Untersuchungen zur Bedeutung der IGF-II-Expression humaner Lebertumorzelllinien

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Per Lund

aus Norrköping

Köln

2001

Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-W. Klein
	Prof. Dr. P. Schirmacher
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Februar 2002

Meiner Schwester Siri
und denen für die wir da sind:
Darja,
Fritz und Stine.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1. Hepatokarzinogenese 1

1.1.1. Allgemeines 1

1.1.2. Morphologische und molekulare Hepatokarzinogenese 2

1.1.3. Wachstumsfaktoren in der Hepatokarzinogenese 5

1.2. IGF-II 7

1.2.1. Biochemische Charakterisierung 7

1.2.2. Physiologische Funktion 10

1.2.3. Funktion in der Tumorgenese 11

1.2.3.1. Allgemeine tumorigene Wirkung 11

1.2.3.2. Funktion in der Hepatokarzinogenese 12

2. Problemstellung **15**

3. Material und Methoden **16**

3.1. Allgemeines 16

3.2. Allgemeine Zellkulturarbeiten 16

3.2.1. Zelllinien 16

3.2.2. Zellkulturmedien und Zusätze 16

3.2.3. Kultivierung der Zellen 16

3.2.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen 17

3.2.5. Mykoplasmentestung 17

3.2.6. Zellzahlbestimmung 18

3.3. Nachweismethoden 18

3.3.1. mRNA-Expression der IGFs, IGF-Rezeptoren und IGFBPs 18

3.3.2. Messung von IGF-II im Zellkulturüberstand 18

3.4. Wachstums- und Toxizitätsuntersuchungen 19

3.4.1. Behandlung der Zellen mit Zytostatika 19

3.4.2. Behandlung der Zellen mit IGF-II, sowie α-IGF-II oder α-IGF-IR-Antikörpern 19

3.4.3. Bestimmung des Zellwachstums 20

3.4.4. Proliferations- und Zytotoxizitätstests 20

3.4.5. Vitalfarbstoff-Färbungen 21

3.4.6. Apoptosenachweis durch TUNEL- und Propidiumiodidfärbung 21

3.4.7. Statistische Analysen 22

3.5. Molekularbiologische Untersuchungen 22

3.5.1. mRNA-Status nach Behandlung mit IGF-II oder α-IGF-II-Antikörper 22

3.5.2. Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäuren 23

3.5.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA 23

3.5.4. cDNA-Microarray-Analyse 23

4. Ergebnisse 25

4.1. Expression von IGF-II und IGF-bindenden Rezeptoren in humanen Lebertumorzelllinien 25

4.1.1. mRNA-Expression von Komponenten der IGF-Achse 25

4.1.2. IGF-II-Sekretion 26

4.2. Untersuchung der Wirkung von IGF-II, sowie α-IGF-II- und α-IGF-IR-Antikörpern auf das Wachstum und das Überleben humaner HCC-Zelllinien 29

4.2.1. Aufbau des Meßsystems 29

4.2.1.1. Bestimmung der grundlegenden Versuchsgrößen 29

4.2.2. Untersuchung der Wirkung der IGF-II-Zugabe 31

4.2.3. Untersuchung der Wirkung der IGF-II-Blockierung 33

4.2.4. Untersuchung der Wirkung der IGF-IR-Blockierung 35

4.3. Untersuchung der Wirkung der Zytostatika Etoposid und Cisplatin auf das Wachstum und das Überleben humaner HCC-Zelllinien 38

4.3.1. Bestimmung des Wachstums und der Nekrose 38

4.3.2. Bestimmung der IGF-II-Sekretion 41

4.3.3. Bestimmung der Vitalität 44

4.3.4. Bestimmung der Apoptose 47

4.4. Untersuchung der Wirkung von IGF-II, sowie α-IGF-II- und α-IGF-IR-Antikörpern bei simultaner Gabe der Zytostatika Etoposid und Cisplatin 50

4.4.1. Untersuchung der Wirkung von IGF-II bei Gabe von Etoposid und Cisplatin 50

4.4.2. Untersuchung der Wirkung von α-IGF-II-Antikörpern bei Gabe von Etoposid und Cisplatin 50

4.4.3. Untersuchung der Wirkung von α-IGF-IR-Antikörpern bei Gabe von Etoposid und Cisplatin 58

4.5. Veränderungen des mRNA-Status der humanen Lebertumorzelllinien nach Gabe von IGF-II oder α-IGF-II-Antikörpern 60

4.5.1. Veränderungen des mRNA-Status von Hep G2-Zellen nach Gabe von IGF-II 60

4.5.2. Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II 60

4.5.3. Veränderungen des mRNA-Status von HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II 62

4.5.4. Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II-Antikörpern 64

5. Diskussion 65

5.1. Expression von Komponenten der IGF-Achse 65

5.2. Autokrine Wachstumsstimulation durch IGF-II 69

5.3. Veränderungen des Ansprechens auf Chemotherapie 72

5.4. Potentielle Effektormechanismen 75

6. Zusammenfassung 78

7. Literaturverzeichnis 79

8. Anhang 95

8.1. Abbildungsverzeichnis 95

8.2. Tabellenverzeichnis 96

8.3. Abkürzungsverzeichnis 97

8.4. Abkürzungsverzeichnis der regulierten Transkripte 99

Kurzzusammenfassung 100

Abstract 101

Erklärung 102

1. Einleitung

1.1. Hepatokarzinogenese

1.1.1. Allgemeines

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der fünfthäufigste maligne Tumor weltweit. 80% der Patienten, die ein HCC entwickeln, sind männlichen Geschlechts (Di Bisceglie et al., 1988). Epidemiologischen Untersuchungen zufolge besteht die höchste Inzidenz des HCC in Zentralafrika und Südostasien, während in Mittel- und Nordeuropa sowie in Nordamerika seine Inzidenz vergleichsweise gering ist (Parkin et al., 1993). Innerhalb Europas zeigt sich ein deutliches Süd-Nord Gefälle mit relativ hohen Erkrankungszahlen in Griechenland, Italien und Spanien. Das HCC entsteht meist auf dem Boden von chronischen Virusinfektionen (Hepatitis B, Hepatitis C), seltener auf dem Boden eines chronischen Alkoholabusus oder angeborener Stoffwechselerkrankungen und anderer seltener Erkrankungen, die zu chronischen Lebererkrankungen führen (Ozturk, 1999) (s.: Tab. 1):

Tab. 1: Prädisponierende Faktoren für die Entstehung eines HCC

1. **Virusinfektionen**
   HBV
   HCV

2. **angeborene Stoffwechselerkrankungen**
   Hämochromatose
   alpha 1-Antitrypsinmangel
   hereditäre Tyrosinämie
   Glykogenspeicherkrankheit Typ I

3. **Medikamente und Toxine**
   Aflatoxin B1
   chronischer Alkoholabusus
   Thorotrast

4. **Sonstige**
   Budd-Chiari-Syndrom
   Ataxia teleangiectasia

In den am stärksten betroffenen Regionen geht die hohe Inzidenz des HCC mit einer hohen Prävalenz chronischer Hepatitis B Virus (HBV)-Infektionen einher. Die Wahrscheinlichkeit aufgrund einer chronischen HBV-Infektion ein HCC zu entwickeln ist gegenüber HBV-

seronegativen Personen bis zum 200-fachen erhöht (Beasley et al., 1981). In den Entwicklungsländern stellt zudem die Verunreinigung von Nahrungsmitteln mit dem Schimmelpilzgift Aflatoxin B1 (Wogan, 1997) eine weitere bedeutende Ursache für die Entstehung des HCC dar. Die chronische Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ist weltweit von stark zunehmender Bedeutung für die Entstehung des HCC und stellt in den westlichen Industrieländern mittlerweile die häufigste Ursache eines HCCs dar (Deuffic et al., 1999). Daneben stellt der chronische Alkoholabusus, der jedoch nahezu ausschließlich im Stadium der Leberzirrhose zur Ausbildung des HCC führen kann, einen wesentlichen Faktor der Lebertumorentstehung in den Industrieländern dar (Kaczynski, 1999).

Auf dem Hintergrund einer chronischen Lebererkrankung entwickelt sich ein HCC meist im Verlauf von Jahrzehnten und tritt daher in westlichen Industrieländern vorwiegend im höheren Lebensalter auf. Patienten mit einem HCC haben eine äußerst schlechte Prognose, was vor allem dem besonders ausgeprägten angioinvasiven Potential des Tumors und dem Fehlen von kurativen Therapiemöglichkeiten zuzuschreiben ist. Wenn der Tumor nicht chirurgisch radikal entfernt werden kann, ist die Prognose sehr schlecht. Der Tumor ist nahezu resistent gegenüber bisher eingesetzten Chemo- oder Strahlentherapien (Okada, 1997). Behandlungen des HCC mit Chemoembolisation, Ethanolinjektion oder Thermoablation zeigen ein begrenztes Ansprechen, bleiben in ihrer Wirkung aber nur palliativ (Bronowicki et al., 1997).

1.1.2. Morphologische und molekulare Hepatokarzinogenese

Für solide maligne Tumoren des Erwachsenen, die sich wie das HCC im Verlauf von Jahrzehnten entwickeln, ist eine Abfolge sequentieller Veränderungen, sogenannter prämaligner Läsionen, zu erwarten. Die Definition der prämalignen Läsionen beim humanen HCC gestaltete sich lange Zeit schwierig, ist aber mittlerweile auf dem Boden zahlreicher Tiermodelle und aufgrund differenzierter morphologischer, zytophotometrischer und klinisch-pathologischer Verlaufsuntersuchungen weitgehend möglich (Sakamoto et al., 1991; Nakanuma et al., 1993), obwohl der lückenlose Beweis des prämalignen Charakters einer Läsion bei der humanen Hepatokarzinogenese im eigentlichen Sinne noch zu führen ist.

Als früheste prämaligne Läsionen gelten beim Menschen kleinzellige, klonale Proliferate, die eine gering verschobene Kern-Zytoplasma-Relation aufweisen und deren Tendenz zum expansiven Wachstum durch eine leichte Kompression der umgebenden Parenchymzelllage

erkennbar ist. Wenn ihre Größe 0,1 cm nicht überschreitet, werden sie als *Dysplastische Foci* bezeichnet. Man geht davon aus, daß sich aus diesen *Dysplastischen Foci* größere (multiazinäre) Läsionen (> 0,1 cm) entwickeln, die man als *Dysplastische Knoten* bezeichnet. Hierbei unterscheidet man zwischen den *Dysplastischen Knoten geringer Atypie*, bei denen nur eine diskrete Hyperzellularität zu beobachten ist und deren Zellen etwa die Größe normaler Hepatozyten und meist eher eosinophiles Zytoplasma aufweisen, sowie den *Dysplastischen Knoten schwerer Atypie*, bei denen die Kern-Zytoplasma-Relation deutlich erhöht und das Zytoplasma meist basophiler ist und oft eine sinusoidale Deviation der Kerne erkennbar wird.
In umschriebenen Arealen kann die Abgrenzung zum HCC schwierig sein. Aufgrund des unzureichenden Datenmaterials ist es noch unklar, ob *Dysplastische Knoten geringer Atypie* rückbildungsfähig sind und ob *Dysplastische Knoten schwerer Atypie* eine obligate Präkanzerose darstellen. Es ist jedoch beschrieben wurden, daß bioptisch als *Dysplastische Knoten* eingestufte Läsionen innerhalb weniger Jahre eine über 50%ige maligne Transformationsrate aufwiesen (Takayama et al., 1990). Über das asymptomatische, kleine, „frühe“ HCC (0,5 cm bis 2 cm Durchmesser), das meist einen hochdifferenzierten Tumor mit nur diskreten zytologischen und strukturellen Atypien darstellt, entsteht dann durch Größenzunahme und weitere z. T. auch morphologisch nachweisbare Progressionsschritte das voll entwickelte metastasierungsfähige HCC.

Zytogenetische Untersuchungen an HCC-Zellen zeigen meist zahlreiche chromosomale Veränderungen wie Polyploidie, Verlust der Heterozygotie, allelische Imbalancen, Amplifikationen und Translokationen. Auch die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus führt oft zu chromosomalen Rearrangements durch Integration in das Wirtsgenom (Su et al., 1998). Die Untersuchungen von Lebertumorproben mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) zeigen, daß bestimmte Chromosomenabschnitte jedoch auffällig häufig amplifiziert oder deletiert sind. Besonders häufig treten chromosomale Zugewinne in den Chromosomenabschnitten 1q (ca. 60%) und 8q (ca. 50%) auf, so daß hier tumorrelevante Onkogene zu erwarten sind. Verluste chromosomalen Materials sind besonders häufig für die Regionen 4q (ca. 60%), 8p (ca. 60%), 16q (ca. 50%) und 17p (ca. 50%) beschrieben wurden, so daß hier für die Hepatokarzinogenese bedeutsame Tumorsuppressorgene zu vermuten sind (Marchio et al., 1997; Kusano et al., 1999; Niketeghad et al., 2001) .

Für das HCC liegt jedoch noch kein der Colonkarzinogenese vergleichbares Konzept vor, das die einzelnen Stufen der Tumorprogression mit definierten molekularen Ereignissen korreliert (Fearon und Vogelstein, 1990). Es ist davon auszugehen, daß ätiologie-spezifische, wie auch unspezifische Mechanismen zur Tumorentstehung beitragen bzw. diese initiieren. Ätiologie-unspezifische Mechanismen führen infolge rezidivierender Schädigung der Hepatozyten (bei chronisch entzündlich-nekrotisierenden Erkrankungen) zu einer verstärkten Leberzellregeneration, wodurch zumindest statistisch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen auch in tumorrelevanten Genen erhöht wird (Schirmacher et al., 1993). Ätiologie-spezifische Veränderungen werden z. B. durch das Schimmelpilzgift Aflatoxin B1, aber auch durch die chronische HBV-Infektion (Integration, Transaktivierung) hervorgerufen. Als Zielgen-Veränderungen sind beim HCC aktivierende Mutationen und die Überexpression von Proto-Onkogenen, inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen, sowie die Überexpression autokrin wirkender Wachstumsfaktoren belegt. Die Analyse des Musters der Genveränderungen weist bislang insgesamt darauf hin, daß insbesondere vier Signalwege beim HCC verändert sind: der p53-Signalweg, essentiell für die DNA-Reparatur, der RB1-Signalweg, essentiell für die Zellzykluskontrolle, der TGF-ß-Signalweg, essentiell für die Wachstumsinhibierung und Apoptose und der ß-Catenin/APC-Signalweg, essentiell für die Morphogenese und Signaltransduktion (Ozturk, 1999).

Im Waldmurmeltier und bei Mäusen führt die Überexpression von N-myc bzw. C-myc zur Entstehung von HCCs (Liu et al., 1997; Wang et al., 1998). Vereinzelt wird C-myc auch in humanen HCCs überexprimiert (Abou-Elella et al., 1996). Die konstitutive Aktivierung des Tyrosin-Kinase-Rezeptors c-met wurde bei etwa 50% aller HCCs nachgewiesen (D`Errico et al., 1996). Somatische Mutationen des ß-Catenin-Gens treten in etwa 30% aller HCCs auf (De la Coste et al., 1998). Sie führen zu einer aberranten nukleären Akkumulation ß-Catenins, über das verschiedene onkogene Transkriptionsfaktoren stimuliert werden können.

Das beim HCC am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen scheint das p53-Gen zu sein (Puisieux und Ozturk, 1997). Punktmutationen oder Deletionen im p53-Gen (Bressac et al., 1990; Murakami et al., 1991) sind bei etwa 35% aller untersuchten HCCs beschrieben. Das Schimmelpilzgift Aflatoxin B1 induziert spezifisch Mutationen im Codon 249 des p53-Gens (überwiegend G-T-Transitionen) (Hsu et al., 1991) und ist damit vor allem in Entwicklungsländern Ursache für ein Drittel der *p53*-Mutationen im HCC. Auch als Folge einer HBV- oder HCV-Infektion treten Mutationen und Aktivierungen des p53-Gens auf, die

sowohl Folge der Virusintegration, wie auch auf eine spezifische Interaktion mit dem HBx-Gen-Produkt des HBV zurückzuführen sein könnten. Eine Inaktivierung des Retinoblastoma-Genprodukts RB-1 tritt beim HCC in etwa 15% der Fälle auf (Murakami et al., 1991).

Neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Aktivierung von Onkogenen, weisen HCCs häufig eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren auf.

1.1.3. Wachstumsfaktoren in der Hepatokarzinogenese

Wachstumsfaktoren sind sezernierte, lösliche Polypeptide, die die Zellproliferation durch Bindung an spezifische, hochaffine zellmembran-ständige Rezeptoren, meist Tyrosinkinasen, stimulieren (Goustin et al., 1986). Die Rezeptor-Ligandenbindung führt nach einer Homo- oder Hetero- bzw. Oligodimerisierung der Tyrosinkinaserezeptoren (Heldin, 1995) und nachfolgender Aktivierung ihrer intrazellulären Kinase-Domänen durch Phosphorylierung spezifischer Tyrosinresiduen, zur Induktion entsprechender Signaltransduktionskaskaden (Kavanaugh und Williams, 1996). Das Signal wird hierduch in den Kern fortgeleitet und steuert hier die Transkription entsprechender Zielgene. Neben der mitogenen Wirkung sind Wachstumsfaktoren in der Regel auch moto- und morphogen, oft auch angiogen oder neurotroph.

Wachstumsfaktoren wirken überwiegend auto- und/oder parakrin. Bei der parakrinen Wachstumsstimulation interagiert der sezernierte Wachstumsfaktor mit Rezeptoren auf benachbarten differenten Zelltypen. Eine autokrine Wachstumsstimulation liegt vor, wenn ein Zelltypus einen Wachstumsfaktor sezerniert und gleichzeitig Rezeptoren für diesen Liganden trägt. Eine autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren ist bei vielen neoplastisch transformierten Zelllinien und Tumoren nachgewiesen und ermöglicht es Tumorzellen, ohne exogene Zufuhr von Wachstumsfaktoren zu überleben oder gar zu wachsen (Sporn und Roberts, 1985). Die autokrine Stimulation kann Tumorzellen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den Zellen des umliegenden Gewebes vermitteln. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Aktivierung der durch Wachstumsfaktoren induzierten Signalwege eine unabdingbare Voraussetzung für die vollständige maligne Transformation eines Tumors darstellen kann (D`Ambrosio et al., 1996).

Während Wachstumsfaktoren im normalen, adulten Lebergewebe nicht oder nur sehr gering exprimiert werden, findet man beim HCC oft eine Überexpression von Wachstumsfaktoren

(Derynck et al., 1986). Die Wachstumsfaktoren, die am häufigsten in der Hepatokarzinogenese aktiviert werden, sind Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II) und Transforming Growth Factor (TGF) α (Yamaguchi et al., 1995).
TGF-α ist ein 50 Aminosäuren langes, lösliches Polypeptid, das der Struktur nach dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) verwandt ist und mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor bindet (De Larco und Todaro, 1978; Marquardt et al., 1983). Es ist ein potentes Mitogen für Hepatozyten und fördert das Wachstum von Hepatozyten in der Leberregeneration. TGF-α wird von einer hohen Anzahl von Lebertumoren überexprimiert (Yamaguchi et al., 1995). Bei 65% der Patienten mit Lebertumoren findet sich eine erhöhte Konzentration von TGF-α im Urin. Transgene Mäuse, die TGF-α überexprimieren, bilden zu 70% HCCs aus (Takagi et al., 1992) und aus nicht maligne transformierten Hepatozyten TGF-α transgener Mäuse lassen sich immortalisierte Hepatozytenzelllinien etablieren.

Die Angiogenese stellt eine essentielle Voraussetzung zum Wachstum von Tumoren dar. Solide Tumoren können nur dann über einen Durchmesser von 1-2 mm hinaus wachsen, wenn sie aus neu gebildeten Blutgefäßen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Beim HCC sprechen Daten dafür, daß eine Angiogenese durch Wachstumsfaktoren, wie VEGF (Park et al., 2000), TGF-ß1 (Ito et al., 1995) und auch IGF-II (Bae et al., 1998; Kim et al., 1998) induziert wird. Zusätzliche motogene Wirkungen von Wachstumsfaktoren mögen zur Invasivität der Tumorzellen beitragen.

Die in den letzten Jahren aufgezeigte Induktion antiapoptotischer Wirkungen von Wachstumsfaktoren (Resnicoff et al., 1995a) stellen für Tumorzellen einen weiteren selektiven Vorteil gegenüber normalen Zellen dar. Normalerweise unterliegt die Apoptose ebenso wie die Zellteilung homöostatischen Kontrollmechanismen. Im neoplastischen Gewebe ist die Homöostase typischerweise in Richtung Wachstum verschoben und die Apoptose zumindest partiell blockiert. Für TGF-α konnte gezeigt werden, daß es nach Aktivierung des Tyrosin-Kinase-Rezeptors EGF antiapoptotisch auf HCC-Zellen (Seki et al., 1997) wirkt. Der Einfluß von IGF-II auf die Apoptose im HCC wird in Abschnitt 1.2.3. detailliert beschrieben. Bisherigen Arbeiten zufolge wirkt insbesondere die Aktivierung des IGF-IR apoptotischen Prozessen entgegen (Sell et al., 1995).

Die Apoptoseinduktion ist auch ein zentrales Wirkprinzip der antineoplastischen Chemo-therapie. Dabei wird die Apoptose durch Hemmung der DNA- oder RNA- oder Protein-

Synthese und/oder –Funktion gehemmt. Bei den für die Chemotherapie eingesetzten Zytostatika handelt es sich um eine heterogene Stoffgruppe, die aufgrund der Wirkungsmechanismen u. a. in Antimetaboliten, Alkylantien, Interkalantien und Mitosehemmstoffe unterteilt werden kann (Haskell, 2001). Bei der Chemotherapie des HCC sind einzelne und kombinierte Behandlungen mit den Interkalantien Cisplatin und Doxorubicin, dem Toposiomerasehemmstoff Etoposid (VP-16), dem Alkylans Ifosfamid und dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil durchgeführt wurden, ohne daß ein signifikantes Ansprechen erzielt werden konnte [Nach Behandlung mit Cisplatin wurden die relativ gesehen günstigsten Responseraten erzielt] (Okada, 1997).

1.2. IGF-II

1.2.1. Biochemische Charakterisierung

IGF-I und IGF-II sind in ihrer Aminosäure-Primärsequenz zu 65% identisch und weisen eine dem Proinsulin ähnliche Struktur und Sequenz auf. Das translatierte Präpro-IGF-II-Polypeptid gliedert sich in verschiedene Domänen (A-E), und wird nach erfolgter Translation mehrfach prozessiert. Zunächst wird im Endoplasmatischen Retikulum die Präpro-Sequenz abgespalten. Danach erfolgt die zusätzliche Abspaltung der E-Domäne, so daß das vollständig prozessierte und sezernierte IGF-II-Polypeptid überwiegend aus 67 Aminosäuren (7.5 kDa) besteht und nur noch die Domänen A-D enthält (Nielsen et al., 1993). Zusätzlich sind Varianten des IGF-II mit höherem Molekulargewicht (12-20 kDa) aus dem Serum isoliert wurden, die offenbar in Folge unvollständiger Prozessierung des IGF-II-Propeptids entstehen (Duguay, 1999).

Das IGF-II-Gen ist auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert (Brissenden et al., 1984; Tricoli et al., 1984). Beim Menschen wird es von vier verschiedenen Promotoren (P1-P4) transkribiert (van Dijk et al., 1991), die entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert werden (Li et al., 1996b). P1 ist ein schwacher, nur postnatal und weitgehend in der Leber aktiver Promotor. P2, P3 und P4 sind besonders während der Fötalentwicklung aktiv, wobei die relativ stärkste Aktivität von P3 ausgeht. Postnatal werden die drei Promotoren weitgehend supprimiert. Das humane IGF-II Gen zeigt ein Promotor-spezifisches genomisches Imprinting (Giannoukakis et al., 1993). P1 ist biallelisch, P2, P3 und P4 sind dagegen nur monoallelisch, nämlich nur vom paternalen Allel aus aktiv. Eine Reihe verschiedener IGF-II-Transkripte wird posttranskriptionell durch alternatives Spleißen, endonukleolytischen Abbau oder 3´-Prozessierung der mRNA erzeugt (Nielsen et al., 1993).

Wachstumsstimulierende Effekte des IGF-II werden nach bisheriger Vorstellung über den IGF-IR, eine transmembrane Tyrosin-Kinase, deren Aminosäure-Sequenz zu 70% mit der des Insulin-Rezeptors übereinstimmt, vermittelt. Die Struktur des IGF-IR ist der Struktur des IR stark homolog (Ullrich et al., 1986; Morgan et al., 1986). Zellen, die beide Gene exprimieren, können IGF-IR/IR-Hybride ausbilden (Baserga et al., 1997). Das IGF-IR-Gen ist auf dem Chromosom 15q25-26 lokalisiert (Abott et al., 1992). Der funktionelle Rezeptor ist ein Heterotetramer, das aus zwei α und zwei ß Untereinheiten besteht. Die α-Untereinheit, die komplett extrazellulär vorliegt, dimerisiert über Disulfidbrücken mit der anderen α-Untereinheit. Die ß-Untereinheit besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. In der intrazellulären Domäne befindet sich die Tyrosin Kinase Domäne.

Die Bindung von IGF-II an den IGF-IR induziert die Autophosphorylierung des Rezeptors an intrazellulären Tyrosin-Resten, die zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten am Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS-1), dem dominanten intrazellulären Substrat für die Tyrosin-Kinase-Aktivität des IGF-IR, führt (Tartare-Deckert et al., 1995; Esposito et al., 1997).
Nach der Aktivierung des IRS-1 können verschiedene Signalwege induziert werden. Diese Signalwege repräsentieren unterschiedliche durch die Aktivierung des IGF-IR vermittelte biologische Antworten, wie die Stimulation des Wachstums und die Inhibierung der Apoptose (O`Connor et al., 1997; Hongo et al., 1998). Die IGF-IR-vermittelten Signale induzieren nach bisheriger Kenntnis im wesentlichen zwei intrazelluläre Signalwege: die Steigerung des Zellwachstums über den MAP-Kinase-Signalweg und die Hemmung der Apoptose über den PI-3-Kinase-Signalweg.
Grb2 bindet mit der SH2-Domäne an einen Phosphotyrosinrest des IRS-1. Über die SH3-Domäne bindet Grb2 an SOS, einen Ras-spezifischen GDP/GTP-Austauschfaktor. Der GRB2/SOS-Komplex interagiert mit Ras-GDP an der Zelloberfläche und katalysiert den GDP/GTP-Austausch am Ras, wodurch die Raf/MAPKK/MAPK-Kaskade aktiviert wird. Die MAP-Kinase transloziert in den Zellkern, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (Ito et al., 1996). Nach Autophosphorylierung des IGF-IR kommt es zusätzlich zu einer Signalweiterleitung über Shc, das ebenfalls die Ras/Raf/MAPKK/MAPK-Kaskade aktivieren kann (Esposito et al., 1997).
Nach der Aktivierung des IGF-IR und Phosphorylierung des IRS-1 können auch die PI-3-Kinase und Akt/PKB aktiviert werden (Kulik et al., 1997). Die p85-regulatorische Untereinheit der PI-3-Kinase assoziiert mit Phosphotyrosin-Resten des IRS-1. Daraufhin

assoziiert die PI-3-Kinase mit Membranen an denen die p110-katalytische Untereinheit der PI-3-Kinase Phosphoinositide phosphoryliert. Die entstehenden phosphorylierten Phosphoinositide, insbesondere Phosphatidylinositol-3,4-Phosphate (PtdIns-3,4-P2) vermitteln die Phosphorylierung und Aktivierung der PKB durch upstream gelegene Phosphatidylinositol-Phosphat-abhängige Kinase (PDK-1 und PDK-2) (Alessi et al., 1998). Eines der diversen downstream der PKB gelegenen Substrate ist Bad, das nach der Phosphorylierung durch die PKB nicht mehr an Bcl-2 und Bcl-x_L bindet und sodann antiapoptotisch wirkt (Datta et al., 1997).
Beide Signalweg interagieren vermutlich auch miteinander. Ras vermittelt nicht nur die mitogenen Signale vom IGF-IR, sondern scheint auch upstream der PI-3-Kinase Signale weiterzuleiten (Kauffmann-Zeh et al., 1997). Neuere Untersuchungen an Tumorzellen weisen darauf hin, daß die antiapoptitischen Eigenschaften von IGF-II auch durch alternative Signalwege vermittelt sein können (Burtscher et al., 1999).

IGF-II bindet auch an den IGF-IIR, ein ubiquitär exprimiertes membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 300 kDa, das identisch mit dem Kation-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor ist. Das Gen für den IGF-IIR liegt auf Chromosom 6q26 (Kilian und Jirtle, 1999). Ob die Bindung des IGF-II an den IGF-IIR einen G-Protein-Signalweg aktiviert (Okamoto et al., 1990), ist umstritten. Nachgewiesen ist, daß IGF-II über den IGF-IIR internalisiert und zu den Lysosomen transportiert wird, wo es degradiert wird. Neben IGF-II und IGF-I bindet der IGF-IIR zahlreiche weitere Proteine, wie Mannose-6-Phosphat-haltige lysosomale Enzyme, Retinsäure und den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (Auletta et al., 1992; Braulke, 1999).

Die Rezeptoren besitzen unterschiedliche Affinitäten zu IGF-I, IGF-II und Insulin. Der IGF-IR weist eine hohe Affinität zum IGF-I (K_D: 0,2-1nm) und eine leicht geringere Affinität zum IGF-II auf. Insulin bindet mit 500- bis 1000-fach geringerer Affinität an den IGF-IR (Grothey et al., 1999). Der IGF-IIR bindet IGF-II mit sehr hoher Affinität (K_D: 0.017-0.7 mM), IGF-I um den Faktor 500 schwächer und zeigt keine nachweisbare Affinität zum Insulin (Nielsen et al., 1993). Der IR bindet IGF-I mit 100-fach geringerer Affinität als Insulin. Es gibt zwei Isoformen des IR, die durch alternatives Spleißen des Exons 11 entstehen: die IR-Isoform-A (ohne Exon 11) und die IR-Isoform-B (einschließlich Exon 11). Aufgrund von neueren Untersuchungen wird die IR-Isoform-A als weiterer hochaffiner Rezeptor für IGF-II angesehen, der IGF-II mit vergleichbarer Affinität wie der IGF-IR bindet. IGF-II kann über

die IR-Isoform-A in Fetal- und Tumorzellen mitogen wirken (Sciacca et al., 1999; Frasca et al., 1999).

Nicht nur durch den Abbau über den IGF-IIR wird die extrazelluläre Verfügbarkeit der IGFs reguliert. Im Serum ist der größte Anteil (> 97%) der IGFs an IGFBPs gebunden, die IGFs mit höherer Affinität binden als der IGF-I-Rezeptor. Normalerweise liegen die IGFs im Serum überwiegend als 150kDa-ternärer Komplex vor, der zumindest aus IGF, IGFBP-3 und einem Glykoprotein besteht. Die IGFBPs regulieren den Austausch der IGFs zwischen den intra- und extravaskulären Kompartimenten und verlängern die Halbwertszeit der zirkulierenden IGFs (Rechler und Clemmons, 1998; Wetterau et al., 1999). In der Leber ist das Vorkommen der IGFBPs 1-6 beschrieben wurden, die meist inhibitorisch auf die von den IGFs vermittelten Effekte wirken, indem sie die Bindung an den IGF-IR verhindern. Unter bestimmten Umständen können die IGFBPs die Wirkung der IGFs auch verstärken, indem sie die IGFs vor der Degradation schützen, wodurch die Verfügbarkeit der IGFs in den Zielgeweben erhöht wird (Murphy, 1998). So können beobachtete apoptosefördernde Eigenschaften des IGFBP-3 auf die Inhibition der IGF-II-Wirkung zurückzuführen sein (Butt et al., 1999). Unabhängig von der Interaktion mit den IGFs bindet das IGFBP-3 an verschiedene Rezeptoren, wie den TGF ß-Typ5-Rezeptor und dem Retinsäure-Rezeptor α. Auch interagiert es mit weiteren Proteinen, wie Heparin, Transferrin und Kollagen Typ I (Wetterau et al., 1999). Eine weiterer Mechanismus zur Regulation der Verfügbarkeit der IGFs besteht in der Freisetzung der IGFs aus den IGFBPs durch Fragmentierung der IGFBPs über IGFBP-Proteasen (Wetterau et al., 1999). In der Abbildung 1 sind die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der IGF-Achse schematisch dargestellt.

1.2.2. Physiologische Funktion

IGF-II wird während der Fötalentwicklung stark exprimiert. Nach der Geburt wird die mRNA-Expression des IGF-II schnell herunterreguliert (Li et al., 1996b). IGF-I und IGF-II besitzen überlappende mitogene und antiapoptotische Eigenschaften. Für eine Vielzahl von Zellen, insbesondere für Knochen- und Muskelzellen ist eine wachstums- und differenzierungsfördernde Funktion der IGFs nachgewiesen wurden (Florini et al., 1996; Langdahl et al., 1998). Bei hohen Konzentrationen wirken die IGFs ähnlich wie Insulin und fördern die Glukoseaufnahme und Glykogensynthese (Nielsen, 1993).

Die Leber stellt den Hauptsyntheseort von IGF-I und IGF-II dar, die zu über 90% an das Blut abgegeben werden. Beim Menschen sind die Serumkonzentrationen von IGF-II nach der Geburt mit etwa 300 ng/ml relativ niedrig, nehmen aber mit zunehmendem Alter bis zur Pubertät auf etwa 800 ng/ml zu. Nach Abschluß der Pubertät bleiben die IGF-II-Konzentrationen bis ins hohe Lebensalter unverändert. Hinsichtlich der Serumkonzentration von IGF-II bestehen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Yu et al., 1999). Die Wirkung von IGF-II auf das Wachstum des Menschen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während die Synthese des IGF-I der Kontrolle des Growth Hormons (GH) unterliegt und erhöhte IGF-I-Serumkonzentrationen z. B. bei Patienten mit Akromegalie gefunden werden (van der Lely et al., 1997), wurde für IGF-II bisher nur die Stimulation der Steroidynthese in humanen adrenokortikalen Zellen (Fottner et al., 1998), jedoch keine Abhängigkeit von der GH-Konzentration nachgewiesen. IGF-II-Knock-Out-Mäuse zeigen zwar keine anlagebedingten Defekte, sind jedoch deutlich wachstumsretardiert (De Chiara et al., 1991).

1.2.3. Funktion in der Tumorgenese

1.2.3.1. Allgemeine tumorigene Wirkung

Die Überexpression von IGF-II ist nicht auf das hepatozelluläre Karzinom beschränkt, sondern tritt häufig bei verschiedenen malignen, kindlichen Tumoren, wie dem Neuroblastom (Kiess et al., 1997), dem Nephroblastom (Qing et al., 1996), dem Hepatoblastom (Li et al., 1997), und dem Rhabdomyosarkom (Minniti et al., 1995), auf. Auch bei diversen Tumoren des Erwachsenenalters wurde eine auf den Tumor beschränkte Überexpression des IGF-II nachgewiesen, wie z. B.: bei über 50% der Prostata- und Mammakarzinome und der Paragangliome (Singer et al., 1995; Li et al., 1998). Beim Vergleich mehrerer Kolonkarzinome wurde IGF-II in einer vergleichenden Analyse von 45000 Transkripten als das am stärksten exprimierte Gen identifiziert (Zhang et al., 1997a).

In einer Reihe von Tumormodellen wurden die Wirkungen von IGF-II charakterisiert. Bei SV40Tag-induzierten Insulinomen bei Mäusen repräsentiert IGF-II einen wichtigen sekundären, die Tumorigenität verstärkenden Faktor. Das Fehlen von IGF-II führt zu einer dramatischen Reduktion des Tumorwachstums bei deutlich zunehmender Apoptose der Tumorzellen (Christofori et al., 1994). Bei einigen Tumorzelllinien und primären Tumorzellen wurde die mitogene und antiapoptotische Wirkung von IGF-II bereits nachgewiesen. Lamm und Christofori (1998) konnten zeigen, daß ß-Tumorzelllinien aus IGF-II-defizienten Mäusen im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypzellen nach

Zytostatikabehandlung eine deutlich erhöhte Apoptoserate aufwiesen. Für Myelomzellen (Xu et al., 1997) und glomeruläre mesangiale Zellen (Mooney et al., 1997), wurde gezeigt, daß die Stimulation mit IGF-II den Zelluntergang durch Apoptose vermindert.

