):9913–20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0377
79. Nakamura M, Miyamoto S'i, Maeda H, Ishii G, Hasebe T, Chiba T, Asaka M, Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(3):1011–6. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.010
80. Boldt HB, Conover CA. Overexpression of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in Ovarian Cancer Cells Promotes Tumor Growth in Vivo. *Endocrinology.* 2011;152(4):1470–8. doi:10.1210/en.2010-1095
81. Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5

- beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10553–7. doi:10.1073/pnas.90.22.10553
82. Andress DL. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor. *Am J Physiol*. 1998;274(4):E744-50. doi:10.1152/ajpendo.1998.274.4.E744
83. Oh Y, Müller HL, Pham H, Rosenfeld RG. Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1993;268(35):26045–8.
84. Jaques G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K. Nuclear Localization of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 in a Lung Cancer Cell Line. *Endocrinology*. 1997;138(4):1767–70. doi:10.1210/endo.138.4.5177
85. Xu Q, Li S, Zhao Y, Maures TJ, Yin P, Duan C. Evidence That IGF Binding Protein-5 Functions as a Ligand-Independent Transcriptional Regulator in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 2004;94(5):353. doi:10.1161/01.RES.0000124761.62846.DF
86. Zhao Y, Yin P, Bach LA, Duan C. Several Acidic Amino Acids in the N-domain of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 Are Important for Its Transactivation Activity. *J Biol Chem*. 2006;281(20):14184–91. doi:10.1074/jbc.M506941200
87. Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: Mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):329–41. doi:10.1038/nrc3720
88. Dai B, Ruan B, Wu J, Wang J, Shang R, Sun W, Li X, Dou K, Wang D, Li Y. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits cancer cell invasion and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5645–54.
89. Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33607–13. doi:10.1074/jbc.M002547200
90. Fanayan S, Firth SM, Baxter RC. Signaling through the Smad pathway by insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. Relationship to

- transforming growth factor-beta 1 signaling. *J Biol Chem.* 2002;277(9):7255–61. doi:10.1074/jbc.M108038200
91. Li W, Sun D, Lv Z, Wei Y, Zheng L, Zeng T, Zhao J. Insulin-like growth factor binding protein-4 inhibits cell growth, migration and invasion, and downregulates COX-2 expression in A549 lung cancer cells. *Cell Biol Int.* 2017;41(4):384–91. doi:10.1002/cbin.10732
92. Mosig RA, Lobl M, Senturk E, Shah H, Cohen S, Chudin E, Fruscio R, Marchini S, D'Incalci M, Sachidanandam R, Dottino P, Martignetti JA. IGFBP-4 tumor and serum levels are increased across all stages of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2012;5(1):3. doi:10.1186/1757-2215-5-3
93. Bartling B, Koch A, Simm A, Scheubel R, Silber R-E, Santos AN. Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -4 enhance the migration of human CD34-/CD133+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Int J Mol Med.* 2010;25(1):89–96.
94. Fu P, Thompson JA, Bach LA. Promotion of cancer cell migration: An insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22298–306. doi:10.1074/jbc.M703066200
95. Sueoka N, Lee HY, Wiehle S, Cristiano RJ, Fang B, Ji L, Roth JA, Hong WK, Cohen P, Kurie JM. Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene.* 2000;19(38):4432–6. doi:10.1038/sj.onc.1203813
96. Butt AJ, Dickson KA, McDougall F, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29676–85. doi:10.1074/jbc.M301965200
97. Li X, Cao X, Li X, Zhang W, Feng Y. Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor for breast cancer. *Cancer Sci.* 2007;98(10):1592–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00565.x
98. Oh Y, Müller HL, Lee DY, Fielder PJ, Rosenfeld RG. Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs. *Endocrinology.* 1993;132(3):1337–44. doi:10.1210/endo.132.3.7679979

99. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238(4826):491–7. doi:10.1126/science.2821619
100. Schütt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol*. 2004;32(3):859–68.
101. Han S, Li Z, Master LM, Master ZW, Wu A. Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin  $\beta$ 1-ERK pathway. *Br J Cancer*. 2014;111(7):1400–9. doi:10.1038/bjc.2014.435
102. Patil SS, Gokulnath P, Bashir M, Shwetha SD, Jaiswal J, Shastry AH, Arimappamagan A, Santosh V, Kondaiah P. Insulin-like growth factor binding protein-2 regulates  $\beta$ -catenin signaling pathway in glioma cells and contributes to poor patient prognosis. *Neuro-oncology*. 2016;18(11):1487–97. doi:10.1093/neuonc/now053
103. Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J*. 1989;8(9):2497–502. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08386.x
104. Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res*. 1991;3(4):243–66. doi:10.1016/0955-2235(91)90003-m
105. Arai T, Busby W, Clemmons DR. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology*. 1996;137(11):4571–5. doi:10.1210/endo.137.11.8895319
106. Russo VC, Schütt BS, Andaloro E, Ymer SI, Hoeflich A, Ranke MB, Bach LA, Werther GA. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology*. 2005;146(10):4445–55. doi:10.1210/en.2005-0467
107. Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL, Werther GA. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology*. 1997;138(11):4858–67. doi:10.1210/endo.138.11.5472

108. Lund J, Søndergaard MT, Conover CA, Overgaard MT. Heparin-binding mechanism of the IGF2/IGF-binding protein 2 complex. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):345–55. doi:10.1530/JME-13-0184
109. Azar WJ, Azar SHX, Higgins S, Hu J-F, Hoffman AR, Newgreen DF, Werther GA, Russo VC. IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology*. 2011;152(9):3332–42. doi:10.1210/en.2011-1121
110. Grimberg A, Coleman CM, Shi Z, Burns TF, MacLachlan TK, Wang W, El-Deiry WS. Insulin-like growth factor factor binding protein-2 is a novel mediator of p53 inhibition of insulin-like growth factor signaling. *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5(10):1408–14. doi:10.4161/cbt.5.10.3455
111. Gschwind D, Müller-Schilling M. Identifizierung von IGFBP-2 und IGFBP-4 als neue prognostisch relevante Zielgene der P53-Familie im hepatozellulären Karzinom. Regensburg: Universitätsbibliothek Regensburg; 2021. Online-Ressource. ger.
112. Pelc A. Charakterisierung von Zielgenexpressionsprofilen der p53-Familie und ihrer prognostischen Relevanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC) [Med. Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2012.
113. Guo C, Lu H, Gao W, Wang L, Lu K, Wu S, Pataer A, Huang M, El-Zein R, Lin T, Roth JA, Mehran R, Hofstetter W, Swisher SG, Wu X, Fang B. Insulin-like growth factor binding protein-2 level is increased in blood of lung cancer patients and associated with poor survival. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74973. doi:10.1371/journal.pone.0074973
114. Lancaster JM, Sayer RA, Blanchette C, Calingaert B, Konidari I, Gray J, Schildkraut J, Schomberg DW, Marks JR, Berchuck A. High expression of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA in epithelial ovarian cancers produces elevated preoperative serum levels. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(4):1529–35. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00623.x
115. Kendrick ZW, Firpo MA, Repko RC, Scaife CL, Adler DG, Boucher KM, Mulvihill SJ. Serum IGFBP2 and MSLN as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2014;16(7):670–6. doi:10.1111/hpb.12199

116. Hur H, Yu EJ, Ham I-H, Jin H-J, Lee D. Preoperative serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 2 predict prognosis of gastric cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(7):10994–1003. doi:10.18632/oncotarget.14202
117. Liou J-M, Shun C-T, Liang J-T, Chiu H-M, Chen M-J, Chen C-C, Wang H-P, Wu M-S, Lin J-T. Plasma Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 Levels as Diagnostic and Prognostic Biomarker of Colorectal Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(4):1717–25. doi:10.1210/jc.2009-2668
118. Lin Y, Jiang T, Zhou K, Xu L, Chen B, Li G, Qiu X, Jiang T, Zhang W, Song SW. Plasma IGFBP-2 levels predict clinical outcomes of patients with high-grade gliomas. *Neuro-oncology*. 2009;11(5):468–76. doi:10.1215/15228517-2008-114
119. Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logie A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M, Le Bouc Y. Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *European Journal of Endocrinology*. 2001;29–36. doi:10.1530/eje.0.1440029
120. Renehan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM, O'Dwyer ST. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2000;83(10):1344–50. doi:10.1054/bjoc.2000.1462
121. Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG. Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(4):1031–5. doi:10.1210/jcem.76.4.7682560
122. Baron-Hay S, Boyle F, Ferrier A, Scott C. Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as a prognostic marker in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1796–806.
123. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: Protector or promoter? *Cancer Res*. 2001;61(24):8601–10.
124. Ranke MB, Maier K-P, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, Flehmig B. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding



- protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res.* 2003;60(4):174–80. doi:10.1159/000073229
125. Ma Y, Cui D, Zhang Y, Han C-C, Wei W. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Promotes Proliferation and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2020;135083–92. doi:10.2147/OTT.S249527
126. Guo Q, Yu D-Y, Yang Z-F, Liu D-Y, Cao H-Q, Liao X-W. IGFBP2 upregulates ZEB1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Dig Liver Dis.* 2020;52(5):573–81. doi:10.1016/j.dld.2019.10.008
127. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 1979;282(5739):615–6. doi:10.1038/282615a0
128. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, editor. Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung der Zelllinie Hep3B gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV; 2012.
129. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307–10. doi:10.1038/35042675
130. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):402–12. doi:10.1038/nrm2395
131. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):749–58. doi:10.1038/nrc2723
132. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4285. doi:10.3389/fonc.2014.00285
133. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Transl. Cancer Res.* 2016;5(6):632–8. doi:10.21037/tcr.2016.11.79
134. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4495–9. doi:10.1073/pnas.89.10.4495
135. Lautem A, Simon F, Hoppe-Lotichius M, Mittler J, Vollmar J, Schad A, Düber C, Galle PR, Otto G, Zimmermann T, Lang H. Expression and prognostic

- significance of insulin-like growth factor-2 receptor in human hepatocellular carcinoma and the influence of transarterial chemoembolization. *Oncol Rep.* 2019;41(4):2299–310. doi:10.3892/or.2019.6995
136. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal.* 1999;13(4):166–72.
137. Hood E. RNAi: What's all the noise about gene silencing? *Environ Health Perspect.* 2004;112(4):A224-9. doi:10.1289/ehp.112-a224
138. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell: From RNA to Protein.* 4th ed. New York, NY: Garland Science; 2002. eng.
139. Coorssen JR, Blank PS, Albertorio F, Bezrukov L, Kolosova I, Backlund PS, Zimmerberg J. Quantitative femto- to attomole immunodetection of regulated secretory vesicle proteins critical to exocytosis. *Anal Biochem.* 2002;307(1):54–62. doi:10.1016/s0003-2697(02)00015-5
140. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics.* 2014;11(5):549–60. doi:10.1586/14789450.2014.939635
141. Moore MG, Wetterau LA, Francis MJ, Peehl DM, Cohen P. Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2003;105(1):14–9. doi:10.1002/ijc.11015
142. Gao S, Sun Y, Zhang X, Hu L, Liu Y, Chua CY, Phillips LM, Ren H, Fleming JB, Wang H, Chiao PJ, Hao J, Zhang W. IGFBP2 Activates the NF- $\kappa$ B Pathway to Drive Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasive Character in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2016;76(22):6543–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0438
143. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Muramaki M, Gleave M, Eto H. Introduction of insulin-like growth factor binding protein-2 gene into human bladder cancer cells enhances their metastatic potential. *Oncol Rep.* 2005;13(2):341–5.
144. Yao X, Wang Y, Duan Y, Zhang Q, Li P, Jin R, Tao Y, Zhang W, Wang X, Jing C, Zhou X. IGFBP2 promotes salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by

