

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

Analyse zur prognostischen und prädiktiven Relevanz der Expression des Tumorsuppressor-
Gens „Insulin-like growth factor 2 receptor“ (*IGF2R*) als Biomarker im Hepatozellulären
Karzinom unter transarterieller Chemoembolisation

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

Vorgelegt von

Larissa Melanie Feustel
aus Speyer

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 HCC: Ätiologie, Therapie, TACE	3
2.2 IGF-Achse	6
2.2.1 IGF-1	7
2.2.2 IGF-2	7
2.2.3 IGF1R	8
2.2.4 IGF2R	9
2.3 IGF2R in Kontext mit TACE und Lebertumoren	11
3 Material und Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Kits	15
3.1.2 Chemikalien	15
3.1.3 Primer	15
3.2 Gerätschaften	16
3.3 Patienten	16
3.4 Methoden	17
3.4.1 Deparaffinierung	17
3.4.2 RNA-Extraktion	18
3.4.3 Reverse Transkription	19
3.4.4 Realtime PCR	19
3.4.5 Statistik	21
4 Ergebnisse	23
4.1 Klinische Daten	23
4.2 Entwicklung der <i>IGF2R</i> mRNA-Expression unter TACE	26

4.3	Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen <i>IGF2R</i> mRNA-Expression.....	30
4.3.1	Klinische Daten, Patientencharakteristika.....	32
4.3.1.1	Tumor-Grading.....	32
4.3.1.2	Tumorstadium.....	33
4.3.1.3	AFP.....	33
4.3.2	Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in Biopsie und Explantat.....	35
4.3.2.1	Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in der Initialbiopsie.....	35
4.3.2.2	Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen <i>IGF2R</i> mRNA-Expression im Explantat.....	37
4.4	Behandlungserfolg der TACE und deren Effekt auf die <i>IGF2R</i> mRNA-Expression.....	39
4.4.1	Quantitative Veränderung der <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in Zusammenhang mit dem Therapieansprechen.....	40
4.4.2	Quantitative Veränderung der <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in Zusammenhang mit der Rezidivfreiheit.....	41
4.5	<i>IGF2R</i> und rezidivfreies 5-Jahres-Überleben.....	42
4.5.1.1	Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben und <i>IGF2R</i> mRNA-Regulation.....	43
4.5.1.2	Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben und relative <i>IGF2R</i> mRNA-Konzentration in der Initialbiopsie.....	44
4.5.2	5-Jahres-Überleben.....	47
5	Diskussion.....	49
5.1	Vergleich der beiden Kollektive, Untersuchung der Regulation von <i>IGF2R</i> mRNA-Expression.....	50
5.2	<i>IGF2R</i> als möglicher Tumormarker.....	54
5.3	<i>IGF2R</i> als Tumorsuppressor und seine prognostische Relevanz.....	60
6	Zusammenfassung.....	65
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Danksagung.....	72

Abkürzungsverzeichnis

AFP	alpha-Fetoprotein
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CREB	Cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IGF	Insulin-like growth factor
IGF2R	Insulin-like growth factor 2 Rezeptor
MMP	Matrix Metalloprotease
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 IGF-System (nach Talia C, Connolly L, Fowler PA. 2021[1])</i>	6
<i>Abbildung 2 Relative IGF2R mRNA-Expression in HCC-Explantaten nach TACE vs. ohne Behandlung mit TACE</i>	27
<i>Abbildung 3 Relative IGF2R mRNA-Expression in Biopsie und Explantat</i>	28
<i>Abbildung 4 Fallspezifische Regulation der relativen IGF2R mRNA-Expression</i>	29
<i>Abbildung 5 AFP-Konzentration vor und nach TACE, n=48 Patienten</i>	34
<i>Abbildung 6 Vergleich der Differenz der relativen IGF2R mRNA-Expression anhand des Therapieansprechens auf TACE</i>	40
<i>Abbildung 7 Vergleich der Differenz der relativen IGF2R mRNA-Expression anhand des Auftretens eines Rezidivs</i>	41
<i>Abbildung 8 Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach hoch- und herunterregulierter relativer IGF2R mRNA-Expression, Endpunkt: Tod und/oder Rezidiv</i>	43
<i>Abbildung 9 Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach hoch- und herunterregulierter relativer IGF2R mRNA-Expression, Endpunkt: Rezidiv</i>	44
<i>Abbildung 10 Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach relativer IGF2R mRNA-Expression in der Initialbiopsie, Endpunkt: Tod und/oder Rezidiv</i>	45
<i>Abbildung 11 Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach relativer IGF2R mRNA-Expression in der Initialbiopsie, Endpunkt: Rezidiv</i>	46
<i>Abbildung 12 Gesamtüberleben, aufgeteilt nach Hoch- und Herunterregulation der relativen IGF2R mRNA-Expression unter TACE</i>	47
<i>Abbildung 13 Gesamtüberleben, aufgeteilt nach relativer IGF2R mRNA-Expression in der Initialbiopsie</i>	48

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Patienten- und Tumorcharakteristika</i>	25
<i>Tabelle 2 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen IGF2R mRNA-Expression unter TACE</i>	30
<i>Tabelle 3 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von relativer IGF2R mRNA-Expression in der Initialbiopsie</i>	36
<i>Tabelle 4 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen IGF2R mRNA-Expression im Explantat</i>	38

1 Einleitung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Durch seine rasche Progredienz und Metastasierung ist es häufig nicht mehr möglich, einen kurativen Therapieansatz in Form einer Tumorresektion oder einer Lebertransplantation zu verfolgen. Um ein Spenderorgan zu erhalten, müssen Patienten oft lange Wartezeiten auf sich nehmen. Während dieser Zeit soll ein Voranschreiten des Tumorstwachstums verhindert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, kommen lokoregionale Therapieverfahren, wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE), zum Einsatz, die gezielt eine weitere Tumorstprogression verhindern sollen.

Hierbei führt die lokale Applikation von Chemotherapeutika und embolisierenden Substanzen in das Tumorgefäßbett zu einer Kombination von Zytotoxizität und Hypoxie im Tumorgewebe. Dies führt zu einer Tumorzellnekrose, wodurch das Tumorstwachstum eingedämmt und bestenfalls zurückgedrängt wird.

Für das HCC besteht ein hoher Bedarf an zuverlässigen prädiktiven und prognostischen Markern. Bislang erforschte Tumormarker zeigten meist eine nicht ausreichende Sensitivität und Spezifität, um sich für eine klinische Anwendung in der Diagnostik und Therapie des HCCs zu qualifizieren.

Das System der Insulin-like growth factors, einer Gruppe von Peptiden, deren Wirkweise der des Insulins ähnelt, und ihren Rezeptoren ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der Tumorforschung. Während die IGFs über den IGF-1-Rezeptor Zellteilung und –migration anregen, führt der IGF-2-Rezeptor (IGF2R) IGF-2 dem lysosomalen Abbau zu und reguliert somit dessen proliferative Wirkung [2-4]. In Bezug auf das HCC waren IGF-1 und 2 sowie der IGF1R auf ihre Funktionen und Bedeutung in Bezug auf Pathogenese und Krankheitsverlauf bereits des Öfteren im Fokus der Forschung [4-7]. Im Vergleich hierzu gibt es noch nicht allzu viele Forschungsarbeiten, welche IGF2R als möglichen Tumorsuppressor in Zusammenhang mit dem hepatozellulären Karzinom setzen [4, 8].

In einer Studie von *Lautem et al.* zur möglichen Rolle von IGF2R als Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom fiel auf, dass *IGF2R* mRNA in mit TACE behandelten HCCs signifikant höher exprimiert wurde als in solchen HCCs, die einer anderen Behandlung zugeführt worden waren [9].

In dieser Arbeit wurden Tumorproben von TACE-Patienten vor und nach der Behandlung auf ihre *IGF2R* mRNA-Expression untersucht. Hierbei wurden erstmals Proben desselben Tumors vor und nach einer therapeutischen Intervention miteinander vergleichend analysiert.

Ziel ist es, eine mögliche prädiktive und prognostische Bedeutung von IGF2R als Tumorsuppressor in mit TACE behandelten HCCs zu untersuchen. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob IGF2R durch die Therapie mit TACE oder anderen Erkrankungs- oder Patientenspezifischen Parametern beeinflusst wird.

2 Literaturdiskussion

2.1 HCC: Ätiologie, Therapie, TACE

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit die fünfthäufigste Krebserkrankung, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen [10]. Dies scheint unter anderem darin begründet zu sein, dass die Inzidenz von Alkoholabusus und Hepatitiden bei Männern höher ist. Neueren Studien zufolge waren auch erhöhte Testosteronspiegel mit dem Risiko, an einem HCC zu erkranken, assoziiert [11].

Ein vorrangiger Risikofaktor, der in 90% der Fälle der Entstehung eines HCCs vorausgeht, ist die Leberzirrhose [12]. Ihr geht der fibrotische Umbau gesunden Lebergewebes aufgrund einer anhaltenden Entzündung voraus [13]. Aber auch chronische Hepatitis-B-Infektionen und nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen ohne Zirrhose prädisponieren für eine Erkrankung an einem HCC und schließen hiervon betroffene Patienten in sekundärpräventive Maßnahmen, wie halbjährliche Vorsorgeuntersuchungen, ein [14]. Zusammengenommen sind 40-75% aller HCCs auf der Grundlage einer Infektion mit dem Hepatitis-B- oder C-Virus entstanden, wobei der Anteil der Hepatitis-B-Infektionen in der Pathogenese mit 30-50% am höchsten ist [15].

Die Vorsorge muss engmaschig erfolgen, da das HCC ein sehr aggressives, früh metastasierendes und angiogenes Wachstum aufweist [14, 16].

Neuere Forschungsansätze halten auch eine zusätzliche Rolle von single nucleotide polymorphisms (SNPs) in bestimmten Genen in der Pathogenese eines HCCs für möglich [17]. Sie streben ein Modell zur individuellen Risikostratifizierung eines Patienten mit Leberzirrhose, unter Einbezug der speziellen Genetik, an [17]. Die Entwicklung auf diesem Gebiet bleibt abzuwarten. An der Pathogenese des HCCs scheint außerdem die Herunterregulation von Tumorsuppressoren wie p53, die durch die im hypervaskularisierten Tumor vorherrschende Hypoxie hervorgerufen wird, beteiligt zu sein [18]. Auch eine starke Interaktion zwischen der Mikroumgebung des Tumors und den Tumorzellen, über die das tumorumgebende Gewebe sogar Einfluss auf die Pathogenese und das Wachstumsverhalten des HCCs nimmt, wurde bereits mehrfach beschrieben und stellt einen weiteren Fokus für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar [19].

Die Diagnosestellung eines HCCs erfolgt bildgebend durch eine Kontrastmittelsonographie, CT, MRT und/oder histologisch durch eine Leberbiopsie. Kurative Therapieoptionen eines HCCs sind begrenzt, eine Resektion des Tumors ist nur in einem sehr frühen Stadium möglich. Hierfür müssen eine erhaltene Leberfunktion (Child A) und ein normaler portalvenöser Druck gegeben sein [14].

Der am meisten verwendete Tumormarker für das HCC ist das alpha-Fetoprotein (AFP), welches allerdings nur in 60-80% der Erkrankungen vom Tumorgewebe exprimiert wird und bei anderen Lebererkrankungen, Schwangerschaft oder vereinzelt gastroenterologischen oder embryonalen Tumoren ebenfalls verstärkt gebildet werden kann [20]. Zur Verlaufsbeurteilung eines HCCs kann AFP als Marker verwendet werden, sofern die Serumkonzentration ≥ 20 ng/ml beträgt [21]. HCCs mit hohem AFP im Serum haben ein höheres Tumorigrad, größere Tumordurchmesser und weisen oftmals ein gefäßinvasives Wachstum auf [21]. Das Squamous cell carcinoma antigen (SCCA) findet in verschiedenen Erkrankungen, wie Lungen-, Cervix- und Oropharynxkarzinomen als Tumormarker Verwendung. Es kann auch mit einer HCC-Erkrankung korrelieren, wird allerdings nur in HCCs exprimiert, deren Pathogenese auf einer viralen Hepatitis gründet. Sowohl alkoholische als auch nicht-alkoholische Steatohepatitiden als Ursache für das später entstehende HCC sprechen gegen einen Nutzen als Tumormarker [22]. Sofern die Messung von SCCA in einer vorliegenden HCC-Erkrankung infrage kommt, kann auch hier erst ab einem Schwellenwert von >200 ng/ml eine Verwendung als Tumormarker in der Therapie und Diagnostik des HCC in Betracht gezogen werden [22]. Andere Biomarker wie DCP (des-gamma-carboxy prothrombin), Glypican-3 oder das Verhältnis von glykosyliertem zu Gesamt-AFP (AFP-L3) wurden in Studien ebenfalls als zur Diagnostik geeignet befunden, weisen allerdings in ihrer Spezifität und Sensitivität ähnliche Schwächen auf oder korrelieren in ihrer Konzentration im Gegensatz zu AFP nicht mit der Tumormasse und haben sich bisher noch nicht in der Frühdiagnostik bewährt [14, 20]. Somit ist die Suche nach einem breit anwendbaren und zuverlässigen Tumormarker, insbesondere zur Frühdiagnostik, noch nicht abgeschlossen.