Allgemein werden die protumorigenen Effekte des IGF-II als Folge einer IGF-IR-Aktivierung betrachtet. IGF-IR-defiziente embryonale Mauszellen konnten weder durch das SV40Tag (Sell et al., 1993), noch durch die Expression von mutiertem *Ha-ras* (Sell et al., 1994) transformiert werden. Resnicoff et al. (1995a) zeigten, daß IGF-IR-antisense Oligonucleotide *in vitro* und noch ausgeprägter *in vivo* das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien inhibieren und die Apoptoserate erhöhen. Die Aktivierung des IGF-IR wird mitunter als notwendige Voraussetzung für eine maligne Transformation angesehen (Baserga et al., 1995).

1.2.3.2. Funktion in der Hepatokarzinogenese

gibt zahlreiche Belege dafür, daß IGF-II einen wichtigen protumorigenen Faktor in der Hepatokarzinogenese darstellt. Unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie wird IGF-II in etwa 30 bis 40% aller humaner HCCs überexprimiert, wobei IGF-II nicht nur in den neoplastischen Zellen, sondern vereinzelt auch in dysplastischen Knoten detektiert wurde (D`Errico et al., 1994; Li et al., 1997). Durch die Infektion mit dem WHV werden HCCs in Waldmurmeltieren induziert. Bei 50% dieser HCCs fand man eine Überexpression von IGF-II (Fu et al., 1988). In den dysplastischen Foci war die Überexpression des IGF-II mit der von N-myc 2 assoziiert (Yang et al., 1993), die auf der spezifischen Integration und Aktivierung durch das WHV-Genom basiert. Bei der chemisch induzierten Hepatokarzinogenese in Ratten (Ueno et al., 1988) kam es ebenso wie in Mäusen, die das SV40Tag leberspezifisch überexprimieren (Schirmacher et al., 1992), zur Reaktivierung der IGF-II-Expression. Auch eine Aktivierung des IGF-II-Gens durch trans-aktivierende virale Proteine, wie das Hepatitis B-Virus Transaktivator X Gen-Produkt (Lee et al., 1998; Kang-Park et al., 2001) wurde immer wieder als Ursache der Lebertumorentstehung in Erwägung gezogen. In humanen Lebertumoren konnten Veränderungen im Imprinting Status der vier IGF-II-Promotoren, in 70% der untersuchten HCCs ein Verlust der P1-Promotor-Aktivität und in 25% der Fälle eine anormale monoallelische IGF-II-Expression nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten IGF-II-Expression assoziiert sind (Li et al., 1997). Für die durch Aflatoxin B1 induzierte mutante Form des p53 (p53mt249), wurde nachgewiesen, daß sie die Transkription des IGF-II vom Promotor P4 aus erheblich verstärkt. Während das Wildtyp p53 die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und TBP an den P4-Promotor inhibiert, verstärkt das p53mt249

die Bindung von Sp1 und TBP an den P4-Promotor. Die Anzahl von Apoptosen war dabei deutlich reduziert (Lee et al., 2000).

Die Überexpression von IGF-II bei Lebertumoren von Nagern korreliert mit einer hohen Proliferationsrate (Schirmacher et al., 1992). In Ovalzellen von Ratten, die als potentielle Vorläuferzellen des HCC angesehen werden, fördert IGF-II das Wachstum, wobei der Effekt von einer autokrinen Interaktion mit dem IGF-IR abhängt (Zhang et al., 1997b). In humanen Hepatoma-Zellen konnte das Wachstum durch IGF-II-Antisense-Oligonukleotide signifikant verringert werden (Lin et al., 1997). Schließlich zeigten immunhistochemische Untersuchungen an humanen Lebertumoren, daß die Expression von IGF-II vorwiegend in den peripheren Zellen eines Tumorherdes lokalisiert ist und dort mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 einhergeht (Sohda et al., 1997). IGF-II stellt einen wichtigen Faktor in der Hepatokarzinogenese dar, denn in IGF-II transgenen Mäusen ist die Tumorgenese erhöht, wobei es überwiegend zur Ausbildung von HCCs kommt (Rogler et al., 1994). Dafür spricht auch, daß im Plasma von mit Chemoembolisation behandelten Patienten beim Aufreten von metastasierenden HCCs eine durchgängige starke Zunahme der IGF-II-Konzentrationen im Plasma gefunden wurde (Song et al., 2001).

Die Deregulation des Zellwachstums durch IGF-II kann auch auf Mutationen oder Expressionsveränderungen der Rezeptoren für IGF-II beruhen. Auf dem Hintergrund einer Transfektion einer humanen HCC-Zelllinie mit dem Hepatitis B-Virus Transaktivator X Gen-Produkt wurde die Expression des IGF-IR stark erhöht, woraufhin die Zugabe von IGF-II zu den Zellen das Wachstum um das sechsfache beschleunigte (Kim et al., 1996). Der IGF-IIR wird zunehmend als Tumorsuppressor angesehen, was mit seiner Funktion bei der Verteilung und dem Abbau von IGF-II (De Souza et al., 1995) zusammenhängt. In etwa 60% der Lebertumoren findet man einen Verlust der Heterozygotie oder Mutationen in dem IGF-IIR, die bereits im Stadium der Ausbildung von *dysplastischen Läsionen* auftreten (Yamada et al., 1997). Die Zugabe von IGFBPs, insbesondere des IGFBP3, verlangsamte das Wachstum durch Inhibierung von IGF-II in einer humanen Hepatomazelllinie (Scharf et al., 1998). Die transkriptionelle Aktivierung des IGFBP3 und die daraus resultierende Neutralisierung von IGF-II könnte einen Teil des tumorsupprimierenden Effektes von p53 darstellen (Buckbinder et al., 1995). Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß die Expression des IGFBP3 durch Zugabe von IGF-II verstärkt wird (Scharf et al., 1998). Dies verdeutlicht wiederum, daß die Wirkung von IGF-II komplex reguliert wird und daß auch negative autoregulatorische Mechanismen wirksam sein können.

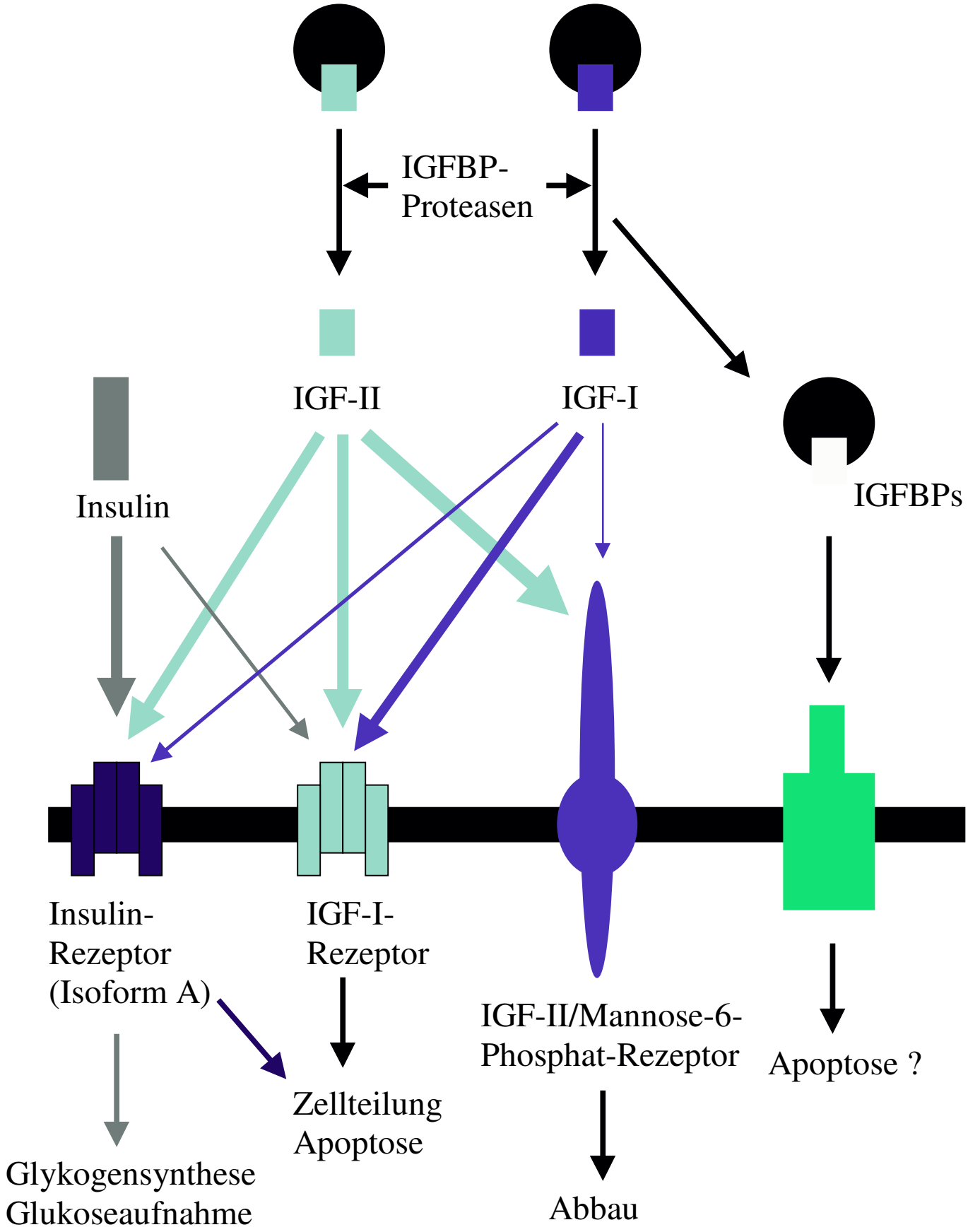


Abb. 1: Interaktion der Komponenten der IGF-Achse.
IGF-I, IGF-II und Insulin binden mit unterschiedlicher Affinität an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Affinität der Liganden zu den Rezeptoren wird durch die Dicke der Pfeile wiedergegeben. IGF-II stimuliert die Zellteilung und die Antiapoptose sowohl über den IGF-I-Rezeptor als auch über die Isoform A des Insulin-Rezeptors.

2. Problemstellung

Bislang haben Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen können, dass IGF-II in einem hohen Anteil von HCCs exprimiert wird und bei der Hepatokarzinogenese im transgenen Tiermodell wachstumsfördernd wirkt (Schirmacher et al., 1992). Die IGF-II-vermittelte autokrine Aktivierung des IGF-IR wurde in Ratteleberovalzelllinien nachgewiesen (Zhang et al., 1997b) und die mitogene und antiapoptotische Wirkung der IGF-IR-Aktivierung in IGF-IR-überexprimierenden Mausfibroblastenzelllinien aufgezeigt (Sell et al., 1995). Diese Erkenntnisse sind jedoch noch relativ allgemein hinsichtlich der jeweiligen exprimierenden Zellpopulation und der Regulation der zelltypspezifischen Expression. Insbesondere ist die IGF-II/IGF-IR-Interaktion in ihrer Konsequenz auf das Wachstum und die Apoptose noch nicht analysiert wurden. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war daher:

1. Die Expression von Komponenten der IGF-Achse in HCC-Zelllinien zu charakterisieren und die Frage zu klären, ob die Tumorzelllinien einen autokrinen Stimulationsmechanismus ausbilden;

2. Die funktionelle Bedeutung einer autokrinen Wirkung von IGF-II und der IGF-IR-Stimulation in den HCC-Zelllinien zu untersuchen;

3. Zu ermitteln, ob die IGF-II- und die IGF-IR-Stimulation bzw. –Inhibition einen Einfluss auf die Chemotherapiesensitivität ausübt;

4. Mögliche Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit der Modulation der IGF-II-Wirkung in HCCs zu ermitteln.

Anhand geeigneter Systeme sollten diese Daten an humanen Lebertumorzelllinien *in vitro* erhoben werden und hinsichtlich ihrer *in vivo* Relevanz beurteilt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeines

Standardchemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Bio-Rad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen. 15 ml- und 50 ml-Polypropylenröhrchen, Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser aus einer Millipore-Q-Plus-Anlage (Millipore, Molsheim, Frankreich) angesetzt. Die Lösungen und Materialien wurden in einem KSG 40/60 Vertikal-Autoklaven (KSG, Olching) bei 120°C und 1.2 bar in feuchter Hitze 30 Minuten lang autoklaviert. Glas- und Metallgeräte wurden vor der Verwendung 6 Stunden im Trockenschrank bei 180°C gebacken.

3.2. Allgemeine Zellkulturarbeiten

3.2.1. Zelllinien

Zelllinie	Differenzierung	Ursprungsgewebe
SK-hep-1	Epithelial	Leberadenocarcinom
Hep G2	Hepatozellulär	Hepatoblastom
Hep 3B	Hepatozellulär	HCC
HuH7	Hepatozellulär	HCC

SK-hep-1, Hep G2 und Hep 3B stammen aus der DSMZ in Braunschweig. HuH7 wurde freundlicherweise von Prof. Bartenschlager (Institut für Virologie, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Zellkulturmedien und Zusätze

FCS	Sigma, Deisenhofen
MEM-Earle	Biochrom, Berlin
RPMI1640	Biochrom, Berlin

3.2.3. Kultivierung der Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Microflow Klasse 2 (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)) mit sterilen Plastikwaren durchgeführt. Die adhärenten Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2) mit 12 ml Medium kultiviert.

Sie wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert. Dabei wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (Megafuge GPR, (Beckmann-Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA), Rotor GH-3.7, 1000 Upm, 6 min., RT). Das Sediment wurde in frischem Medium aufgenommen, gut resuspendiert und daraus $4x10^5$ Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Zählkammer nach Neubauer (s.: 3.2.6.). Die Zellen wurden regelmäßig hinsichtlich möglicher Mykoplasmenkontamination überprüft (s.: 3.2.5.). SK-hep-1, Hep G2 und HuH7 wurden in RPMI1640-Medium, das mit 10% FCS supplementiert worden war, kultiviert. Hep 3B wurden in MEM-Medium, ebenfalls unter Zusatz von 10% FCS, gehalten. Alle Zelllinien wurden bei 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus, München) inkubiert.

3.2.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen

A. Einfrieren

Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurden trypsiniert, bei 1000 Upm abzentrifugiert und in Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO (Sigma) aufgenommen. Auf jedes Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) wurden etwa $2x10^6$ Zellen verteilt. Die Einfrierröhrchen wurden zunächst in einem Styroporbehälter über Nacht bei –80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

B. Auftauen

Ein Einfrierröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und schnell bei 37°C im Wasserbad (GFL, Burgwedel) aufgetaut. Dann wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert, abzentrifugiert und erneut in frischem Medium gewaschen, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2) mit 12 ml Medium überführt und wie oben beschrieben passagiert.

3.2.5. Mykoplasmentestung

Der Test wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Boehringer Mannheim), der spezifisch in die DNA interkaliert, durchgeführt, so daß der Zellkern in den gefärbten Zellen fluoresziert, während das Zytoplasma ungefärbt bleibt. Sind die Zellen mit Mykoplasmen kontaminiert, findet sich im Bereich des Zytoplasmas und der Zellmembran eine punktförmige, durch die Mykoplasmen-DNA erzeugte Fluoreszenz. Auf die mittels UV-Licht sterilisierten Objektträger wurde ein Tropfen Zellsuspension mit einer Zelldichte von 10^4 Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für zwei Tage kultiviert, bis mindestens die

Hälfte des Objektträgers mit Zellen bedeckt war. Die Fixierung erfolgte für 2 mal 5 Minuten in Methanol/Essigsäure (3:1). Daraufhin wurden die getrockneten Objektträger für 15 Minuten mit DAPI (0.1 µg/ml in Methanol) im Dunkeln gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua bidest wurden die Objektträger getrocknet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop Aristoplan (Leica, Bensheim) mit UV-Anregung. Alle Daten im Ergebnisteil stammen von Zellen, die mykoplasmenfrei waren.

3.2.6. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Zählkammer nach Neubauer (Sigma). Hierzu wurde ein Aliquot einer gut durchmischten Zellsuspension entnommen und nach 1:1- oder 1:5-Verdünnung (je nach Zelldichte) mit einer 0.02% [v/v] Trypanblau-Lösung (Serva) in die Zählkammer pipettiert. 4 Großquadrate wurden ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen x100}}{\text{Kammerhöhe (0,1 mm) x Verdünnung x Fläche der Großquadrate (4mm}^2\text{)}} = \text{Zellzahl/ml}$$

3.3. Nachweismethoden

3.3.1. mRNA-Expression der IGFs, IGF-Rezeptoren und IGFBPs

$5x10^5$ Zellen wurden auf einer Zellkulturschale (100 x 20 mm) ausgesät. Nach 3 Tagen wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (s.: 3.5.2.), wurde nur die RNA weiterverwendet, die nach der gelektrophoretischen Auftrennung (s.: 3.5.3.) keine Degradation aufwies. Die RNA wurde in einer Speed-Vac (UniEquip, Martinsried) getrocknet, mit RNase-freiem Wasser (Gibco, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 2 µg/µl aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –70°C aufbewahrt. Die Expression der Gene wurde mittels cDNA-Microarray-Analyse bestimmt (s.: 3.5.4.).

3.3.2. Messung von IGF-II im Zellkulturüberstand

Bei der Bestimmung der Wachstumskurven (s.: 3.4.3.) wurden auch Zellkulturüberstände abgenommen. Sie wurden unverdünnt als Proben verwendet, in denen die Konzentration von freiem IGF-II mit dem ACTIVE IGF-II-ELISA (DSL, Sinsheim) nach Herstellerangaben bestimmt wurden. Er beruht auf einer enzymatischen zwei-Schritt-Sandwich-Immunfärbung. 20 µl der IGF-II-Standards (0 – 30 ng/ml) und der Proben wurden in Mikrotiterplatten

inkubiert, die mit IGF-II-Antikörper beschichtet waren. Nach der Inkubation und dem Waschen wurden die Vertiefungen mit einem zweiten IGF-II-Antikörper behandelt, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Nach der zweiten Inkubation und dem weiteren Waschen, wurden die Vertiefungen mit Tetramethylbenzidin inkubiert. Durch Zugabe von 0.2 M H_2SO_4 wurde die Farbreaktion gestoppt und die Absorption durch Messung bei der Wellenlänge 450 nm mit 620 nm als Referenz im Mikrotiterspektrophotometer Multiskan MS 6.0 (Labsystems, Helsinki, Finnland) bestimmt. Die Standards und Proben wurden jeweils im doppelten Ansatz gemessen. Der lineare Bereich der Messung erstreckte sich über den Bereich von 0.5 bis 26 ng/ml. Die molare Konzentration von IGF-II errechnet sich wie folgt: [IGF-II] nmol/ml = 0.13 x [IGF-II] ng/ml.

3.4. Wachstums- und Toxizitätsuntersuchungen

3.4.1. Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Cisplatin (Sigma) wurde in DMF (Sigma) gelöst und lichtgeschützt bei Raumtemperatur bewahrt, Etoposid (Sigma) wurde in DMSO (Sigma) gelöst und bei 4°C bewahrt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen jeweils 10 µg/µl. Unmittelbar vor Behandlung der Zellen wurden die Stammlösungen im Zellkulturmedium RPMI1640 verdünnt. Die Behandlung der Zellen erfolgte 48 h nach Aussaat über einen Zeitraum von 24 bis 72 h. Verschiedene Zytostatikakonzentrationen wurden in gleichen Volumina hinzupipettiert. Die Endkonzentration von Etoposid lag bei 0.6 bis 40 µg/ml, die von Cisplatin bei 0.15-20 µg/ml. Kontrollen mit den entsprechenden Verdünnungen der Lösungsmittel wurden ebenfalls mitgeführt.

3.4.2. Behandlung der Zellen mit IGF-II, sowie α-IGF-II- oder α-IGF-IR-Antikörpern

Nach Aufnahme von 25 µg rekombinantem, humanen IGF-II (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) in 250 µl RPMI1640 (0.1 µg/µl IGF-II) wurden 10 µl Aliquots bei –20°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Zugabe wurden sie bei RT aufgetaut, bei Bedarf weiter verdünnt und nur einmal verwendet. Der anti-Ratten α-IGF-II (Upstate Biotechnology) lag in sterilem PBS gelöst (1 µg/µl) vor. Von dem gegen den humanen IGF-IR gerichteten α-IGF-IR (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) und dem α-KLH (R&D Systems) wurden jeweils Stammlösungen (1 µg/µl) in sterilem PBS hergestellt. 48 h nach Aussaat von $3x10^3$ Zellen pro Vertiefung in eine Zellkulturmikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen (Greiner, Nürtingen) wurde

rekombinantes, humanes IGF-II in Endkonzentrationen von 2 bis 200 ng/ml hinzugegeben. Zur Neutralisierung wurden 100 µg/ml α-IGF-II oder 10 µg/ml α-IGF-IR eingesetzt. Irrelevanter α-KLH wurde als Negativ-Kontrolle in gleichen Endkonzentrationen zugegeben. Bei kombinierten Behandlungen wurden IGF-II, α-IGF-II oder α-IGF-IR jeweils 1 h vor Gabe des Zytostatikum zu den Zellen gegeben.

3.4.3. Bestimmung des Zellwachstums

$2x10^5$ Zellen wurden in Zellkulturschalen (60 x 15 mm) mit 5 ml Medium ausgesät. Die Zellzahl wurde in bestimmten Zeitabständen (etwa alle 24 h) nach der Aussaat bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer (s.: 3.2.6.) ausgezählt. Wachstumskurven wurden parallel von Zellen erstellt, die 48 h nach Aussaat mit Zytostatika behandelt worden waren.

Zusätzlich wurde das Zellwachstum über den Proliferations-und Zytotoxizitätstest EZ4U (Biomedica, Wien, Österreich) (s.: 3.4.4.) bestimmt. Hierzu wurden $3x10^3$ Zellen in jede Vertiefung einer Zellkulturmikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen ausgesät und das Wachstum nach Substratumsatz durch spektrophotometrische Absorptionsmessung quantifiziert.

3.4.4. Proliferations- und Zytotoxizitätstest

Die Proliferation und die Sensitivität der Zellen gegenüber Zytostatika wurde mit dem MTT-verwandtem Test EZ4U nach Herstellerangaben bestimmt. Die Methode beruht auf der Entdeckung, daß lebende Zellen schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate reduzieren. Dies erfordert intakte Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle inaktiv werden.

48 h vor Behandlung wurde eine Zellsuspension mit $3x10^3$ Zellen in 200 µl Medium auf jede der 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Verdünnungen von Etoposid und Cisplatin in konstanten Volumina wurden alleine oder in Kombination mit rekombinantem IGF-II oder α-IGF-II oder α-IGF-IR oder α-KLH für Behandlungszeiträume von 24 bis 72 h zugegeben. Nach Entfernung des Mediums und Zugabe von 200 µl frischem Medium wurden 20 µl des Tetrazoliumreagenz hinzupipettiert. Nach Inkubation für 3 h bei 37°C im Brutschrank, wurde die Absorption des von den Zellen gebildeten ziegelroten Formazan-Derivats bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm im Mikrotiterplatten-spektrophotometer gemessen. Zusätzlich wurde unmittelbar vor der Behandlung der Substratumsatz von Zellen, die im parallelen Ansatz auf einer anderen Platte

ausgesät wurden waren, bestimmt. Die erhaltene Absorption wurde von der Absorption der behandelten Zellen abgezogen (Δ OD). Alle Messungen lagen im linearen Bereich des Tests.

3.4.5. Vitalfarbstoff-Färbung

Trypanblau ist stark negativ geladen. Daher kann es nicht in die intakte Zellen gelangen. Tote Zellen nehmen den Farbstoff über Löcher in der Zellmembran auf und werden dadurch blau angefärbt. 48 h vor der Behandlung wurden 2x105 Zellen in Zellkulturschalen (60 x 15 mm) mit 5 ml Medium ausgesät. Zum entsprechenden Zeitpunkt nach der Behandlung wurden die Zellen abtrypsiniert und mit dem Medium des Überstands vereinigt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen abtrypsiniert und in 1 ml Medium aufgenommen. Davon wurden 20 µl mit 20 µl 0.2 % [v/v] Trypanblaulösung (in PBS) verdünnt und die Zahl toter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (s.: 3.2.6.) bestimmt. Zu den toten Zellen wurden sowohl vergrößerte, runde, tiefblaue Zellen, wie auch Zellfragmente zusammengefaßt.

3.4.6. Apoptosenachweis durch TUNEL- und Propidiumiodidfärbung

48 h vor der Behandlung wurden $2x10^5$ Zellen in Zellkulturschalen (60 x 15 mm) mit 5 ml Medium ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die abgeschwommenen Zellen gesammelt und anschließend mit den adhärenten Zellen, die abtrypsiniert wurden, vereinigt. Nach der Zentrifugation (Rotor GH-3.7, 1000 Upm, 5 min., RT), wurden die Zellen in PBS verdünnt und Zytospin-Präparate hergestellt. Die TUNEL-Färbung wurde mit dem Apoptosis Detection System (Promega, Mannheim) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 4%iger Formaldehyd-Lösung (4°C, 30 min.) fixiert. Nach dem Waschen, der Permeabilisierung der Zellmembran mit 0.2% Triton-X 100 (4°C, 5 min.), und nochmaligem Waschen, wurden die Zellen für 1 h bei 37°C im Dunkeln mit dem Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, Fluorescein-12-dUTP) und Terminaler desoxynucleotidyl Transferase (TdT) inkubiert. Die TdT baut dabei auch das Fluorescein-12-dUTP an die freien 3´-Hydroxyl-Enden der DNA ein. Die Fragmentierung der DNA durch endogene Endonukleasen in Multimere von 180 bis 200 Basepaaren ist ein Hauptcharakteristikum der Apoptose. Somit können apoptotische Zellen durch Anregung der Grünfluoreszenz des Fluorescein identifiziert werden. Nach dem Abstoppen der Reaktion in 2xSSC und dem Waschen wurden die Zellkerne mit Propidiumiodid (Sigma), das in die DNA interkaliert, gegengefärbt. Anschließend wurden in jedem Experiment mindestens 500 Zellen unter der 400- bzw. 630-fachen Vergrößerung untersucht. Neben der Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen wurden die Propidiumiodid-gefärbten Zellen unter den Gesichtspunkten

typischer morphologischer Merkmale der Apoptose (Chromatin Kondensation, Karryhorhexis, apoptotische Körperchen) beurteilt. Parallel wurden Aliquots einer Vitalfarbstoff-Färbung (s.: 3.4.5.) unterzogen.

3.4.7. Statistische Analysen

Die Experimente mit dem Proliferations-und Zytotoxizitätstest EZ4U (s.: 3.4.4.) wurden mindestens im dreifachen Ansatz und mehrfach durchgeführt. Daher konnte die Sensitivität der Zellen bei verschiedenen Behandlungen statistisch auf Unterschiede untersucht werden. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde über den einfachen ANOVA (Analysis of Variance) mit Bonferronis post test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde vor der Datengewinnung auf 5% festgelegt. Die Mittelwerte sind mit den Standardabweichungen dargestellt. Durch folgende *P*-Werte wird das Signifikanzniveau festgelegt: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) und $P < 0.001$(***). Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Computer Software GraphPadInStat, Version 3.01 für Windows 95, (Graph Pad Software, Kalifornien, USA).

3.5. Molekularbiologische Untersuchungen

3.5.1. mRNA-Status nach Behandlung mit IGF-II oder α-IGF-II-Antikörpern

Zur Untersuchung von Veränderungen im mRNA-Status der Lebertumorzelllinien nach Blockade von IGF-II und nach Stimulation mit IGF-II, wurden jeweils $4x10^5$ Zellen in zwei Zellkulturschalen (100 x 20 mm) in 10 ml Medium mit 10% FCS ausgesät. 48 h nach Aussaat wurden die Zellen behandelt. Zur Blockade von IGF-II wurde α-IGF-II zugegeben, die zugehörige Kontrolle wurde mit dem Kontrollantikörper α-KLH in gleicher Konzentration inkubiert. Vor der Behandlung erfolgte kein Mediumwechsel, damit die Effekte der Blockade des autokrin sezernierten IGF-II beobachtet werden konnten. Bei Stimulation mit IGF-II wurden die Zellen 48 h nach der Aussaat vom Medium, dem 10% FCS zugesetzt wurden war, auf Medium ohne FCS gesetzt, damit die Wirkung des extern zugesetztem IGF-II weder durch Serumkomponenten, noch durch zuvor autokrin sezerniertes IGF-II überlagert wurde. Am Ende der Behandlung wurde die RNA mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) isoliert. Nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (s.: 3.5.2.) und der Beurteilung der RNA-Qualität (s.: 3.5.3.), wurde die Kontroll-Probe mit der behandelten Probe in der cDNA-Microarray-Analyse (s.: 3.5.4.) verglichen.

3.5.2. Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV Spektrophotometer (U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) ermittelt. Die Extinktion E260 = 1.0 entspricht einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA (Sambrook et al., 1989). Um mögliche Proteinverunreinigungen der Proben zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm berechnet, wobei nukleinsäurehaltige Lösungen als ausreichend rein angesehen wurden, wenn der E260/E280-Quotient $\geq$ 1,8 betrug.

3.5.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in formaldehydhaltigen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung eines 1%igen Formaldehydgels wurde 1g Agarose in 74 ml DEPC-H_2O aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 10 ml 10x Laufpuffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumaceteat, 10 mM EDTA, pH 7.0), 16.2 ml 37%iges Formaldehyd und 6 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] zugegeben und das Gemisch direkt in einen DEPC-behandelten Gelträger gegossen. 10 µg Gesamt-RNA wurden in 4 µl DEPC-H_2O gelöst, und 7.7 µl Probenpuffer (1 x Laufpuffer, 17.5% [v/v] deionisiertes Formamid, 6.5%[v/v] Formaldehyd) zugegeben. Das Gemisch wurde bei 65°C 5 Minuten lang denaturiert und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 3 µl 5x Ladepuffer (5x Laufpuffer, 0.25% [w/v] Bromphenolblau, 15% [w/v] Ficoll Typ 400) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 70 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Gellauf wurde im langwelligen UV-Licht analysiert und photographiert.

3.5.4. cDNA-Microarray-Analyse

Als Ausgangsmaterial wurde für jede Probe 4 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 2 µl in verschiedenen ATLAS Arrays (Human cDNA Expression, Human 1.2., Human Cancer 1.2. und Human Apoptosis (Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA)) eingesetzt. Die auf den Arrays gespotteten cDNAs (bis zu 1176) bestehen aus 200 bis 600 bp langen, mRNA-spezifischen Sequenzen. Die Gesamt-RNA wurde einer RT-PCR-Reaktion mit der MMLV Reversen Transkriptase im Multi Thermal Cycler PTC-200 (Biozym, Oldendorf) unterworfen. Dabei wurden für die auf die Nylonmembranen gespotteten cDNAs sequenzspezifischen Primer, die Nukleotide (dCTP, dGTP, dTTP, jeweils 5 mM) und α-^{32}P-dATP (spezifische

Aktivität: 111 TBq, 3000 µCi/mmol (Amersham-Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Nach der Markierung wiesen die Proben eine spezifische Aktivität von 10-20 x 10^6 cpm auf. Nach der Prähybridisierung der Membranen (1 h, 68°C), erfolgte die Hybridisierung der markierten Proben mit den auf die Nylonmembran gespotteten cDNAs über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen (Labotec, Wiesbaden). Am nächsten Tag wurden die Membranen viermal für eine halbe Stunde bei geringer Stringenz (2x SSC, 1% SDS; 68°C) und daraufhin für eine halbe Stunde hochstringent (0.1x SSC, 0.5% SDS; 68°C) gewaschen. Nachdem die Membranen in 2xSSC gewaschen wurden, wurden sie in Klarsichtfolie eingeschweißt und für 24 h bis 48 h gegenüber einem Phosphor-Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien, USA) exponiert. Die erzeugten Signale wurden über den Phosphor-Imager Storm 840 (Molecular Dynamics) eingelesen und mittels der Software Image Quant (Molecular Dynamics) und der Software ATLAS Image 1.0 (Clontech) ausgewertet. Bedingung für den Vergleich der Stärke von zwei Signalen auf verschiedenen Arrays war der Normalisierung der jeweiligen Signalstärken gegenüber dem jeweiligen Hintergrundwert. Hierzu wurden die Signalstärken der gespotteten Housekeeping cDNAs bei den im Vergleich untersuchten Arrays aufeinander abgeglichen. Nur wenn sich Signale mindestens um den Faktor 2 unterschieden, wurden sie als in der Menge relevant veränderte Transkripte registriert. Außerdem wurden Signale, die verändert erschienen nochmals optisch kontrolliert, um Artefakte auszuschließen.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von IGF-II und IGF-bindenden Rezeptoren in humanen Lebertumorzelllinien

4.1.1. mRNA-Expression von Komponenten der IGF-Achse

Die Bestimmung der mRNA-Expression von Komponenten der IGF-Achse (IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR, IR-Pr., IGFBP1-6) in den HCC-Zelllinien, wurde mittels Nylon cDNA-Microarrays (Human 1.2 und Human Cancer 1.2) durchgeführt. In der Tabelle 2 sind die Stärken der Hybridisierungssignale in Bereichen vom Vielfachen des Wertes, der gegenüber dem Hintergrund als positives Signal gilt, angegeben. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich wird, exprimierten SK-hep-1, Hep G2, Hep 3B und HuH7 den IGF-IR und den IGF-IIR. Nur bei den SK-hep-1 war keine IGF-II-mRNA nachweisbar. In der Abbildung 2 ist das Muster der RNA-Expression beispielhaft für die Zelllinie HuH7 gezeigt.

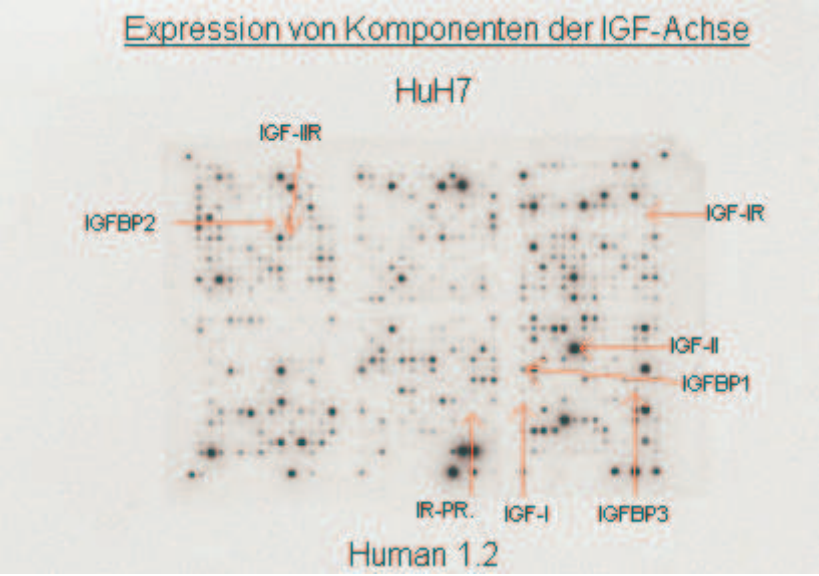


Abb. 2: Expression von Komponenten der IGF-Achse in HuH7-Zellen.

Die mRNA aus 4 µg Gesamt-RNA wurde in einer RT-PCR-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und auf den Human 1.2 Atlas (Clontech) hybridisiert. Die Signale der Komponenten der IGF-Achse sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte mit der Software Image Quant.

Tab. 2: Expression von Komponenten der IGF-Achse in HCC-Zelllinien.