- activating the NF- $\kappa$ B/ZEB1 signaling pathway. *Cancer Lett.* 2018;43238–46.  
doi:10.1016/j.canlet.2018.06.008
145. Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W. An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin  $\alpha$ 5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14085–91.  
doi:10.1074/jbc.M513686200
146. Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou Y-H, Liao WS-L, Fuller GN, Zhang W. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res.* 2003;63(15):4315–21.
147. Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA. IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):329–46. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.12.001
148. Frommer KW, Reichenmiller K, Schutt BS, Hoeflich A, Ranke MB, Dodt G, Elmlinger MW. IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J Mol Endocrinol.* 2006;37(1):13–23.  
doi:10.1677/jme.1.01955
149. Uzoh CC, Holly JMP, Biernacka KM, Persad RA, Bahl A, Gillatt D, Perks CM. Insulin-like growth factor-binding protein-2 promotes prostate cancer cell growth via IGF-dependent or -independent mechanisms and reduces the efficacy of docetaxel. *Br J Cancer.* 2011;104(10):1587–93. doi:10.1038/bjc.2011.127
150. Kühnl A, Kaiser M, Neumann M, Fransecky L, Heesch S, Radmacher M, Marcucci G, Bloomfield CD, Hofmann W-K, Thiel E, Baldus CD. High expression of IGFBP2 is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011;35(12):1585–90.  
doi:10.1016/j.leukres.2011.08.006
151. Zheng R, Chen W, Xia W, Zheng J, Zhou Q. The Prognostic Values of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Family in Ovarian Cancer. *Biomed Res Int.* 2020;20207658782. doi:10.1155/2020/7658782
152. Huang Y-F, Cheng W-F, Wu Y-P, Cheng Y-M, Hsu K-F, Chou C-Y. Circulating IGF system and treatment outcome in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(2):217–29. doi:10.1530/ERC-13-0274

153. Chen K-F, Chen H-L, Tai W-T, Feng W-C, Hsu C-H, Chen P-J, Cheng A-L. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337(1):155–61. doi:10.1124/jpet.110.175786
154. Liang Y, Zheng T, Song R, Wang J, Yin D, Wang L, Liu H, Tian L, Fang X, Meng X, Jiang H, Liu J, Liu L. Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1 $\alpha$  inhibition in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013;57(5):1847–57. doi:10.1002/hep.26224
155. Rudalska R, Dauch D, Longerich T, McJunkin K, Wuestefeld T, Kang T-W, Hohmeyer A, Pesic M, Leibold J, Thun A v., Schirmacher P, Zuber J, Weiss K-H, Powers S, Malek NP, Eilers M, Sipos B, Lowe SW, Geffers R, Laufer S, Zender L. In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat Med.* 2014;20(10):1138–46. doi:10.1038/nm.3679
156. Tovar V, Cornella H, Moeini A, Vidal S, Hoshida Y, Sia D, Peix J, Cabellos L, Alsinet C, Torrecilla S, Martinez-Quetglas I, Lozano JJ, Desbois-Mouthon C, Solé M, Domingo-Domenech J, Villanueva A, Llovet JM. Tumour initiating cells and IGF/FGF signalling contribute to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2017;66(3):530–40. doi:10.1136/gutjnl-2015-309501
157. Lu H, Wang L, Gao W, Meng J, Dai B, Wu S, Minna J, Roth JA, Hofstetter WL, Swisher SG, Fang B. IGFBP2/FAK pathway is causally associated with dasatinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(12):2864–73. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0233
158. Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) selectively induces apoptosis in lung cancer cells dependent on epidermal growth factor receptor signaling for survival. *Cancer Res.* 2006;66(11):5542–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4620

## 10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Elisabeth Backu, geboren am 08.12.1995 in München, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater\*in oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **11. Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die am Erfolg dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling für Ihre intensive Betreuung und Ihre kontinuierliche Förderung. Ich bedanke mich für Ihre ständige Unterstützung und Ermutigung zur Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen. Unter Ihrer Leitung durfte ich wertvolle Erfahrungen auf fachlicher und persönlicher Ebene sammeln, die mich auf meinem weiteren Weg begleiten werden.

Weiterhin danke ich PD Dr. Claudia Kunst und PD Dr. Karsten Gülow für Ihre konstruktive Kritik und Hilfe in der Planung und Ausführung neuer Experimente. Außerdem bedanke ich mich bei allen Forschungsmitgliedern der Arbeitsgruppe für die interessanten Dialoge, die Einführung in die Laborarbeit und die Unterstützung in den einzelnen Experimenten.

Auch danke ich der Fakultät für Medizin für die Förderung meiner Promotionsarbeit durch ein Promotionsstipendium.

Tausend Dank gilt meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung.