Für nicht-resektable Tumoren ist, bei nicht stattgehabter Metastasierung, die Lebertransplantation die einzige kurative Therapieoption. Da der Bedarf an Organtransplantaten das Angebot an postmortalen Organspenden bei Weitem übersteigt, wurden entsprechend der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten die sog. Mailand-Kriterien festgelegt. Ihnen zufolge können Patienten mit einer Läsion von maximal 5 cm oder bis zu drei Läsionen von je maximal 3 cm lebertransplantiert und somit auf die Eurotransplant-Liste gesetzt werden, sofern der Tumor keine makroskopische Gefäßinvasion vorweist und keine extrahepatischen Herde vorliegen [14].

Da die Wartezeit für ein Spenderorgan mehrere Monate betragen kann, besteht die Gefahr, dass durch voranschreitendes Tumorstadium die Mailand-Kriterien nicht mehr erfüllt werden. Um dies zu verhindern, kommen Bridging-Verfahren zum Einsatz, die innerhalb dieser Wartezeit das Tumorstadium eindämmen können. Die hiervon am häufigsten angewandte Therapie ist die TACE, durch die sogar ein Downstaging des Tumors möglich ist [23]. Sie findet nicht nur beim Bridging Anwendung, sondern auch in palliativer Behandlungsabsicht bei gutem

Allgemeinzustand und ausreichender Leberfunktion, Ausbleiben von Gefäßinvasion und extrahepatischer Manifestation [24]. *Otto et al.* zeigten, dass eine TACE auch bei Patienten außerhalb der Mailand-Kriterien zu einem Downstaging des Tumors bis hin zur Erfüllung der Mailand-Kriterien führen kann. Außerdem zeigte sich, dass weniger aggressive Tumore ein besseres Therapieansprechen unter TACE hatten. *Otto et al.* stellten daher die Hypothese auf, dass durch die Auswahlkriterien für eine Therapie mit TACE möglicherweise biologisch weniger aggressive Tumore selektiert werden [25].

Bei der TACE werden der Effekt einer lokoregionalen, chemotherapeutischen Behandlung mit dem einer ischämischen Nekrose bei arterieller Embolisation kombiniert [26]. Über einen Katheter wird unter radiologischer Kontrolle zunächst eine lipidhaltige Emulsion in das arterielle Tumorgefäßbett injiziert, durch deren Beschaffenheit zuführende Blutgefäße zeitweise verschlossen werden. Hierdurch wird in erster Linie die Blutversorgung des Tumors gedrosselt. Anschließend wird ein Embolisat appliziert, um eine weitere Verlangsamung des Blutflusses im Tumorgefäßbett zu implizieren. Durch die Minimierung der Blutzufuhr wird im durch die embolisierten Gefäße versorgten Tumorgewebe eine Hypoxie hervorgerufen.

Das anschließend über den Katheter verabreichte Chemotherapeutikum verbleibt durch die embolisierenden Substanzen länger im Gefäßbett des Tumors. Es kann durch die lokal begrenzte Wirkung in höheren Dosen verabreicht werden, als dies bei einer systemischen Chemotherapie der Fall ist [27]. Durch das synergistische Zusammenwirken von Sauerstoffmangel und Chemotherapeutikum kommt es zu einer höchstmöglichen Tumorzellnekrose [28].

Das Langzeitüberleben von TACE-Patienten kann durch das Auftreten von Tumorrezidiven, -progress sowie neuen Läsionen limitiert werden. Durch die streng lokale Wirkung der Therapie können anfangs mikroskopisch kleine Tumorherde außerhalb des Behandlungsgebiets, die in der Bildgebung zu Therapiebeginn nicht erfasst wurden, ungehindert wachsen oder neu entstehen [24].

Eine konventionelle, systemische Chemotherapie, wie sie bei vielen anderen Tumorentitäten als etablierte Methode Anwendung findet, ist bei einem HCC aufgrund seiner Heterogenität und verschiedener Tumorätiologien eine nachrangige Therapieoption [29]. Bei Tumoren, die trotz lokoregionaler Verfahren größenprogredient oder für diese initial nicht geeignet sind, wird unter Voraussetzung einer guten Leberfunktion (Child A) und einer Lebenserwartung >3 Monaten ein Versuch mit Systemtherapien unternommen [14]. Hierbei handelt es sich um Biologika; die Behandlungsleitlinien für das HCC sind bezüglich der Algorithmen dieser Immuntherapien in ständiger Überarbeitung. Aktueller Standard in der Erstlinie des nicht-kurativ behandelbaren HCC ist die Kombination aus dem PD-L1- Antikörper Atezolizumab und

dem VEGF- Antikörper Bevacizumab sowie alternativ die Gabe der Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib oder Lenvatinib [14, 30]. Bei Ausschöpfung aller zugelassenen Therapiemöglichkeiten kann eine Monotherapie mit den Anti PD-1 Antikörpern Nivolumab oder Pembrolizumab oder Kombinationstherapie mit Nivolumab und dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab erfolgen [14].

2.2 IGF-Achse

Das System der Insulin-like growth factors (IGF), einer Gruppe von Peptiden, und ihren Rezeptoren ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der Tumorforschung. Die IGF-Achse besteht aus den IGF-Liganden, IGF-1 und -2, den IGF-Rezeptoren IGF1R und IGF2R und den IGF-bindenden Proteinen, IGFBPs.

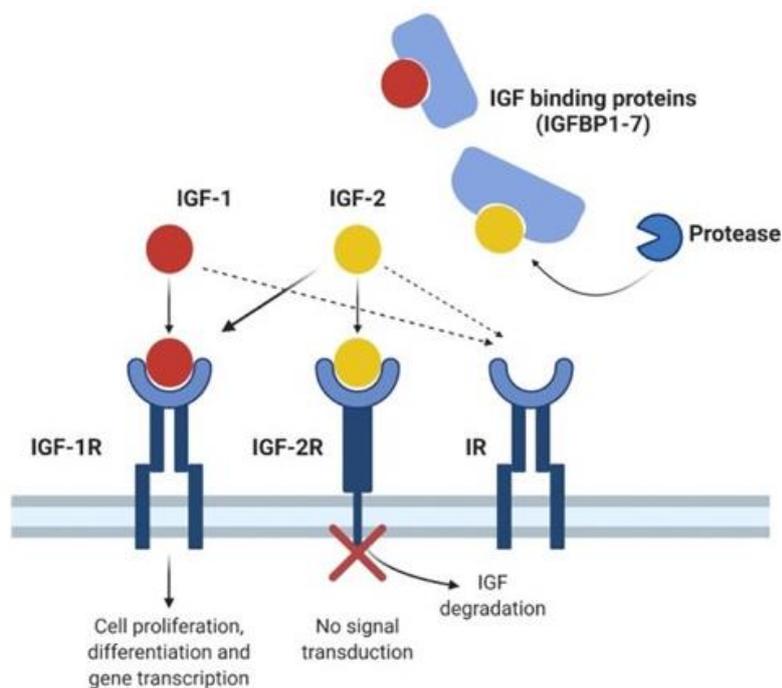


Abbildung 1: IGF-System (nach Talia C, Connolly L, Fowler PA. 2021[1])

Die Molekülstruktur der Insulin-like growth factors, IGF-1 und IGF-2, ist der des Insulins zu beinahe 50% homolog [31]. Sie setzen bei Rezeptorbindung metabolische Kaskaden in Gang, die in ihrer Wirkung der des Insulins sehr ähnlich sind. So spielt das IGF-System, insbesondere in der Embryonalentwicklung, eine wichtige Rolle für Entwicklung und Wachstum von Geweben indem es Zellteilung, -differenzierung und -migration induziert bzw. reguliert [2].

Sowohl IGF-1 als auch IGF-2 werden in mehreren adulten Organen und Geweben produziert [32].

Ihre Wirkung an der Zelle entfalten die IGFs über die Bindung an die beiden IGF-Rezeptoren, IGF1R und IGF2R.

Bei den IGF-bindenden Proteinen handelt es sich um eine Gruppe von sechs Peptiden, die die Halbwertszeit von zirkulierenden IGFs verlängern und deren Interaktion mit den IGF-Rezeptoren beeinflussen [2]. Sie haben unter bestimmten Voraussetzungen, unabhängig von den IGFs, auch eigene Effekte auf Zellen hinsichtlich der Apoptosesensitivität, Proliferation und Migration [2].

2.2.1 IGF-1

Die Synthese von IGF-1 wird in erster Linie durch Somatotropin (STH) reguliert [33]. Sie findet hauptsächlich in der Leber statt, aber auch andere Gewebe können im Rahmen parakriner oder autokriner Regulation IGF-1 sezernieren [34].

IGF-1 kann in seiner Aktivität bei einer malignen Entartung von Zellen deren Apoptosemechanismen unterdrücken, sodass das Überleben mutierter Zellen direkt von ihrer IGF-1-Aktivität abhängen kann [3]. Generell konnten eine erhöhte Sekretion von IGF-1 und ein dysreguliertes Zellwachstum in Tumoren miteinander in Verbindung gebracht werden [33]. Studien zeigten außerdem, dass IGF-1 die Migration von Melanom-Zellen stimuliert [35].

Die Expression von *IGF-1* mRNA in Hepatozyten ist in hepatischen Neoplasien im Vergleich zum umgebenden, gesunden Lebergewebe vermindert [36]. Dies könnte in der herabgesetzten Expression von Somatotropin-Rezeptoren oder einer generell herunterregulierten Expression von IGF-1 im erkrankten Gewebe begründet sein [36].

Unabhängig von der Beeinträchtigung der Leberfunktionen, kommt es beim HCC zu einem starken Rückgang des Serum-IGF-1-Spiegels [37]. Es besteht, unabhängig von der Grunderkrankung, ein Zusammenhang zwischen IGF-1-Expression und Leberzirrhose, dem Langzeitüberleben nach Tumorresektion [34] und dem Voranschreiten eines HCCs [5].

Hohe initiale IGF-1-Serumspiegel bei HCC sind mit einem besserem progressionsfreiem Überleben und Langzeitüberleben assoziiert [5].

2.2.2 IGF-2

IGF-2 wird weitgehend unabhängig von STH produziert, bislang konnte nur den IGF-BPs ein geringer Einfluss auf den IGF-2-Serumspiegel nachgewiesen werden [33]. In einer gesunden Leber wird *IGF-2* mRNA nach einer postnatalen Umstellung des mRNA-Musters kaum messbar produziert [4]. Seine physiologische Funktion in der adulten Leber ist unklar [34].

Bei Überexpression spielt IGF-2 eine Rolle in der Pathogenese von Neoplasien [32] und Großwuchs-assozierten Erkrankungen, wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom [3], ebenso wiesen Tumoren der Nieren und Nebennieren erhöhte *IGF-2* mRNA-Spiegel auf [33]. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Aktivität eines der sechs *IGF-2* Promoter durch den Wildtyp des Gens *p53* inhibiert wird. Bei *p53* handelt es sich um ein Protein, welches Zellen vor Krebsentstehung schützt [2] und dessen mutierte Formen unter allen Mutagenen am häufigsten in menschlichen Tumoren auftreten [38].

In Untersuchungen von HCC-Proben fielen in Tumor-Gewebe eine Überexpression von *IGF-2* mRNA [4] und bei Behandlung mit *IGF-2* mRNA Antisense-Oligonukleotiden ein starker Rückgang im Wachstum von HCC-Zellreihen auf [39]. Diese Beobachtungen sprechen für einen Zusammenhang zwischen hochregulierter IGF-2-Expression und der Entwicklung eines HCCs.