	SK-hep-1	Hep G2	Hep 3B	HuH7
IGF-I	+	+	+	+
IGF-II	negativ	+++++	+++++	+++++
IGF-IR	+	+	+	+
IGF-IIR	+++	++	+++	++
IR-PR.	negativ	+	+	+
IGFBP1	++	++++	++	++++
IGFBP2	+++	negativ	negativ	+
IGFBP3	++++	negativ	+	++
IGFBP4	n.u.	n.u.	negativ	negativ
IGFBP5	n.u.	n.u.	negativ	negativ
IGFBP6	n.u.	n.u.	negativ	negativ

Zur Unterscheidung wurden folgende Größenbereiche ausgewählt:

Wert ≥ 100fach über Hintergrundwert:	+++++
Wert 10 bis 100fach über Hintergrundwert:	++++
Wert 5 bis 10fach über Hintergrundwert:	+++
Wert 2 bis 5fach über Hintergrundwert:	++
Wert 1 bis 2fach über Hintergrundwert:	+
Wert ≤ Hintergrundwert:	negativ
n. u.:	nicht untersucht

4.1.2. IGF-II-Sekretion

Im Folgenden wurde die Sekretion von IGF-II untersucht. Der ELISA wies ungebundenes humanes IGF-II nach, jedoch nicht IGF-II, das an Rezeptoren, IGF-bindende Proteine oder anderweitig gebunden bzw. internalisiert ist. Wie aus der Abbildung 3 hervorgeht, reicherten die HCC-Zellinien Hep G2, Hep 3B und HuH7 IGF-II im Überstand an, wohingegen kein IGF-II im Überstand der Zelllinie SK-hep-1 nachweisbar war. Bovines IGF-II wurde mit dem ELISA nicht detektiert. Im Verlauf des Zellwachstums akkumulierte ungebundenes IGF-II in den Überständen aller IGF-II-positiven Zelllinien. Wie man aus der Tabelle 3 entnehmen kann, blieben die Konzentrationen von IGF-II im Überstand von Hep G2 und Hep 3B der Zellzahl gegenüber annähernd konstant. Bei den HuH7 Zellen reicherte sich das IGF-II relativ zur Zellzahl fortlaufend an. Die Zelllinien Hep G2, Hep 3B und HuH7 sezernierten IGF-II in derart hohen Konzentrationen, daß beträchtliche Mengen an freiem, funktionell-aktivem IGF-II vorlagen.

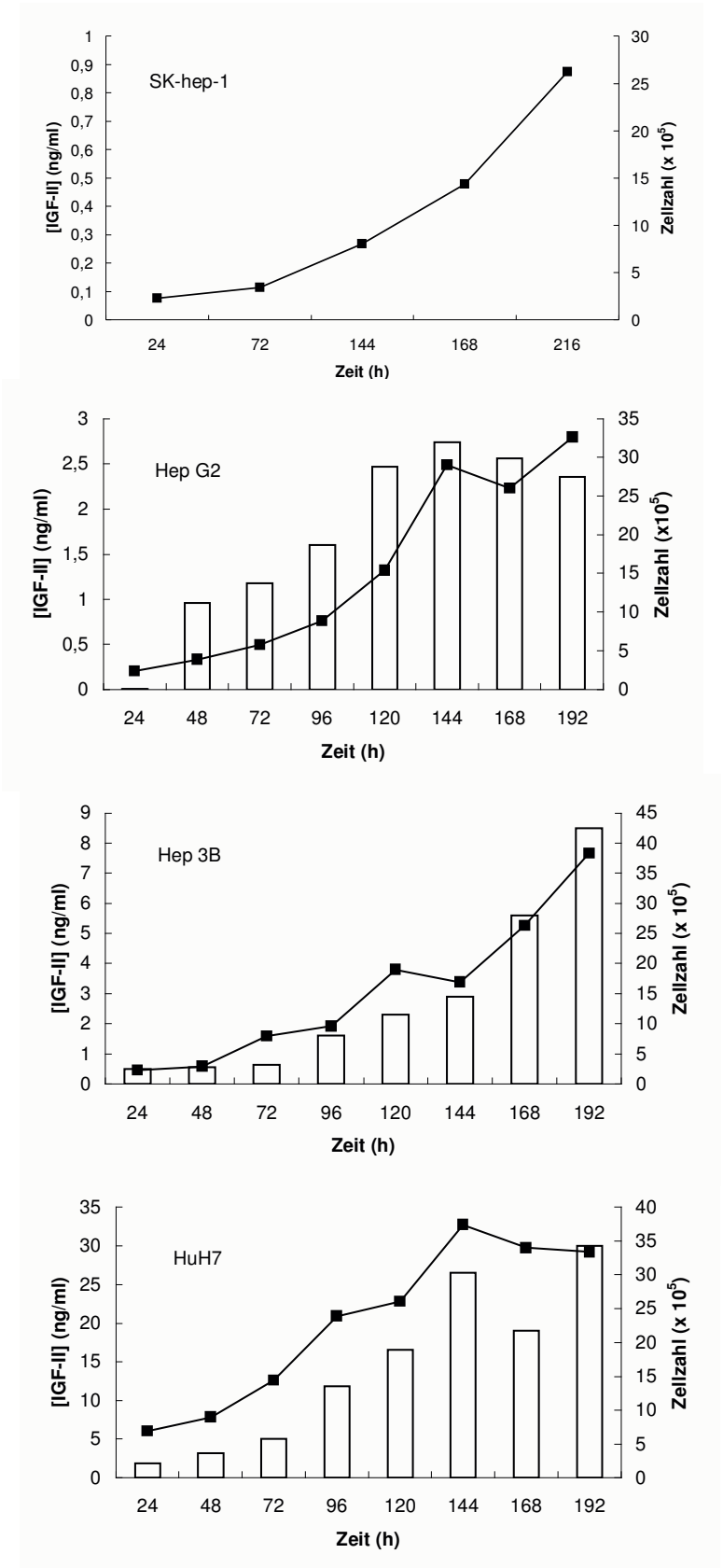


Abb. 3: Wachstum umd IGF-II-Sekretion von kultivierten humanen HCC-Zelllinien.
$2x10^5$ Zellen wurden jeweils auf eine Zellkulturschale (60 x 15 mm) ausgesät. Die Zellzahl (Linien) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Dabei wurden auch die Überstände abgenommen und nachfolgend die Konzentrationen des ungebundenen IGF-II im ELISA gemessen.

Tab. 3: IGF-II-Konzentrationen im Überstand von HCC-Zelllinien.

	Lebertumorzelllinien			
	SK-hep-1	Hep G2	Hep 3B	HuH7
Zeitpunkt nach Aussaat (h)	[IGF-II] (pg/ml)/ 10^5 Zellen	[IGF-II] (pg/ml)/ 10^5 Zellen	[IGF-II] (pg/ml)/ 10^5 Zellen	[IGF-II] (pg/ml)/ 10^5 Zellen
24	0	40	220	270
48	n.u.	250	190	350
72	0	200	80	350
96	n.u.	180	170	500
120	n.u.	160	120	640
144	0	90	170	700
168	0	140	210	560
192	n.u.	70	220	900

4.2. Untersuchung der Wirkung von IGF-II, sowie α-IGF-II- und α-IGF-IR-Antikörpern auf das Wachstum und das Überleben humaner HCC-Zelllinien

4.2.1. Aufbau des Meßsystems

4.2.1.1. Bestimmung der grundlegenden Versuchsgrößen

Zur quantitativen Bestimmung des Wachstums der HCC-Zellinien wurde der MTT-verwandte Test EZ4U verwendet, der die Zahl vitaler Zellen als Funktion der Menge des in den Mitochondrien umgesetzten Substrates bestimmt. Zunächst waren die Versuchsbedingungen zu finden, unter denen die folgenden Bedingungen gewährleistet waren:

1. Zwischen der nach dem Umsatz des Farbstoffs gemessenen Absorption und der Zellzahl sollte eine lineare Beziehung bestehen. Dazu mußte die Anzahl der Zellen, die ausgesät wurden, so eingestellt werden, daß die gemessene Absorption auch nach 120-stündigem Wachstum der Zellzahl proportional blieb. Dies war nur dann der Fall, wenn die Zellen im Laufe der Inkubation nicht bis zur Konfluenz wuchsen. Hierin war auch die Forderung, den Einfluß der Behandlungen auf das Wachstum einer exponentiell wachsenden Zellkultur zu untersuchen, enthalten.
2. Der Substratumsatz durch die Mitochondrien der Zellen vor der Messung, durfte ebenfalls nur so lange erfolgen, wie eine lineare Beziehung zwischen der Absorption und der Zellzahl bestand.

Zunächst wurde, wie in Abbildung 4 gezeigt, die Absorption von Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl bestimmt. Die Regressionsanalyse ergab eine positive Korrelation ($r = 0,96$) zwischen der Absorption und einer Zellzahl von bis zu $5x10^4$ Zellen. Wie aus der Abbildung 5 hervorgeht, blieb die lineare Beziehung zwischen den 120 h nach der Aussaat gemessenen Absorptionen und den Zellzahlen der initial ausgesäten Verdünnungsreihe bestehen. Die Regressionsanalyse ergab eine positive Korrelation ($r = 0,99$). Nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff wurden Absorptionswerte erhalten, bei denen die geforderte lineare Beziehung zwischen der Absorption und der Zellzahl gegeben war.

In jedem der folgenden Versuche wurde jeweils eine Verdünnungsreihe mitgeführt, um aus der Regressionsgeraden, die sich aus der Verdünnungsreihe ableiten ließ, die relative Zellzahl in den behandelten Proben berechnen zu können. Auf allen weiteren Vertiefungen der Platte (Kontrollen und Behandlungen) wurden $3x10^3$ Zellen ausgesät. Die Behandlungen erfolgten in Medium mit 10% FCS, da die Zellen in dieser Dichte ohne Serumzugabe kein oder nur ein stark verlangsamtes Wachstum und eine hohe Nekroserate (> 20%) aufwiesen.

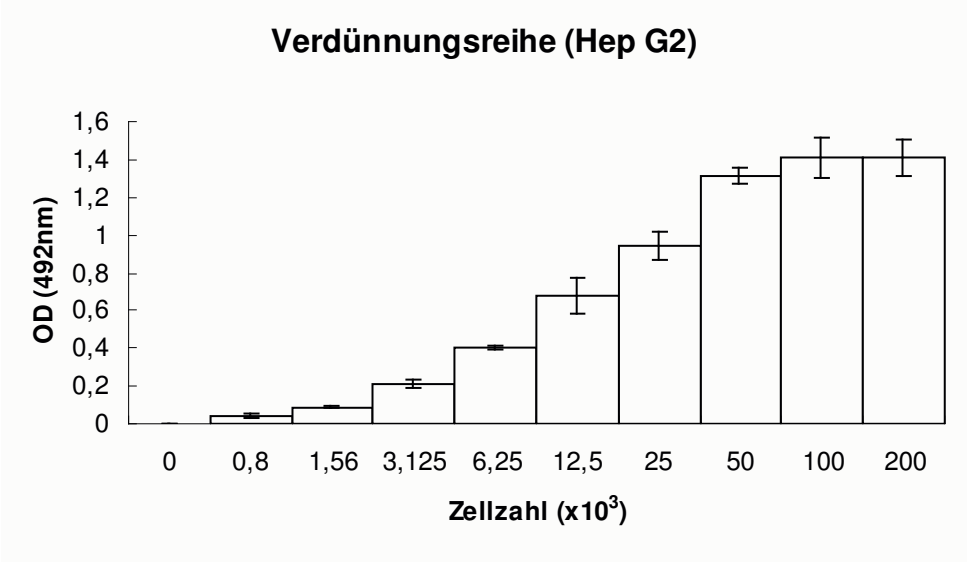


Abb. 4: Substratumsatz (OD (492nm)) als Funktion der Zahl von Hep G2-Zellen.
Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension von Hep G2-Zellen wurde auf den Vertiefungen der 96-Well-Platte eine Verdünnungsreihe ausgesät. 6 h nach Aussaat adhärierten die Zellen auf dem Boden der Platte. Daraufhin wurde der Umsatz des Substrates photometrisch bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung.

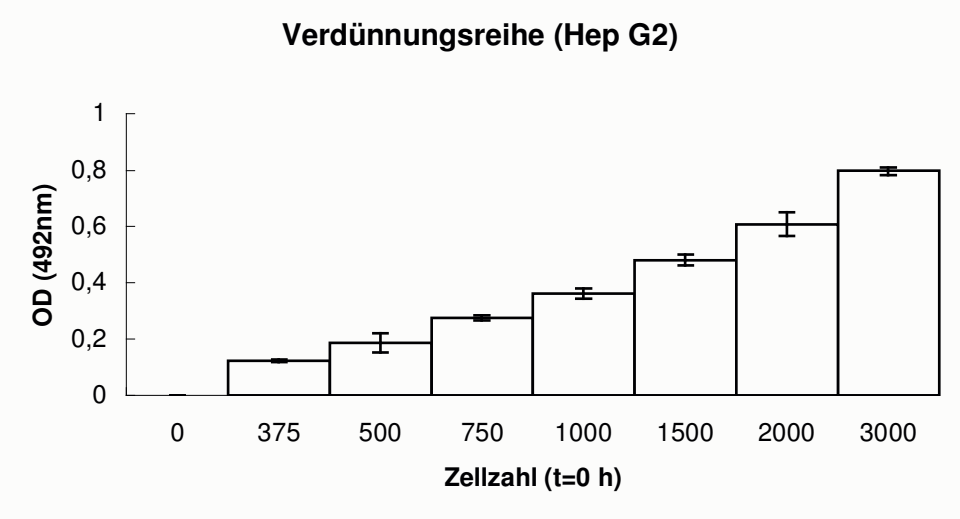
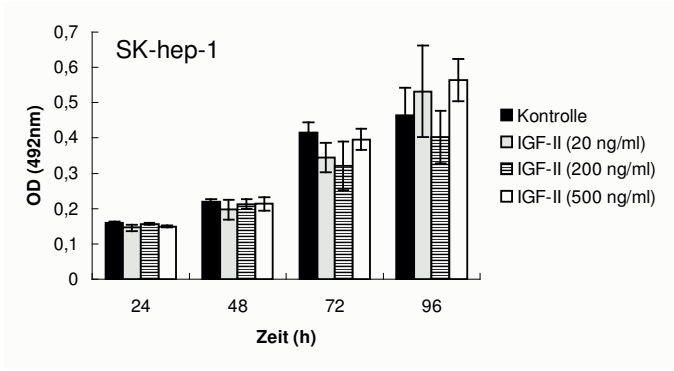
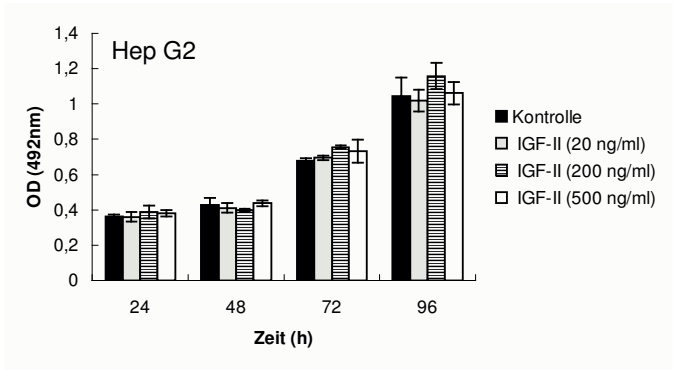


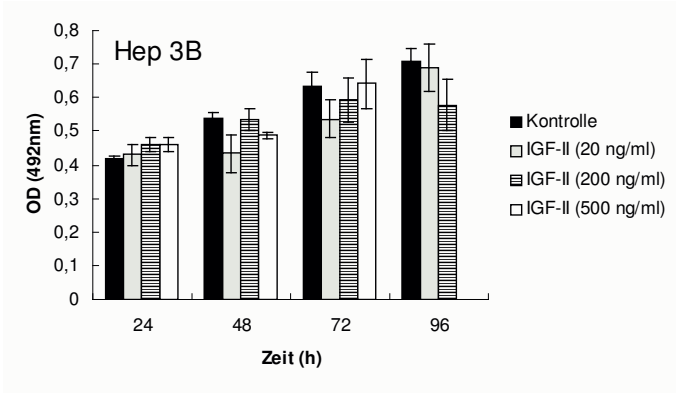
Abb. 5: Substratumsatz (OD (492nm)) nach 120 h als Funktion der initial ausgesäten Zahl von Hep G2-Zellen.
Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension von Hep G2-Zellen wurde auf den Vertiefungen der 96-Well-Platte eine Verdünnungsreihe ausgesät. 120 h nach Aussaat wurde der Umsatz des Substrates photometrisch bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung.

4.2.2. Untersuchung der Wirkung der IGF-II-Zugabe

Der Einfluß von IGF-II auf das Wachstum der HCC-Zelllinien wurde untersucht. Wie in der Abbildung 6 dargestellt ist, konnten zwischen den mit IGF-II behandelten und den unbehandelten Zellen keine Unterschiede im Wachstum festgestellt werden. Das Wachstum der Zellen wurde über einen Zeitraum von 24 h bis 96 h nach Zugabe von IGF-II bestimmt. Zu keinem Zeitpunkt ließ sich, auch bei Variation der eingesetzten IGF-II-Konzentrationen, das Wachstum beeinflussen. In einigen Experimenten wurde IGF-II direkt nach Aussaat oder auch 2 h, 4 h und 24 h nach Aussaat zu den Zellen gegeben, anstatt wie üblicherweise 48 h nach Aussaat. In anderen Experimenten wurde IGF-II in Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1 µg/ml zugegeben. Doch sowohl die Veränderung des Behandlungszeitpunktes, wie auch die der IGF-II-Konzentration beeinflußte das Wachstum der Zellen nicht. Auch die Stimulation der Zellen mit IGF-II unter Verwendung serumfreien Mediums blieb ohne Wirkung auf das Wachstum der Zellen. Die externe Gabe von IGF-II zu den HCC-Zelllinien wirkte auch nicht auf das Überleben der Zellen ein. Die Anzahl Trypan-Blau-positiver und apoptotischer Zellen blieb nach Gabe von IGF-II unverändert, wobei die unbehandelten Kulturen allerdings schon nur bis zu maximal 10 % Trypan-Blau-positive Zellen aufwiesen und Apoptosen selten waren (< 2%). Die biologische Aktivität des eingesetzten IGF-II wurde überprüft, indem das Wachstum der Brusttumorzelllinie MCF-7, in Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten (Karey und Sirbasku, 1988), stimuliert wurde.







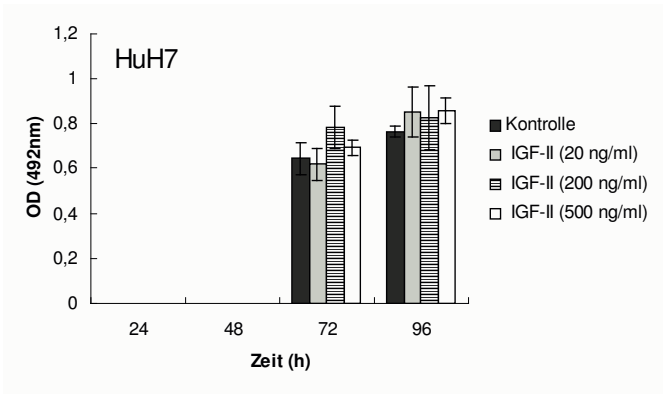


Abb. 6: Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach IGF-II-Zugabe.
Die Aussaat der Zellen und die Behandlung erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IGF-II in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellzahl wurde nach Umsatz des Substrates photometrisch gemessen. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung.

4.2.3. Untersuchung der Wirkung der IGF-II-Blockierung.

Mit der Feststellung, daß die Zugabe von IGF-II keine nachweisbare Wirkung auf das Wachstum der HCC-Zelllinien hatte, konnte die Annahme, daß IGF-II eine mitogene Wirkung auf die HCC-Zelllinien ausübt, angesichts der Sekretion hoher IGF-II-Konzentrationen, nicht ausgeschlossen werden, da das sezernierte IGF-II das Wachstum der HCC-Zelllinien maximal stimulieren könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die HCC-Zelllinien mit neutralisierenden α-IGF-II-Antikörpern inkubiert. Aus der Abbildung 7 geht hervor, daß das Wachstum der Zelllinien Hep G2, Hep 3B und HuH7 nach Neutralisierung von IGF-II vermindert wurde. Die Zugabe von α-IGF-II hatte jedoch keinen Einfluß auf das Wachstum der Zelllinie SK-hep-1. Bei der Zelllinie Hep 3B hemmte die Neutralisierung von IGF-II das Wachstum nahezu vollständig. Bei den Zelllinien Hep G2 und HuH7 wurde das Wachstum um etwa 40% verringert. In den Zelllinien Hep G2 und HuH7 wurde die wirksame Konzentration des α-IGF-II bestimmt. Die stärkste Hemmung wurde bei der höchsten getesteten Antikörperkonzentration von 100 µg/ml erzielt, die in allen weiteren Versuchen eingesetzt wurde. Die Versuche zeigten, daß das Wachstum aller IGF-II sezernierenden Zellen durch die Neutralisierung von IGF-II verringert wird. Das Überleben blieb in der exponentiellen Wachstumsphase nach Neutralisierung von IGF-II jedoch unverändert. Bei Einsatz konfluenter Kulturen nahm die Zahl Trypan-Blau-positiver Zellen nach Neutralisierung von IGF-II drastisch zu (s.: Abb. 8).

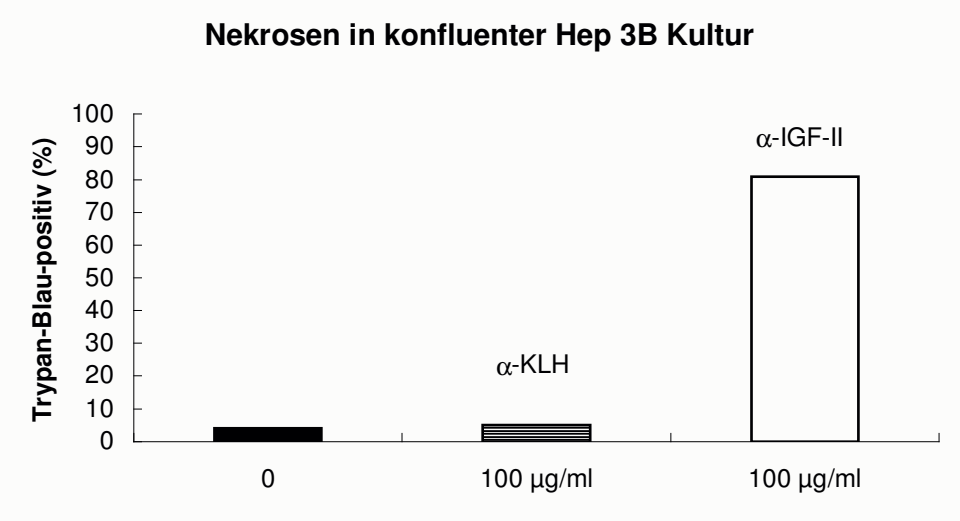


Abb. 8: Überleben von konfluenten Hep 3B-Zellen nach Zugabe von α-IGF-II.
$2x10^5$ Zellen wurden auf eine Zellkulturschale (60x 15mm) ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen von α-IGF-II und dem Kontrollantikörper α-KLH inkubiert. Angegeben ist die Zahl Trypan-Blau-positiver Zellen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

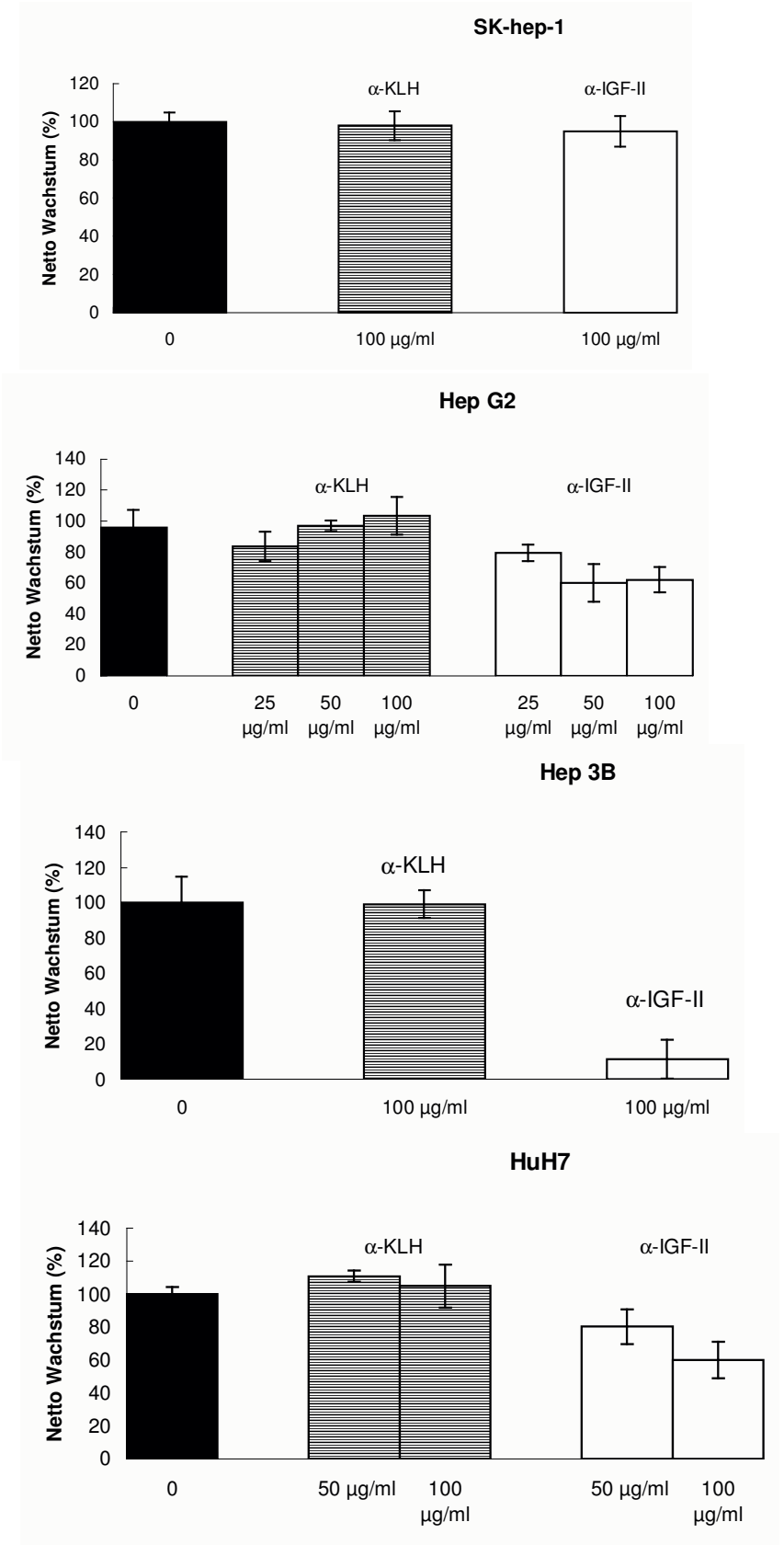


Abb. 7: Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach Zugabe von α-IGF-II.
Die Aussaat der Zellen und die Behandlung erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden für 72 h mit α-IGF-II und dem Kontrollantikörper α-KLH in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zellzahl wurde nach Umsatz des Substrates photometrisch gemessen. Angegeben ist das Wachstum nach Beginn der Behandlung, wobei der Wert der unbehandelten Kontrollen auf 100% angeglichen wurde. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung.

4.2.4. Untersuchung der Wirkung der IGF-IR-Blockierung

Sollte IGF-II das Wachstum der HCC-Zelllinien ausschließlich über den IGF-IR stimulieren, dann ist anzunehmen, daß die Blockade des IGF-IR das Wachstum der Zellen in ähnlichem Maße, wie die Blockade von IGF-II, hemmt. Wie die Abbildung 9 zeigt, wurde das Wachstum durch Zugabe des α-IGF-IR bei der Zelllinie Hep G2 mit etwa 40% in ähnlichem Maße, wie nach Gabe des α-IGF-II, verringert. Die Hemmung des Wachstums durch den α-IGF-IR hing von der eingesetzten Konzentration ab und erreichte ihr Maximum bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 µg/ml. Bei den anderen Zelllinien hemmte der α-IGF-IR das Wachstum nicht. Auch bei weiteren Versuchen in denen Hep 3B und HuH7 mit dem α-IGF-IR für 48h und 96h inkubiert wurden, konnte keine Wirkung beobachtet werden. Weder bei den Hep G2, noch bei den anderen Zelllinien fand sich nach Trypan-Blau-Färbung oder nach Propidumiodid-Färbung eine Zunahme avitaler oder spezifisch apoptotischer Zellen. Somit reagierte nur die Zelllinie Hep G2 auf die Neutralisierung des IGF-IR mit vermindertem Wachstum, das Überleben wurde jedoch nicht beeinflußt.

In der Abbildung 10 sind die Wirkungen von IGF-II, α-IGF-II und α-IGF-IR auf das Wachstum der HCC-Zelllinien zusammengefasst.

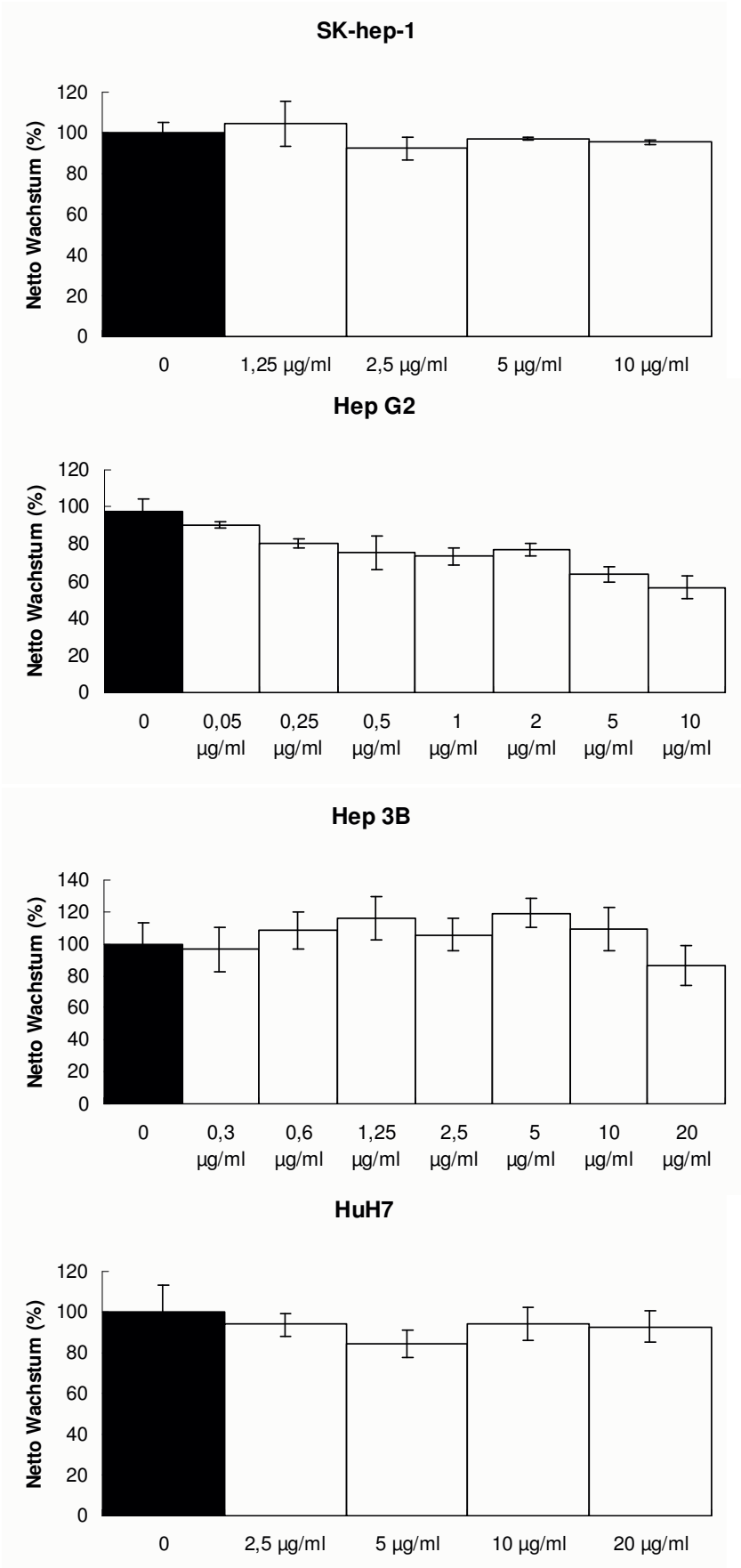
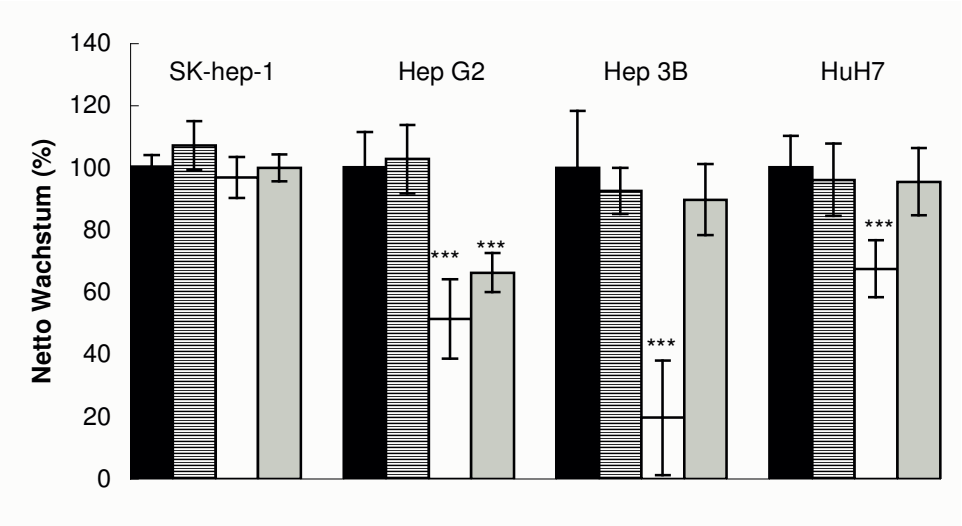


Abb. 9: Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach Zugabe von α-IGF-IR.
Die Aussaat der Zellen und die Behandlung erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden für 72 h mit α-IGF-IR (offene Balken) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Dann wurde die Zellzahl nach Umsatz des Substrates photometrisch bestimmt. Angegeben ist das Netto Wachstum, wobei der Wert der unbehandelten Kontrollen (geschlossene Balken) auf 100% angeglichen wurde. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung.

A.



B.

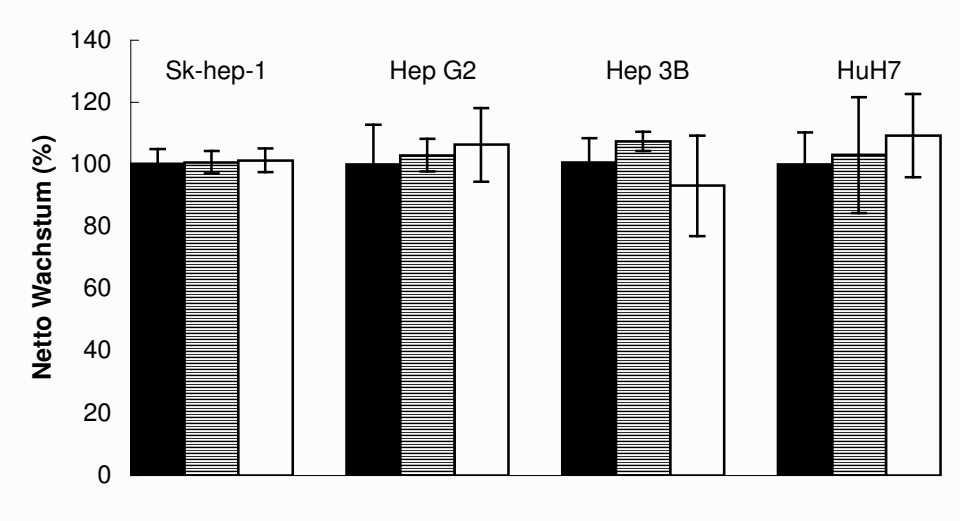


Abb. 10: Wirkung von IGF-II auf das Wachstum von HCC-Zelllinien.
In jedem Experiment wurden $3x10^3$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. 48 h nach der Aussaat wurden sie für 72 h behandelt. Angegeben sind die relativen Wachstumsraten, wobei der Wert der unbehandelten Kontrollen auf 100% gesetzt wurde.
(A) Inkubation mit α-IGF-II (100 µg/ml) (offene Balken), α-IGF-I-R (10 µg/ml) (graue Balken) und dem Kontroll-Antikörper α-KLH (100 µg/ml) (gestreifte Balken) und ohne Antikörper (geschlossene Balken).
(B) Inkubationen mit 20 ng/ml (gestreifte Balken) und 200 ng/ml rekombinantem humanem IGF-II (offene Balken) und ohne rekombinante Proteine (geschlossene Balken). Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen, die im dreifachen Ansatz durchgeführt wurden ± Standardabweichung. Die Signifikanz wurde nach Bonferoni´s post t test berechnet (***, $p< 0.001$; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$).

4.3. Untersuchung der Wirkung der Zytostatika Etoposid und Cisplatin auf das Wachstum und das Überleben humaner HCC-Zelllinien

4.3.1. Bestimmung des Wachstums und der Nekrose

Der Einfluß von Etoposid und Cisplatin auf das Wachstum und die Vitalität von Hep G2- und Hep 3B-Zellen wurde untersucht. Das Wachstum der Zellen wurde mit steigender Dosis von Etoposid (s.: Abb. 11A) oder Cisplatin (s.: Abb. 11B) zunehmend gehemmt. Der toxische Effekt der Zytostatika wurde im selben Versuchsansatz über die Aufnahme des Farbstoffes Trypan-Blau in die Zellen verfolgt. Wie in der Abbildung 11 gezeigt ist, erhöhte sich der Anteil nekrotischer Zellen bei Zunahme der Zytostatikadosis. Bei Hep G2- und Hep 3B-Zellen konnten nach 72-stündiger Behandlung zwei Wirkungen der Zytostatika, die von den eingesetzten Konzentrationen abhängig waren, unterschieden werden: im niedrigen Dosisbereich erhöhte sich der Anteil der nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bis auf den dreifachen Wert. Das Wachstum wurde in diesem Dosisbereich verlangsamt, aber nicht vollständig gehemmt. Dieser Dosisbereich wird im Folgenden als zytostatischer Dosisbereich bezeichnet. Im höheren Dosisbereich stieg der Anteil avitaler Zellen auf über 30% an. Hier wurde das Wachstum der Zellen nach der Behandlung vollständig inhibiert. Dieser Dosisbereich wird im Folgenden als zytotoxischer Dosisbereich bezeichnet. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Hep G2- und Hep 3B-Zellen hinsichtlich der Zytostatikawirkung. Der zytotoxische Dosisbereich des Etoposids begann bei circa 10 µg/ml, der von Cisplatin bei circa 1,25 µg/ml. Betrachtet man den Zeitverlauf des Wachstums und des Zelltodes, so traten deutliche Unterschiede in der Wirkung verschiedener Etoposidkonzentrationen erst 48 h nach Beginn der Behandlung auf und verstärkten sich mit zunehmender Behandlungsdauer. Allein das vermehrte Auftreten nekrotischer Hep G2 Zellen konnte bereits 24 h nach der Behandlung mit Etoposid beobachtet werden. Cisplatin induzierter Zelltod war früher zu detektieren. Bereits 24 h nach der Behandlung war die Zellzahl bei hohen Dosierungen von Cisplatin gegenüber der Kontrolle verringert und die Nekrose erhöht.

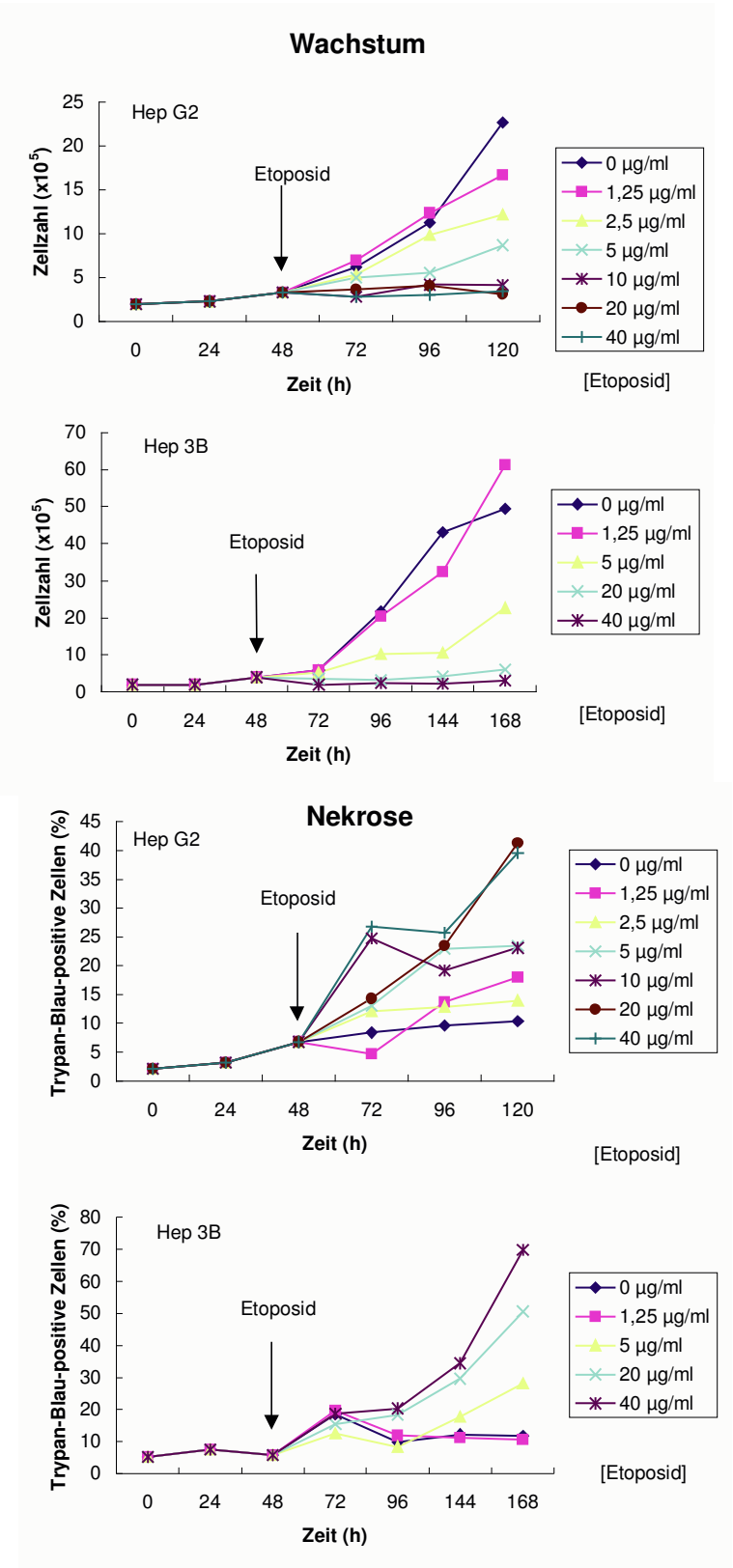


Abb. 11A: Wachstum und Nekrose von Hep G2- und Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Etoposid.
$2x10^5$ Zellen wurden auf eine Zellkulturschale (60 x 15 mm) ausgesät. 48 h nach Aussaat wurden die Zellen mit Etoposid in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde die Zellzahl und der Anteil nekrotischer Zellen bestimmt

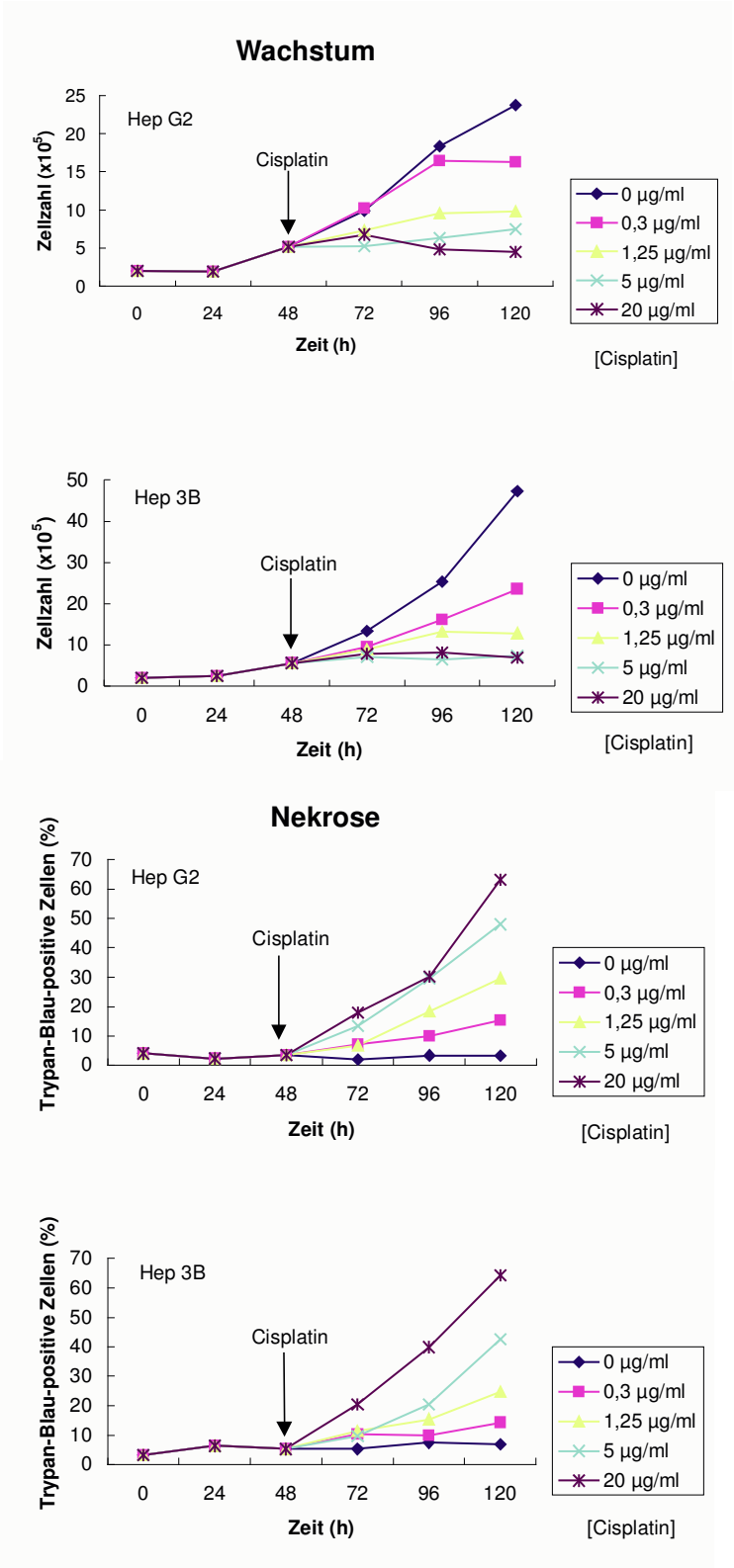


Abb. 11B: Wachstum und Nekrose von Hep G2- und Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.
$2x10^5$ Zellen wurden auf eine Zellkulturschale (60 x 15 mm) ausgesät. 48 h nach Aussaat wurden die Zellen mit Cisplatin in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde die Zellzahl und der Anteil nekrotischer Zellen bestimmt

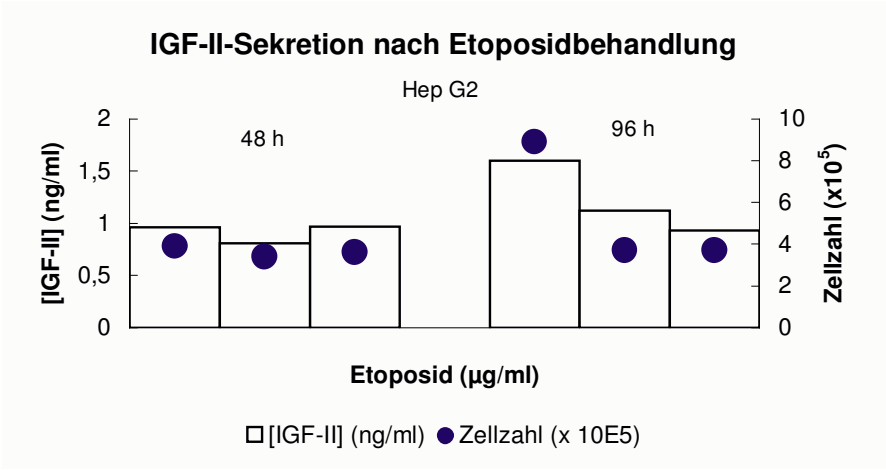
4.3.2. Bestimmung der IGF-II-Sekretion

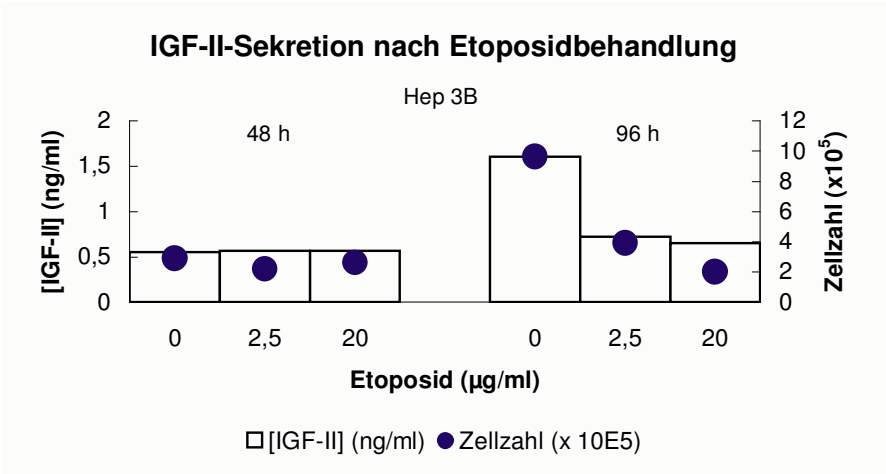
Die Wirkung von Etoposid und Cisplatin auf die IGF-II-Sekretion von Hep G2-, Hep 3B- und HuH7-Zellen wurde untersucht. Diese Experimente sollten zeigen, ob Zellen, die mit Zytostatika behandelt werden, aktiv IGF-II in die extrazelluläre Umgebung abgeben. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen behandelt.

Wie Abbildung 12A zeigt, ergaben sich 48 h nach Behandlung mit Etoposid in einem zytostatischen Dosisbereich (2,5 µg/ml) und in einem zytotoxischen Dosisbereich (20 µg/ml) keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich Zellzahl und IGF-II-Konzentration im Überstand. Nach 96 h-Inkubation mit Etoposid wuchsen die Zellen kaum, wobei die Konzentration von IGF-II im Zellkulturüberstand unverändert blieb. Dahingegen nahm die Zellzahl und die IGF-II-Konzentration im Überstand der unbehandelten Zellen zu.

Nach Behandlung mit 0,6 µg/ml Cisplatin (s.: Abb. 12B) über 48 h blieben Zellzahl und IGF-II-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert. Nach Behandlung mit 5 µg/ml Cisplatin ließ sich bei Hep G2-Zellen bereits eine deutliche Abnahme der Zellzahl und der IGF-II-Konzentration im Überstand nachweisen. Sowohl die Zellzahl als auch die Konzentration von IGF-II im Überstand waren nach der Inkubation mit Cisplatin für 96 h im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Die Zellzahlen und die IGF-II-Konzentrationen bei den Hep 3B glichen denen nach Behandlung für 48 h. Nur die IGF-II-Konzentrationen im Überstand der Zelllinien Hep G2 und HuH7 nach Behandlung mit 0,6 µg/ml Cisplatin nahmen zu, wodurch ein leichter Unterschied in der Wirkung der zytostatischen und der zytotoxischen Dosis erkennbar wurde.

Bei den in 4.4. beschriebenen Experimenten konnte man davon ausgehen, daß freies IGF-II im Zellkulturüberstand vorlag, was die Voraussetzung für die autokrine Stimulation der Zellen durch IGF-II darstellt und somit auch die Voraussetzung zur Untersuchung der Hemmung dieser autokrinen Stimulation durch α-IGF-II oder α-IGF-IR bei simultaner Zytostatikabehandlung.





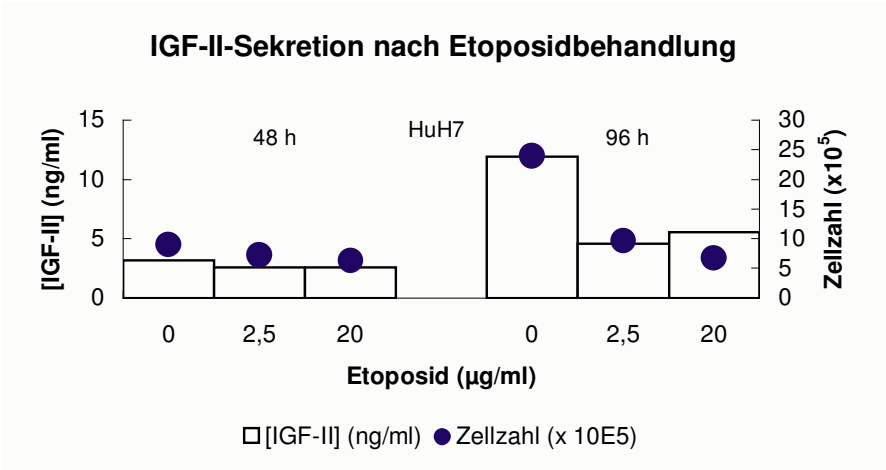
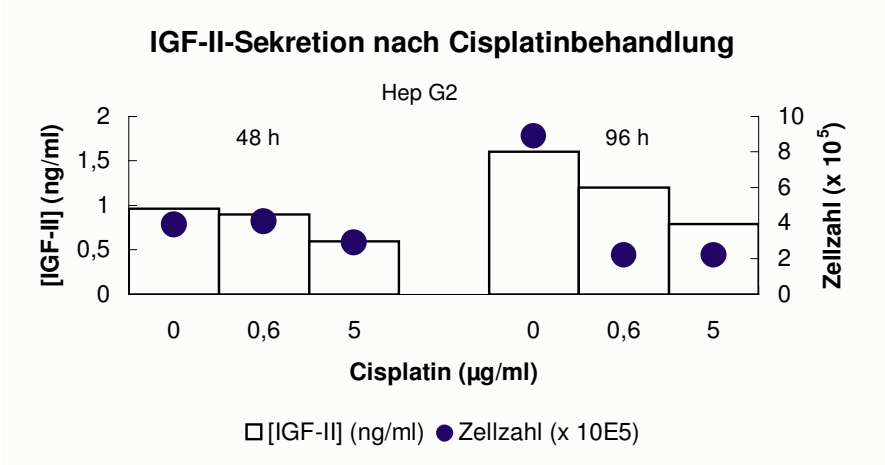
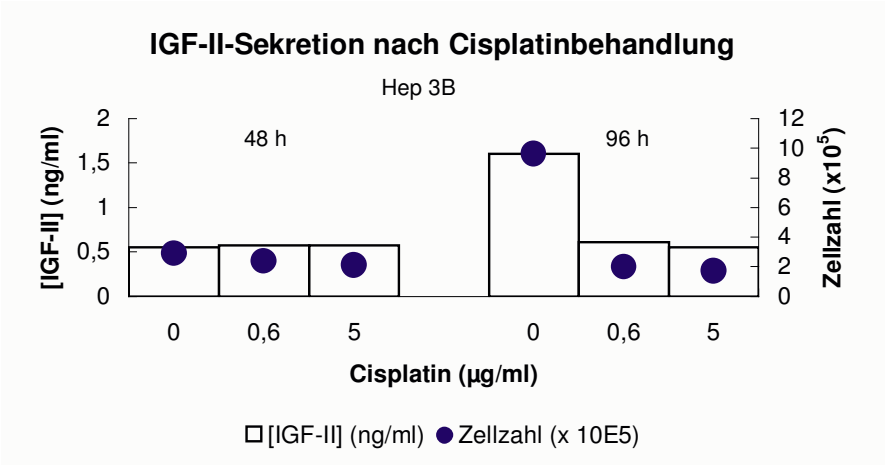


Abb. 12A: Wachstum und IGF-II-Sekretion von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid.
$2x10^5$ Zellen wurden jeweils pro Zellkulturschale (60 x 15 mm) ausgesät und 24 h nach der Aussaat mit Etoposid in den angegebenen Konzentrationen behandelt.
Die Zellzahl (Kreise) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung bestimmt. Parallel dazu wurden die Überstände abgenommen und nachfolgend die Konzentration des ungebundenen IGF-II im ELISA bestimmt (Balken).





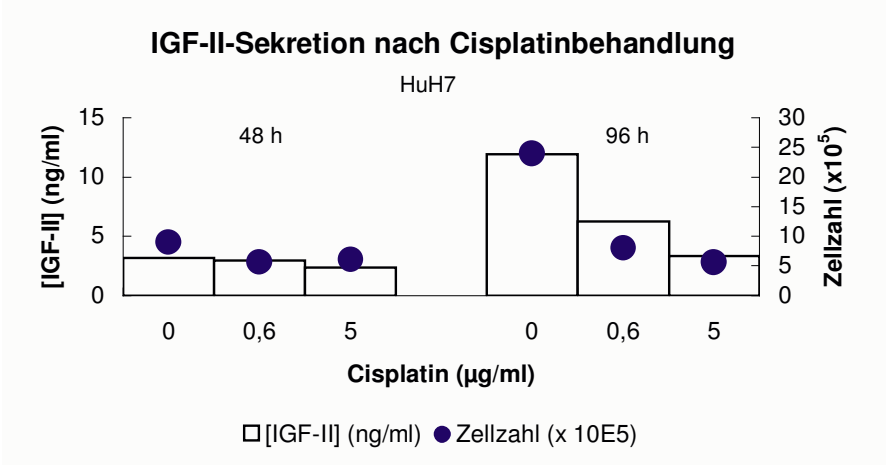


Abb. 12B: Wachstum und IGF-II-Sekretion von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Cisplatin.
$2x10^5$ Zellen wurden jeweils pro Zellkulturschale (60 x 15 mm) ausgesät und 24 h nach der Aussaat mit Cisplatin in den angegebenen Konzentrationen behandelt.
Die Zellzahl (Kreise) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung bestimmt. Parallel dazu wurden die Überstände abgenommen und nachfolgend die Konzentration des ungebundenen IGF-II im ELISA bestimmt (Balken).

4.3.3. Bestimmung der Vitalität

Die Vitalität von Hep G2- und Hep 3B- Zellen in Abhängigkeit von der Etoposid- und der Cisplatin-Dosis ist in Abbildung 13 dargestellt. Zunächst wurde die Vitalität der Zellen im Zeitverlauf nach Behandlung mit drei verschiedenen Dosierungen der Zytostatika bestimmt (s.: Abb. 13A). Proportional zur Behandlungsdauer mit Etoposid, nahmen die Unterschiede zwischen den unbehandelten Zellen und den behandelten Zellen zu. 24 h nach der Inkubation mit Etoposid waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und der höchsten eingesetzten Dosis erkennbar. Die Wirkung der geringsten eingesetzten Etoposid-Dosis auf die HCC- Zelllinien wurde erst nach Inkubation für 72 h detektierbar. Bei beiden Zelllinien ließen sich nach 72 h ein zytostatischer Dosisbereich (2,5 µg/ml Etoposid) mit verringertem Zellwachstum und ein zytotoxischer Dosisbereich (40 µg/ml Etoposid), ohne Zellwachstum, unterscheiden. Bei Behandlung mit 40 µg/ml Etoposid wurde der Verlauf der toxischen Wirkung auf die Zellpopulation deutlich. Während 24 h nach der Behandlung von Hep 3B mit 40 µg/ml Etoposid noch ein Wachstum der Zellen feststellbar war, nahm im Zeitraum zwischen 24 h und 48 h die Zellzahl ab, so daß die Zahl vitaler Zellen zu diesem Zeitpunkt geringer als die Zahl vitaler Zellen zu Beginn der Behandlung war (Δ OD < 0). Dieser Effekt war bei den HepG2-Zellen stärker ausgeprägt.

Betrachtete man die Wirkung von Cisplatin auf die beiden HCC-Zellinien im Zeitverlauf, so ließ sich feststellen, daß sie der Wirkung von Etoposid vergleichbar war. Auch hier nahmen die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen mit fortlaufender Behandlungsdauer zu. Nach 72 h ließen sich ein zytostatischer (0,15-0,6 µg/ml Cisplatin) und ein zytotoxischer Dosisbereich (2,5 µg/ml Cisplatin) unterscheiden. Auffallend war, daß die Behandlung mit 2,5 µg/ml Cisplatin für 24 h schon ausreichte, um die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu verringern. Diese Experimente zeigten, daß eine Behandlung der HCC-Zellen mit Etoposid und Cisplatin für 72 h notwendig war, um die Wirkungen der verschiedenen Zytostatikakonzentrationen unterscheiden zu können. Daher erfolgte die Behandlung bei den folgenden Experimenten immer für 72 h.

In der Abbildung 13B ist die Wirkung von Etoposid oder Cisplatin auf die Vitalität der Zellen nach Inkubation für 72 h in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration dargestellt. Nach der Behandlung mit Etoposid waren ein zytostatischer (0,3 – 5 µg/ml Etoposid) und ein zytotoxischer Dosisbereich (ab 10 µg/ml) unterscheidbar. In diesem Versuch war die Vitalität der Hep 3B-Zellen bei den höheren Etoposidkonzentrationen (ab 5 µg/ml) stärker reduziert als bei Hep G2-Zellen. Für Cisplatin ließen sich ein zytostatischer (0,075 bis 1,25 µg/ml) und ein zytotoxischer Dosisbereich (ab 2,5 µg/ml) unterscheiden.

VITALITÄT

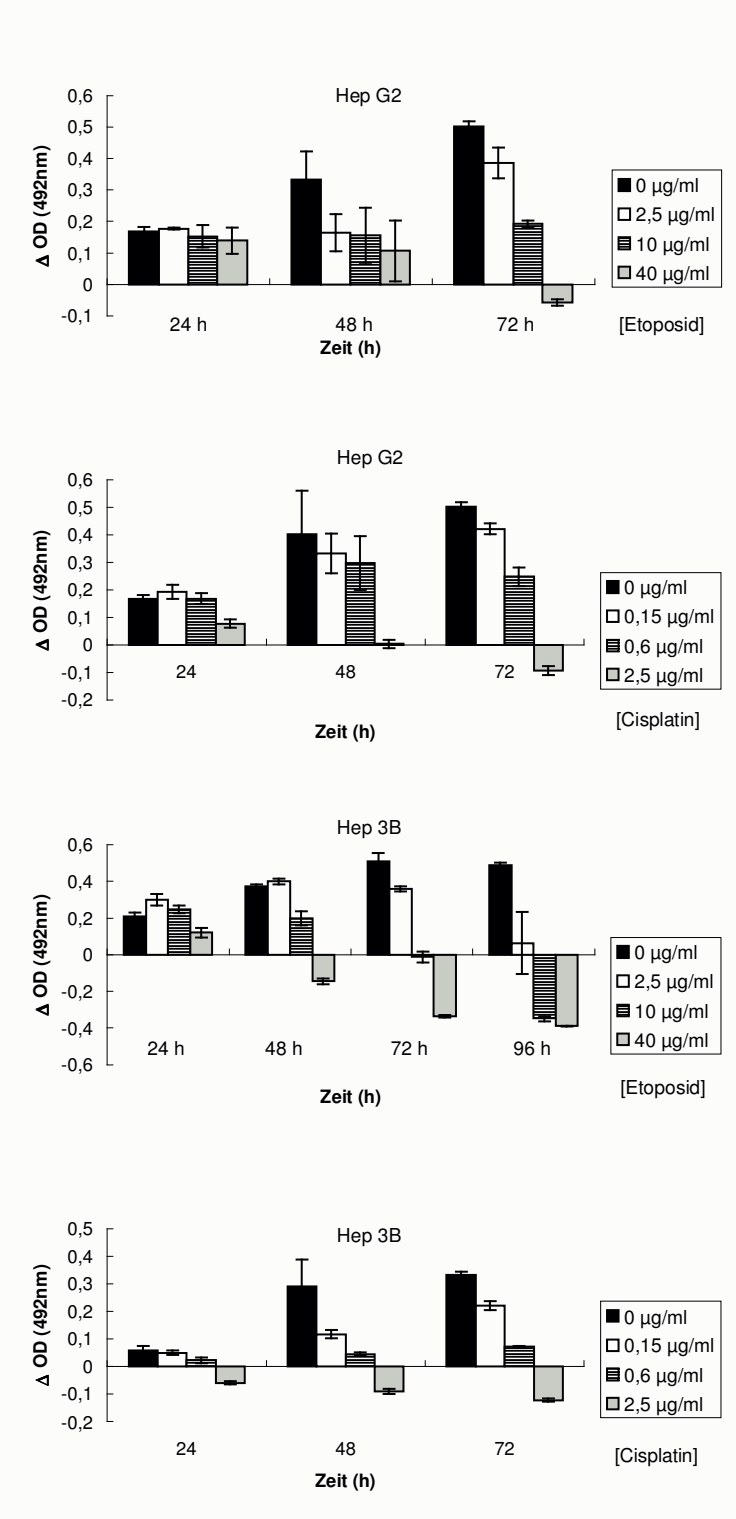


Abb. 13A: Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin im Zeitverlauf.
48 h vor der Behandlung wurden jeweils $3x10^3$ Zellen ausgesät. Die Vitalität der Zellen wurde nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch ermittelt. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches ist dargestellt. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar.

VITALITÄT

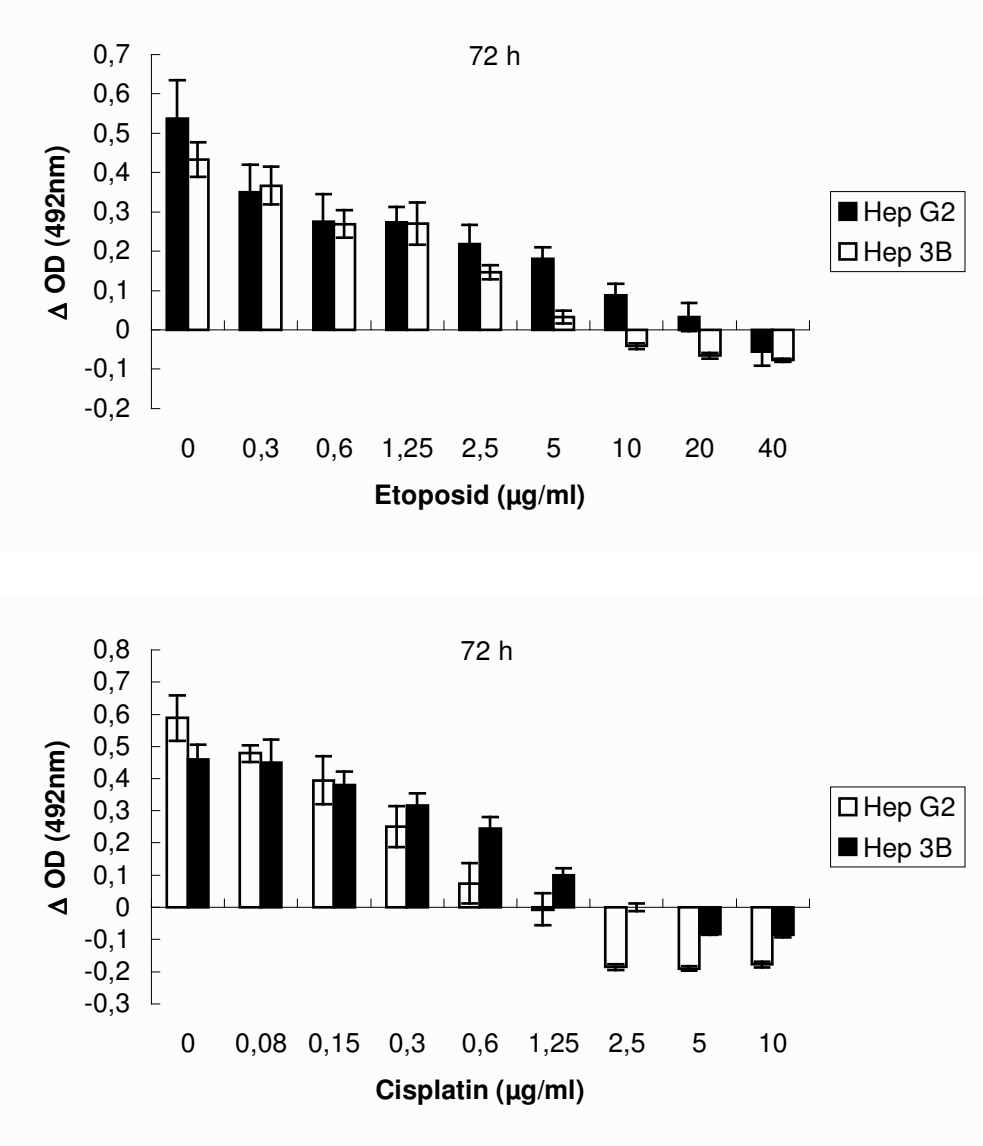


Abb. 13B: Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin in Abhängigkeit von der Dosis.
48 h vor der Behandlung wurden jeweils $3x10^3$ Zellen ausgesät. Die Behandlung erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen für 72h. Die Vitalität der Zellen wurde nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch ermittelt. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches ist dargestellt. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar.

4.3.4. Bestimmung der Apoptose

Die apoptotischen Zellen wurden anhand der Kern-und Zellmorphologie nach Propidiumiodidfärbung bestimmt. Dazu wurde parallel auch der Anteil nekrotischer Zellen durch Trypan-Blau-Färbung, wie auch die Zahl von Zelltrümmern, bestimmt.

Aus der Abbildung 14 entnimmt man, daß der Anteil avitaler Zellen mit steigender Dosis der Zytostatika zunahm. Nur 0 bis 5% der unbehandelten Hep G2- und Hep 3B-Zellen wiesen eine apoptotische Morphologie auf, waren TUNEL-positiv oder fielen als Zelltrümmer auf. Der Anteil nekrotischer Zellen lag unter 10%. Behandelte man Hep G2-Zellen mit steigenden Dosierungen von Etoposid, nahm der Anteil der nekrotischen Zellen am stärksten zu, aber auch der Anteil der apoptotischen und TUNEL-positiven Zellen stieg an. Es fiel auf, daß der Anteil von Zelltrümmern an den behandelten Zellen im zytostatischen Dosisbereich (bis 2,5 µg/ml Etoposid) unter 10% blieb, aber im zytotoxischen Dosisbereich auf über 50% stark zunahm. Bei Hep 3B-Zellen, die mit Etoposid behandelt wurden, fand man das gleiche Phänomen, wobei die Veränderung in der Rate des Zelltodes beim Wechsel vom zytostatischen (bis 2,5 µg/ml Etoposid) zum zytotoxischen (ab 10 µg/ml Etoposid) Dosisbereich deutlicher wurde und alle Formen des Zelltodes beinhaltete. Hep G2-Zellen, die für 72 h mit Cisplatin behandelt wurden, zeigten mit einem Anteil von toten Zellen, der für die jeweilige untersuchte Form des Zelltodes unter 20% lag, nur einen leichten Anstieg des Zelltodes im zytostatischen Dosisbereich von Cisplatin (0,3 bis 1,25 µg/ml). Im zytotoxischen Dosisbereich (ab 5 µg/ml) nahm der Anteil toter Zellen stark zu. Die Zunahme der avitalen Zellen in den mit Cisplatin behandelten Hep 3B-Zellen, entsprach dem Verlauf, wie er bei den Hep G2-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin auftrat.

In Abbildung 15 ist der Zeitverlauf der Induktion von TUNEL-positiven Zellen nach Cisplatinbehandlung für die Zelllinie Hep G2 gezeigt. In der Abbildung 16 sind Aufnahmen von apoptotischen Hep 3B Zellen nach Behandlung mit Cisplatin gezeigt.