In mit TACE behandelten HCCs korrelierte der IGF-2-Serumspiegel außerdem mit dem Auftreten von Metastasen, was zusätzlich einen Zusammenhang der IGF-2-Produktion mit der Tumorinvasivität vermuten lässt [40].

2.2.3 IGF1R

Der IGF-1 Rezeptor bindet sowohl IGF-1 als auch IGF-2 und, mit vielfach geringerer Affinität, Insulin. Er ist an eine Tyrosinkinase gekoppelt, welche durch die Konformationsänderung einer Rezeptordomäne bei Substratbindung autophosphoryliert wird. Die hierbei in Gang gesetzte Signalkaskade mündet in einer vermehrten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zur Expression von Genen führen, welche für Zellproliferation und -differenzierung codieren [2]. IGF1R als Vermittler der antiapoptotischen und wachstumsfördernden Effekte von IGF-1 ist ebenfalls Gegenstand der Tumorforschung. Die Regulation der *IGF1R*-Genexpression steht in engem Zusammenhang mit einigen Tumorsuppressor- und Onkogenen [2]. So wurde nachgewiesen, dass der Wildtyp von *p53* die Expression des IGF1R-Gens hemmt, wohingegen mutierte Formen von *p53* in Tumoren die *IGF1R*-Genexpression hochregulieren [41]. In Brustkrebs-Zellen wurde eine Überexpression von IGF1R festgestellt und ein direkter Zusammenhang von IGF1R-Expression und Krankheitsverlauf vermutet [42].

In HCC-Tumorgewebe fiel eine im Vergleich zu gesundem Lebergewebe erhöhte IGF1R-Expression auf, die in ihrer Ausprägung mit dem Tumorausmaß korrelierte [7].

2.2.4 IGF2R

Der IGF-2 Rezeptor (IGF2R) bindet in erster Linie IGF-2 und andere Mannose-6-Phosphat enthaltende Peptide; seine Affinität für IGF-1 ist sehr gering [43]. Er wird von vielen Geweben produziert und zirkuliert in seiner löslichen Form im Blut [44]. Mehr als 90% der IGF-2 Rezeptoren befinden sich intrazellulär, wo sie Anschluss an Endosomen oder den Golgi-Apparat haben, weshalb nur ein geringer Anteil auf der Zelloberfläche exprimiert wird [45]. 90-95 % des in der Zellmembran integrierten Rezeptors befinden sich auf der äußeren Seite, nur ein geringerer Anteil intrazellulär [46].

IGF2R ist nicht an eine Tyrosinkinase gekoppelt, sondern fungiert als Scavenger-Rezeptor, indem er IGF-2 über Endozytose dem lysosomalen Abbau zuführt [46]. Hierdurch reguliert er die über Bindung an den IGF-1 Rezeptor vermittelte, wachstumsfördernde Aktivität von IGF-2. Außerdem reguliert er den zellulären Transport von lysosomalen Enzymen wie beispielsweise Catepsin, welches am proteolytischen Abbau der IGF-BPs beteiligt ist.

Pathophysiologische Untersuchungen an Herzgewebe zeigten außerdem, dass IGF2R intrazellulär an ein G-Protein gekoppelt ist und somit, unabhängig von IGF-2, intrazelluläre Kaskaden in Gang setzen kann [47]. Eine Studie an Gefäßmuskelzellen erbrachte außerdem die Erkenntnis, dass die Rezeptorbindung von IGF2R LTGF- β aktiviert, einen TGF- β -bindenden Komplex. TGF- β ist ein Wachstumsinhibitor, der durch Freisetzung aus dem Komplex aktiviert wird [48]. Im HCC kann diese Funktion von TGF- β verloren gehen. Studien zeigten, dass die Signalkaskaden von TGF- β insbesondere im Rahmen einer chronischen Hepatitis-Infektion über verschiedene Mechanismen soweit umgestellt werden, dass eine onkogene Wirkung entfaltet wird. Diese äußert sich in Form einer Induktion von gefäßinvasivem Wachstum, Migration, Metastasierung und Angiogenese [19].

Durch die Tatsache, dass IGF2R in doppelter Funktion, durch Degradation von IGF-2 und Hemmung von TGF- β , als Wachstumsregulator fungiert, ist er für die Erforschung verschiedener proliferativer Erkrankungen von Interesse. So konnte bei Tieren mit IGF2R-Mutationen erhöhte IGF-2-Spiegel in Verbindung mit einem erhöhtem Geburtsgewicht und perinataler Sterblichkeit sowie Organomegalien beobachtet werden [31]. In einer Chorionkarzinom-Zellreihe mit induzierter IGF2R-Herunterregulation wurden erhöhte IGF-2-Spiegel und Wachstumsraten gemessen [49].

In verschiedenen Tumoren, wie dem Mammakarzinom [50], Nebennierentumoren [51], Bronchialkarzinomen [52] und Kopf-Hals-Tumoren [53], wurde ein Heterozygotie-Verlust des IGF2R-Gens nachgewiesen. Der Wegfall der IGF2R-Funktion führt zu einem verminderten Abbau von IGF-2, dessen Bioverfügbarkeit hierdurch ansteigt und über den IGF1R vermehrt Tumor- und Gefäßwachstum stimuliert [4]. Außerdem werden durch den ebenfalls reduzierten

Transport lysosomaler Enzyme ebendiese verstärkt sezerniert und können somit möglicherweise extrazelluläre Matrixproteine abbauen. Hierdurch könnten Tumorwachstum und -metastasierung begünstigt werden [4], weshalb IGF2R auch als Tumorsuppressor bezeichnet wird. *Bannoud et al.* konnten außerdem in Brustkrebszelllinien eine estradiolabhängige Hochregulation von IGF2R feststellen, was vermuten lässt, dass die Expression von IGF2R bei weiblichen Tumorpatienten hierdurch beeinflusst wird [54].

In einer Studie an Bronchialkarzinomen zeigten *Tian et al.*, dass eine im Vergleich zu nicht erkranktem Lungengewebe verstärkte IGF2R-Expression in den Tumorzellen mit einem niedrigen Grading und Tumorstadium sowie einem, im Vergleich zu niedrig exprimierenden Tumoren, verlängerten Gesamtüberleben einherging. Hier zeigte die Mehrheit der Karzinome eine vergleichsweise niedrigere IGF2R-Expression, was ebenfalls die Funktion als Tumorsuppressor bestätigt [55]. Darüber hinaus korrelierte die IGF2R-Expression mit der Chemosensitivität der Tumorzellen und ließ daher einen Rückschluss auf den Therapieerfolg des Chemotherapeutikums schließen [55]. Die Korrelation von IGF2R-Expression und Tumorstadium und -grading lässt zusätzlich zur Rolle als Tumorsuppressor auch eine Funktion von IGF2R als Tumormarker möglich erscheinen.

Eine Studie von *Wu et al.* an HCC-Tumorzellen zeigte ein ähnliches Ergebnis, auch hier wurde IGF2R im Vergleich zu gesundem Lebergewebe deutlich schwächer exprimiert [56]. *Sue et al.* beschrieben, dass bei 7 von 11 Lebertumoren im Vergleich zum tumorumgebenden Gewebe eine Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression erfolgt war [57].

In HCCs und dysplastischen Knoten der Leber beschrieben *Scott et al.* analog zu den Forschungsergebnissen anderer Tumorentitäten ein Heterozygotie-Verlust des *IGF2R*-Gens [46]. Außerdem war eine verstärkte IGF2R-Expression im HCC mit einem längeren rezidivfreien Überleben einhergegangen [9]. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass IGF2R als Tumorsuppressor des hepatozellulären Karzinoms agiert [58].

In Prostatatumoren und Osteosarkomen hingegen konnte eine verstärkte IGF2R-Expression nachgewiesen werden [59, 60]. Es ist also möglich, dass IGF2R in den verschiedenen Tumoren unterschiedlich induziert wird oder variable Funktionen erfüllt.

2.3 IGF2R in Kontext mit TACE und Lebertumoren

Die Wirkmechanismen der TACE auf molekularer Ebene sind bisweilen noch nicht erforscht. Studien zeigten allerdings verschiedene Effekte von Hypoxie und DNA-Schädigung, wie sie bei TACE kombiniert angewendet werden. *Wu et al.* stellten fest, dass in HCC-Tumorzellen unter Hypoxie die Tumorsuppressoren p53 und das von-Hippel-Lindau-Gen herunterreguliert werden [56].

Ein die IGF2R-Expression negativ regulierender Transkriptionsfaktor ist das Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responsive element-binding protein, CREB [18], dessen Genexpression bei Hypoxie hochreguliert wird [16]. CREB ist in HCC-Zelllinien im Vergleich zu gesundem Lebergewebe stark heraufreguliert, was vermutlich durch die hypoxischen Areale im Tumorgewebe getriggert wird [16]. Es unterstützt die Angiogenese und verleiht Tumorzellen gegenüber hypoxieinduzierter Apoptose Immunität [16]. Über diese bekannten Mechanismen lässt sich die Vermutung anstellen, dass Hypoxie über die Hochregulation von CREB zu einer Supprimierung der IGF2R-Expression führt.

Untersuchungen von *Ramakrishnan et al.* zur Wirkung von Chemotherapeutika, die teilweise auch bei einer TACE verwendet werden, zeigten, dass es zu einer transienten Hochregulierung des IGF-2 Rezeptors auf der Zelloberfläche kam [61]. Dieses Ergebnis zeigte sich ungeachtet des Ursprungs der Tumorzellen (Maus, Mensch) und der Tumorart (Multiples Myelom, Mammakarzinom) bei allen untersuchten Zelllinien. Die Synthese von IGF2R wurde allerdings durch die Chemotherapie nicht beeinflusst, vielmehr kam es zu einer Umverteilung der Rezeptoren von intrazellulär auf die Zelloberfläche. Dies scheint in Zusammenhang mit der durch die Zytostatika induzierte Autophagie der Zellen zu stehen [61]. Die Autophagie ist ein Mechanismus, den Zellen unter metabolischem Stress nutzen, um ihr Überleben unabhängig von externer Energiezufuhr temporär zu sichern. Hierbei werden zelleigene Organellen und Proteine über Autophagosomen zu den zelleigenen Lysosomen transportiert, um dort in wieder verwertbare Energiequellen und Proteinbausteine abgebaut zu werden. Dieser katabole Stoffwechsel ermöglicht Tumorzellen, trotz des zytotoxischen Einflusses der Chemotherapeutika zu überleben [62].

Ein weiterer Faktor, den es bei der Erforschung von IGF2R im HCC zu beachten gilt, ist der wechselseitige Einfluss von Microenvironment und Tumor. Beim Microenvironment handelt es sich um das direkt dem Tumor angrenzende Gewebe, das über verschiedene Interaktionen eine Schlüsselrolle als Modulator von Tumorwachstum, -invasivität und Metastasierung innehat [19]. Es ist ein Sammelbegriff für verschiedene daran beteiligte Zellen, Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme, Proteine der extrazellulären Matrix und inflammatorische Zytokine. Viele dieser Zellen und Zytokine, wie Ito-Zellen und Transforming

Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), erfüllen in gesundem Lebergewebe tumorsupprimierende Funktionen. Sie spielen auch bei der Leberfibrose eine Rolle, da sie den bindegewebigen Umbau als Anpassungsreaktion an eine dauerhafte Entzündung, beispielsweise im Rahmen einer chronischen Hepatitis, fördern. Bei einer HCC-Erkrankung werden sie allerdings über die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und anderer Faktoren, wie Matrix Metalloproteasen (MMPs) und das Umschalten ihrer zugehörigen Signalkaskaden, zu onkogenen Faktoren moduliert. Diese Modulationen vom tumorsupprimierenden pSmad3C Pathway zum onkogenen pSmad3L Pathway werden unter anderem durch das Hepatitis B-Protein sowie das Hepatitis C-Virus über die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase ausgelöst [19]. Die onkogene Funktion von TGF- β 1 äußert sich in Form eines verstärkenden Effekts auf Migration, Angiogenese, Metastasierung, und den Ausbau der Tumor-Stroma-Wechselwirkungen. Diese Effekte induziert TGF- β 1 indirekt über die Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und tissue growth factor sowie die Modifikation und Mehrbildung verschiedener Integrine [19]. TGF- β 1 wird durch MMP-9 oder MMP-2 aktiviert [19]. Beide MMPs sind auch an der Inflammationsreaktion im Rahmen der Pathogenese einer Leberfibrose beteiligt [63].