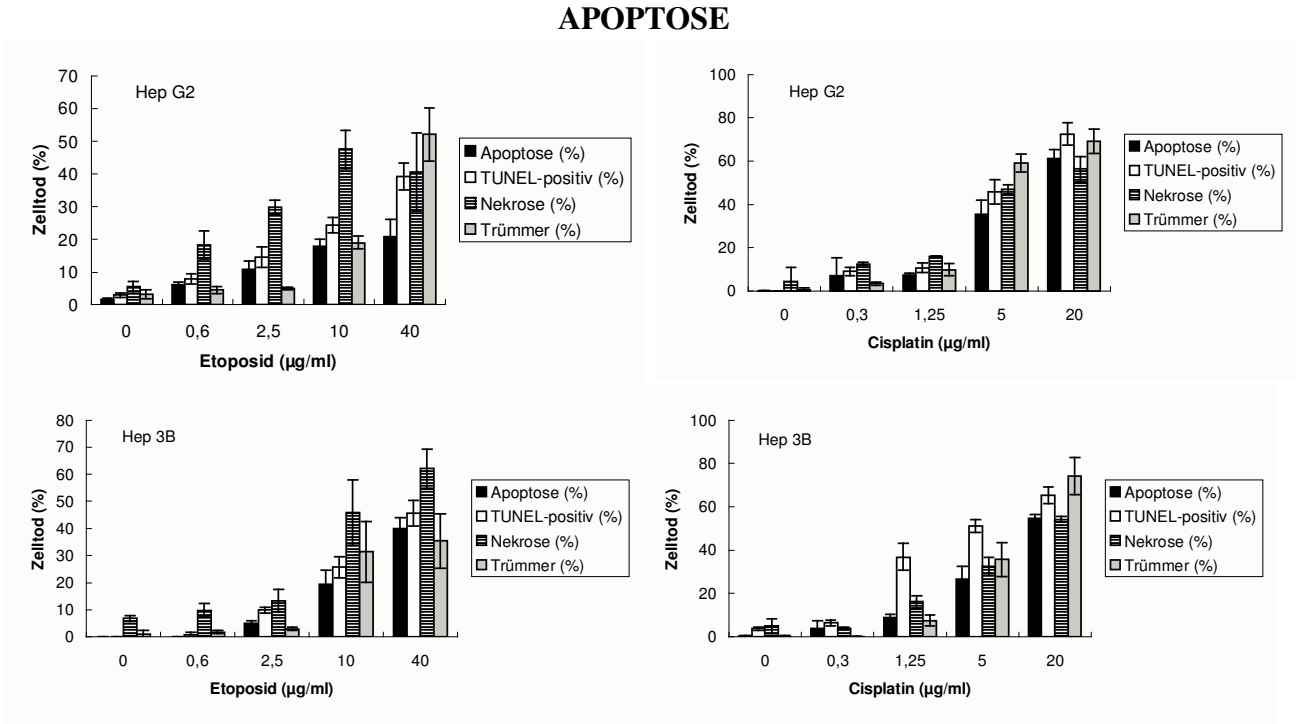


Abb. 14: Analyse des Zelltodes nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin
Morphologisch apoptotische, TUNEL-positive, Trypan-Blau-positive (nekrotische) und fragmentierte Zellen wurden nach 72-stündiger Behandlungsdauer quantitativ erfasst. Die TUNEL-positiven und die Zellen mit apoptotischer Morphologie wurden auf einem Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In einem aus dem selben Versuchsansatz stammenden Aliquot wurde der Anteil an nekrotischen Zellen und der Anteil an Zellfragmenten in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ± Standardabweichung dar.

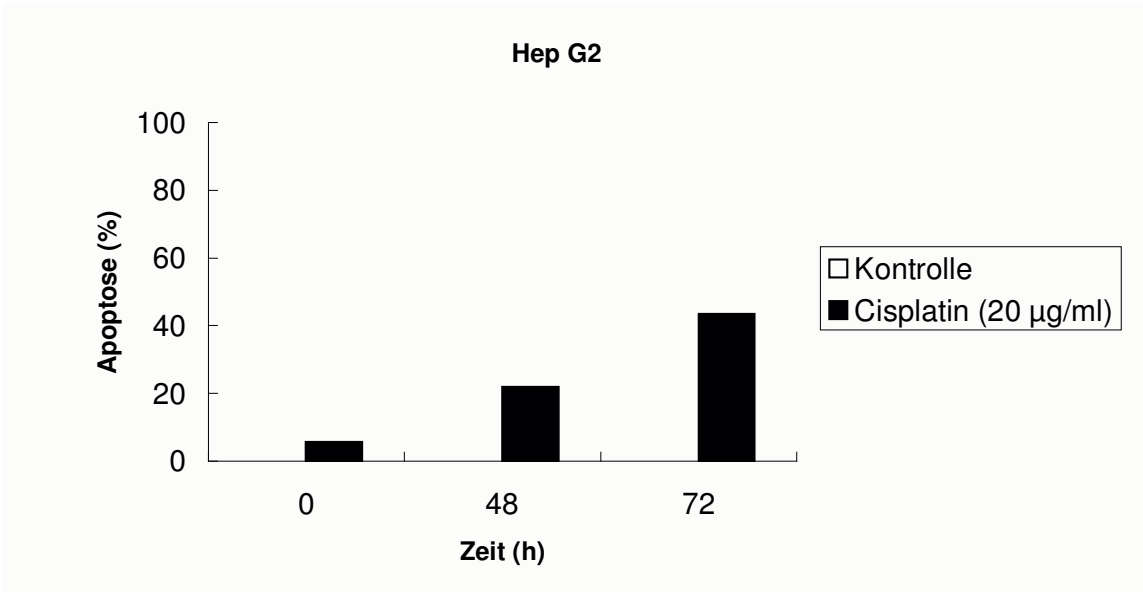


Abb. 15: Apoptose nach Cisplatinbehandlung im Zeitverlauf.
Die Rate der morphologisch apoptotischen Hep G2 Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit 20µg/ml Cisplatin quantitativ bestimmt.

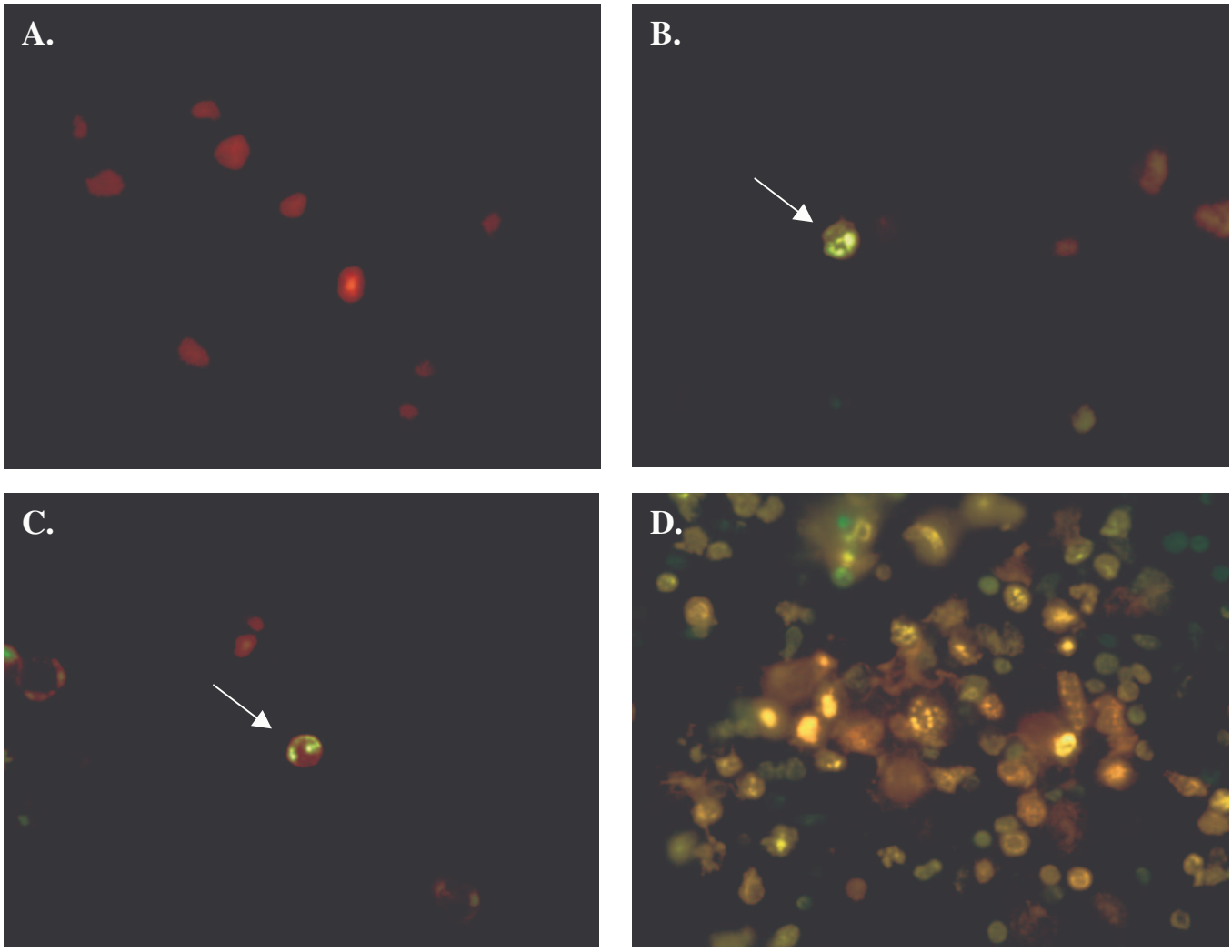


Abb. 16: Apoptose in Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.
A) Kontrolle. Unbehandelte, Propidiumiodid- (rot-) gefärbte Zellen mit normaler Morphologie.
B) Cisplatin; 1,25 µg/ml. Kernfragmentierung und -kondensation in einer TUNEL-positiven, grün-gefärbten Zelle (Pfeil).
C) Cisplatin; 1,25 µg/ml. Randständige Kernkondensation und beginnende -fragmentierung in einer TUNEL-positiven, grün-gefärbten Zelle (Pfeil).
D) Cisplatin; 20 µg/ml. Stark fragmentiertes Chromatin in TUNEL-positiven, grüngelb gefärbten Zellen.

4.4. Untersuchung der Wirkung von IGF-II, sowie α-IGF-II- und α-IGF-IR-Antikörpern bei simultaner Gabe der Zytostatika Etoposid und Cisplatin

4.4.1. Untersuchung der Wirkung von IGF-II bei Gabe von Etoposid und Cisplatin

Die Gabe von IGF-II stimulierte das Wachstum in allen vier untersuchten HCC-Zelllinien nicht (s.: 4.2.2.). Es konnte damit aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Stimulation mit IGF-II die Überlebensrate der Zellen bei Behandlung mit den Zytostatika Etoposid und Cisplatin erhöht. Daher wurde, wie in der Abbildung 17 für die Zelllinien Hep G2 und Hep 3B dargestellt ist, der Einfluß von IGF-II auf das Überleben der Tumorzellen bei Behandlung mit Cisplatin oder Etoposid untersucht. Weder bei diesen beiden Zelllinien, noch bei den SK-hep-1-Zellen, noch HuH7-Zellen konnte das Ansprechen auf die Zytostatika durch externe Zugabe von IGF-II signifikant verändert werden.

4.4.2. Untersuchung der Wirkung von α-IGF-II-Antikörpern bei Gabe von Etoposid und Cisplatin

Die IGF-II-sezernierenden HCC-Zelllinien Hep G2 und Hep 3B wurden hinsichtlich der Wirkung von α-IGF-II-Antikörpern auf die Vitalität mit Etoposid oder Cisplatin behandelt. Damit sollte geklärt werden, ob die Blockade des sezernierten IGF-II das Ansprechen auf die Chemotherapie moduliert.

Betrachtet man zunächst den Einfluß der IGF-II-Neutralisierung auf das Wachstum der Hep G2 Zellen, so erkennt man eine Reduktion der Zellzahl um 30 bis 50% nach Behandlung mit α-IGF-II. Vergleicht man die Vitalität der Hep G2 Zellen, die mit α-IGF-II-Antikörpern und Etoposid behandelt wurden (s.: Abb. 18), mit der Vitalität der Hep G2-Zellen, die mit dem Kontrollantikörper α-KLH und Etoposid behandelt wurden, so erkennt man, daß die Neutralisierung von IGF-II zur vollständigen Hemmung des Wachstums bei Hep-G2 Zellen, die mit Etoposid (1,25 µg/ml und 2,5 µg/ml) im zytostatischen Dosisbereich behandelt wurden, führte. Dieser Unterschied war signifikant und im Vergleich zur Wachstumshemmung bei den unbehandelten Zellen überadditiv. Im zytotoxischen Dosisbereich von Etoposid (10 µg/ml und 40 µg/ml) war keine bzw. nur noch eine schwach signifikante Verminderung der Vitalität bei den α-IGF-II-behandelten Zellen im Vergleich zu den α-KLH-behandelten Zellen zu beobachten.

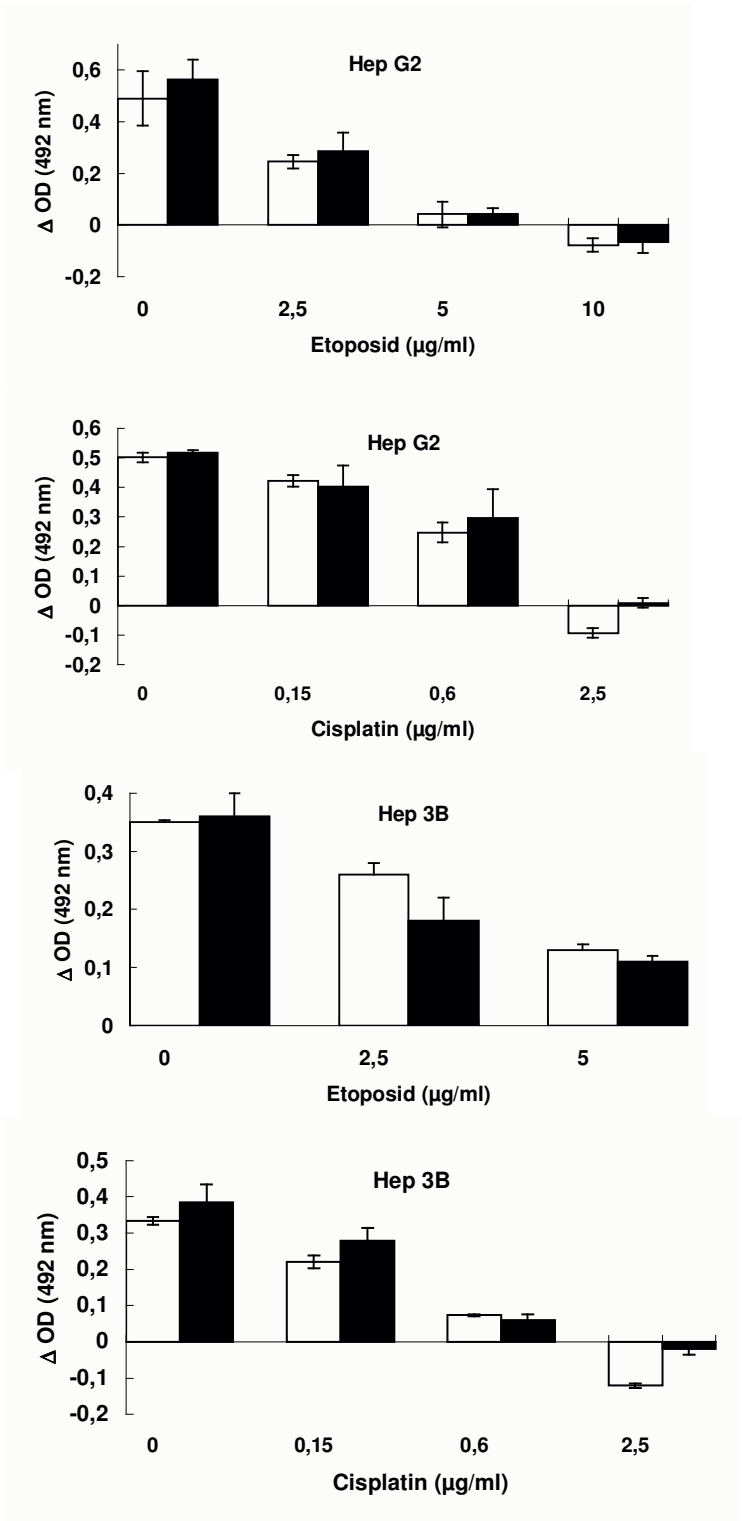


Abb. 17: Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von IGF-II.

$3x10^3$ Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-well-Platte ausgesät. 48 h später wurden die Zellen nicht stimuliert (offene Balken) oder mit IGF-II (200 ng/ml) (geschlossene Balken) stimuliert. Sofort danach wurde Etoposid oder Cisplatin für 72 h in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Vor und nach der Inkubation wurde die Vitalität der Zellen nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch bestimmt, wobei die Differenz als Δ OD (492 nm) angegeben ist. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar.

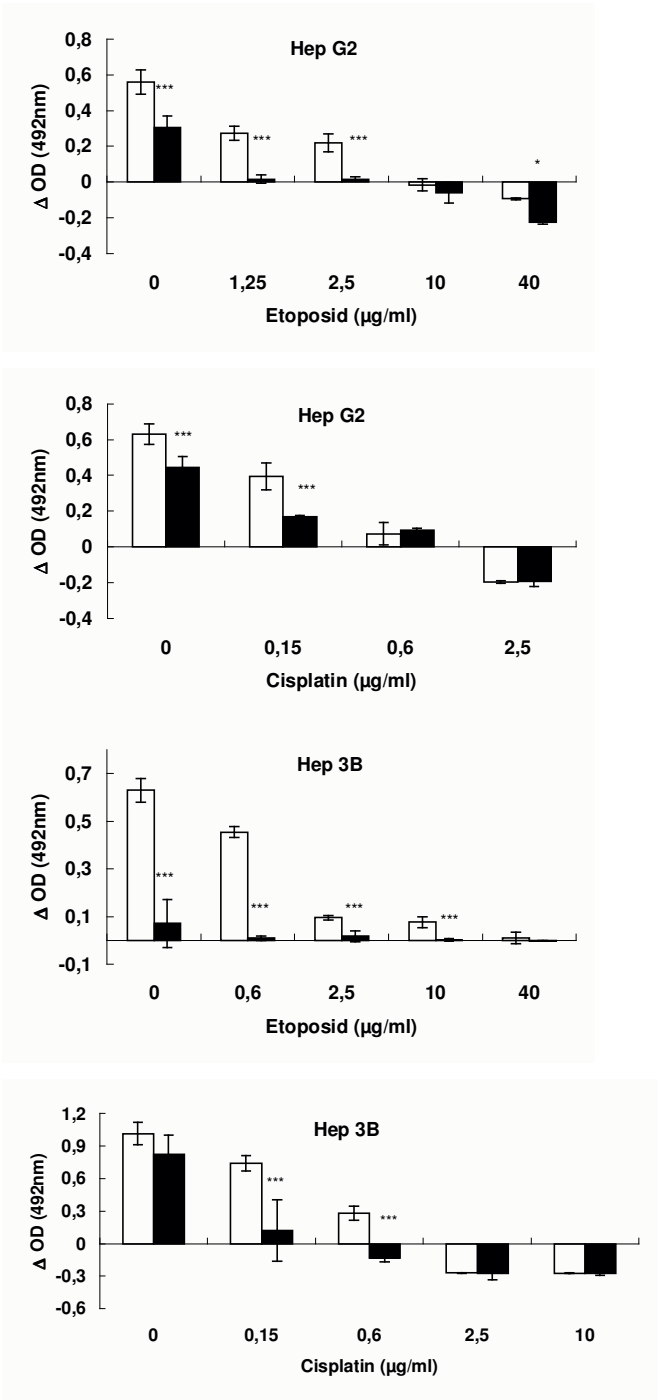


Abb. 18: Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von α-IGF-II.

$3x10^3$ Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-well-Platte ausgesät. Nach 48 h wurden α-IGF-II (100 µg/ml) (geschlossene Balken) oder Kontrollantikörper (α-KLH; 100 µg/ml), (offene Balken) zugegeben. Sofort danach wurde Etoposid oder Cisplatin für 72 h in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Vor und nach der Inkubation wurde die Vitalität der Zellen nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch bestimmt, wobei die Differenz als Δ OD (492 nm) angegeben ist. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar. Hep 3B-Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, waren bereits kurz nach der Behandlung konfluent gewachsen. Signifikante Unterschiede beim Vergleich jedes Paares der behandelten Zellen sind angegeben (($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

Aus der Abbildung 18 kann man auch entnehmen, daß Hep G2-Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden nach Neutralisierung des autokrin sezernierten IGF-II mit höherer Zelltodrate auf Cisplatin reagierten, als Hep G2-Zellen, die mit α-KLH inkubiert wurden. In diesem Versuch wurde das Wachstum in den unbehandelten Zellen durch Gabe von α-IGF-II-Antikörpern um etwa 30% signifikant gehemmt. Nach Behandlung mit 0,15 µg/ml Cisplatin war die Vitalität der mit α-IGF-II-Antikörpern behandelten Hep G2-Zellen signifikant (um etwa 50%) verringert. Dieser Effekt war im Vergleich zu der Wirkung bei den unbehandelten Kontrollzellen überadditiv. Bei Behandlung mit 0,6 µg/ml und 2,5 µg/ml Cisplatin konnten keine Unterschiede in der Vitalität der Zellen festgestellt werden. Die Behandlung mit diesen Dosierungen führte bereits bei der Inkubation mit dem Kontrollantikörper zu einer nahezu vollständigen Reduktion des Zellwachstums (0,6 µg/ml Cisplatin) bzw. zum kompletten Absterben der Zellpopulation (2,5 µg/ml Cisplatin), wodurch bei Behandlung mit α-IGF-II-Antikörpern keine weiteren Effekte darstellbar waren.

In der Abbildung 18 sind ebenso die Wirkungen der IGF-II-Neutralisierung auf Zytostatika-behandelte Hep 3B-Zellen gezeigt. Das Experiment, in dem die Hep 3B-Zellen mit Etoposid behandelt wurden, wurde an subkonfluenten Kulturen durchgeführt. Vergleicht man die unbehandelten Zellen, die mit α-IGF-II inkubiert wurden, mit unbehandelten Zellen, die mit dem Kontrollantikörper inkubiert wurden, so erkennt man, daß die Neutralisierung von IGF-II in diesem Versuch die Zellzahl bereits um 80% reduzierte. Die Behandlung mit Etoposid in den Dosierungen von 0,6 µg/ml, 2,5 µg/ml und 10 µg/ml führte bei Gabe des Kontrollantikörpers zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität, bei der aber ein Nettowachstum der Zellen noch nachweisbar war. Die zusätzliche Gabe neutralisierender Antikörper, die gegen IGF-II gerichtet waren, resultierte in einer signifikanten Hemmung des Wachstums, mit dem Verlust aller vitaler Zellen. Bei der zytotoxischen Etoposiddosierung von 40 µg/ml ließ sich kein Unterschied in der Vitalität der mit α-KLH und der mit α-IGF-II behandelten Zellen erkennen.

Die Hep 3B-Zellen, die zur Untersuchung der Wirkung des α-IGF-II bei Gabe von Cisplatin angesetzt worden waren, waren im Zeitraum der Behandlung konfluent gewachsen. Hier konnte bei der Blockade des IGF-II in den unbehandelten Zellen keine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu den mit dem Kontrollantikörper behandelten Zellen erzielt werden. Die Behandlung mit Cisplatin im zytostatischen Dosisbereich führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität der mit α-IGF-II behandelten Hep 3B-Zellen, im

Vergleich zu den mit α-KLH behandelten Hep 3B-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde bei Behandlung mit 0,15 µg/ml Cisplatin um etwa 80% reduziert und bei den mit 0,6 µg/ml behandelten Hep 3B-Zellen vollständig aufgehoben. Nach Behandlung mit zytotoxischen Dosierungen von Cisplatin (2,5 µg/ml und 10 µg/ml) waren alle Zellen abgestorben. Es war damit eine Unterscheidung der Effekte in den mit α-KLH und in den mit α-IGF-II inkubierten Zellen nicht möglich.
In der Abbildung 19 (A und B) sind exemplarisch Aufnahmen von Hep 3B-Zellen, die mit Cisplatin, unter Gabe des α-KLH oder des α-IGF-II, behandelt wurden, gezeigt. Bereits unter dem Lichtmikroskop war die Zunahme der avitalen Zellen und die Induktion der Apoptose durch Blockade des IGF-II erkennbar. Durchgängig waren die mit neutralisierenden Antikörpern gegen IGF-II behandelten Zellen stärker fragmentiert, verkleinert und zeigten einen deutlich verringerten Farbstoffumsatz. Auch nach Behandlung mit der zytotoxischen Konzentration von 2,5 µg/ml Cisplatin traten fragmentierte Zellen und Zelltrümmer bei den mit α-IGF-II behandelten Zellen verstärkt auf.

Der Beitrag, den die verstärkte Apoptose nach Neutralisierung von IGF-II hatte, wurde über die TUNEL-Färbung und anhand der morphologischen Analyse quantifiziert. In der Abb. 20 ist für die Zelllinie Hep 3B die Veränderung der Rate apoptotischer Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, auch bei Blockade des IGF-II durch neutralisierende Antikörper, gezeigt. Im zytostatischen Dosisbereich (0,6 µg/ml Cisplatin) führte die Neutralisierung von IGF-II zu einer Verdoppelung der Apoptosen. Nach Inkubation mit 20 µg/ml Cisplatin konnten keine Unterschiede in der Apoptoserate festgestellt werden.

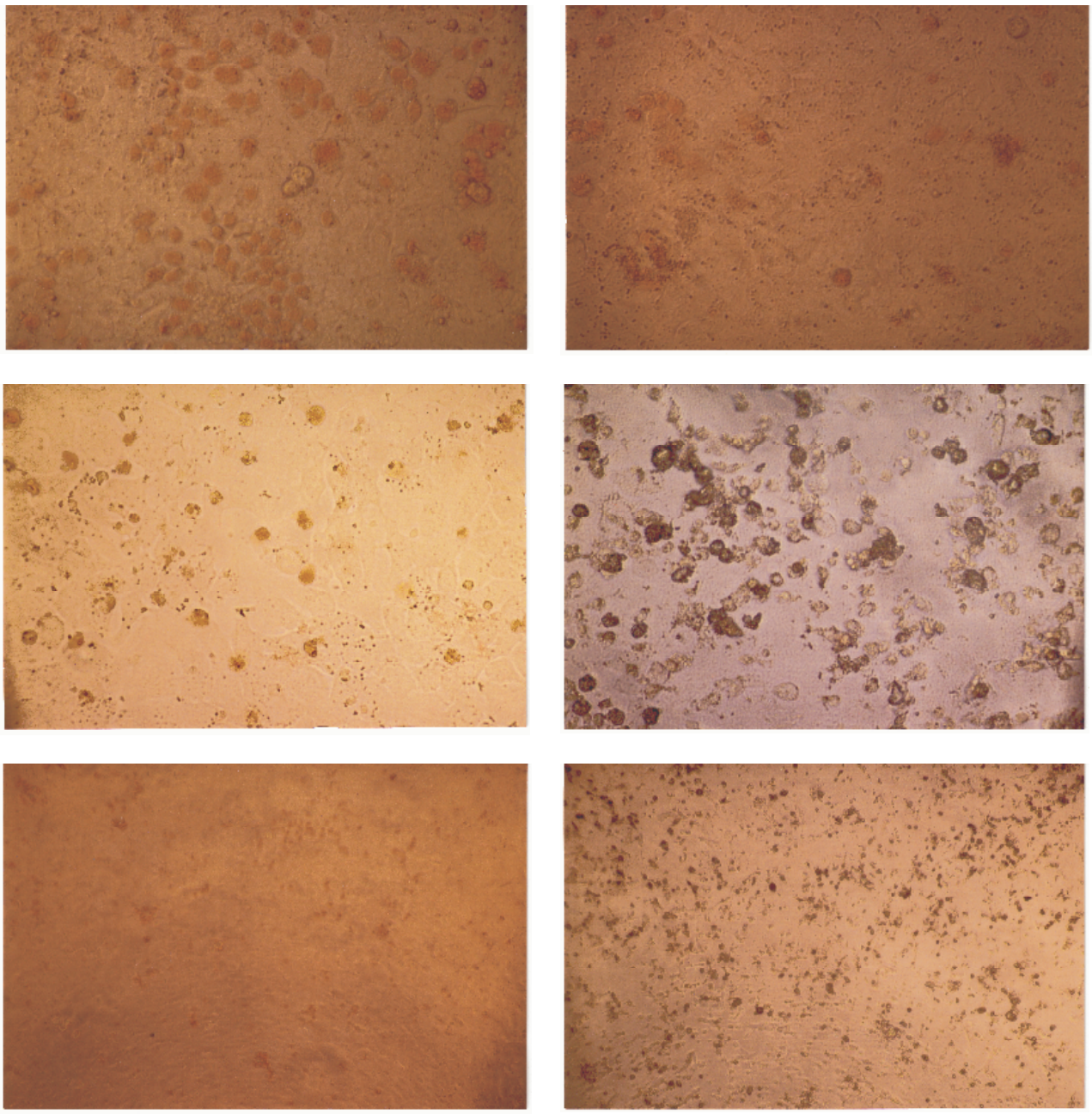


Abb. 19A: Apoptose nach Behandlung mit Cisplatin unter Neutralisierung von IGF-II in Hep 3B-Zellen.
Aufnahmen von Hep 3B-Zellen zu dem in der Abb. 18 gezeigten Versuch.
A) Kontrolle + α-KLH
B) Kontrolle + α-IGF-II
C) 0.15 µg/ml Cisplatin + α-KLH
D) 0.15 µg/ml Cisplatin + α-IGF-II
E) 0.6 µg/ml Cisplatin + α-KLH
F) 0.6 µg/ml Cisplatin + α-IGF-II
(Vergrößerung: A), B), E) und F): 100x; C) und D): 400x).
Die Aufnahmen wurden 1 h nach Zugabe des Substrates (EZ4U) angefertigt.

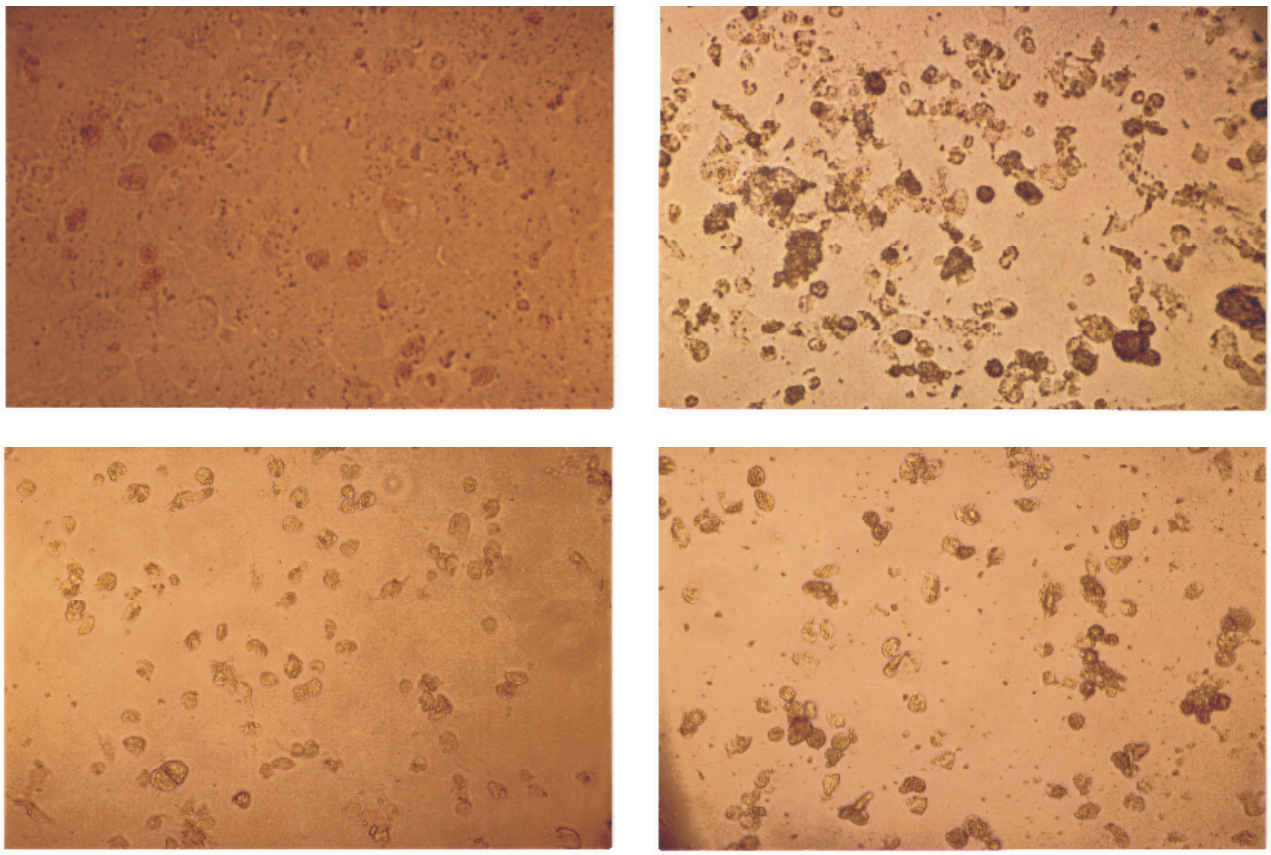


Abb. 19B: Apoptose nach Behandlung mit Cisplatin unter Neutralisierung von IGF-II in Hep 3B-Zellen.
Aufnahmen von Hep 3B-Zellen zu dem in der Abb. 18 gezeigten Versuch.
G) 0.6 µg/ml Cisplatin + α-KLH
H) 0.6 µg/ml Cisplatin + α-IGF-II
I) 2.5 µg/ml Cisplatin + α-KLH
J) 2.5 µg/ml Cisplatin + α-IGF-II
(Vergrößerung: 400x).
Die Aufnahmen wurden 1 h nach Zugabe des Substrates (EZ4U) angefertigt.

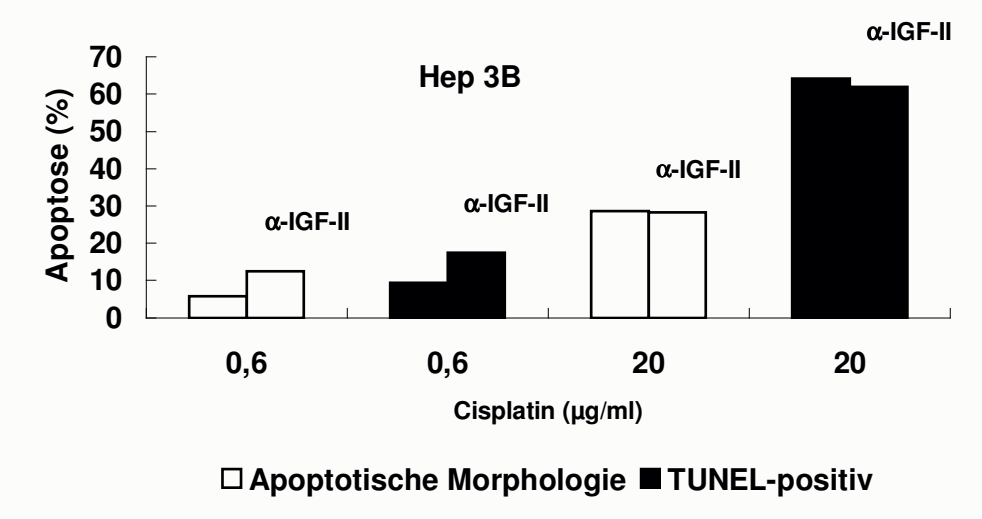


Abb. 20: Apoptoserate in Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.
Apoptose von Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit 0,6 µg/ml und 20 µg/ml Cisplatin für 72 h. Irrelevanter Kontrollantikörper α-KLH (100 µg/ml) (offene Balken) oder zugegeben. Sofort danach wurde Etoposid oder Cisplatin für 72 h in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Vor und nach der Inkubation wurde die Vitalität der Zellen nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch bestimmt, wobei die Differenz als Δ OD (492 nm) angegeben ist. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar. Hep 3B-Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, waren bereits kurz nach der Behandlung konfluent gewachsen. Signifikante Unterschiede beim Vergleich jedes Paares der behandelten Zellen sind angegeben (($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

4.4.3. Untersuchung der Wirkung von α-IGF-IR-Antikörpern bei Gabe von Etoposid und Cisplatin

Wie aus der Abbildung 21 hervorgeht, verringert die Neutralisierung des IGF-IR nur bei den Hep G2-Zellen die Vitalität bei simultaner Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin. Die Neutralisierung des IGF-IR bei Behandlung mit Etoposid führte in der Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl um etwa 30%. Bei Gabe einer zytostatischen Etoposidkonzentration (2,5 µg/ml) wurde die Vitalität der Zellen signifikant verringert. Im zytotoxischen Dosisbereich (10 µg/ml und 40 µg/ml Etoposid) konnte kein Unterschied zwischen den mit α-IGF-IR inkubierten Hep G2 und den entsprechenden Kontrollen gefunden werden.

In Hep G2-Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, verringerte die Neutralisierung des IGF-IR das Wachstum der unbehandelten Kontrollzellen ebenfalls signifikant um etwa 30%. Die Behandlung mit Cisplatin im zytostatischen Dosisbereich (0,15 µg/ml Cisplatin und 0,6 µg/ml Cisplatin) führte bei Gabe des α-IGF-IR nur bei der niedrigeren Dosis zu einer schwach signifikanten Abnahme (etwa 15%) der Vitalität. Im zytotoxischen Dosisbereich (2,5 µg/ml Cisplatin) konnte nach Neutralisierung des IGF-IR keine Wirkung auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden. Die Wirkung der IGF-IR-Neutralisierung entsprach derjenigen nach IGF-II-Neutralisierung in der Hinsicht, daß sie auf den zytostatischen Dosisbereich beschränkt war. Im Vergleich zur Neutralisierung von IGF-II bei der Zytostatikabehandlung waren die Effekte nach Neutralisierung des IGF-IR schwächer.

Die Vitalität der Hep 3B-Zellen wurde, wie auch in der Abbildung 21 gezeigt, nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin durch die Neutralisierung des IGF-IR nicht beeinflußt. Auch in der HCC-Zelllinie HuH7 führte die Neutralisierung des IGF-IR nicht zu einer Abnahme der Vitalität bei simultaner Behandlung mit Cisplatin oder Etoposid.

Die antiapoptotische Wirkung der IGF-IR-Neutralisierung konnte nur bei der Zelllinie Hep G2, bei der die Blockade des IGF-IR zur Wachstumsreduktion führt, beobachtet werden. Die Zelllinien, die nach Neutralisierung des IGF-IR keine Wachstumsreduktion zeigten, wiesen nach Zytostatikabehandlung auch keine erhöhten Apoptoseraten auf.

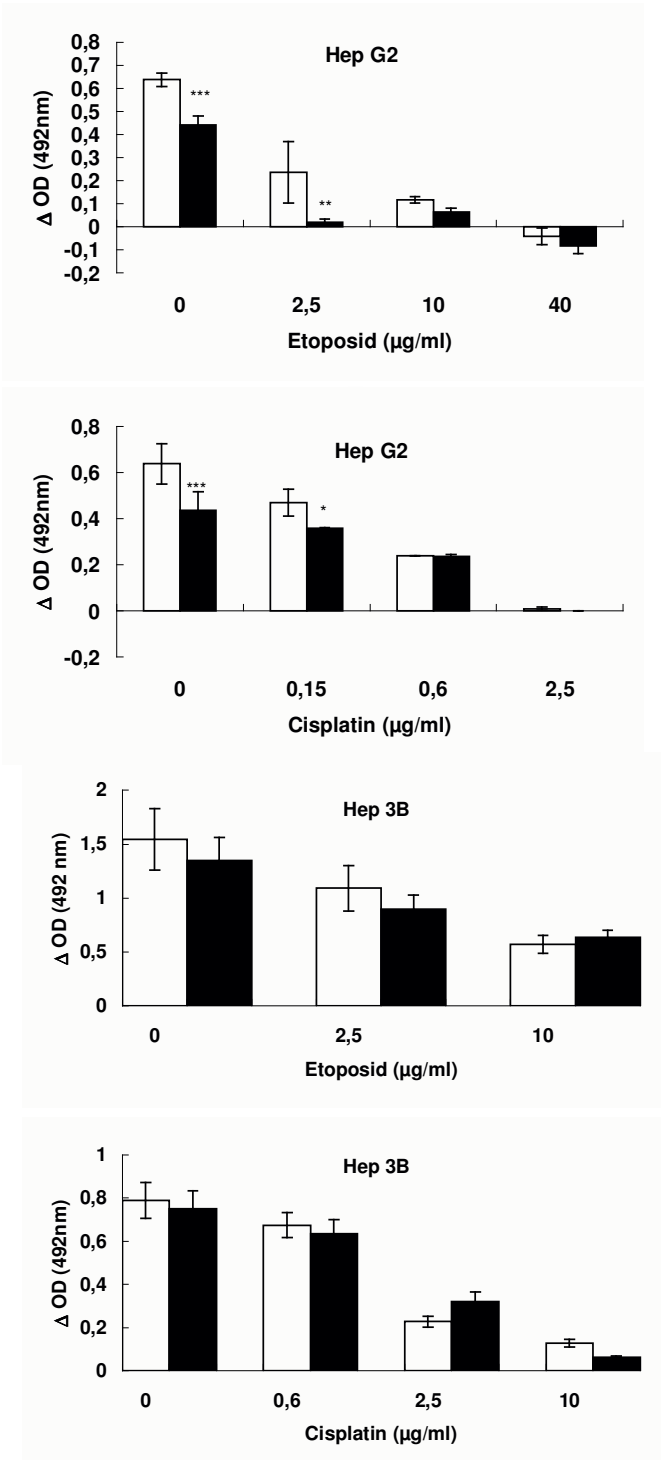


Abb. 21: Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von α-IGF-IR.

$3x10^3$ Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 48 h wurden α-IGF-IR (10 µg/ml) (geschlossene Balken) oder der Kontrollantikörper (α-KLH; 10 µg/ml) (offene Balken) zugegeben. Sofort danach wurde Etoposid oder Cisplatin für 72 h in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Vor und nach der Inkubation wurde die Vitalität der Zellen nach Umsatz des Substrates (EZ4U) photometrisch bestimmt, wobei die Differenz als Δ OD (492 nm) angegeben ist. Die Werte stellen Mittelwerte aus dem mindestens dreifachen Ansatz ± Standardabweichung dar. Signifikante Unterschiede beim Vergleich jedes Paares der behandelten Zellen sind angegeben (($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

4.5. Veränderungen des mRNA-Status der humanen Lebertumorzelllinien nach Gabe von IGF-II oder α-IGF-II-Antikörpern

Die Veränderungen des mRNA-Status der jeweiligen Zelllinie sind in den Tabellen 4 bis 7 aufgeführt. Der jeweiligen Tabelle lassen sich die Behandlungsdauer, die eingesetzten Konzentrationen von IGF-II oder α-IGF-II, der jeweils verwendete Atlas Filter und die in ihren Konzentrationen veränderten Trnskripte entnehmen. Transkripte, die sich mindestens um den Faktor zwei nach der Behandlung unterschieden, wurden als verändert angegeben. Beispielhaft sind Abbildungen von cDNA-Microarrays (s.: Abb. 22 bis 24) gezeigt. Die Abkürzungen der nach der Behandlung regulierten Transkripte sind in 8.4. erläutert.

4.5.1. Veränderungen des mRNA-Status von Hep G2-Zellen nach Gabe von IGF-II

Der Einfluß von IGF-II auf den mRNA-Status von Hep G2-Zellen wurde in einem Experiment untersucht. Bei 3 von 1176 auf den Human 1.2. Array gespotteten cDNAs wurden nach Gabe von IGF-II Veränderungen im mRNA-Status detektiert (s.: Tab. 4).

Tab. 4: Quantitativ veränderte Transkripte in Hep G2-Zellen nach Gabe von IGF-II

Behandlungsdauer; [IGF-II]	Clontech-Array	Aktivierte Transkripte (Faktor)	Supprimierte Transkripte (Faktor)
5 h; 3 x 100 ng/ml	Human 1.2.	GLUT1 (2,3) NOL1 (2,2)	IGFBP-1 (4,8)

4.5.2. Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II

Der Einfluß von IGF-II auf den mRNA-Status der Zelllinie Hep 3B wurde in zwei Experimenten untersucht (s.: Tab. 5), von denen das erste in der Abbildung 22 gezeigt ist. Die Zelllinie Hep 3B wurde in jedem der Versuche mit IGF-II über einen Zeitraum von 5 h stimuliert. Bis auf drei Transkripte (ITG α6, ITG ß4 und PRL-1), die in beiden Experimenten nach Stimulation mit IGF-II reguliert wurden, unterschieden sich die in ihrer Menge regulierten Transkripte in den jeweiligen Experimenten. Die Anteile der aktivierten und supprimierten Transkripte nach Stimulation mit IGF-II war ausgewogen.

Tab. 5: Quantitativ veränderte Transkripte in Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II

Behandlungsdauer; [IGF-II]	Clontech-Array	Aktivierte Transkripte (Faktor)	Supprimierte Transkripte (Faktor)
5 h; 3 x 100 ng/ml	Human 1.2.	ECK (2,6) PLANH1 (2,3) PRL-1 (7,7) SHB (2) Thymosin ß4 (6,1)	ERF1 (4) ITG α6 (>10) ITG ß1 (11,5) ITG ß4 (> 10) SNF2L1 (3,9)
5 h; 3 x 100 ng/ml	Human 1.2.	CBF-B (4,2) IL-8-pr. (2,6) NOL1 (2) PCNA (4,2) PRL-1 (2)	BCL-X (3,1) CREB-1 (2,2) ITG α6 (4,5) ITG ß4 (3,1)

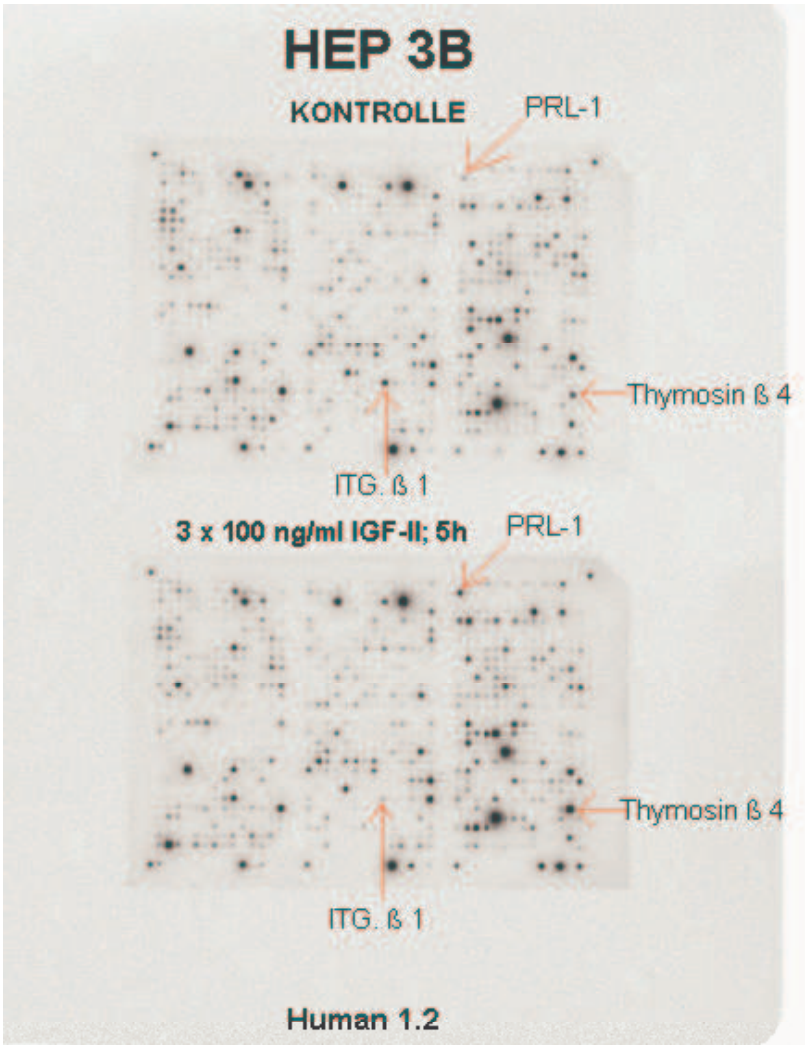


Abb. 22: Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II. Hep 3B-Zellen wurden für 5 h mit IGF-II behandelt und das Expressionsmuster auf dem Human 1.2. Array mit dem der unbehandelten Kontrolle verglichen. Einige der durch die Behandlung quantitativ veränderten mRNAs sind gezeigt (Pfeile).

4.5.3. Veränderungen des mRNA-Status von HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II

Das mRNA-Expressionsmuster der Zelllinie HuH7 nach IGF-II-Gabe wurde in drei cDNA-Microarray-Analysen (s.: Tab. 6) untersucht. Im ersten Versuch wurden HuH7-Zellen über einen Zeitraum von 5 h mit IGF-II behandelt. Im zweiten Versuch wurden sie mit drei Dosierungen von IGF-II für jeweils eine halbe Stunde behandelt und das Expressionsmuster mit dem der unbehandelten Kontrolle verglichen. Im dritten Versuch erfolgte die Behandlung mit 200 ng/ml IGF-II für 1 h. In zwei von drei Versuchen wurden zwei Transkripte (ITGß4 und α2MRAP) wiederholt in ihrer Expression supprimiert. Weiterhin wurde bei allen eingesetzten IGF-II-Konzentrationen eine Verringerung der Expression des ITG ß4 und des α2MRAP gefunden. Bei zwei von drei Dosierungen wurde das IGFBP-2 supprimiert und die das humane Cullin-Homologs hoch reguliert. In der Abbildung 23 ist die Wirkung von IGF-II in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration gezeigt.

Tab. 6: Quantitativ veränderte Transkripte in HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II

Behandlungsdauer; [IGF-II]	Clontech-Array	Aktivierte Transkripte (Faktor)	Supprimierte Transkripte (Faktor)
5 h; 3 x 100 ng/ml	Human 1.2.	Ral A (2,1)	A-myb (2) HDGF (2) 40s-Rib. (2,4)
1. 30 min.; 2 ng/ml 2. 30 min.; 20 ng/ml 3. 30 min.; 200 ng/ml	Human Cancer 1.2.	1. Cullin-Homolog (2) NUP 153 (2,8)	1. Caspase 10 (2,1) CHRM4 (4,5) IGFBP-2 (2,2) ITG ß4 (2,6) TGF-ß (2,1) α2MRAP (3,3)
		2. Cullin-Homolog (2,4) PTEN (3,5)	2. BMP2A (2,6) HDGF (2,5) ITGß4 (2,2) Rho C (4,5) α2MRAP (3,6)
		3. Keine	3. IGFBP-2 (2,1) ITG ß4 (2,2) α2MRAP (3,7)
1 h; 200 ng/ml	Human Cancer 1.2.	ELFG1 (2,6) HSC70-int. P. (2,5)	CDK5 (2,1) ITG ß4 (3) α2MRAP (4,9)

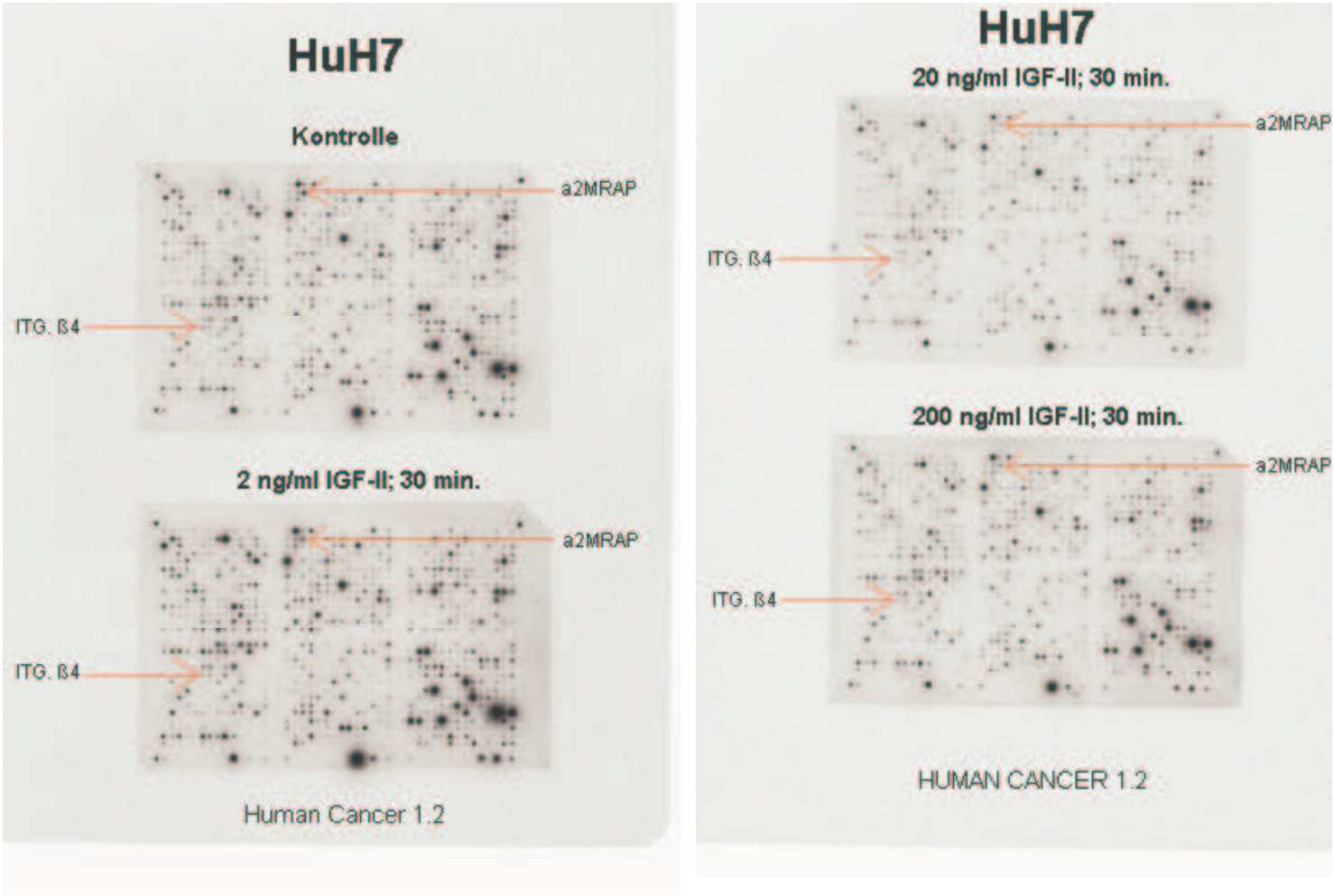


Abb. 23: Veränderungen des mRNA-Status von HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II. HuH7-Zellen wurden für jeweils 30 Minuten mit 2, 20 bzw. 200 ng/ml IGF-II behandelt und das Expressionsmuster auf dem Human Cancer 1.2. Array mit dem der unbehandelten Kontrolle verglichen. Einige der durch die Behandlung quantitativ veränderten mRNAs sind gezeigt (Pfeile).

4.5.4. Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II-Antikörpern

Der mRNA-Status der Zelllinie Hep 3B wurde nach Blockade von IGF-II durch neutralisierende Antikörper in zwei Experimenten untersucht (s.: Tab. 7). Sowohl nach Blockade für 5 h, als auch nach Blockade für 24 h wurde der Transkriptionsfaktor EGR-1 hochreguliert. HLH1R21 wurde nach 5-stündiger Blockade des IGF-II hoch und nach 24-stündiger Blockade runter reguliert. Abbildung 24 zeigt das Resultat der 5-stündigen Blockade von IGF-II.

Tab. 7: Quantitativ veränderte Transkripte in Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II

Behandlungsdauer; [IGF-II]	Clontech-Array	Aktivierte Transkripte (Faktor)	Supprimierte Transkripte (Faktor)
5 h; 300 µg/ml	Human	CI-B18 (2,9) EGR-1 (5,2) HLH1R21 (2,8) TGF-ß (2)	CD71-AG. (2)
24 h; 100 µg/ml	Human.	EGR-1 (2) IGF-II (2)	HLH1R21 (2,2)

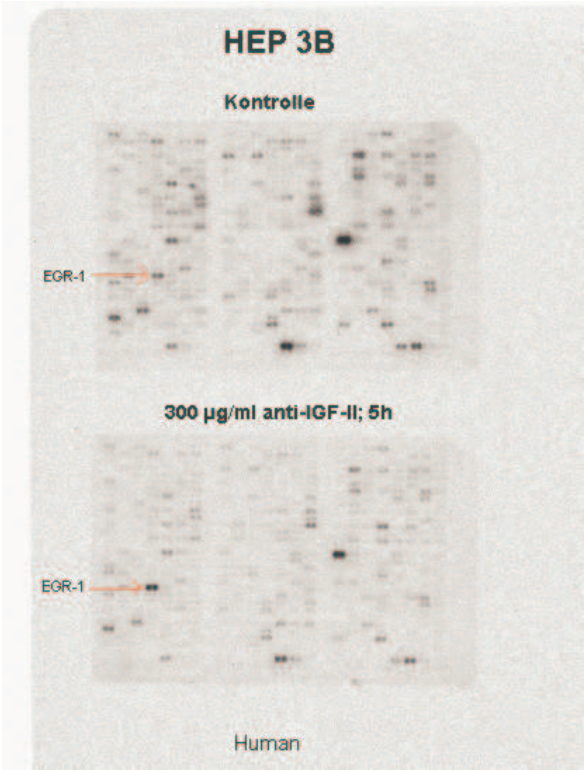


Abb. 24: Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II. Hep 3B-Zellen wurden 24 h mit α-IGF-II behandelt und das Expressionsmuster mit dem der unbehandelten Kontrolle (Human Array, Clontech) verglichen. EGR-1-mRNA wurde durch die Blockade des IGF-II am stärksten induziert (Pfeil).

5. Diskussion

5.1. Expression von Komponenten der IGF-Achse

In drei humanen HCC-Zelllinien (Hep G2, Hep 3B und HuH7), die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren, nicht jedoch in der Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep-1, konnte eine starke Überexpression und Sekretion von IGF-II nachgewiesen werden. IGF-II stellte bei diesen HCC-Zelllinien die mit Abstand am stärksten exprimierte Komponente der IGF-Achse dar. Der Vergleich der Hybridisierungsstärken der 1024 gespotteten cDNAs auf den cDNA-Microarray-Membranen ergab, daß IGF-II immer zu den 5% der am stärksten exprimierten Gene gehörte. Neben IGF-II wurde auch IGF-I von den untersuchten Zelllinien exprimiert. Der IGF-IR wurde in allen untersuchten Zelllinien, der IR-Precursor nur in Hep G2-, Hep 3B- und HuH7-Zellen exprimiert. In allen HCC-Zelllinien war die Expression des IGF-IIR deutlich detektierbar. Das Muster der Expression der IGFBPs variierte bei den Zelllinien. Während SK-Hep-1- und HuH7-Zellen die IGFBPs -1, -2 und -3 exprimierten, konnte für die Zelllinie Hep 3B nur die Expression des IGFBP-1 und des IGFBP-3, für die Zelllinie Hep G2 nur die Expression des IGFBP-1 gezeigt werden.

Obwohl noch keine vergleichenden Untersuchungen zur Expression der Komponenten der IGF-Achse in den HCC-Zelllinien durchgeführt wurden, bestätigen die Arbeiten verschiedener Autoren partiell die vorliegenden Daten. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die Expression von IGF-II durch Hep G2- und HuH7-Zellen u. a. durch Lin et al. (1997), die Expression von IGF-II durch Hep 3B-Zellen u. a. durch Li et al. (1997) gezeigt worden. IGF-I wird von den meisten kultivierten Tumorzelllinien exprimiert, wobei die IGF-I-Expression für Hep G2-Zellen u. a. durch Chew et al. (1995) und für Hep 3B-Zellen u. a. durch Nolten et al. (1994) demonstriert werden konnte. Für SK-Hep-1- und HuH7-Zellen wurde die Expression des IGF-I in dieser Arbeit erstmalig gezeigt. Die Wirkungen von IGF-II und IGF-I werden nach dem aktuellen Wissensstand zumindest zu einem wesentlichen Teil durch Bindung an den IGF-IR vermittelt, der in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wurde, wie bereits in Hep G2-Zellen gezeigt wurde (Kim et al., 1996). Eine schwache Expression des IR war in Hep G2-, Hep 3B- und HuH7-Zellen nachweisbar. Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen an Hep G2-Zellen gestützt, in denen die Expression des IR und das Auftreten beider IR-Isoformen (+ Exon 11 und – Exon 11) nachgewiesen wurde (Norgren et al., 1994). Während die durchgängig nachweisbare starke Expression des IGF-IIR in den untersuchten Zelllinien in

anderen Arbeiten bislang nicht analysiert wurde, ergänzen einige Arbeiten die Beobachtungen zur Expression der IGFBPs. Die Expression des IGFBP-1 in Hep G2-Zellen wurde auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt (Lee et al., 1993; Lang et al., 1999), die Expression des IGFBP-3 in Hep 3B-Zellen z. B. auch in der Arbeit von Kim et al. (1999) nachgewiesen.

Die erhobenen Daten zeigen eine starke Aktivierung der IGF-II-Expression in den HCC-Zelllinien und bestätigen die Auffassung, daß die Überexpression von IGF-II ein häufig zu beobachtendes Phänomen bei der Entstehung und Progression von Tumoren darstellt. So wird bei einer Vielzahl von Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, u.a. solchen des Kindesalters (Sullivan et al., 1995), verschiedenen Adenokarzinomen (Takanami et al., 1996) und experimentell induzierten endokrinen Neoplasien (Minniti et al., 1995) die Überexpression von IGF-II beobachtet. Die Daten zur IGF-II-Expression in den HCC-Zelllinien ergänzen insbesondere die Befunde, nach denen in zumindest 30-40% aller HCCs (Fiorentino et al., 1994; Li et al., 1997) eine Überexpression von IGF-II auftritt und sie auch bei experimentell induzierten HCCs (Fu et al., 1988; Ueno et al., 1988; Schirmacher et al., 1992) häufig zu beobachten ist.

In den HCC-Zelllinien liegt nicht nur eine Reexpression des IGF-II, sondern eine für Tumorzellen typische Überexpression des IGF-II vor. Für die HCC-Zelllinie Hep 3B ist gezeigt wurden, daß die Überexpression von IGF-II mit dem Verlust der P1-Promotor-Aktivität des IGF-II-Gens, bei verstärkter und biallelischer Aktivität des P3-Promotors, also einem Verlust des Promotor-spezifischen genomischen Imprintings einhergeht (Li et al., 1997). Im Gegensatz hierzu geht die Überexpression von IGF-II in der HCC-Zelllinie Hep G2, mit einer verstärkten, monoallelischen P3-Aktivität einher (Li et al., 1997). Eine Erklärung für die beobachtete starke Überexpression von IGF-II in Hep 3B-Zellen, könnte die p53-Defizienz der HEP 3B-Zellen sein. So ist beschrieben wurden, daß p53 die Aktivität des P3- und P4-Promotors des IGF-II-Gens in Rhabdomyosarkomzellen negativ reguliert (Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1998). Die im ELISA bestimmten Mengen von autokrin sezerniertem IGF-II im Überstand der HCC-Zellen sind mit Konzentrationen von 0,3 bis 30 ng/ml (0,039 bis 3,9 nmol/l) als sehr hoch einzuschätzen, da es sich um freies (d. h.: nicht an IGFBPs gebundenes) IGF-II handelt und da schon die Gabe von IGF-II in Konzentrationen von 0,55 ng/ml bzw. 4,3 ng/ml bei den nicht IGF-II sezernierenden Brusttumorzelllinien MCF-7 bzw. T47D zu einer halbmaximalen Stimulation des Wachstums (Karey und Sirbarsku, 1988) führte. Auch im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren, deren

Wirkkonzentrationen oft im pg-Bereich liegen (halbmaximale Wachstumsstimulation in MCF-7-Zellen durch 35 pg/ml EGF und 0,42 ng/ml bFGF (Karey und Sirbarsku, 1988)), sind die sezernierten IGF-II-Konzentrationen beträchtlich. Die Konzentrationen an freiem IGF-II verdeutlichen, daß die hohen Mengen transkribierter IGF-II-mRNA in eine entsprechend hohe IGF-II-Protein-Synthese und –Sekretion umgesetzt werden und daß in allen Zelllinien aktives IGF-II im Überschuß vorliegt.

Das von allen untersuchten Zelllinien sezernierte IGF-I induziert nach Bindung an den IGF-IR gleiche Wirkungen, wie das IGF-II (Karey und Sirbarsku, 1988; Nielsen, 1993). Obwohl eine Überexpression von IGF-I vor allem bei Prostatakarzinomen (Stattin et al., 2000), Mammakarzinomen (Toropainen et al., 1995) und einzelnen soliden pädiatrischen Tumoren, wie primitiven neuroektodermalen Tumoren (Hirschfeld und Helman, 1994) beschrieben wurde, konnten noch in keinem Fall erhöhte IGF-I-Serumkonzentrationen beim HCC festgestellt werden (Stuver et al., 2000). Auch die untersuchten HCC-Zelllinien exprimieren nur sehr geringe Mengen an IGF-I, wobei das sezernierte IGF-I in beträchtlich geringeren Konzentrationen als IGF-II vorlag. Daher ist, obwohl IGF-I und IGF-II mit ähnlich hohen Affinitäten um die Bindung an den IGF-IR konkurrieren, davon auszugehen, daß bei den untersuchten HCC-Zelllinien vornehmlich IGF-II über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren die nachgeschalteten intrazellulären Signalwege induziert.

Alle untersuchten Lebertumorzelllinien exprimierten den IGF-IR und mit Ausnahme der SK-Hep-1-Zellen exprimieren auch alle Zellen IR-Vorläufer-mRNA. Somit sind, die Intaktheit der intrazellulären Signaltransduktionswege vorausgesetzt, die Bedingungen zur kompetenten Signalvermittlung gegeben. Die Expression des IGF-IR ist zwar vergleichsweise gering, jedoch zeichnen sich Tyrosin-Kinase-Rezeptoren allgemein durch eine relativ geringe Expression von $1x10^3$ bis $1x10^4$ Rezeptormolekülen pro Zelle aus (Butler et al., 1998). Einzelne Arbeiten zeigen zwar, daß die Stärke der durch IGF-I und IGF-II vermittelten biologischen Effekte mit der Zahl der exprimierten IGF-IRs korreliert (Butler et al., 1998; Resnicoff et al., 1995b), aber eine Überexpression des IGF-IR konnte in HCCs oder HCC-Zelllinien bislang nicht nachgewiesen werden. Da freies IGF-II im Überstand der HCC-Zelllinien akkumuliert, ist davon auszugehen, daß die Rezeptoren gesättigt sind und eine maximale Rezeptoraktivierung vorliegt. Aufgrund der Expressionsdaten ist somit von einer maximalen Aktivität der IGF-II-Achse und der nachgeschalteten funktionellen Effekte auszugehen.

Obwohl verschiedene gentechnisch eingeführte Mutationen im IGF-IR das tumorigene Potential in kultivierten Zellen verstärkten (Li et al., 1996a; Romano et al., 1999), sind bislang noch keine Mutationen des IGF-IR bei humanen Tumoren *in vivo* beschrieben worden. Die transformierende Eigenschaft des IGF-IR bei Aktivierung ist an sich gegeben und bedarf zur Ausprägung vermutlich nur der Aktivierung durch andere onkogene Faktoren. So konnte gezeigt werden, daß eine HCC-Zelllinie, die mit dem Gen für das HBV-X-Gen-Produkt transfiziert worden war (Kim et al., 1996) und Melanom-Zelllinien, die mutiertes p53 aufwiesen (Girnita et al., 2000), eine gesteigerte IGF-IR-Expression und erhöhtes Entartungspotential aufwiesen.

Es ist ungewiss, ob die beobachtete, schwache Expression der IR-precursor mRNA in den HCC-Zellen für die Signaltransduktion durch IGF-II von Bedeutung ist. Generell ist die Relevanz der Aktivierung des IR bei der Hepatokarzinogenese umstritten, obwohl einige Arbeiten eine Aktivierung des IR durch IGF-II beschreiben. So konnte eine wachstumsfördernde Wirkung von IGF-II auf eine IR-überexprimierende 3T3-ähnliche Mausfibroblastenzelllinie durch Morrione et al. (1997) gezeigt werden.
In Hep G2-Zellen ist gezeigt wurden, daß Insulin spezifisch durch die Aktivierung des IR und IGF-I spezifisch durch Aktivierung des IGF-IR gleiche biologische Prozesse induziert (Verspohl et al., 1988). Die Funktion des IGF-II wurde jedoch nicht näher untersucht. Eine signifikant erhöhte IR-Proteinkonzentration im Lebertumorgewebe (Spector et al., 1999) lässt eine Funktion der IR-Aktivierung im Rahmen der Hepatokarzinogenese ebenfalls möglich erscheinen.
In den meisten Zellen und Geweben bindet der IR IGF-II nur mit relativ geringer Affinität. Jedoch bindet die IR-Isoform A, die durch ein Fehlen des von Exon 11 kodierten Bereiches gekennzeichnet ist und besonders in fetalen Geweben und von diversen Tumoren exprimiert wird, IGF-II mit gleicher Affinität, wie der IGF-IR (Frasca et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Bindung von IGF-II an die IR-Isoform-A stärker mitogen als metabolisch auf Mammakarzinomzelllinien wirkte (Sciacca et al., 1999). Untersuchungen, die eine mögliche Aktivierung der IR-Isoform A durch IGF-II belegen, sind in den HCC-Zelllinien jedoch bislang noch nicht durchgeführt worden.

Obwohl der Abbau von IGF-II eine Funktion des in allen untersuchten HCC-Zelllinien nachgewiesenen IGF-IIR ist, akkumuliert IGF-II im Zellkulturüberstand. Dies zeigt, daß die Expression des IGF-IIR die Akkumulation des IGF-II nicht verhindert. Zwar wird das

Konzept, nach dem der IGF-IIR als Tumorsuppressorgen agiert, durch Arbeiten unterstützt, die zeigen, daß die Zugabe löslichen IGF-II-Rezeptors zu IGF-II-sensitiven Zellen die DNA-Synthese-Rate deutlich vermindert (Scott und Weiss, 2000), doch ist die Stärke der DNA-Synthese-Hemmung von der eingesetzten IGF-II-Konzentration abhängig, die bei den untersuchten HCC-Zelllinien hoch ist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei etwa 60% der HCCs ein Verlust der Heterozygotie des IGF-IIR (De Souza et al., 1995; Yamada et al., 1997), vorlag, wobei 50% der verbleibenden IGF-IIR-Allele Mutationen aufwiesen (Yamada et al., 1997). Byrd et al. (1999) zeigten, daß auch tumorspezifische, inaktivierende Mutationen des IGF-IIR, die in den untersuchten HCC-Zelllinien nicht auszuschließen sind, vorkommen können.

Zusammenfassend sind somit die Vorraussetzungen für eine autokrine Stimulation des IGF-IR durch IGF-II in allen drei untersuchten HCC-Zelllinien (Hep G2, Hep 3B und HuH7) gegeben.