IGF2R gehört zu den Aktivatoren der MMP-9 [64] und induziert hierüber indirekt TGF- β 1. Da TGF- β 1 im Microenvironment des bereits entstandenen HCCs die genannten onkogenen Mechanismen aktiviert, ist die IGF2R-induzierte Aktivierung ein Mechanismus, der die vorrangig beschriebene Rolle von IGF2R als Tumorsuppressor, zumindest in Bezug auf das microenvironment des bereits entstandenen HCCs, relativieren könnte [19].

In HCC-Tumoren wiesen *Gaba et al.* nach erfolgreicher TACE eine Mehrexpression der mRNA von Genen nach, die die Sensitivität der Tumorzelle gegenüber Chemotherapeutika sowie den Übergang der Zelle in die Apoptose fördern [65]. Das lässt die Überlegung zu, dass die TACE nicht nur die Expression dieser Gene beeinflusst. Es können weitere Gene existieren, die ebenfalls als Indikatoren für Chemosensitivität gegenüber der TACE genutzt werden können und damit die Prognose der Therapie mit TACE abschätzen lassen. Die Mehrexpression von IGF2R stand in einer Studie an Bronchialkarzinomen unter platinbasierter Chemotherapie in Zusammenhang mit der Chemosensitivität des Tumors und damit der Prognose [55]. Daher ist es denkbar, dass IGF2R auch in Bezug auf den Therapieerfolg der TACE einen bislang noch nicht erforschten Nutzen erfüllt.

Lautem et al. untersuchten erstmals das Expressionsverhalten von IGF2R im hepatozellulären Karzinom und analysierten dessen Auswirkung auf klinische und tumorspezifische Parameter [9]. In ihrer Arbeit zur Expression und prognostischen Signifikanz von IGF2R in HCC-Tumoren und dem Einfluss von TACE wurden Gewebeproben aus HCC-Tumoren und

tumorumgebendem Gewebe von 92 Patienten untersucht, die sich einer Tumorresektion (n=66) oder Lebertransplantation (n=26) unterzogen hatten. Bei 26 Patienten (27%) war zuvor eine Therapie mit TACE erfolgt. Als Kontrolle für die Analysen wurde gesundes Lebergewebe (n=31) von Patienten untersucht, bei denen aufgrund einer hepatischen Metastasierung bei Kolon- oder Mamma-Karzinom eine Leberteilektomie durchgeführt wurde.

Es zeigte sich, dass in HCC-Tumorgewebe 20% weniger *IGF2R* mRNA exprimiert wurde als im tumorumbegleitenden Gewebe, das eine mit gesundem Lebergewebe vergleichbare *IGF2R* mRNA-Expression aufwies. Insgesamt fiel die *IGF2R* mRNA-Expression in 61% der Tumore niedriger aus als in tumorumbegleitendem Gewebe („Herunterregulation“), während es sich in 39% umgekehrt verhielt („Hochregulation“). Im Vergleich zur herunterregulierten Gruppe zeigten Patienten mit hochregulierter *IGF2R* mRNA-Expression ein signifikant besseres rezidivfreies Überleben [9].

Bei den mit TACE behandelten Fällen zeigte sich im Vergleich zu anderen Behandlungsregimen eine signifikant höhere *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorgewebe. Es zeigte sich außerdem, dass die mit TACE behandelten HCCs zu 58% in ihrer *IGF2R* mRNA-Expression hochreguliert waren, während bei nicht mit TACE behandelten Tumoren nur in 32% der Fälle eine Hochregulation erfolgt war [9].

In der mit TACE behandelten Patientengruppe fielen ein signifikant weniger ausgedehntes und invasives Tumorstadium sowie, ebenfalls signifikant, kleinere Tumordurchmesser auf. In Bezug auf das rezidivfreie Überleben konnte außerdem in der mit TACE behandelten Patientengruppe ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt werden [9].

Die Ergebnisse von *Lautem et al.* lassen vermuten, dass die *IGF2R* mRNA-Expression im hepatozellulären Karzinom nicht nur einen prognostischen Faktor in Bezug auf Überleben und das Auftreten von Rezidiven darstellt, sondern außerdem in Zusammenhang mit der Aggressivität des Tumors steht. Nachdem die Regulation des Expressionsverhaltens von *IGF2R* lediglich in HCC-Tumorproben nach Explantation bestimmt wurde, bleibt offen, ob und inwiefern sich die *IGF2R*-Expression im Krankheitsverlauf vor der chirurgischen Intervention verändert. Der auffallend hohen Inzidenz von hochregulierter *IGF2R* mRNA-Expression in Tumoren, welche einer TACE zugeführt worden waren, könnten die Ausschlusskriterien für eine solche Behandlung zugrunde liegen, was bereits von *Otto et al.* postuliert wurde [25]. Auch hier stellt sich die Frage, ob die Tumore bereits vor Beginn der TACE höhere *IGF2R* mRNA-Expressionslevel aufweisen als nicht mit TACE behandelte Tumore und inwiefern sich die Expression bis zum Abschluss der TACE verändert.

Therapieentscheidungen und prognostische Schätzungen in Bezug auf eine HCC-Erkrankung werden anhand tumorspezifischer und klinisch klassifizierender Parameter getroffen. In

Zusammenschau der aktuellen Studienlage lässt sich jedoch ein Mangel an zuverlässigen Biomarkern feststellen, die ergänzend zur Bildgebung und klinischen Scores eine Überwachung des Krankheitsverlaufes ermöglichen und zur Abschätzung der Krankheitsprognose herangezogen werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Einmalhandschuhe	VWR, Leuven
Reaktionsgefäß SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß mit Deckel 8er Streifen à 200µl	Peqlab, Erlangen
Pipette 10 µl, Pipetman Classic	Gilson, Middleton
Pipette 20 µl, Pipetman Classic	Gilson, Middleton
Pipette 100 µl, Pipetman Classic	Gilson, Middleton
Pipette 1000 µl, Pipetman Classic	Gilson, Middleton
Pipettenspitzen 10 µl, SafeSeal	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen 20 µl, SafeSeal	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen 100 µl, SafeSeal	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen 1000 µl, SafeSeal	Biozym, Oldendorf
Elektronische Einkanalpipette 5-120 µl, e120	Biohit Sartorius, Göttingen
PCR 96-Well TW-MT-Platte, weiß	Biozym, Oldendorf
Transparente Abklebefolien für 96-Well Platte	Biozym, Oldendorf
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen

3.1.1 Kits

High Pure FFPE RNA Micro Kit	Roche, Mannheim
Maxima Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific, Waltham
Absolute Blue QPCR Mix, SYBR Green, with separate ROX vial	ThermoFisher Scientific, Waltham

3.1.2 Chemikalien

Ethanol 100%	AppliChem, Darmstadt
Xylol	AppliChem, Darmstadt
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.3 Primer

GAPDH Primer:	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
5'-TTT TGC GTC GCC AGC CGA G-3'(forward),	
5'-ACC AGG CGC CCA ATA CGA CC-3'(reverse)	

IGF2R Primer: Qiagen GmbH, Hilden
HS_IGF2R_1_SG Quantitect Primer Assay

3.2 Gerätschaften

Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Vortexmischer MS1 MiniShaker	IKA- Werke GmbH, Staufen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Heizblock, HBT 130-2	HLC, Bovenden
PCR Thermocycler, FlexCycler	Analytik Jena
Thermoschüttler pro	CellMedia, Elsteraue
Zentrifuge, Galaxy mini	VWR, Radnor
Universalzentrifuge, Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Spektralphotometer, NanoVue	GE Healthcare, Freiburg
LightCycler® 480	Roche, Mannheim

3.3 Patienten

Untersucht wurden in Paraffin eingebettete Tumorgewebsproben von 104 Patienten, welche wegen eines hepatozellulären Karzinoms an der Universitätsklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zwischen 1998 und 2014 behandelt wurden. Hierzu war vor Beginn der Arbeit ein Ethikanatrag gemäß der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes zu Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen gestellt und von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt worden (Nr. 847.243.17 (11077)).

Alle Tumoren wurden histologisch in einer Initialbiopsie gesichert und mit transarterieller Chemoembolisation (TACE) behandelt. Im Anschluss an die Behandlung erfolgte bei allen Patienten aus dem Probenkollektiv eine Lebertransplantation. Hierbei wurden anhand des intraoperativen Befundes der Tumordurchmesser und die Anzahl der Knoten erhoben sowie die Einteilung anhand der Tumor-Klassifikation vorgenommen. In der 81% der untersuchten Fälle wurde auch das Tumorgrading in den Tumorproben im Explantat bestimmt; bei 19 Patienten erfolgte das Grading aufgrund der Histologie in der Tumorbiopsie vor Beginn der TACE.

Nach der Lebertransplantation wurde pro Tumor jeweils eine Gewebsprobe der Initialbiopsie und aus dem Leberexplantat untersucht. Aus 79 Biopsien und 88 Explantaten konnte RNA gewonnen werden. Die restlichen Gewebsproben waren entweder zu alt oder enthielten, besonders im Fall der Initialbiopsien, zu wenig Gewebematerial zur Extraktion von RNA.

Vor der Durchführung des experimentellen Teils wurden alle vorhandenen Gewebsproben der in dieser Arbeit untersuchten Fälle in der Pathologie der Universitätsklinik Mainz histologisch auf das Vorhandensein von Tumorgewebe untersucht. Für die RNA-Extraktion wurde jeweils Material derjenigen Gewebsprobe benutzt, in welcher anteilig das meiste Tumorgewebe vorhanden war. Dieser Untersuchungsvorgang erübrigte sich für die Initialbiopsie-Proben, da hierfür nur ein solitärer Stanzzyylinder mit Gewebe entnommen worden war.

3.4 Methoden

3.4.1 Deparaffinierung

Von den Paraffinblöcken wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und als Gewebsprobe zur Deparaffinierung verwendet. Je nach Gewebsanteil im Schnitt wurden einer bis zwei dieser Schnitte zunächst in einem 1,5 µl Reaktionsgefäß mit 800 µl Xylol versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf dem Vortexmischer vor und nach einer zweiminütigen Inkubationspause je dreimal für 4 Sekunden gemischt. Dann erfolgte eine fünfminütige Inkubation, danach wurde die Probe bei maximaler Geschwindigkeit (13000 UpM) drei Minuten zentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde nach Abpipettieren des flüssigen Überstandes noch ein weiteres Mal, ebenfalls mit 800 µl Xylol, wiederholt. Auch daraufhin wurde der flüssige Überstand abpipettiert und verworfen.

Zur Deparaffinierung und Rehydrierung der Proben kam eine absteigende Alkoholreihe zur Anwendung. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß mit 800 µl 100% Ethanol aufgefüllt, dreimal für 4 Sekunden mit dem Vortexmischer geschüttelt und direkt für 3 Minuten 13000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand wieder abpipettiert und verworfen. Dann wurde das Gewebe im Reaktionsgefäß mit 800 µl 70% Ethanol versetzt und nach dreimaligem Vortex-Mischvorgang für jeweils 4 Sekunden abermals für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Gefäß für 20 Sekunden zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer 10 µl-Pipette abpipettiert.

Im letzten Arbeitsschritt wurden die geöffneten Reaktionsgefäße für 15 Minuten in einem Heizblock bei 55°C inkubiert, damit verbliebene Ethanolreste verdunsten konnten.

3.4.2 RNA-Extraktion

Die Expression eines bestimmten Gens lässt sich durch genspezifische mRNA als quantitativ messbarem Parameter sehr gut bestimmen.

Die erste RNA-Extraktion wurde 1981 durch J. Feramisco mit Pheno-Chloroform durchgeführt [66]. Bereits 1978 gelang Alan Colman erstmals eine DNA-Extraktion durch Adsorption der Nukleinsäuren an Silikagel und Glasfaser [67]. Dieses Verfahren wurde im weiteren Verlauf auch an die Extraktion von RNA adaptiert.

Die Funktionsweise des für die RNA-Extraktion eingesetzten „High Pure FFPE RNA Kit“ der Firma Roche basiert auf ebendieser Bindung der Nukleinsäuren an Glasfaser. Er wurde nach Angaben des Herstellers angewendet.

Für die RNA-Isolierung wurde das Gewebe zunächst einer Zellyse unterzogen. Hierzu wurde es mit 60 µl Tissue Lysis Buffer und 10 µl 10% SDS versetzt, dreimal für 4 Sekunden mit dem Vortexmischer gerüttelt und anschließend kurz zentrifugiert. Zum Abbau von Proteinen im Zelllysate erfolgte die Zugabe von 30 µl Proteinase K. Nach 3 viersekündigen Vortexmischvorgängen mit anschließender kurzer Zentrifugation wurden die Reaktionsgefäße 3 Stunden bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von je 200 µl Bindepuffer und 100% Ethanol wurden die Reaktionsansätze 3 Mal 4 Sekunden gerüttelt und kurz zentrifugiert.

Das Lysat wurde im Anschluss auf eine Glasfaser-Säule pipettiert, welche auf ein Sammelgefäß aufgesteckt war. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 9100 UpM wurde die abgefilterte Flüssigkeit verworfen. Danach erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, um den Filter zu trocknen.

Um die Glasfaser-Säulen von genomischer DNA zu reinigen, wurden 30µl DNase-Lösung (3µl DNase Inkubationspuffer und 27 µl DNase (5,4 U/µl)) auf die Säule gegeben. Hiernach wurden die Sammelgefäße bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

Das Waschen der Glasfaserfilter erfolgte zunächst durch die Gabe von 300 µl Waschpuffer I auf die Säule, woraufhin nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 9100 UpM das Filtrat verworfen wurde. Der vorangegangene Schritt wurde im Anschluss mit 300 µl Waschpuffer II und danach noch einmal mit 200 µl Waschpuffer II wiederholt. Anschließend wurden die Säulen auf neue Sammelgefäße gesetzt und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Damit das Risiko einer möglichen Kontamination der RNA mit den verwendeten Chemikalien minimiert werden und die RNA aus der Glasfaser herausgelöst werden konnte, wurde die Säule darufhin auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 20 µl Elutionspuffer auf die Filtermembran pipettiert. Nach Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur erfolgte die einminütige Zentrifugation bei 9100 UpM. Das Eluat wurde im Anschluss erneut auf den Filteraufsatz pipettiert, wieder für je eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 9100 UpM abzentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.4.3 Reverse Transkription

Im Umgang mit RNA ist es wichtig zu wissen, dass diese durch die einzelsträngige Molekülstruktur instabiler ist als DNA und durch ubiquitär vorkommende RNAsen leicht zersetzt wird. Aus diesem Grund sind beim Arbeiten mit RNA RNase-freie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Handschuhe obligat und das Durchführen aller Arbeitsschritte auf Eis empfehlenswert.

Die Entdeckung der Reversen Transkriptase 1970 durch Howard Temin [68] und David Baltimore [69] wurde 1975 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. 1971 gelang zum ersten Mal die Herstellung von cDNA aus RNA mithilfe der reversen Transkriptase durch S. Spiegelman [70].

Die Reverse Transkription wurde mittels des Maxima Reverse Transkriptase-Kits von FisherScientific nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde 1 µg RNA benötigt, wobei die Normierung auf 1 µg RNA pro Reaktionsansatz der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der anschließend durchgeführten PCR dienen sollte. Um diese Menge für jede RNA-Probe zu bestimmen, wurde die RNA-Konzentration pro µl mittels Spektralphotometrie bestimmt und anschließend das für 1 µg benötigte Volumen berechnet.

Der Ansatz zur Reversen Transkription erfolgte auf Eis und hatte folgende Zusammensetzung:

4 µl 5X Reaktionsmix

2 µl Maxima Enzymmix

1 µg RNA

Aufgefüllt wurde mit Aqua dest. auf 20 µl Gesamtmenge.

Nach vorsichtigem Mischen und Abzentrifugieren des Reaktionsansatzes wurde dieser im Thermocycler 10 Minuten bei 25°C, danach 15 Minuten bei 50°C und anschließend 5 Minuten bei 85°C inkubiert.

3.4.4 Realtime PCR

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem DNA *in vitro* vervielfältigt wird. Es wurde erstmals 1987 von Kary Mullis durchgeführt [23].

Zunächst erfolgt eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 95°C. An die hierbei entstandenen einzelsträngigen DNA-Moleküle lagern sich bei einer spezifischen Temperatur dem Reaktionsansatz zugefügte Primer an (Annealing/Hybridisierung). Primer sind spezielle Basenabfolgen in der DNA bindende Moleküle. Sie dienen der thermostabilen DNA-Polymerase als Startmolekül für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges bei

72°C (Elongation). Durch mehrfaches Wiederholen eines solchen PCR-Zyklus (Denaturierung, Primerannealing, Elongation) wird der betroffene Genabschnitt exponentiell vervielfältigt.

Die PCR ist daher in optimalen Zeit-Temperatur-Intervallen durchzuführen und in ihrer Effizienz zusätzlich von der Menge an Polymerase, Primern und Nukleotiden im Reaktionsansatz abhängig.

Bei einer „Realtime PCR“ kommt ein Fluoreszenzmarker (SYBR Green) zum Einsatz, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Durch die Bindung des Markers an die neu gebildete DNA verändert sich dessen Fluoreszenz, die nach jedem Amplifikationszyklus gemessen wird. Das bedeutet, dass das Amplifikationsprodukt schon während der PCR in seiner Quantität visualisiert werden kann. Die normalerweise im Anschluss notwendige Agarose-Gelelektrophorese zur quantitativen und qualitativen Auswertung der PCR kann entfallen.

Die Spezifität der Realtime-PCR kann durch einen möglichst einheitlichen Schmelzkurven-Peak aller DNA-Amplifikate bewiesen werden. Dieser Schmelzpunkt ist durch die Basenabfolge der amplifizierten DNA festgelegt.

Für jede cDNA-Probe wurde ein PCR-Ansatz mit *IGF2R*-Primern und ein Ansatz mit *GAPDH*-Primern amplifiziert. Als Haushaltsgen wird *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) von jeder Zelle auch im basalen Stoffwechsel kodiert und kann bei der quantitativen Bestimmung anderer Gene als Referenzgen dienen.

Somit wurde zum einen die durch die PCR ermittelte Expression von *IGF2R* mRNA in Bezug auf die gemessene *GAPDH* mRNA-Menge normiert. Zum anderen diente der Vergleich der Expression beider Gene als Kontrolle bezüglich Schwankungen der Enzymaktivitäten der Reversen Transkriptase, Unterschieden in der RNA-Qualität und Pipettierfehlern zwischen den verschiedenen Reaktionsansätzen.

Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-Well-Platte auf Eis pipettiert, wobei auf jeder Platte ein Negativ-Kontrollansatz mit Nuklease-freiem Wasser und ein Kontrollansatz mit einer sicher positiven Probe zur Qualitätssicherung der PCR-Ergebnisse angesetzt wurde.

Für die Realtime PCR wurde das Kit „Absolute Blue qPCR Mix, SYBR Green, with separate ROX vial“ von ThermoFisher Scientific nach den Herstellerangaben unter Zugabe der 5'- und 3'- Primer für *GAPDH* beziehungsweise *IGF2R* verwendet.

Der Ansatz für die Realtime-PCR enthielt:

5 µl 2X Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix

0.7 µl 5'-Primer (10 µM)

0.7 µl 3'-Primer (10 µM)

1 µl cDNA

Ad 10 µl mit Aqua dest.

Die danach im Lightcycler durchgeführte PCR erfolgte, je nach zu bestimmendem Gen, in dafür speziellen Zeit-Temperatur-Intervallen:

	<i>GAPDH</i>	<i>IGF2R</i>
Denaturierung	95°C (15 Minuten)	95°C (15 Minuten)
Quantifizierung (45 Zyklen)	95°C (10 Sekunden), 66°C (30 Sekunden), 72°C (30 Sekunden) 83°C (2 Sekunden)	95°C (10 Sekunden), 55°C (30 Sekunden), 72°C (30 Sekunden) 83°C (5 Sekunden)
Schmelzen	95°C (5 Sekunden) 55°C (1 Minute) 97°C (kontinuierliches Aufheizen)	95°C (5 Sekunden) 55°C (1 Minute) 97°C (kontinuierliches Aufheizen)
Abkühlen	40°C	40°C (10 Sekunden)

Die für die PCR benötigten Primer können nicht nur die amplifizierte DNA, sondern, insbesondere bei Vorliegen von sehr wenig DNA, auch andere Primer an komplementären Basen binden. Die hierbei potenziell entstandenen Primer-Dimere werden im Verlauf der Schmelzkurve am Ende der PCR früher aufgetrennt als die amplifizierte DNA, die einen höheren Schmelzpunkt hat.

Im Anschluss an die PCR erfolgte die relative Quantifizierung der Ergebnisse für *IGF2R* anhand derer für *GAPDH* mit Hilfe des Programms „LightCycler 480 Software, Release 1.5.162“.

3.4.5 Statistik

Die statistische Datenanalyse der Arbeit wurde mit SPSS 23.0 durchgeführt.

Alle Daten wurden zunächst einer Plausibilitätsprüfung unterzogen, bevor die explorative Analyse erfolgte.

Da es sich um eine explorative Analyse handelte, soll an dieser Stelle explizit darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen einer solchen lediglich Besonderheiten in Bezug auf die analysierten Zusammenhänge aufgezeigt, jedoch keine Beweise erbracht werden können. P-Werte werden auch bei entsprechend kleinem Wert nicht als Signifikanz, sondern als Tendenz gewertet.

Um Zusammenhänge zu prüfen, wurde bei zwei verbundenen, stetigen oder kategorialen Stichproben der verbundene Wilcoxon-Test, bei zwei unabhängigen Variablen der Mann-Whitney-U-Test, angewendet; Überlebenszeitanalysen wurden einem Log-Rank-Test unterzogen. Zum Gruppenvergleich zweier kategorialer Variablen wurde aufgrund des großen Stichprobenumfangs der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots bei einer stetigen und einer kategorialen Variable, Kreuztabellen bei zwei kategorialen Variablen und Überlebenszeiten betreffend Kaplan-Meier-Kurven verwendet.

In Bezug auf die Entwicklung der *IGF2R*-Expression im Verlauf der Behandlung wurden zwei verschiedene Parameter bestimmt, eine kategoriale Variable, die eine Hoch- oder Herunterregulierung der Genexpression benennt, und die Differenz aus der relativen Expression nach und vor TACE, die eine Hoch- oder Herunterregulierung quantitativ abbildet.

In den 5-Jahres-Überlebenskurven wurde der eintretende Status als HCC-assoziiert eingetretener Tod definiert, hierdurch enthalten die Kaplan-Meier-Kurven exakt die eingetretenen Todesfälle, die in Zusammenhang mit *IGF2R* von Interesse sind. Andere Todesursachen wurden zensiert.

Zur Untersuchung des rezidivfreien 5-Jahres-Überlebens wurden sowohl Todesfälle im Rahmen des Krankheitsprogresses, als auch das Rezidiv als Ereignis betrachtet. Des Weiteren wurde eine Analyse mit Rezidiv als Ereignis und Tod als Zensur durchgeführt (rezidivfreie Zeit).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit insgesamt 104 Patienten durchgeführt. Davon waren 81 Patienten (78%) männlich und 23 (22%) weiblich. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Lebertransplantation lag bei 60 Jahren, wobei der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Operation 36 Jahre und der älteste 70 Jahre war.

Der Nachbeobachtungszeitraum wurde ab dem Tag der Transplantation bis zum Zeitpunkt der Datenabnahme für diese Arbeit oder des Todeszeitpunktes des Patienten definiert. Er lag im Median bei 1981 Tagen, das kürzeste Nachbeobachtungsintervall bei 77 Tagen und das längste bei 6046 Tagen nach erfolgter Transplantation.

Das rezidivfreie Überleben markiert das Zeitintervall zwischen Transplantation und dem Auftreten eines Rezidivs. Es erstreckte sich im Median über 1741 Tage, während bei einem Patienten bereits innerhalb von 41 Tagen ein Rezidiv auftrat und das längste rezidivfreie Intervall bei 6046 Tagen lag.

Für eine Behandlung mit TACE müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden. Die Daten zu Child-Stadium, TNM-Klassifikation sowie Größe und Anzahl der Knoten wurden erst bei der Lebertransplantation erhoben und entsprechen daher nicht den Einschlusskriterien für eine Therapie mit TACE.