5.2. Autokrine Wachstumsstimulation durch IGF-II

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, daß die Antikörper-vermittelte Blockade des autokrin wirksamen IGF-II zu einer signifikanten Abnahme des Wachstums in allen untersuchten IGF-II-sezernierenden HCC-Zelllinien (Hep G2, Hep 3B und HuH7) führt, jedoch nicht in der IGF-II-negativen Zelllinie SK-Hep-1. Während das Wachstum in Hep G2- und HuH7-Zellen um etwa 40% reduziert war, wurde das Wachstum der Hep 3B-Zellen nahezu vollständig gehemmt. Eine Wachstumshemmung von Hep G2- und HuH7-Zellen durch Blockade des IGF-II erzielten auch Lin et al. (1997), die mit gegen die IGF-II-mRNA gerichteten Antisense-Oligonukleotiden die Translation der IGF-II-mRNA verhindern konnten. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, daß die Neutralisierung des IGF-IR das Wachstum von Hep G2-Zellen ebenfalls um etwa 40% reduziert. In den Hep 3B- und HuH7-Zellen hatte die Neutralisierung des IGF-IR keinen Effekt. Es liegen keine weiteren Arbeiten zur Wirkung der IGF-IR-Blockade in den untersuchten HCC-Zellen vor. Durch Zugabe von IGF-II konnte das Wachstum in keiner der untersuchten Zelllinien stimuliert werden, wie auch in der Arbeit von Zvibel et al. (1995) gezeigt wird, daß die exogene Zugabe von IGF-II zu Hep G2-Zellen das Wachstum nicht fördert.

Die gezeigten Daten bestätigen Beobachtungen an anderen Lebertumormodellen, die nahelegen, daß IGF-II das Wachstum über einen autokrinen Stimulationsmechanismus fördert. In IGF-II-transgenen Mäusen wurde die Reexpression von IGF-II in späten Stadien der Lebertumorgenese in topographischer Korrelation mit hoher Replikationsrate beobachtet (Schirmacher et al., 1992), im humanen HCC-Gewebe wurde ebenfalls eine Kolokalisation von IGF-II und dem Proliferationsmarker MIB1 nachgewiesen (Sohda et al., 1997) und in einer humanen Hepatomazelllinie wurde die wachstumsfördernde Wirkung von IGF-II nachgewiesen (Scharf et al., 1998). Auch in maligne transformierten, IGF-II-überexprimierenden Ovalzelllinien aus der Rattenleber konnte die autokrine Wachstums-stimulierende Wirkung von IGF-II, unter Einsatz des gleichen IGF-II-neutralisierenden Antikörpers, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, gezeigt werden (Zhang et al., 1997b). Darüber hinaus belegen auch Untersuchungen an anderen Tumormodellen die Bedeutung der autokrinen Wachstumsstimulation durch IGF-II. So wird das Wachstum von SV40Tag-induzierten Insulinomen auf dem Hintergrund einer genetischen IGF-II-Defizienz nahezu vollständig inhibiert (Christofori et al., 1994). In der Brusttumorzelllinie MCF-7 wurde die IGF-II-vermittelte, autokrine Wachstumsstimulation durch einen IGF-IR-neutralisierenden Antikörper signifikant gehemmt (Osborne et al., 1989).

Das Wachstum der HCC-Zelllinien Hep G2 und HUH7 wurde durch die höchste eingesetzte Antikörperkonzentration von 100 µg/ml etwa auf die Hälfte verringert. Da die Anzahl avitaler Zellen unverändert blieb, muß die Wachstumshemmung auf einer verlangsamten Proliferationsrate der Zellen beruhen. Diese Schlußfolgerung ist gut vereinbar mit Daten, die in einer IGF-II-überexprimierenden murinen Myoblastenzelllinie eine Verkürzung des Zellzyklus und eine Zunahme der Cyclin D1-, p21- Expression beschreiben (Zhang et al., 1999). Auch Ergebnisse aus Untersuchungen an der humanen Colonkarzinomzelllinie Caco-2 zeigten, daß die IGF-II-Expression, bei starker Stimulation des Wachstums, mit der Expression von p21 und der Phosphorylierung von RB-1 assoziiert ist, und dabei der Differenzierung der Zellen entgegenwirkt (Zarrilli et al., 1999).
In Hep 3B-Zellen ist das Wachstum aber nahezu komplett inhibiert. Es ist anzunehmen, daß das Wachstum auch durch die Einleitung proapoptotischer Prozesse, wie sie in einem Experiment nach Inkubation konfluenter Hep 3B-Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen IGF-II auftraten, verringert wird. Nach den vorliegenden Daten ist der IGF-II-Signalweg für das Wachstum und Überleben der Hep 3B-Zellen essentiell.

Bei der in den Experimenten eingesetzten maximalen Antikörperkonzentration von 100 µg/ml α-IGF-II ist gemäß Herstellerangabe davon auszugehen, daß die wachstumsstimulierende Wirkung von 100 ng/ml freiem IGF-II neutralisiert wird. Da die Konzentration an freiem IGF-II im Zellkulturüberstand 30 ng/ml nicht überstieg, ist davon auszugehen, daß freies IGF-II im Zellkulturüberstand effizient neutralisiert wurde. Allerdings werden die IGF-II-vermittelten Effekte auf das Wachstum in dem gewählten experimentellen Ansatz möglicherweise nicht vollständig erfasst, da die exogen zugegebenen neutralisierenden Antikörper nicht oder nur ineffizient die IGF-II-Moleküle inhibieren, die an IGFBPs oder Rezeptormoleküle gebunden oder auch bereits internalisiert sind. Außerdem stellen die gemessenen Konzentrationen nur Momentaufnahmen dar und berücksichtigen nicht, daß IGF-II im Verlauf der fünftägigen Inkubation beständig neu synthetisiert und abgebaut wird und gleichzeitig trotz wiederholter Gabe auch eine gewisse Degradation der Antikörpermoleküle anzunehmen ist.

Da die Wirkung der IGF-II- und die der IGF-IR-Blockade in Hep G2-Zellen vergleichbar ist, liegt die Annahme nahe, daß die für IGF-II beobachteten Wirkungen vornehmlich durch Aktivierung des IGF-IR weitergeleitet werden. Hier besteht ein Zusammenhang, wie er zuvor auch für den autokrinen IGF-II/IGF-IR-Signalweg in Ovalzelllinien von Ratten beschrieben wurde (Zhang et al., 1997b). Im Gegensatz dazu wird das Wachstum der Hep 3B- und HuH7-Zellen nach Neutralisierung des IGF-IR keineswegs verringert. Obwohl mit diesem Ergebnis nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Aktivierung des IGF-IR auch in diesen Zellen wachstumsfördernd wirkt, läßt sich schlussfolgern, daß die wachstumsfördernde Wirkung des IGF-II in Hep 3B- und HuH7-Zellen nicht ausschließlich durch den IGF-IR vermittelt sein kann und dieser hierfür entbehrlich ist. Alternativ könnten wachstumsstimulierende Effekte durch die hochaffine Bindung des IGF-II an die IR-Isoform A vermittelt werden (Frasca et al., 1998; Sciacca et al., 1999). Da der IGF-IR in Hep 3B und HuH7-Zellen exprimiert wird, ist es naheliegend, anzunehmen, daß in diesen Zellen die wachstumsfördernden Wirkungen des IGF-II durch die Aktivierung der IR-Isoform A vermittelt werden, wenn der IGF-IR funktionell inhibiert ist.

Die exogene Zugabe von rekombinantem, biologisch aktivem IGF-II hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der HCC-Zelllinien. Aufgrund der vorherrschenden hohen Konzentrationen an freiem IGF-II und der durch die Neutralisierung des IGF-II erzielten Wachstumsverminderung ist davon auszugehen, daß die Menge des autokrin sezernierten

IGF-II ausreicht, um das Wachstum der HCC-Zelllinien im Rahmen der IGF-II-Achse maximal zu stimulieren. Die fehlende stimulierende Wirkung von IGF-II auf die IGF-II-negative Zelllinie SK-Hep-1 spricht dafür, daß (möglicherweise aufgrund der fehlenden IGF-II-Sekretion) auch die nachgeschalteten Signaltransduktionswege unter der Tumorgenese nicht konserviert wurden oder auch durch andere Wachstumsfaktoren bereits maximal aktiviert sind.

Insgesamt sind die Ergebnisse gut vereinbar mit der Hypothese, daß IGF-II als Prototyp eines überexprimierten, von einer Tumorzelle sezernierten, autokrinen Wachstumsfaktors einen wichtigen protumorigenen Kompetenzfaktor für das Wachstum von Lebertumorzellen darstellt.

5.3. Veränderungen des Ansprechens auf Chemotherapie

In der vorliegenden Arbeit konnte die wachstumshemmende und Apoptose-induzierende Wirkung von Cisplatin und Etoposid auf Hep G2- und Hep 3B-Zellen gezeigt werden. Die beobachteten Effekte verstärkten sich mit zunehmenden Konzentrationen und Behandlungszeiträumen. Dabei konnte zwischen einem zytostatischen Dosisbereich mit deutlich verringertem Wachstum bei nur gering erhöhten Apoptoseraten und einem zytotoxischen Dosisbereich mit vollständiger Hemmung des Wachstums bei stark erhöhten Apoptoseraten unterschieden werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen erstmalig, daß die Antikörper-vermittelte Blockade von IGF-II in Hep G2- und Hep 3B-Zellen das Ansprechen gegenüber den Zytostatika Cisplatin und Etoposid durch die zusätzliche Inhibierung des Wachstums und Induktion der Apoptose signifikant erhöht. Gleichgerichtete Effekte wurden nach der Antikörper-vermittelten Blockade des IGF-IR in Hep G2-Zellen, jedoch nicht in Hep 3B-Zellen beobachtet. Die zusätzliche, exogene Gabe von IGF-II beeinflusste das Ansprechen der Zellen auf die Zytostatika jedoch nicht.

Die in dieser Arbeit gezeigte Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion durch Cisplatin in Hep G2- und Hep 3B-Zellen deckt sich, auch hinsichtlich der Verläufe der Dosis-Wirkungskurven, gut mit der von Jiang et al. (1999) beschriebenen. In der vorliegenden Arbeit wird auch gezeigt, daß Etoposid in Hep 3B-Zellen Apoptose induziert. Der Annahme, daß Etoposid in Hep 3B-Zellen keine Apoptose induziert (Adjei et al., 1996) muß damit widersprochen werden. Es ist davon auszugehen, daß die in der Arbeit von Adjei et al. (1996) eingesetzte Etoposidkonzentration (5 µM (3 µg/ml)) bei einer Inkubationszeit von nur 48

Stunden zu gering war. Die toxische Wirkung von Etoposid auf Hep G2-Zellen unter Berücksichtigung der Apoptoseinduktion wurde in dieser Arbeit erstmalig gezeigt. Hervorzuheben ist, daß in der vorliegenden Arbeit erstmalig der Einfluss von Komponenten der IGF-Achse auf das Überleben von HCC-Zellen nach Behandlung mit Zytostatika untersucht wurde.

Hinweise darauf, daß die Blockade von IGF-II das Überleben nach Zytostatikabehandlung verbessert, stammen aus anderen Tumormodellen. Lamm und Christofori (1998) zeigten, daß IGF-II defiziente murine ß-Tumorzellen, im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypzellen nach Behandlung mit Zytostatika (u. a. Etoposid) eine deutlich erhöhte Apoptoserate aufwiesen. Xu et al. (1997) zeigten, daß die Zugabe von IGF-II zu Myelomzelllinien die Dexamethason-induzierte Apoptose signifikant verringert. Mooney et al. (1997) konnten durch IGF-II die Cycloheximid- und Etoposid-induzierte Apoptose in humanen Mesangialzellen etwa um die Hälfte reduzieren.

Auch für den IGF-IR ist gezeigt wurden, daß seine Aktivierung die Apoptose nach Zytostatikabehandlung in verschiedenen Modellsystemen reduziert. Die IGF-IR-Aktivierung in einer IGF-IR-überexpimierenden murinen Fibroblastenzelllinie führte im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen zu einer signifikanten Abnahme des Zelltodes nach Behandlung mit Etoposid (Sell et al., 1995). Nach exogener Stimulation durch IGF-I verstärkte die Gabe des IGF-IR-neutralisierenden Antikörpers α-IR3 die zytotoxische Wirkung von 5-Fluorouracil in einer Kolonkarzinomzelllinie um ein Vielfaches (Perer et al., (2000), Beech et al. (2001)) zeigten, daß die IGF-IR-Aktivierung in der Mammatumorzelllinie MCF-7 das Überleben nach Doxorubicin- bzw. Taxolbehandlung verbessert.

Das verbesserte Ansprechen auf die Zytostatika durch Unterbrechung der autokrinen IGF-II-Stimulation ist in der vorliegenden Arbeit allerdings zum ersten Mal für Lebertumorzelllinien gezeigt wurden. Die spontane Apoptoserate blieb nach Neutralisierung des IGF-II/IGF-IR-Signalweges in den untersuchten HCC-Zellen unverändert, obwohl das Wachstum signifikant verringert wurde. Bei N-myc-überexprimierenden Lebertumorzellen von Waldmurmeltieren reduziert IGF-II die spontane Apoptoserate (Ueda und Ganem, 1996), bei IGF-II-defizienten murinen ß-Tumorzelllinien ist sie erhöht (Lamm und Chrisofori, 1998). Aufgrund der vorliegenden Daten ist anzunehmen, daß die IGF-II-vermittelten Effekte beim Fehlen eines Apoptose-induzierenden Reizes vorrangig das Wachstum der HCC-Zelllinien regulieren. Wie

sich aus den in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen ergab, kam es im zytostatischen Dosisbereich unter der Einwirkung Apoptose-induzierender Stimuli (Cisplatin und Etoposid) sowohl zu einer Reduktion des Wachstums als auch des Überlebens nach Neutralisierung des autokrin wirksamen IGF-II. Ist das Wachstum jedoch, wie in konfluenten Hep 3B-Zellen, deutlich eingeschränkt, so erhöht sich der Anteil toter Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bei Blockade des IGF-II stark. Im zytotoxischen Dosisbereich blieb die IGF-II-Blockade wirkungslos, da die Schädigung der Zellen durch die Zytostatika bereits so umfassend war, daß IGF-II-vermittelte Signale ohne Einfluss blieben. In der Arbeit von Beech et al. (2001) nähern sich die Dosis-Wirkungskurven von IGF-IR-aktivierten versus nicht-aktivierten MCF-7-Brustzelllinien mit zunehmenden Konzentrationen der Zytostatika Doxorubicin und Taxol stark an, wodurch die Annahme gestützt wird, daß die Hemmung biologischer Signalmediatoren nur dann wirkungsvoll ist, wenn die mit Zytostatika behandelten Zellen nicht gänzlich zerstört werden.

In Übereinstimmung mit den Daten zur Wachstumshemmung verbessert die Blockade des IGF-IR nur in Hep G2-, aber nicht in Hep 3B-Zellen das Ansprechen auf die Zytostatika Cisplatin und Etoposid. In Hep G2-Zellen gleichen sich die Effekte der IGF-IR- und der IGF-II-Neutralisierung. Dies entspricht einer Situation, in der die autokrine IGF-II/IGF-IR-Interaktion das Ansprechen auf die Zytostatika verschlechtert. Wie in 5.1.2. diskutiert, könnten die antiapoptotischen Wirkungen von IGF-II in Hep 3B-Zellen zusätzlich durch Aktivierung alternativer Rezeptoren, wie der IR-Isoform A vermittelt werden, wenn der IGF-IR funktionell inhibiert ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß autokrin sezerniertes IGF-II das Ansprechen von HCC-Zellen auf Zytostatika verringert. Daher könnte die Unterbrechung des IGF-II-Signalweges eine Strategie zur Behandlung des HCC darstellen. Es bieten sich verschiedene Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen an. Es erscheint zwar weniger realistisch *in vivo* die z. T. ausgeprägte Überexpression von IGF-II durch die Gabe neutralisierender Antikörper zu verhindern, doch könnte die Verfügbarkeit von IGF-II durch neutralisierend wirkende IGFBPs oder durch inaktivierende Liganden, die um den IGF-IR konkurrieren, verringert werden. IGFBPs könnten durch Gabe von Trichostatin A hochreguliert werde (Gray et al., 2000), außerdem könnte durch die Gabe von löslichem IGF-IIR die IGF-II-vermittelte Proliferation verringert werden (Scott und Weiss, 2000). Die Inhibierung des IGF-IR ist

bereits Gegenstand klinischer Studien, jedoch sind aufgrund des breiteren Wirkungsspektrums des IGF-IR unerwünschte Wirkungen wahrscheinlicher.

5.4. Potentielle Effektormechanismen

In der vorliegenden Arbeit wurde der mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Blockade des IGF-II und von Hep G2-, Hep 3B- und HuH7-Zellen nach Stimulation mit IGF-II anhand von cDNA-Microarrayanalysen untersucht.

Nach Blockade des IGF-II in Hep 3B-Zellen nahmen insbesondere die Transkriptkonzentrationen des Transkriptionsfaktors EGR-1 und mit zunehmender Inkubationsdauer auch die des IGF-II selbst zu. Letzteres ist möglicherweise im Sinne einer negativen Rückkopplung zu erklären.

Die Gabe von IGF-II zu den Zellen führte zur Zu- und Abnahme verschiedener Transkripte. In Hep 3B-Zellen wurde wiederholt eine Abnahme der mRNAs der Integrin-Familie (α6, ß1 und ß4) und eine Zunahme der mRNAs der nukleären Tyrosin-Phosphatase PRL-1 beobachtet. In HuH7-Zellen nahmen ebenfalls die Integrin ß4-Transkripte und auch wiederholt die α2MRAP-Transkripte ab.

Die transkriptionelle Regulation der Expression einzelner Gene nach Gabe von IGF-II ist im humanen Lebertumormodell bisher nur an Hep G2-Zellen für einige leberspezifisch exprimierte Gene von Zvibel et al. (1995) untersucht wurden. So führte die Stimulation durch IGF-II zu einer Zunahme der Albumin- und HNF-3-mRNA, blieb aber ohne Einfluss auf die Expression von α-1-Antitrypsin und der leberspezifischen Transkriptionsfaktoren HNF-3-α und HNF-4.

Der Einfluss des α-IGF-II auf die Expression des EGR-1 und des IGF-II ist in der Literatur noch nicht beschrieben wurden, doch liegen Daten vor, nach denen die Expression von IGF-II durch EGR-1 reguliert wird. Bae et al. (1998) zeigten, daß Hep G2-Zellen unter hypoxischen Bedingungen den Transkriptionsfaktor EGR-1 vermehrt exprimieren, der dann durch Bindung an den P3-Promotor des IGF-II-Gens die Transkription der 6.0 kb grossen IGF-II-Transkripte induziert, welche in der gesunden adulten Leber supprimiert sind, aber im HCC wieder aktiviert werden können. Hypoxische Bedingungen liegen normalerweise unter pathologischen Umständen, wie z. B. im Zentrum von HCCs vor, doch die Blockade von IGF-II kann in unserem System möglicherweise ebenfalls durch Aktivierung des EGR-1 zur

nachgeschalteten Zunahme der IGF-II-Expression führen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß nach der Blockade des sezernierten IGF-II im Sinne einer Gegenregulation die IGF-II-Expression induziert wird, wobei EGR-1 einen potentiellen Aktivator darstellt.
Untersuchungen an humanen Tumorzelllinien zeigten, daß EGR-1 durch Aktivierung von TGF-ß, das, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, auch durch Blockade des IGF-II in Hep 3B-Zellen aktiviert wurde, wachstumshemmend und durch Aktivierung des p53 proapoptotisch wirkt (Liu et al., 1998). Die beschriebenen Wirkungen sind mit den in dieser Arbeit beobachteten Wirkungen der IGF-II-Blockade in Hep 3B-Zellen vereinbar, so daß EGR-1 als Mediator der durch die IGF-II-Blockade erzielten Effekte in Frage kommt.

Die Integrine α6, ß1 und ß4 wurden in Hep 3B-Zellen durch IGF-II deutlich herunter reguliert. Für das Integrin ß4 wurde in HuH7-Zellen ein gleichgerichteter Effekt beobachtet.
Die Integrine stellten die Gruppe der am deutlichsten durch IGF-II regulierten Transkripte dar. Alle Integrine sind Heterodimere, die aus einer α und einer ß Untereinheit aufgebaut sind. Sie sind bei der Zell-Matrix und der Zell-Zell-Adhäsion von herausragender Bedeutung (Ruoslahti, 1991). Das Basalmembran-bindende α6/ß4-Integrin findet sich nur in epithelialen Zellen. Integrin ß1 ist essentiell für Wechselwirkungen zwischen dem Epithel und dem Mesenchym und kann mit einer Reihe von α-Untereinheiten interagieren. In Hep G2- und Hep 3B-Zellen ist die Aktivierung des heterodimeren Laminin-Rezeptors Integrin α6/ß1, sowie dessen Stimulation durch die Zytokine TGF-ß und FGF-2 gezeigt wurden (Nejjari et al., 1999). Daten zur Wirkung von IGF-II auf die Expression der Integrine sind bislang nicht bekannt.

Die deutlich zu beobachtende Abnahme der Integrin-Expression nach Gabe von IGF-II, zeigt an, daß IGF-II die Zell-Zell-Adhäsion verringern könnte, was die Ablösung von Zellen aus dem normalen Gewebeverband fördern und damit zur Tumorinvasion und letztendlich auch zur Metastasierung beitragen könnte. Für diese Möglichkeit sprechen u. a. Arbeiten an der Blasenkarzinomzelllinie UM-UC-2, die zeigen, daß die Expression des Integrinheterodimers α6/ß4 wachstumshemmend und tumorsupprimierend wirkt (Kim et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch eine Zunahme der Transkriptmengen der nukleären Tyrosin-Phosphatase PRL-1 in Hep 3B-Zellen nach Stimulation mit IGF-II gezeigt werden.
Die Transkripte des PRL-1 (Abkürzung für: phosphatase of regenerating liver) sind während der stärksten Wachstumsphase der Leberregeneration in schnell proliferierenden Hepatozyten

und Nichtparenchymzellen durchgängig erhöht. PRL-1 wird außerdem in hohen Mengen von anderen proliferierenden Zellen und einer Vielzahl von Tumorzelllinien, wie Hepatomzelllinien exprimiert (Diamond et al., 1994). PRL-1-transfizierte Zellen weisen verkürzte Populationsverdopplungszeiten auf, wachsen dichter und nahezu Substrat-unabhängig. Die Überexpression des humanen PRL-1 in epithelialen Zellen führt neben der Transformation kultivierter Zellen auch zur Tumorbildung in Nacktmäusen (Cates et al., 1996). Die Hypothese, daß PRL-1 an der Vermittlung proliferationsfördernder Effekte des IGF-II in Lebertumorzelllinien beteiligt sein kann, wird weiterhin durch Untersuchungen gestützt, die zeigen, daß die Expression von PRL-1 in der regenerierenden Leber und in mit Mitogenen behandelten Zellen schnell induziert wird (Peng et al., 1999). Die Tatsache, daß PRL-1 in der mit Insulin behandelten H35 Ratten Hepatomzelllinie konstitutiv exprimiert wird (Diamond et al., 1994), andere früh induzierten Gene aber weiterhin normal reguliert sind, verweist auf eine möglicherweise häufig in Lebertumoren auftretende, spezifische Regulation des PRL-1 durch Komponenten der IGF-Achse hin.

Die erhobenen Daten liefern Hinweise auf mögliche Funktionen der Effektoren des IGF-II in Lebertumorzellen. Die Untersuchungen zum Einfluss von IGF-II (und anderen Wachstumsfaktoren) auf den mRNA-Status in Lebertumormodellen stehen noch am Anfang. cDNA-Microarrays, die umfassendere Datensätze zu den Veränderungen des mRNA-Status liefern und Analyseprogramme, welche die Daten im Hinblick auf sinnvolle Modelle möglicher Expressionsregulation und Interaktionen der Proteinprodukte ordnen, können helfen, Wirkungsweise von protumorigenen Faktoren auf molekularer Ebene zu charakterisieren, und möglicherweise pathologische Klassifizierung von Tumoren ergänzen.

6. Zusammenfassung

IGF-II wird häufig in experimentell induzierten und humanen hepatozellulären Karzinomen überexprimiert und seine Expression korreliert mit einem verstärktem Tumorwachstum. In dieser Arbeit wurde an humanen Lebertumorzelllinien (SK-Hep-1, Hep G2, Hep 3B und HuH7) untersucht, ob IGF-II das Wachstum fördert, das Ansprechen auf Zytostatika moduliert und welche Gene durch IGF-II reguliert werden.

Die IGF-II-Sekretion wurde mittels ELISA quantifiziert und die Expression von Komponenten der IGF-II-Achse durch cDNA-Microarrayanalysen bestimmt. Nach Stimulation der Zellen mit rekombinantem humanem IGF-II oder Blockade des IGF-II oder des IGF-IR durch monoklonale neutralisierende Antikörper wurde das Wachstum und die Vitalität der Zellen über die Erstellung von Wachstumskurven, durch Trypan-Blau-Färbung und in einem MTT-verwandten Assay bestimmt. Apoptose wurde morphologisch und mittels der TUNEL-Färbung bestimmt. Die gleichen Parameter wurden bei kombinierter Gabe der Zytostatika Cisplatin oder Etoposid, und IGF-II oder neutralisierenden Antikörpern gegen IGF-II oder den IGF-IR, bestimmt. Zusätzlich wurde die Veränderung der Genexpression nach Stimulation der HCC-Zellen mit IGF-II bzw. nach Neutralisierung des IGF-II mit cDNA-Microarrays untersucht.

Die HCC-Zelllinien (Hep G2, Hep 3B und HuH7) wiesen eine starke Überexpression und Sekretion von IGF-II auf und stimulierten ihr Wachstum in autokriner Weise. Die Blockade von IGF-II erhöhte das Ansprechen auf die Zytostatika Etoposid und Cisplatin besonders im geringeren, zytostatischen Dosisbereich, was zu einem erheblichen Teil auf erhöhter Apoptose beruhte. Sowohl die Zugabe als auch die Neutralisierung von IGF-II veränderte die Expression potentieller Mediatoren der IGF-II-Wirkung, wie die des Transkriptionsfaktors EGR-1, der Tyrosin-Phosphatase PRL-1 und der Integrine α6, ß1 und ß4.

Die funktionellen Untersuchungen zeigen, dass IGF-II als relevanter protumorigener Faktor für HCC-Zellen anzusehen ist und daß die Inhibition von IGF-II das Wachstum von Lebertumorzellen negativ und ihr Ansprechen auf Chemotherapeutika positiv beeinflußt.

7. Literaturverzeichnis

Abbott, A. M., Bueno, R., Pedrini, M. T., Murray, J. M. und Smith, R. J. (1992)
Insulin-like growth factor I receptor gene structure.
J Biol Chem, **267(15)**: 10759-10763.

Abou-Elella, A., Gramlich, T., Fritsch, C. und Gansler, T. (1996)
c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis.
Mod Pathol, **9(2)**: 95-98.

Adjei, P. N., Kaufmann , S. H., Leung, W. Y., Mao, F. und Gores, G. J. (1996)
Selective induction of apoptosis in Hep 3B cells by topoisomerase I inhibitors: evidence for a protease-dependent pathway that does not activate cysteine protease P32.
J Clin Invest, **98(11)**: 2588-2596.

Alessi, D. R. und Cohen, P. (1998)
Mechanism of activation and function of protein kinase B.
Curr Opin Genet Dev, **8(1)**: 55-62.

Auletta, M., Nielsen, F. C. und Gammeltoft, S. (1992)
Receptor-mediated endocytosis and degradation of insulin-like growth factor I and II in neonatal rat astrocytes.
J Neurosci Res, **31(1)**: 14-20.

Bae, M. H., Lee, M. J., Bae, S. K., Lee, O. H., Lee, Y. M., Park, B. C. und Kim, K. W. (1998)
Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity.
Cancer Lett, **128(1)**: 41-46.

Baserga, R. (1995)
The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?
Cancer Res, **55(2)**: 249-252.

Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. und Valentinis, B. (1997)
The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis.
Biochim Biophys Acta, **1332(3)**: F105-126.

Beasley, R. P., Lin, C. C., Hwang, L. Y. und Chien, C. S. (1981)
Hepatocellular carcinomas and hepatitis B virus: a prospective study of 22707 men in Taiwan.
Lancet, **2(8256):** 129-1133.

Beech, D. J., Parekh, N. und Pang, Y. (2001)
Insulin-like growth factor-I receptor antagonism results in increased cytotoxicity of breast cancer cells to doxorubicin and taxol.
Oncol Rep, **8(2):** 325-329.

Braulke, T. (1999)
Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein.
Horm Metab Res, **31(2-3):** 242-246.

Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J., Wands, J. R. und Ozturk, M. (1990)
Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma.
Proc Natl Acad Sci U S A, **87(5):** 1973-1977.

Brissenden, J. E., Ullrich, A. und Francke, U. (1984)
Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor.
Nature, **310(5980):** 784-786.

Bronowicki, J. P., Vetter, D. und Doffoel, M. (1997)
Chemoembolization of hepatocellular carcinoma.
In: Okuda K. und Tabor E. [Hrsg.], Liver Cancer, Churchill Livingstone, New York [u. a.], pp 463-469.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R., und Kley, N. (1995)
Induction of growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.
Nature, **377(6550)**: 646-649.

Burtscher, I., Compagni, A., Lamm, G. M. und Christofori, G. (1999)
An insulin-like growth factor-mediated, Phosphtidylinositol 3´ Kinase-independent survival signaling pathway in ß tumor cells.
Cancer Res, **59(16):** 3923-3926.

Butler, A. A., Blakesley, V. A., Poulaki, V., Tsokos, M., Wood, T. L., Le Roith, D. und Pouliki, V. (1998)
Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression.
Cancer Res, **58(14):** 3021-3027.

Butt, A. J., Firth, S. M., und Baxter, R. C. (1999)
The IGF axis and programmed cell death.
Immunol Cell Biol, **77(3)**: 256-262.

Byrd, J. C., Devi, G. R., de Souza, A. T., Jirtle, R. L. und MacDonald, R. G. (1999)
Disruption of ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor by cancer-associated missense mutations.
J Biol Chem, **274(34)**: 24408-24416.

Cates, C. A., Michael, R. L., Stayrook, K. R., Harvey, K. A., Burke, Y. D., Randall, S. K., Crowell, P. L. und Crowell, D. N. (1996)
Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases.
Cancer Lett, **110(1-2)**: 49-55.

Chew, S. L., Lavender, P., Clark, A. J. und Ross, R. J. (1995)
An alternatively spliced human insulin-like growth factor-I transcript with hepatic tissue expression that diverts away from the mitogenic IBE1 peptide.
Endocrinology, **136(5)**: 1939-1944.

Christofori, G., Naik, P. und Hanahan, D. (1994)
A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis.
Nature, **369(6479)**: 414-418.

D`Ambrosio, C., Ferber, A., Resnicoff, M. und Baserga, R. (1996)
A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis.
Cancer Res, **56(17)**: 4013-4020.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. E. (1997)
Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.
Cell, **91(2)**: 231-241.

De Chiara, T. M., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1991)
Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene.
Cell, **64(4)**: 849-859.

De La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A. und Perret, C. (1998)
Somatic mutations of beta catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas.
Proc Natl Acad Sci U S A, **95(15):** 8847-8851.

DeLarco, J. E. und Todaro, G. J. (1978)
Human transforming growth factor-α: precursor structure and expression in E. Coli.
Cell, **38:** 287-297.

D`Errico, A., Fiorentino, M., Ponzetto, A., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Brechot, C., Scoazec, J. Y. und Grigioni, W. F. (1996)
Liver hepatocyte growth factor does not always correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: its specific receptor c-met does.
Hepatology, **24(1):** 60-64.

D`Errico, A., Grigioni, W. F., Fiorentino, M., Baccarini, P., Lamas, E., De Mitri, S., Gozzetti, G., Mancini, A. M. und Brechot, C. (1994)
Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) in human hepatocellular carcinomas: an immunhistochemical study.
Pathol Int, **44(2)**: 131-137.

Derynck, R., Goeddel, D. V. Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S. und Berger, W. H. (1987)
Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and ß and the epidermal growth factor receptor by human tumors.
Cancer Res, **47(3)**: 707-712.

De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C. und Jirtle, R. L. (1995)
M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity.
Nat Genet, **11(4)**: 447-449.

Deuffic, S., Poynard, T. und Valleron, A. J. (1999)
Correlation between hepatitis C virus prevalence and hepatocellular carcinoma mortality in Europe.
J Viral Hepat, **6(5)**: 411-413.

Diamond, R. H., Cressman, D. E., Laz, T. M., Abrams, C. S. und Taub, R. (1994)
PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth.
Mol Cell Biol, **14(6)**: 3752-3762.

Di Bisceglie, A. M., Rustgi, V. K., Hoofnagle, J. M., Dusheiko, J. M. und Lotze, M. T. (1988)
NIH conference. Hepatocellular Carcinoma.
Ann Intern Med, **108(3)**: 390-401.

Duguay, S. J. (1999)
Post-translational processing of insulin-like growth factors.
Horm Metab Res, **31(2-3)**: 43-49.

Esposito, D. L., Blakesley, V. A., Koval, A. P., Scrimgeour, A. G. und Le Roith, D. (1997)
Tyrosine residues in the C-terminal domain of the insulin-like growth factor-I receptor mediate mitogenic and tumorigenic signals.
Endocrinology, **138(7)**: 2979-2988.

Fearon, E. R. und Vogelstein, B. (1990)
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell, **61(5)**: 759-767.

Fiorentino, M., Grigioni, W. F., Baccarini, P., D`Errico, A., De Mitri, M. S., Pisi, E. und Mancini, A. M. (1994)
Different in situ expression of insulin-like growth factor type II in hepatocellular carcinoma. An in situ hybridization and immunohistochemical study.
Diagn Mol Pathol, **3(1)**: 59-65.

Fottner, C., Engelhardt, D. und Weber, M. M. (1998)
Regulation of steroidgenesis by insulin.like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins.
J Endocrinol, **158(3)**: 409-417.

Florini, J. R., Ewton, D. Z. und Coolican, S. A. (1996)
Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis.
Endocr Rev, **17(5)**: 481-517.

Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A. und Vigneri, R. (1999)
Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells.
Mol Cell Biol, **19(5)**: 3278-3288.

Fu, X. X., Su, C. Y., Lee, Y., Hintz, R., Biempica, L., Snyder, R. und Rogler, C. E. (1988)
Insulinlike growth factor II expression and oval cell proliferation associated with hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus carriers.
J Virol, **62(9)**: 3422-3430.

Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C. G. und Polychronakos, C. (1993)
Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene.
Nat Genet, **4(1)**: 98-101.

Girnita, L., Girnita, A., Brodin, B., Xie, Y., Nilsson, G., Dricu, A., Lundeberg, J., Wejde, J., Bartolazzi, A., Wiman, K. G. und Larsson, O. (2000)
Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: functional impact.
Cancer Res, **60(18)**: 5278-5283.

Goustin, A. S., Edward, B. L., Gary, D. S. und Harold, L. M. (1986)
Growth factors and cancer.
Cancer Res, **46(3)**: 1015-1029.

Gray, S. G., Kytola, S., Lui, W. O., Larsson, C. und Ekström, T. J. (2000)
Modulating IGFBP-3 expression by trichostatin A: potential therapeutic role in the treatment of hepatocellular carcinoma.
Int J Mol Med, **5(1)**: 33-41.

Grothey, A., Voigt, W., Schober, C., Müller, T., Dempke, W. und Schmoll, H. J. (1999)
The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors.
J Cancer Res Clin Oncol, **125(3-4)**: 166-173.

Haskell, C. M. (2001)
Principles of cancer chemotherapy.
In: Haskell, C. M. [Hrsg.], Cancer Treatment, Saunders, Philadelphia [u. a.], pp63-86.

Heldin, C. H. (1995)
Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.
Cell, **80(2)**: 213-223.

Hirschfeld, S. und Helman, L. (1994)
Diverse roles of insulin-like growth factors in pediatric solid tumors.
In Vivo, **8(1)**: 81-90.

Hongo, A., D`Ambrosio, C., Miura, M., Morrione, A. und Baserga, R. (1996)
Mutational analysis of the mitogenic and transforming activities of the insulin-like growth factor I receptor.
Oncogene, **12(6)**: 1231-1238.

Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J. und Harris, C. C. (1991)
Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas.
Nature, **350(6317)**: 427-428.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H. und Matsuzawa, Y. (1995)
Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma.
Cancer Lett, **89(1)**: 45-48.

Ito, T., Sasaki, Y. und Wands, J. R. (1996)
Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases.
Mol Cell Biol, **16(3)**: 943-951.