Die Erhebung der Tumorausdehnung (Tumordurchmesser und Anzahl der Knoten) erfolgte histopathologisch im Anschluss an die Lebertransplantation. Bei 45 Patienten wurden 1-3 Knoten beschrieben und bei 31 Patienten mehr als drei Knoten, während es in 24 Fällen durch die Vorbehandlung bereits zu einer Tumornekrose gekommen war.

Der Tumordurchmesser wurde beim Auftreten mehrerer Knoten im größten Knoten, bei Auftreten einer Nekrose anhand des Durchmessers des nekrotischen Areals bestimmt. Im Median betrug der Tumordurchmesser 2,6 cm, während der kleinste Tumor 0,3 cm maß und der größte eine Ausdehnung von 8 cm hatte. Insgesamt wurde bei 58 Patienten ein Tumordurchmesser unter 3 cm und bei 46 Patienten von 3 cm und größer beschrieben.

Die Bestimmung des Tumorstadiums erfolgte nach der TNM-Klassifikation. Bei 53 Patienten (51%) erfolgte die Lebertransplantation im Stadium I (T1), bei 42 (40%) im Stadium II (T2), bei 4 Patienten (4%) im Stadium III (T3) und bei einem Patienten (1%) im Stadium IV (T4). Bei 4 Patienten (4%) war der Status bezüglich des Tumorstadiums unbekannt.

Das Tumorgrading wurde in 85 Fällen (82%) aus dem histologischen Befund des Leberexplantats und in 19 Fällen (18%) aus dem der Initialbiopsie erhoben. Insgesamt hatten

24% der Tumore (25 Fälle) ein G1, 57% (59 Fälle) ein G2, 8% (8 Fälle) ein G3, 1% ein G4 und in 10% (11 Fälle) konnte der Befund einem Gx entsprechend keiner der vorherig genannten Grading-Kategorien zugeordnet werden. In der Patientengruppe, deren Grading aus der Initialbiopsie bestimmt wurde, hatten jeweils 8 Patienten (je 42%) ein G1 oder G2, während je ein Tumor (5%) als G3, G4 oder Gx eingestuft wurde.

Das AFP kann in seiner Funktion als Tumormarker bei Erkrankung an einem HCC mit der Tumormarklast korrelieren. Die Bestimmung der AFP-Serumkonzentration gehört daher zum verlaufdiagnostischen Standard bei einer HCC-Erkrankung und erfolgt regelmäßig. Die Serumkonzentration im Patientenkollektiv dieser Arbeit betrug vor Beginn der Therapie mit TACE im Median 15,9 ng/ml, wobei der niedrigste Serumspiegel bei 2,3 ng/ml und der höchste bei 4191,0 ng/ml lag. Nach der Therapie mit TACE, zum Zeitpunkt der Transplantation, lag die mediane Serumkonzentration des AFP bei 9,3 ng/ml, der niedrigste gemessene Wert bei 2,0 ng/ml und die höchste Konzentration bei 913,0 ng/ml.

Die funktionelle Beeinträchtigung einer zirrhotischen Leber wird anhand der Child-Pugh-Kriterien klassifiziert. Anhand der Gerinnungs- und Syntheseparameter, Aszitesmenge und Enzephalopathie erfolgt die Einteilung in die Child-Stadien, wobei das Child-Stadium A für keine größere, Child B für eine mäßige und Child C für eine starke Beeinträchtigung der Leberfunktion stehen. Zum Zeitpunkt der Transplantation hatten 53 Patienten (51%) ein Child-Stadium A, während je 25 Patienten (24,5%) als Child B oder C klassifiziert wurden. Bei einem Patienten stand keine Information bezüglich des Child-Stadiums zur Verfügung.

Verschiedene Lebererkrankungen führen, meist über eine Zirrhose, zur Entstehung eines HCCs. Im vorliegenden Kollektiv lag der Tumorerkrankung in 57 Fällen (55%) eine virale Lebererkrankung zugrunde, hiervon waren 17 Patienten (30%) an einer Hepatitis B und 40 Patienten (70%) an einer Hepatitis C erkrankt. Bei den 47 Patienten ohne virale Grunderkrankung (45% des Gesamtkollektivs) waren in 37 Fällen (78%) chronischer Alkoholabusus und bei 7 Patienten (15%) Erberkrankungen wie alpha-1-Antitrypsinmangel oder Hämochromatose für das in der Folge entstandene HCC ursächlich, während bei 3 Patienten (7%) keine Grunderkrankung festgestellt werden konnte (kryptogene Zirrhose).

Die TACE als palliatives Verfahren überbrückt die Wartezeit bis zur Lebertransplantation. Im untersuchten Kollektiv erhielten die Patienten im Median fünf Therapien, während die maximale Anzahl bei 13 TACE und die minimale Anzahl bei einer TACE (8 Patienten) lag.

Tabelle 1 Patienten- und Tumorcharakteristika

Patientenzahl, n	104
Mediane Nachbeobachtung in Tagen (Verteilungsbreite)	1981,5 (77-6046)
Medianes rezidivfreies Überleben in Tagen (Verteilungsbreite)	1741 (41-6046)
Männlich/weiblich, n	81/23
Medianes Alter in Jahren (Verteilungsbreite)	60 (36-70)
Knoten (1-3/multiple/Nekrose), n	45/31/24 ^a
Tumordurchmesser (<3 cm/>3cm), n	58/46
Medianer Tumordurchmesser in cm (Verteilungsbreite)	2,6 (0,3-8)
Tumor-Klassifikation (T1/T2/T3/T4;n)	53/42/4/1 ^a
Grading (G1/G2/G3/G4/Gx), n	25/59/8/1/11
Grading bei Biopsie (G1/G2/G3/G4/Gx),n	8/8/1/1/1 ^b
AFP in ng/ml	
- vor TACE, Median (Verteilungsbreite)	15,9 (2,3-4191,0)
- nach TACE, Median (Verteilungsbreite)	9,3 (2,0-913,0)
Child A/B/C, n	53/25/25 ^c
Ätiologie (viral/nicht-viral), n	57/47
- viral (Hepatitis B/Hepatitis C), n	17/40
- nicht-viral (äthyltoxisch/ sonstige/ nicht bekannt), n	37/7/3
Mediane Anzahl TACE (Verteilungsbreite), n	5 (1-13)

^abei vier Patienten lagen keine Daten vor

^bbei 85 Patienten lagen keine Daten zum Grading der Initialbiopsie vor

^cbei einem Patienten lagen keine Daten bezüglich einer Leberzirrhose vor

4.2 Entwicklung der *IGF2R* mRNA-Expression unter TACE

Lautem et al. zeigten, dass HCCs, die mit TACE vorbehandelt wurden, im Vergleich zu nicht mit TACE behandelten HCCs eine signifikant erhöhte *IGF2R* mRNA-Expression im Tumor aufweisen [9]. Ebenfalls fielen im direkten Vergleich zu Patienten ohne TACE-Behandlung ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben und, anhand des Vergleichs von TNM-Stadien, Grading und lokalem Befund, eine insgesamt weniger aggressive Tumorbilogie in der Gruppe mit TACE-Behandlung auf. Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich die zentrale Fragestellung dieser Arbeit nach einem möglichen, direkten Einfluss der Therapie mit TACE auf die relative Expression von *IGF2R* mRNA.

Im Patientenkollektiv von *Lautem et al.* wurden nur die Explantate der Patienten untersucht, da in den meisten Fällen kein Gewebe aus der Initialbiopsie vorhanden war. Daher wurde für die vorliegende Arbeit ein Patientenkollektiv zusammengestellt, bei dem von jedem Patienten sowohl Tumormaterial aus dem Explantat als auch aus der Initialbiopsie zur Verfügung stand.

Um die Vergleichbarkeit des Patientenkollektivs von *Lautem et al.* [9] und des „Dissertationskollektivs“ zu gewährleisten, wurde zunächst die relative *IGF2R* mRNA-Expression beider Kollektive miteinander verglichen.

Abbildung 2 zeigt eine Boxplot-Analyse, in welcher die von *Lautem et al.* ermittelte relative *IGF2R* mRNA-Expression in HCC-Explantaten nach erfolgter oder nicht erfolgter TACE der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in den Explantaten des Patientenkollektivs dieser Arbeit gegenübergestellt wurde.

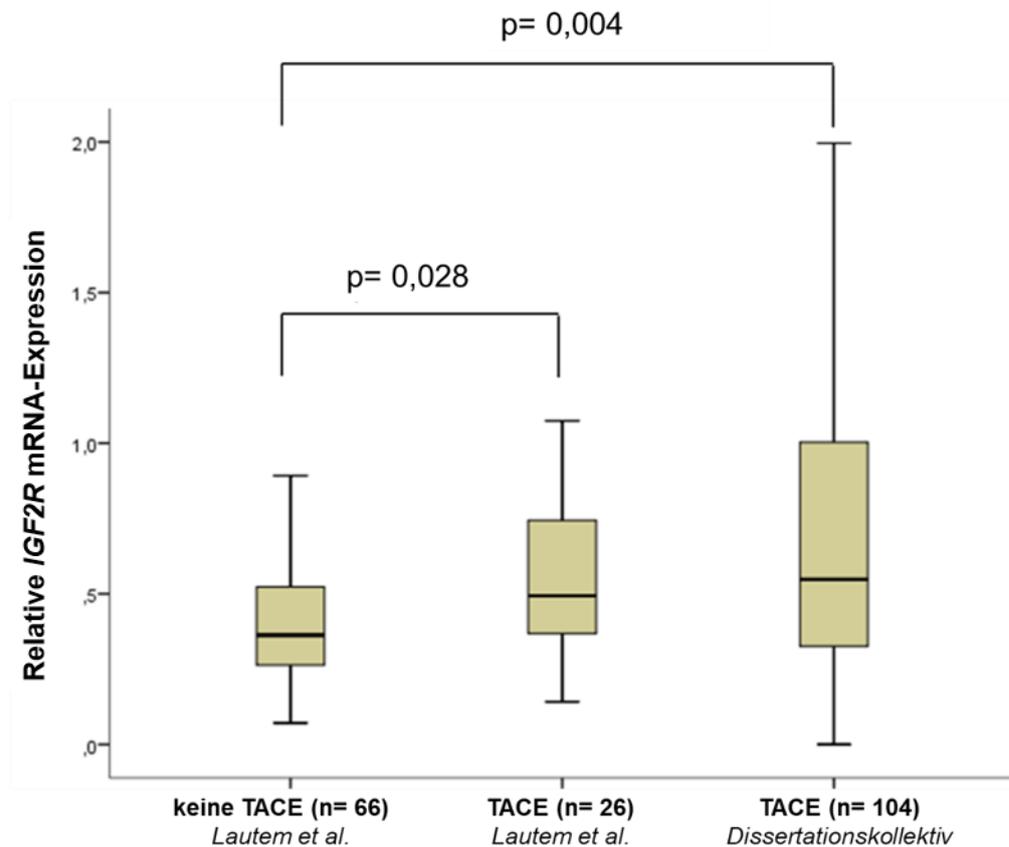


Abbildung 2: Relative *IGF2R* mRNA-Expression in HCC-Explantaten nach TACE vs. ohne Behandlung mit TACE

Abbildung 2 zeigt, dass die in dieser Arbeit analysierten Tumorproben nach TACE-Therapie, analog zu den Explantaten des Patientenkollektivs von *Lautem et al.*, im Median im Vergleich zu nicht-TACE-behandelten HCCs eine höhere relative *IGF2R* mRNA-Expression aufwiesen (Dissertationskollektiv: $p=0,004$ / Kollektiv „*Lautem et al.*“ $p=0,028$). Hiermit konnte bestätigt werden, dass beide Patientenkollektive sich hinsichtlich der *IGF2R* mRNA-Expression ähnlich verhielten.

Anschließend wurde im Dissertationskollektiv die relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und im Explantat nach Lebertransplantation bestimmt. Der Vergleich der relativen *IGF2R* mRNA-Expression von Biopsie und Explantat sollte zeigen, ob und in welchem Ausmaß es zu einer Veränderung der Expression im Verlauf einer Therapie mit TACE kommt. Dies sollte die Frage klären, ob bereits initial eine höhere relative *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorgewebe bestand und ob diese sich im zeitlichen Verlauf der Therapie veränderte. Die Entnahmekzeitpunkte der Gewebeproben von Biopsie und Explantat entsprachen zeitlich gesehen dem Beginn und dem Ende der TACE-Therapie.

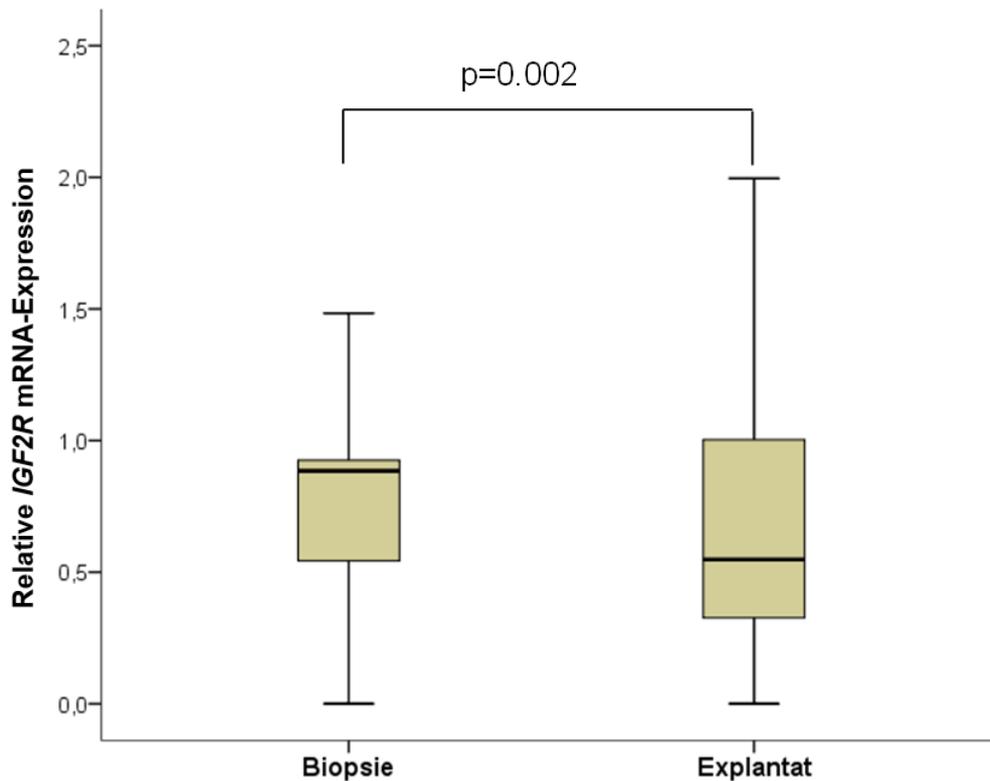


Abbildung 3: Relative IGF2R mRNA-Expression in Biopsie und Explantat

Abbildung 3 stellt die relative *IGF2R* mRNA-Expression der Initialbiopsien der relativen *IGF2R* mRNA-Expression der Explantate gegenüber. Der Boxplot zeigt, dass die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat, nach der Behandlung mit TACE, um 38 % geringer war als in der Initialbiopsie ($p=0,002$).

Für einen Überblick über die individuelle Regulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression stellt das folgende Histogramm die Differenz der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat für jeden Patienten im Einzelnen dar (s. Abbildung 4).

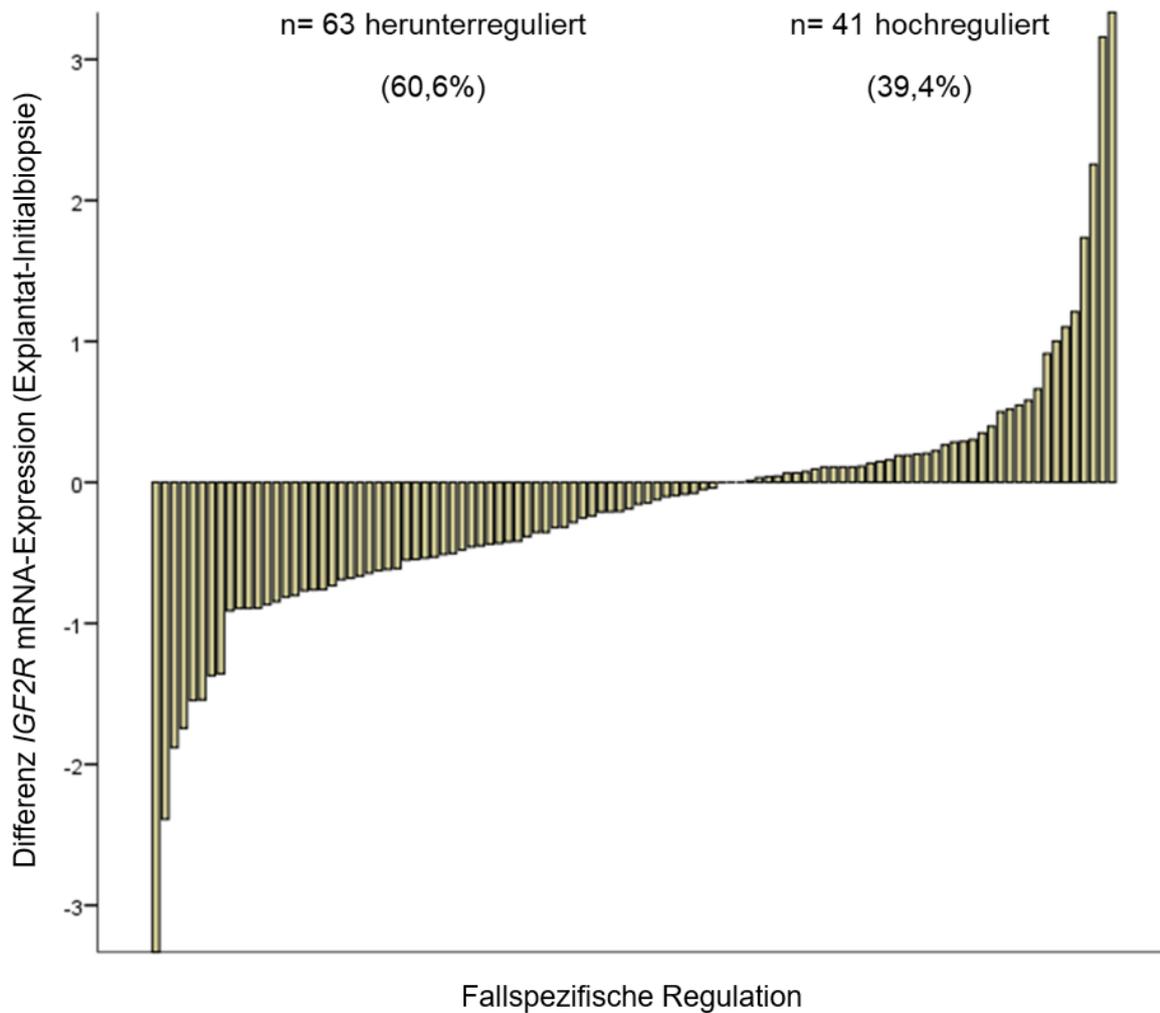


Abbildung 4: Fallspezifische Regulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression

Bei 63 Patienten erfolgte eine Herunterregulierung der relativen *IGF2R* mRNA-Expression (60,6%), während 41 Patienten (39,4%) im Explantat eine Hochregulation von *IGF2R* mRNA aufwiesen. Die Höhe der jeweiligen Balken korreliert hierbei mit dem Ausmaß der Differenz von relativer *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat.

4.3 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen *IGF2R* mRNA-Expression

Die vorangegangenen Analysen zeigen, dass es bei der Mehrheit der Patienten unter einer Therapie mit TACE zu einer Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression kam und die *IGF2R* mRNA-Expressionslevel der mit TACE behandelten Tumore im Vergleich zu unbehandelten hepatozellulären Karzinomen höher ausfielen. Als Konsequenz hieraus stellte sich die Frage, ob diese Ergebnisse mit bestimmten Tumor- oder Patientencharakteristika korrelierten.

Parameter wie TNM-Klassifikation, Grading, Child-Stadium, Anzahl und maximaler Durchmesser der Knoten sowie die AFP-Konzentration im Serum (bei Werten über 20 ng/ml) stellen wichtige Grundlagen für die Planung, Zielsetzung und Durchführbarkeit einer Tumorbehandlung dar. Da sie die makroskopische und mikroskopische Tumorbilogie klassifizieren, bieten sich diese Parameter für Analysen in Bezug auf eventuelle Korrelation mit der Entwicklung des Expressionsverhaltens von *IGF2R* mRNA an. Sie wurden, ebenso wie die Daten bezüglich des rezidivfreien Überlebens, hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit dem Expressionsverhalten von *IGF2R* mRNA geprüft (s. Tabellen 2 und 3).

Sowohl die Differenz der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in Initialbiopsie und Explantat als auch die nominale Einteilung in Hoch- oder Herunterregulation bilden die relative *IGF2R* mRNA-Expression über den Zeitraum vor dem Beginn bis zum Abschluss der TACE-Behandlung ab. In Tabelle 2 wurde die relative *IGF2R* mRNA-Expression nominal als Hoch- bzw. Herunterregulation dargestellt.

Tabelle 2 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen *IGF2R* mRNA-Expression unter TACE

	Expression der <i>IGF2R</i> mRNA im Verlauf der TACE		
	Hochregulation	Herunterregulation	p-Wert
N	41	63	
Mediane Nachbeobachtung in Tagen (Verteilungsbreite)	1927 (119-4848)	2340 (77-6046)	0,732
Medianes rezidivfreies Überleben in Tagen (Verteilungsbreite)	1787 (119-4848)	1731 (41-6046)	0,742

	Expression der <i>IGF2R</i> mRNA im Verlauf der TACE		
	Hochregulation	Herunterregulation	p-Wert
Männlich/weiblich	37/4	44/19	0,016
Medianes Alter in Jahren (Verteilungsbreite)	58 (43-68)	60 (36-70)	0,658
Knoten (1-3/multiple/Nekrose), n	19/12/9 ^a	26/19/15	0,910
Tumordurchmesser (<3 cm/>3cm)	21/20	37/26	0,786
Medianer Tumordurchmesser in cm (Verteilungsbreite)	2,5 (0-8,0)	2,5 (0-8,0)	0,399
Grading gesamt (G1/G2/G3/G4/Gx), n	11/20/3/0/7	14/39/5/1/4	0,362
Grading bei Biopsie (n=19) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	3/1/1/0/0	5/7/0/1/1	0,307
Grading bei LTx (n=95) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	8/19/2/0/7	9/32/5/0/3	0,224
Tumor-Klassifikation (T1/T2/T3/T4), n	23/16/1/1 ^a	30/26/3	0,301
AFP in ng/ml			
- vor TACE, Median (Verteilungsbreite)	14 (2,7-3590,0)	16,7 (2,3-4191,0)	0,563
- nach TACE, Median (Verteilungsbreite)	9,4 (2,8-913,0)	9,0 (2,0-639,0)	0,313
AFP (hochreguliert/herunterreguliert), n	4/14	4/26	0,451
Child A/B/C (n)	23/9/9 ^b	30/16/16	0,742
Hepatische Grunderkrankung (viral/nicht-viral), n	21/20	24/39	0,304
Mediane Anzahl TACE (Verteilungsbreite), n	5 (1-13)	5 (1-10)	0,354

^abei vier Patienten lagen keine Daten bezüglich der Knotenanzahl und des Tumorstadiums vor

^bbei einem Patienten lagen keine Daten bezüglich einer Leberzirrhose vor

4.3.1 Klinische Daten, Patientencharakteristika

Zwischen den Patientengruppen, die eine Hoch- bzw. Herunterregulation zeigten, konnte kein auffälliger Unterschied bezüglich des mittleren Nachbeobachtungszeitraums nachgewiesen werden (413 Tage längere Nachbeobachtung bei herunterregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression, $p=0,732$).

Da *IGF2R* als Tumorsuppressor angesehen wird, wäre bei hochregulierter *IGF2R* mRNA-Expression ein verlängertes rezidivfreies Überleben zu erwarten gewesen. Das rezidivfreie Überleben betrug in der hochregulierten Patientengruppe durchschnittlich 56 Tage mehr als bei Patienten mit herunterregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression ($p=0,742$). Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden.

Im Geschlechtervergleich fiel auf, dass Frauen häufiger eine herunterregulierte *IGF2R* mRNA-Expression aufwiesen als Männer ($p=0,016$), die mediane Altersdifferenz bei Erkrankung betrug zwei Jahre ($p= 0,658$).