Jiang, S., Song, M. J., Shin, E. C., Lee, M. O., Kim, S. J. und Park, J. H. (1999)
Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways.
Hepatology, **29(1)**: 101-110.

Kaczynski, J. (1999)
Prevention of cirrhosis is the best measure against hepatocellular cancer.
Läkartidningen, **96(4)**: 338-341.

Kang-Park, S., Lee, J. H., Shin, J. H. und Lee, Y. I. (2001)
Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings.
Biochem Biophys Res Commun, **282(2)**: 303-307.

Karey, K. P. und Sirbasku, D. A. (1988)
Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 beta-estradiol.
Cancer Res, **48(14)**: 4083-4092.

Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffer, P., Downward, J. und Evan, G. (1997)
Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB.
Nature, **385(6616)**: 544-548.

Kavanaugh, W. M. und Wiliams, L. T. (1996)
Signaling through receptor tyrosine kinases.
In: Heldin, C.-H. und Purton, M. [Hrsg.], Signal Transduction, Chapmann & Hall, London [u. a.], pp3-15.

Kiess, W., Koepf, G., Christiansen, H. und Blum, W. F. (1997)
Human neuroblastoma cells use either insulin-like growth factor-I or insulin-like growth factor-II in an autocrine pathway via the IGF-I receptor: variability of IGF, IGF binding protein (IGFBP) and IGF receptor gene expression and IGF and IGFBP secretion in human neuroblastoma cells in relation to cellular proliferation.
Regul Pept, **72(1)**: 19-29.

Killian, J. K. und Jirtle, R. L. (1999)
Genomic structure of the human M6P/IGF2 receptor.
Mamm Genome, **10(1)**: 74-77.

Kim, D. G., Lee, D. Y., Cho, B. H., You, K. R., Kim, M. Y. und Ahn, D. S. (1999)
Down-regulation of insulin-like growth factor binding proteins and growth modulation in hepatoma cells by retinoic acid.
Hepatology, **29(4)**: 1091-1098.

Kim, K. W., Bae, S. K., Lee, O. H., Bae, M. H., Lee, M. J. und Park, B. C. (1998)
Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma.
Cancer Res, **58(2)**: 348-351.

Kim, S. O., Park, J. G. und Lee, Y. I. (1996)
Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product.
Cancer Res, **56(16)**: 3831-3836.

Kim, S. Y., Bachman, N. J., Nair, T. S., Goldsmith, S., Liebert, M., Grossman, H. B., Lomax, M. I, und Carey, T. E. (1997)
Beta 4 integrin transfection of UM-UC-2 (human bladder carcinoma) cells: stable expression of a spontaneous cytoplasmic truncation mutant with rapid loss of clones expressing intact beta 4.
Cancer Res, **57(1)**: 38-42.

Kulik, G., Klippel, A. und Weber, M. J. (1997)
Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidyl-inositol 3-kinase, and Akt.
Mol Cell Biol, **17(3)**: 1595-1606.

Kusano, N., Shiraishi, K., Kubo, K., Oga, A., Okita, K. und Sasaki, K. (1999)
Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features.
Hepatology, **29(6)**: 1858-1862.

Lamm, G. M. und Christofori, G. (1998)
Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumor cells.
Cancer Res, **58(4)**: 801-807.

Lang, C. H., Nystrom, G. J. und Frost, R. A. (1999)
Regulation of IGF binding protein-1 in hep G2 cells by cytokines and reactive oxygen species.
Am J Physiol, **276(3 Pt 1)**: G719-727.

Langdahl, B. L., Kassem, M., Möller, M. K. und Eriksen, E. F. (1998)
The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone.
Eur J Clin Invest, **28(3)**: 176-183.

Lee, P. D., Suwanichkul, A., De Paolis, L. A., Snuggs, M. B., Morris, S. L. und Powell, D. R. (1993)
Insulin-like growth factor (IGF) suppression of IGFBP-1 production: evidence for mediation by the type I IGF receptor.
Regul Pept, **48(1-2)**: 199-206.

Lee, Y. I., Lee, S., Das, G. C., Park, U. S., Park, S. M. und Lee, Y. I. (2000)
Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma.
Oncogene, **19(33)**: 3717-3726.

Lee, Y. I., Lee, S., Lee, Y., Bong, Y. S., Hyun, S. W., Yoo, Y. D., Kim, S. J., Kim, Y. W. und Poo, H. R. (1998)
The human hepatitis B virus transactivator X gene product regulates Sp1 mediated transcription of an insulin-like growth factor II promoter 4.
Oncogene, **16(18)**: 2367-2380.

Li, S., Resnicoff, M. und Baserga, R. (1996a)
Effect of mutations at serines 1280-1283 on the mitogenic and transforming activities of the insulin-like growth factor I receptor.
J Biol Chem, **271(21)**: 12254-12260.

Li, S. L., Goko, H., Xu, Z. D., Kimura, G., Sun, Y., Kawachi, M. H., Wilson, T. G., Wilczynski, S. und Fujita-Yamaguchi, Y. (1998)
Expression of insulin-like growth factor (IGF)-II in human prostate, breast, bladder, and paraganglioma tumors.
Cell Tissue Res, **291(3)**: 469-479.

Li, X., Cui, H., Sandstedt, B., Nordlinder, H., Larsson, E. und Ekström, T. J. (1996b)
Expression levels of the insulin-like growth factor-II gene (IGF-II) in the human liver: developmental relationships of the four promoters.
J Endocrinol, **149(1)**: 117-124.

Li, X., Nong, Z., Ekström, C., Larsson, E., Nordlinder, H., Hofmann, W. J., Trautwein, C., Odenthal, M., Dienes, H. P., Ekström, T. J. und Schirmacher, P. (1997)
Disrupted IGF2 promoter control by silencing of promoter P1 in human hepatocellular carcinoma.
Cancer Res, **57(10)**: 2048-2054.

Lin, S. B., Hsieh, S. H., Hsu, H. L., Lai, M. Y., Kann, L. S. und Au, L. C. (1997)
Antisense oligodeoxynucleotides of IGF-II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF-II.
J Biochem (Tokyo), **122(4)**: 717-722.

Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E. und Mercola, D. (1998)
Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1.
Cancer Gene Ther, **5(1)**: 3-28.

Liu, P., Terradillos, O., Renard, C. A., Feldmann, G., Buendia, M. A. und Berneau, D. (1997)
Hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus/c-myc mice: sustained cell proliferation and biphasic activation of insulin-like growth factor II.
Hepatology, **25(4)**: 874-883.

Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., Danglot, G., Tiollais, P., Bernheim, A. und Dejean, A. (1997)
Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization.
Genes Chromosomes Cancer, **18(1)**: 59-65.

Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, H. E., Twardzik, D. R., DeLarco, J. E., Stephenson, J. R. und Todaro, G. J. (1983)
Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor.
Proc Natl Acad Sci U S A, **80**: 4684-4688.

Minniti, C. P., Luan, D., O'Grady, C., Rosenfeld, R., Oh, Y. und Helman, L. J. (1995)
Insulin-like growth factor II overexpression in myoblasts induces phenotypic changes typical of the malignant phenotype.
Cell Growth Differ, **6(3)**: 263-269.

Mooney, A., Jobson, T., Bacon, R., Kitamura, M. und Savill, J. (1997)
Cytokines promote glomerular mesangial cell survival in vitro by stimulus-dependent inhibition of apoptosis.
J Immunol, **159(8)**: 3949-3960.

Morgan, D. O., Jarnagin, K. und Roth, R. A. (1986)
Purification and characterization of the receptor for insulin-like growth factor I.
Biochemistry, **25(19)**: 5560-5564.

Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S. Q, Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1997)
Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A, **94(8)**: 3777-3782.

Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S. und Sekiya, T. (1991)
Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas.
Cancer Res, **51(20)**: 5520-5525.

Murphy, L. J. (1998)
Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy?
J Mol Endocrinol, **21(2)**: 97-107.

Nakanuma, Y., Terada, T., Ueda, K., Terasaki, S., Nonomura, A. und Matsui, O. (1993)
Adenomatous hyperplasia of the liver as a precancerous lesion.
Liver, **13(1)**: 1-9.

Nejjari, M., Hafdi, Z., Dumortier, J., Bringuier, A. F., Feldmann, G. und Scoazec, J. Y. (1999)
alpha6beta1 integrin expression in hepatocarcinoma cells: regulation and role in cell adhesion and migration.
Int J Cancer, **83(4)**: 518-525.

Nielsen, F. C. (1993)
The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II.
Prog Growth Factor Res, **4**: 257-290.

Niketeghad, F., Decker, H. J., Caselmann, W. H., Lund, P., Geissler, F., Dienes, H. P. und Schirmacher, P. (2001)
Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis.
Br J Cancer, **85(5)**: 697-704.

Nolten, L. A., van Schaik, F. M., Steenbergh, P. H. und Sussenbach, J. S. (1994)
Expression of the insulin-like growth factor I gene is stimulated by the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha and LAP.
Mol Endocrinol, **8(12)**: 1636-1645.

Norgren, S., Li, L. S. und Luthman, H. (1994)
Regulation of human insulin receptor RNA splicing in HepG2 cells: effects of glucocorticoid and low glucose concentration.
Biochem Biophys Res Commun, **199(1)**: 277-284.

O`Connor, R., Kauffmann-Zeh, A., Liu, Y., Lehar, S., Evan, G. I., Baserga, R. und Blättler, W. A. (1997)
Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis.
Mol Cell Biol, **17(1)**: 427-435.

Okada, S. (1997)
Chemotherapy for hepatocellular carcinoma.
In: Okuda K. und Tabor E. [Hrsg.], Liver Cancer, Churchill Livingstone, New York [u. a.], pp441-447.

Okamoto, T., Nishimoto, I., Murayama, Y., Ohkuni, Y. und Ogata, E. (1990)
Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor is incapable of activating GTP-binding proteins in response to mannose 6-phosphate, but capable in response to insulin-like growth factor-II.
Biochem Biophys Res Commun, **168(3)**: 1201-1210.

Osborne, C. K., Coronado, E. B., Kitten, L. J., Arteaga, C. I., Fuqua, S. A., Ramasharma, K., Marshall, M. und Li, C. H. (1989).
Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor.
Mol Endocrinol, **3(11)**: 1701-1709.

Ozturk, M. (1999)
Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis.
Sem in Liver Dis, **19(3)**: 235-242.

Park, Y. N., Kim, Y. B., Yang, K. M. und Park, C. (2000)
Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis.
Arch Pathol Lab Med, **124(7)**: 1061-1065.

Parkin, D. M., Pisani, P. und Ferlay, J. (1993)
Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985.
Int J Cancer, **54(4)**: 594-606.

Peng, Y., Du, K., Ramirez, S., Diamond, R. H. und Taub, R. (1999)
Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration.
J Biol Chem, **274(8)**: 4513-20.

Perer, E. S., Madan, A. K., Shurin, A., Zakris, E., Romeguera, K., Pang, Y. und Beech, D. J. (2000)
Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells.
J Surg Res, **94(1)**: 1-5.

Puisieux, A. und Ozturk, M. (1997)
TP53 and hepatocellular carcinoma.
Pathol Biol (Paris), **45(10)**: 864-870.

Qing, R. Q., Schmitt, S., Ruelicke, T., Stallmach, T. und Schoenle, E. J. (1996)
Autocrine regulation of growth by insulin-like growth factor (IGF)-II mediated by type I IGF-receptor in Wilms tumor cells.
Pediatr Res, **39(1)**: 160-165.

Rechler, M. M. und Clemmons, D. R. (1998)
Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins.
Trends Endocrinol Metab, **9**: 176-183.

Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P. und Baserga, R. (1995a)
The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo.
Cancer Res, **55(11)**: 2463-2469.

Resnicoff, M., Burgaud, J. L., Rotman, H. L., Abraham, D. und Baserga, R. (1995b)
Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors.
Cancer Res, **55(17)**: 3739-3741.

Rogler, C. E., Yang, D., Rossetti, L., Donohoe, J., Alt, E., Chang, C. J., Rosenfeld, R., Neely, K. und Hintz, R. (1994)
Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor–II transgenic mice.
J Biol Chem, **269(19)**: 13779-13784.

Romano, G., Prisco, M., Zanocco-Marani, T., Peruzzi, F., Valentinis, B. und Baserga, R. (1999)
Dissociation between resistance to apoptosis and the transformed phenotype in IGF-I receptor signaling.
J Cell Biochem, **72(2)**: 294-310.

Ruoslahti E. (1991)
Integrins.
J Clin Invest, **87(1)**: 1-5.

Sakamoto, M. ,Hirohashi, S. und Shimotsato, Y. (1991)
Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma.
Hum Pathol, **22(2)**: 172-178.

Scharf, J. G., Schmidt-Sandte, W., Pahernik, S. A., Ramadori, G., Braulke, T. und Hartmann, H. (1998)
Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC).
Carcinogenesis, **19(12)**: 2121-2128.

Schirmacher, P., Held, W. A., Yang, D., Chisari, F. V., Rustum, Y. und Rogler, C. E. (1992)
Reactivation of insulin-like growth factor during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth.
Cancer Res, **52(9)**: 2549-2556.

Schirmacher, P., Rogler, C. E. und Dienes, H. P. (1993)
Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis.
Virchows Arch B (Cell Pathol), **63(2)**: 71-89.

Sciacca, L., Costantino, A., Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Scalia, P., Sbraccia, P., Goldfine, I. D., Vigneri, R. und Belfiore, A. (1999)
Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism.
Oncogene, **18(15)**: 2471-2479.

Scott, C. D. und Weiss, J. (2000)
Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor inhibits DNA synthesis in insulin-like growth factor II sensitive cells.
J Cell Physiol, **182(1)**: 62-68.

Seki, S., Sakai, Y., Kitada, T., Kawakita, N., Yanai, A., Tsutsui, H., Sakaguchi, H., Kuroki, T. und Monna, T. (1997)
Induction of apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line by a neutralizing antibody to transforming growth factor-alpha.
Virchows Arch, **430(1)**: 29-35.

Sell, C., Baserga, R. und Rubin, R. (1995)
Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I-receptor prevent etoposide-induced apoptosis.
Cancer Res, **55(2)**: 303-306.

Sell, C., Dumenil, G., Deveaud, C., Miura, M., Coppola, D., De Angelis, T., Rubin, R., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1994)
Effect of a null mutation of the type 1 IGF receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts.
Mol Cell Biol, **14(6)**: 3604-3612.

Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J. P., Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1993)
Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 IGF receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A, **90(23)**: 11217-11221.

Singer, C., Rasmussen, A., Smith, H. S., Lippman, M. E., Lynch, H. T. und Cullen, K. J. (1995)
Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma: evidence for paracrine function.
Cancer Res, **55(11)**: 2448-2454.

Sohda, T., Oka, Y., Iwata, K., Gunn, J., Kamimura, S., Shijo, H., Okumura, M. und Yun, K. (1997)
Co-localisation of insulin-like growth factor II and the proliferation marker MIB1 in hepatocellular carcinoma cells.
J Clin Pathol, **50(2)**: 135-137.

Song, B. C., Chung, Y. H., Kim, J. A., Lee, H. C, Yoon, H. K., Sung, K. B., Yang, S. H., Yoo, K., Lee, Y. S. und Suh, D. J. (2001)
Association between insulin-like growth factor-2 and metastases after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study.
Cancer, **91(12)**: 2386-2393.

Spector, S. A., Olson, E. T., Gumbs, A. A., Friess, H., Buchler, M. W. und Seymour, N. E. (1999)
Human insulin receptor and insulin signaling proteins in hepatic disease.
J Surg Res, **83(1)**: 32-35.

Sporn, M. B. und Roberts, A. B. (1985)
Autocrine growth factors and cancer.
Nature, **313(6005)**: 745-747.

Stattin, P., Bylund, A., Rinaldi, S., Biessy, C., Dechaud, H., Stenman, U. H., Egevad, L., Riboli, E., Hallmans, G. und Kaaks, R. (2000)
Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study.
J Natl Cancer Inst, **92(23)**: 1910-1917.

Stuver, S. O., Kuper, H., Tzonou, A., Lagiou, P., Spanos, E., Hsieh, C. C., Mantzoros, C. und Trichopoulos, D. (2000)
Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men.
Intl J Cancer, **87(1)**: 118-121.

Su, T. S., Hwang, W. L. und Yauk, Y. K. (1998)
Characterization of hepatitis B virus integrant that results in chromosomal rearrangement.
DNA Cell Biol, **17(5)**: 415-425.

Sullivan, K. A., Castle, V. P., Hanash, S. M. und Feldman, E. L. (1995)
Insulin-like growth factor II in the pathogenesis of human neuroblastoma.
Am J Pathol, **147(6)**: 1790-1798.

Takagi, H., Sharp, R., Hammermeister, C., Goodrow, T., Bradley, M. O., Fausto, N., und Merlino, G. (1992)
Molecular and genetic analysis of liver oncogenesis in transforming growth factor alpha transgenic mice.
Cancer Res, **52(19)**: 5171-5177.

Takanami, I., Imamuma, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. und Kodaira, S. (1996)
Insulin-like growth factor-II as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma.
J Surg Oncol, **61(3)**: 205-208.

Takayama, T., Makuuchi, M., Hirohashi, S., Sakamoto, M., Okazaki, N., Takayasu, K., Kosuge, T., Motoo, Y., Yamazaki, S. und Hasegawa, H. (1990)
Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma.
Lancet, **336(8724)**: 1150-1153.

Tartare-Deckert, S., Sawka-Verhelle, D., Murdaca, J. und Van Obberghen, E.(1995)
Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin-receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in the yeast two hybrid system.
J Biol Chem, **270(40)**: 23456-23460.

Toropainen, E., Lipponen, P. und Syrjanen, K. (1995)
Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in female breast cancer as related to established prognostic factors and long-term prognosis.
Eur J Cancer, **31A(9)**: 1443-1448.

Tricoli, J. V., Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I. und Shows, T. B. (1984)
Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12.
Nature, **310(5980)**: 784-786.

Ueda, K. und Ganem, D. (1996)
Apoptosis is induced by N-myc expression in hepatocytes, a frequent event in hepadnavirus oncogenesis, and is blocked by insulin-like growth factor II.
J Virol, **70(3)**:1375-83.

Ueno, T., Takahashi, K., Matsuguchi, T., Ikejiri, K., Endo, H. und Yamamoto, M. (1988)
Reactivation of rat insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis, **9(10)**: 1779-1783.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S. und Chen, E. (1986)
Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity.
EMBO J, **5(10)**: 2503-2512.

van der Lely, A. J., de Herder, W. W., Janssen, J. A. und Lamberts, S. W. (1997)
Acromegaly: the significance of serum total and free IGF-I and IGF-binding protein-3 in diagnosis.
J Endocrinol, **155: Suppl. 1**: S9-13; discussion S15-16.

Van Dijk, M. A., van Schaik, F. M., Bootsma, H. J., Holthuizen, P. und Sussenbach, J. S. (1991)
Initital characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene.
Mol Cell Endocrinol, **81(1-3)**: 81-94.

Verspohl, E. J., Maddux, B. A. und Goldfine, I. D. (1988)
Insulin and insulin-like growth factor I regulate the same biological functions in HEP-G2 cells via their own specific receptors.
J Clin Endocrinol Metab, **67(1)**: 169-174.

Wang, H. P., Zhang, L., Dandri, M. und Rogler, C. E. (1998)
Antisense downregulation of N-myc1 in woodchuck hepatoma cells reverses the malignant phenotype.
J Virol, **72(3)**: 2192-2198.

Wetterau, L. A., Moore, M. G., Lee, K. W., Shim, M. L. und Cohen, P. (1999)
Novel Aspects of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins.
Mol Genet Metab, **68(2)**: 161-181.

Wogan, G. N. (1997)
Aflatoxin Exposure as a risk factor in the etiology of hepatocellular carcinoma.
In: Okuda K. und Tabor E. [Hrsg.], Liver Cancer, Churchill Livingstone, New York [u. a.], pp 51-57.

Xu, F., Gardner, A., Tu, Y., Michl, P., Prager, D. und Lichtenstein, A. (1997)
Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors.
Br J Haematol, **97(2)**: 429-440.

Yamada, T., De Souza, A. T., Finkelstein, S. und Jirtle, R. L. (1997)
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, **94(19)**: 10351-10355.

Yamaguchi, K., Carr, B. I. und Nalesnik, M. A. (1995)
Concomitant and isolated expression of TGF-alpha and EGF-R in human hepatoma cells supports the hypothesis of autocrine, paracrine and endocrine growth of human hepatoma.
J Surg Oncol, **58(4)**: 240-245.

Yang, D., Alt, E. und Rogler, C. E. (1993)
Coordinate expression of N-myc 2 and insulin-like growth factor II in precancerous altered hepatic foci in woodchuck hepatitis virus carriers.
Cancer Res, **53(9)**: 2020-2027.

Yu, H., Mistry, J., Nicar, M. J., Koshravi, M. J., Diamandis, A., van Doorn, J. und Juul, A. (1999)
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, **13(4)**: 166-172.

Zarrilli, R., Pignata, S., Apicella, A., Di Popolo, A., Memoli, A., Ricchi, P., Salzano, S. und Acquaviva, A. M. (1999)
Cell cycle block at G1-S or G2-M phase correlates with differentiation of caco-2 cells: effect of constitutive insulin-like growth factor II expression.
Gastroenterology, **116(6)**: 1358-1366.

Zhang, L., Kashanchi, F., Zhan, Q., Zhan, S., Brady, J. N., Fornace, A. J., Seth, P. und Helman, L. J. (1996)
Regulation of insulin-like growth factor II P3 promotor by p53: a potential mechanism for tumorigenesis.
Cancer Res, **56(6)**:1367-1373.

Zhang, L., Kim, M., Choi, Y. H., Goemans, B., Yeung, C., Hu, Z., Zhan, S., Seth, P. und Helman, L. J. (1999)
Diminished G1 checkpoint after gamma-irradiation and altered cell cycle regulation by insulin-like growth factor II overexpression.
J Biol Chem, **274(19)**: 13118-13126.

Zhang, L., Zhan, Q., Zhan, S., Kashanchi, F., Fornace, A. J., Seth, P. und Helman, L. J. (1998)
p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells.
DNA Cell Biol, **17(2)**: 125-131.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1997a)
Gene expression profiles in normal and cancer cells.
Science, **276(5316)**: 1268-1272.

Zhang, N., Siegel, K., Odenthal, M., Becker, R., Oesch, F., Dienes, H. P., Schirmacher, P. und Steinberg, P. (1997b)
The role of insulin-like growth factor II in the malignant transformation of rat liver oval cells.
Hepatology, **25(4)**: 900-905.

Zvibel, I., Brill, S. und Reid, L. M. (1995)
Insulin-like growth factor II regulation of gene expression in rat and human hepatomas.
J Cell Physiol, **162(1)**: 36-43.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Interaktion der Komponenten der IGF-Achse	14
Abb. 2	Expression von Komponenten der IGF-Achse in HuH7-Zellen	25
Abb. 3	Wachstum und IGF-II-Sekretion von kultivierten humanen HCC-Zelllinien	27
Abb. 4	Substratumsatz (OD (492nm)) als Funktion der Zahl von Hep G2-Zellen	30
Abb. 5	Substratumsatz (OD (492nm)) nach 120 h als Funktion der initial ausgesäten Zahl von Hep G2-Zellen	30
Abb. 6	Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach IGF-II-Zugabe	32
Abb. 7	Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach Zugabe von α-IGF-II	34
Abb. 8	Überleben von konfluenten Hep 3B-Zellen nach Zugabe von α-IGF-II	33
Abb. 9	Wachstum von humanen HCC-Zelllinien nach Zugabe von α-IGF-IR	36
Abb. 10	Wirkung von IGF-II auf das Wachstum von HCC-Zelllinien	37
Abb. 11A	Wachstum und Nekrose von Hep G2- und Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Etoposid	39
Abb. 11B	Wachstum und Nekrose von Hep G2- und Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin	40
Abb. 12A	Wachstum und IGF-II-Sekretion von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid	42
Abb. 12B	Wachstum und IGF-II-Sekretion von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Cisplatin	43
Abb. 13A	Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin im Zeitverlauf	45
Abb. 13B	Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin in Abhängigkeit von der Dosis	46
Abb. 14	Analyse des Zelltodes nach Behandlung mit Etoposid und Cisplatin	48
Abb. 15	Apoptose nach Cisplatinbehandlung im Zeitverlauf	48
Abb. 16	Apoptose in Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin	49
Abb. 17	Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von IGF-II	51
Abb. 18	Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von α-IGF-II	52

Abb. 19A	Apoptose nach Behandlung mit Cisplatin unter Neutralisierung von IGF-II in Hep 3B-Zellen	55
Abb. 19B	Apoptose nach Behandlung mit Cisplatin unter Neutralisierung von IGF-II in Hep 3B-Zellen	56
Abb. 20	Apoptoserate in Hep 3B-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin	57
Abb. 21	Vitalität von humanen HCC-Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder Cisplatin bei Gabe von α-IGF-IR	59
Abb. 22	Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II	61
Abb. 23	Veränderungen des mRNA-Status von HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II	63
Abb. 24	Veränderungen des mRNA-Status von Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II	64

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Prädisponierende Faktoren für die Entstehung des HCC	1
Tab. 2	Expression von Komponenten der IGF-Achse in HCC-Zelllinien	26
Tab. 3	IGF-II-Konzentrationen im Überstand von HCC-Zelllinien	28
Tab. 4	Quantitativ veränderte Transkripte in Hep G2-Zellen nach Gabe von IGF-II	60
Tab. 5	Quantitativ veränderte Transkripte in Hep 3B-Zellen nach Gabe von IGF-II	61
Tab. 6	Quantitativ veränderte Transkripte in HuH7-Zellen nach Gabe von IGF-II	62
Tab. 7	Quantitativ veränderte Transkripte in Hep 3B-Zellen nach Gabe von α-IGF-II	64

8.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALS	Acid Labile Subunit
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	komparative genomische Hybridisierung
DAPI	5,6-diamidino-2-phenylindol - dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dATP	desoxy-Adenosintriphophat
dCTP	desoxy-Cytidintriphophat
dGTP	desoxy-Guanosintriphophat
dUTP	desoxy-Uridintriphophat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
E260	Extinktion bei 260 nm
FCS	Fetal Calf Serum
GH	Growth Hormone
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphophat
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HUGO	Human Genome Organisation
s.	siehe
IGFBP	Insulinlike Growth Factor Binding Protein
IGF-I	Insulinlike Growth Factor 1
IGF-II	Insulinlike Growth Factor 2
IGF-IR	Insulinlike Growth Factor 1 Rezeptor
IGF-IIR	Insulinlike Growth Factor 2 Rezeptor
IgG	Immunoglobulin
IR	Insulin Rezeptor
IR-Pr.	Insulin Rezeptor Vorläufer
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat 1
K_D	Dissoziationskonstante
KLH	Key (Hole) Limpet Hemocyanin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
mm	millimol
mmol	millimolar
nm	nanomol
n.u.	nicht untersucht
OD	Optische Dichte (Absorption).
OD (492nm)	Die bei 492nm gemessene Absorption.
PBS	Phosphate Buffered Saline

PDK	Phosphat abhängige Kinase
PI-3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PtdIns-3,4-P2	Phosphatidylinositol-3,4-Phosphat
r	Regressionskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SH2	src-homology region 2
SH3	src-homology region 3
SSC	Standard Saline Citrate
SOS	Son of Sevenless
SV40Tag	Simian Virus 40 large T Antigene
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
Δ OD	Differenz der Absorption

8.4. Abkürzungsverzeichnis der regulierten Transkripte

A-myb	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1
BCL-X	BCL2-like 1, apoptosis regulator bcl-x
BMP2A	bone morphogenetic protein 2
CBF-B	CCAAT-transcription binding subunit
CCNA	cyclin A
CDK5	cyclin-dependent kinase 5
CD71-AG	transferrin receptor (p90, CD71)
CHRM4	cholinergic receptor, muscarinic 4
CI-B18	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7 (18kD, B18)
CREB-1	cAMP responsive element binding protein 1
ECK	ephrin type-A receptor
EGR-1	early growth response 1
ELF1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
ERF1	butyrate response factor 1 (EGF-response factor 1)
GLUT1	erythrocyte glucose transporter
HDGF	hepatoma-derived growth factor
HNF4	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
HLH1R21	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
HSC70-int. P.	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma)
HSP27	heat shock 27kD protein 1
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein 1
IGFBP-2	insulin-like growth factor binding protein 2
IL-8-pr.	interleukin 8, precursor
ITG α6	integrin, alpha 6
ITG ß1	integrin, beta 1
ITG ß4	integrin, beta 4
NUP153	RAN binding protein 2 (nuclear pore complex protein NUP358)
NOL1	proliferating cell nucleolar antigen P120
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PLANH1	endothelial plasminogen activator inhibitor-1 precursor
PRL-1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (phosphatase of regenerating liver)
PTDINS(4)P-5-kinase	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, beta
PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)
Ral A	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)
Rho C	ras homolog gene family, member C
SHB	SHB adaptor protein (a Src homology 2 protein)
SNF2L1	global transcription activator
TGFß	transforming growth factor, beta 1
α2MRAP	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein 1
40S-Rib.	(40S) ribosomal protein S19

Die Abkürzungen sind entsprechend der HUGO-Nomenklatur erläutert.

Kurzzusammenfassung

Insulin-like Growth Factor (IGF-II) wird häufig in experimentellen und humanen hepatozellulären Karzinomen überexprimiert und als protumorigener Faktor betrachtet. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war zu bestimmen, ob und in welcher Weise IGF-II diese Wirkung auf humane Lebertumorzellen entfaltet und ob IGF-II die Chemotherapie-Antwort in diesen Zellen verändert. Desweiteren sollten mögliche Mediatoren, die duch IGF-II in ihrer Expression reguliert werden, identifiziert werden.

Die HCC-Zelllinien (Hep G2, Hep 3B und HuH7) zeigten eine starke Überexpression von IGF-II und stimulierten das Wachstum in autokriner Weise durch die Sekretion hoher Mengen an IGF-II. Während die exogene Zugabe von IGF-II das Wachstum nicht beeinflußte, war das Wachstum nach Neutralisierung von IGF-II oder dem IGF-IR signifikant verringert. Die zytostatischen Effekte von Etoposid und Cisplatin wurden überadditiv verstärkt, wenn IGF-II oder der IGF-IR neutralisiert wurden. Die Zellzahl wurde zusätzlich bei geringen Zytostatikakonzentrationen reduziert und die Apoptoserate im zytostatischen Konzentrationsbereich erhöht. Die Neutralisierung von IGF-II, wie auch die kurzfristige Stimulation mit IGF-II veränderte die Expression von Transkriptionsfaktoren (u. a. EGR-1), der Tyrosin-Phosphatase PRL-1 und Mitgliedern der Integrin-Familie (α6, ß1 und ß4).

Die funktionellen Untersuchungen belegen, daß IGF-II in den HCC-Zellen einen wichtigen, autokrin wirkenden, protumorigenen Faktor darstellt, dessen Blockade das Ansprechen auf chemotherapeutische Behandlung verbessert.

Abstract

Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) is frequently overexpressed in experimental and human hepatocellular carcinomas and regarded as a protumorigenic factor. The aim of this study was to determine whether and in which manner IGF-II acts on human liver tumor cells and wether IGF-II modulates chemotherapy-response in these cells. Other mediators regulating IGF-II-expression should be identified.

The HCC-cell lines (Hep G2, Hep 3B and HuH7) showed a strong overexpression of IGF-II and stimulated growth in an autocrine manner by secreting high amounts of IGF-II. While exogeneous addition of IGF-II did not influence proliferation, neutralization of IGF-II or the IGF-IR decreased proliferation significantly. The cytostatic effects of etoposide and cisplatin were augmented in an overadditive manner, when either IGF-II or the IGF-IR were neutralized. Cell number was additionaly reduced at lower doses and the rate of apoptosis increased at cytostatic doses. Neutralization of IGF-II as well as short stimulation by IGF-II modulated the expression of transcription factors (e.g. EGR-1), the tyrosine phosphatase PRL-1 and members of the integrin-family (α6, ß1 and ß4).

The functional investigations confirm that IGF-II is an important, autocrine acting, protumorigenic factor in HCC-cells, whose neutralization enhances the response toward chemotherapeutic treatment.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H.-W. Klein betreut worden.

Per Lund

Teilpublikationen:

- **Lund, P., Niketeghad, F., Dienes, H.-P. und Schirmacher, P.**
  Chemotherapy-sensitivity of human liver tumor cells is enhanced by interfering with the IGF-II/IGF-I-receptor signalling pathway.
  In: Beger, H. G. und Link, K. H. [Hrsg.], Gastroenterological Carcinogenesis, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 179-182.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Schirmacher für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Anleitung zum selbständigen Arbeiten. Auch möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft, sein ständiges Interesse und für die Durchsicht dieser Arbeit bedanken. Ich konnte vieles von Herrn Prof. Dr. P. Schirmacher lernen und verdanke ihm ein tieferes Verständnis der Forschung.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-W. Klein möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Referats und für seine Gesprächsbereitschaft bedanken. Besonders anregend empfand ich den Besuch seiner Vorlesungen und Seminare, die mir ein grundlegendes Verständnis der Signaltransduktion vermittelten.

Bei Frau Prof. Dr. S. Korsching möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Bei Frau Dr. Parwaresch möchte ich mich für die Übernahme der Protokollführung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Kaina möchte ich mich rückblickend nochmals für die gute Ausbildung im Rahmen meiner Diplomarbeit bedanken, die ich im Verlauf meiner Tätigkeit immer mehr zu schätzen lernte.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Steinberg und Herrn PD. Dr. J. Hengstler möchte ich mich für ihre Gesprächsbereitschaft und das Interesse an der Arbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Streeck und Herrn Prof. Dr. Krone, sowie der DFG möchte ich mich für die Gewährung des Stipendiums der Graduiertenkollege in Mainz und Köln bedanken.

Bei Frau Dr. M. Odenthal und Herrn Prof. Dr. H.-P. Dienes möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für die praktische Mithilfe im Laboralltag möchte ich insbesondere Iris Sawitza, Dominic Schubert und Dr. Fernando Perez danken. Auch Fataneh Niketeghad, Katharina Petmecky und Dr. Mario Beilmann danke ich für die Zusammenarbeit.

Für die Mithilfe bei EDV-Arbeiten gilt mein Dank Philipp Wittwer, Matthias Zapp und Philipp Zenker.

Besonderer Dank gilt all denen, die außerdem zur stimulierenden und freundlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, wobei ich stellvertretend für alle nur einige nenne: Holger Babbe, Renate Eilers, Dietrich Grimme, Georg Grohmann, Matthias Gymnich, Susanne Paul und Marc-Peter Spindler.

Bei Khadijeh, Fatih, Sayna und Tara bedanke ich mich herzlich für ihre Unterstützung.

Schließlich danke ich meiner Familie für den Rückhalt, den sie mir gab.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Per Lund
Adresse	Weißenstadter Ring 3, 13581 Berlin
Geburtsdatum	8. August 1969
Geburtsort	Norrköping
Nationalität	norwegisch
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Bildungsweg

Schulbildung

1977 bis 1980	*Erich-Kästner-Grundschule* in Bonn
1980 bis 1989	*Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium* in Bonn
18. Mai 1989	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1990 bis 1997	Studium der Biologie an der *Universität zu Mainz*
Mai 1992	Diplom-Vorprüfung
August 1996	Diplom-Hauptprüfung in den Fächern: Genetik, Physiologische Chemie, Botanik und Pharmakologie
April 1996 bis März 1997	Diplomarbeit im *Institut für Toxikologie, Universität zu Mainz* unter Anleitung von Prof. Dr. B. Kaina Thema: „Der Einfluß des Protoonkogens c-fos und des Tumorsuppressorgens p53 auf die Sensitivität von embryonalen Mausfibroblasten gegenüber DNA-schädigenden Substanzen“
April 1997 bis Februar 2002	Dissertation am *Institut für Pathologie, Universität zu Mainz* (April 1997 bis Juli 1998) und am *Institut für Pathologie, Universität zu Köln* (August 1998 bis Februar 2002) unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Schirmacher und Prof. Dr. H.-W. Klein. Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung der IGF-II-Expression humaner Lebertumorzellen“