Die Anzahl und der maximale Durchmesser der Tumorherde sollten bei einer möglichen tumorsuppressiven Wirkung von *IGF2R* im Vergleich der hochregulierten zur herunterregulierten Patientengruppe entsprechend niedriger sein. Tabelle 2 zeigt, dass die Verteilung der Anzahl der Tumorherde in beiden Gruppen ungefähr gleich ausfiel und es keine auffällige Verteilung zugunsten einer bestimmten Anzahl in hoch- oder herunterregulierter Patientengruppe gab ($p=0,910$).

Es trat keine deutliche Tendenz hinsichtlich eines Tumordurchmessers größer oder kleiner 3 cm in hoch- und herunterregulierter Patientengruppe ($p= 0,786$) auf, in beiden Patientengruppen betrug der mediane Tumordurchmesser 2,5 cm ($p=0,399$).

4.3.1.1 Tumor-Grading

Das Grading als Einstufung des Differenzierungsgrades eines Tumors zeigt an, wie stark die Tumorzellen im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe entartet sind. Sollte das Grading in Zusammenhang mit der Entwicklung der *IGF2R* mRNA-Expression stehen, könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Rolle von *IGF2R* als Biomarker sein.

Das Tumorgrading wurde histopathologisch in 19 Fällen in der Initialbiopsie und in 85 Fällen im Explantat bestimmt. Da die Entnahmezeitpunkte der Gewebeproben zeitlich ungefähr dem Beginn und dem Ende der TACE-Therapie entsprechen, wurden die beiden Patientengruppen getrennt voneinander in Bezug auf Hoch- bzw. Herunterregulierung von *IGF2R* mRNA analysiert.

Bei der Betrachtung der Verteilungsverhältnisse fiel auf, dass die Tumore sowohl in der Analyse des Gesamtkollektivs ($p=0,362$) als auch der Patientengruppe „Grading bei LTx“ ($p=0,224$) mehrheitlich als G1 und G2 eingestuft wurden, wobei zwischen hoch- und herunterregulierter Untergruppe keine auffälligen Verteilungsunterschiede erkennbar waren.

Patienten mit hochregulierter *IGF2R* mRNA-Expression, deren Grading aus dem histopathologischen Befund der Initialbiopsie erhoben wurde, hatten mehrheitlich G1-Tumore, während in der herunterregulierten Gruppe die meisten Tumore als G2 eingestuft wurden ($p=0,307$). Ein Zusammenhang zwischen Regulation der *IGF2R* mRNA-Expression und Grading bestand jedoch nicht.

4.3.1.2 Tumorstadium

Bei vier Patienten standen bezüglich des Tumorstadiums keine Daten zur Verfügung. Das Tumorstadium wird nach erfolgter TACE bestimmt und könnte bei einer Korrelation mit Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression für eine Verwendung von IGF2R als Biomarker sprechen (s. Tabelle 2).

Sowohl in der hoch- als auch der herunterregulierten Patientengruppe wurden die meisten Tumore als T1 eingestuft, während T2 in beiden Gruppen das zweithäufigste Tumorstadium war ($p=0,301$). Die Analyse zeigte keinen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Regulationsmuster der relativen *IGF2R* mRNA-Expression.

4.3.1.3 AFP

AFP ist ein Verlaufsparemeter und Biomarker für das HCC. Bei einer Serumkonzentration ab 20 ng/ml dient AFP als Tumormarker, ab diesem Referenzwert ist von einer Korrelation von AFP-Konzentration und Tumorlast auszugehen. In Bezug auf die Hypothese, IGF2R als Biomarker in der Behandlung eines HCCs einzusetzen, bieten sich daher vergleichende Analysen mit AFP als bereits etabliertem Tumormarker an. In der folgenden Grafik wurden zunächst die AFP-Serumlevel des Patientenkollektivs vor und nach TACE dargestellt. Hierfür wurden die Daten von 48 Patienten verwendet, bei denen die AFP- Serumkonzentration initial über 20 ng/ml lag.

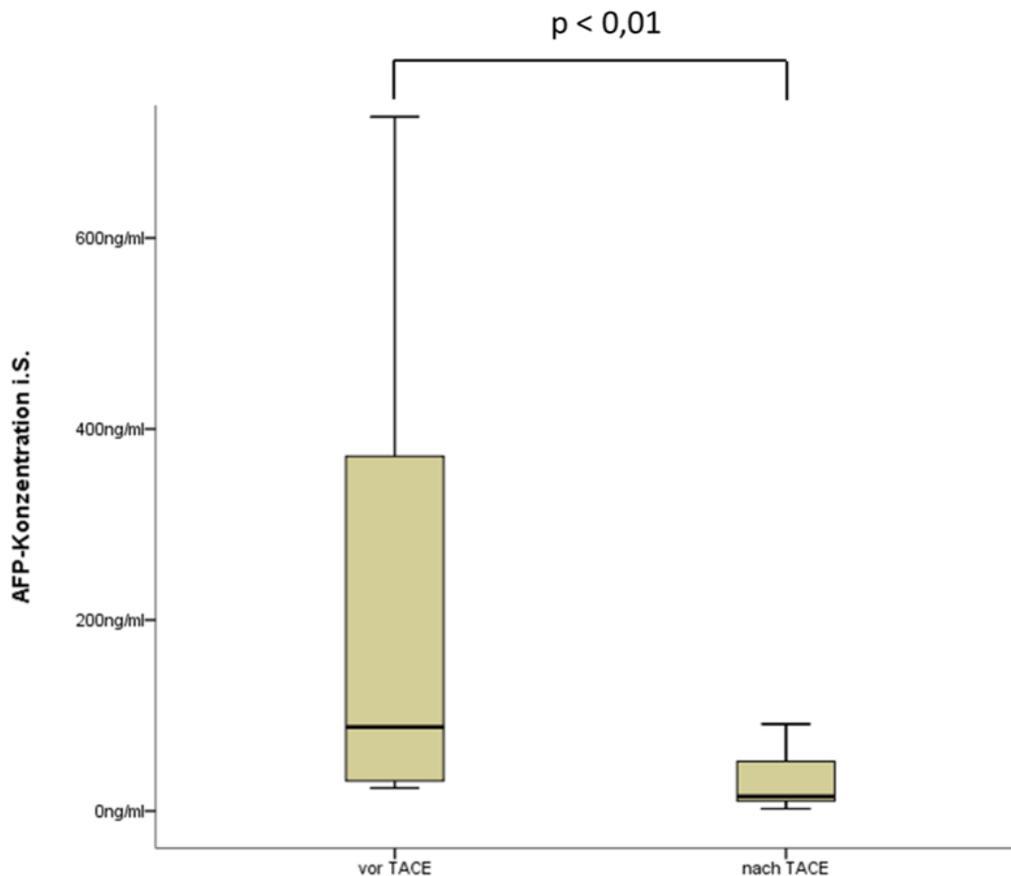


Abbildung 5: AFP-Konzentration vor und nach TACE, n=48 Patienten

Abbildung 5 zeigt, dass die AFP-Konzentration während der Behandlung mit TACE um 42% abnahm ($p < 0,01$). Insgesamt kam es bei 40 Patienten (83%) zu einer Herunterregulation und bei 8 Patienten (17%) zu einer Hochregulation der AFP-Konzentration i.S. unter Therapie mit TACE.

Im Anschluss wurde geprüft, ob die Entwicklung der *IGF2R*-Expression und AFP-Konzentration im Rahmen der Behandlung mit TACE miteinander korrelieren.

Der Tabelle 2 entnehmbar betrug die Differenz der medianen AFP-Konzentration i.S. vor TACE 2,7 ng/ml ($p = 0,563$), mit höheren Serumspiegeln in der Patientengruppe mit herunterregulierter *IGF2R* mRNA-Expression, nach TACE lag die Differenz nur noch bei 0,4 ng/ml ($p = 0,313$). Diese Unterschiede weisen keine Signifikanz auf, daher gab es keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen Hoch- oder Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression und der AFP-Konzentration im Serum.

Für die letzte in Tabelle 2 aufgeführte Analyse, in Bezug auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der AFP-Konzentration und dem Regulationsverhalten der *IGF2R* mRNA-Expression, erfolgte eine Zuteilung der Patienten in Hoch- oder Herunterregulation der AFP-Serumkonzentration, sofern die AFP-Level im Serum initial den Referenzwert von mindestens

20 ng/ml erreichten. Es wurden daher nur die Werte der AFP-Serumkonzentration von 48 Patienten einbezogen.

Bei Tumoren mit hochregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression fand in 4 Fällen (8%) gleichzeitig eine Hochregulierung der AFP-Konzentration i.S. und bei 14 Patienten (30%) eine Herunterregulierung der AFP-Konzentration statt. In HCCs mit herunterregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression kam es bei 26 Patienten (54%) ebenfalls zu einer Herunterregulation der AFP-Konzentration und in 4 Fällen zu einer Hochregulation (8%) (s. Tab. 2, $p=0,451$). Auch diese Ergebnisse sind nicht signifikant. Somit war kein Zusammenhang zwischen einer Hoch- oder Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression und der AFP-Konzentration feststellbar.

4.3.2 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat

Bei Initialbiopsie und Explantat handelt es sich um Tumorproben, welche jeweils vor Beginn und nach Abschluss der TACE entnommen werden. Da von Fall zu Fall unterschiedlich viele TACE-Therapiesitzungen erfolgten und der jeweilige Effekt der TACE auf den Tumor hierdurch unterschiedlich groß ausfiel, wurden analog zu Tabelle 2 auch in Bezug auf die Einzelwerte der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat Analysen durchgeführt, die mögliche Zusammenhänge der Tumor- und Patientendaten mit der *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat untersuchen.

4.3.2.1 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie

Die im Tumorgewebe der Biopsie gemessene relative *IGF2R* mRNA-Expression ist ein von der TACE unabhängiger Wert, da die Biopsie vor Beginn der Therapie zur Diagnosesicherung entnommen wurde.

Nachdem die in Tabelle 2 durchgeführten Analysen keinen Hinweis auf einen Zusammenhang der Hoch- oder Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression mit Patienten- oder Tumorcharakteristika erbracht haben, wurde im Folgenden geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den tumor- und patientenspezifischen Daten und der relativen *IGF2R* mRNA-Expression vor TACE bestand. Hierzu wurden die Patienten anhand der medianen relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie in zwei Gruppen eingeteilt und vergleichend analysiert.

Bei Hinweisen auf Zusammenhänge zwischen diesen Parametern könnte die relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie für den weiteren Krankheitsverlauf ab Diagnosestellung von prognostischer Relevanz sein.

Tabelle 3 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von relativer *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie

	relative <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in der Initialbiopsie		
	< Median	≥ Median	p-Wert
N	52	52	
Mediane Nachbeobachtung in Tagen (Verteilungsbreite)	1506 (79-4791)	2476 (77-6046)	0,020
Medianes rezidivfreies Überleben in Tagen (Verteilungsbreite)	1497 (79-4791)	1879 (41-6046)	0,164
Männlich/weiblich	44/8	37/15	0,155
Medianes Alter in Jahren (Verteilungsbreite)	58 (43-68)	60 (36-70)	0,757
Knoten (1-3/multiple/Nekrose), n	25/13/11 ^a	20/18/13	0,470
Tumordurchmesser (<3 cm/>3cm)	32/20	26/26	0,238
Medianer Tumordurchmesser in cm (Verteilungsbreite)	2,5 (0-8,0)	2,95 (0-8,0)	0,197
Grading gesamt (G1/G2/G3/G4/Gx), n	14/29/2/0/7	11/30/6/1/4	0,380
Grading bei Biopsie (n=19) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	6/3/1/0/0	2/5/0/1/1	0,243
Grading bei LTx (n=95) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	8/26/1/7	9/25/6/3	0,155
Tumor-Klassifikation (T1/T2/T3/T4), n	30/18/1/1 ^a	23/24/3/0	0,436
AFP in ng/ml			
- vor TACE, Median (Verteilungsbreite)	25,5 (3,1-4191,0)	13,5 (2,3-2268,0)	0,258
- nach TACE, Median (Verteilungsbreite)	11,0 (2,2-788,0)	8,505 (2,0-913,0)	0,294
AFP hochreguliert/herunterreguliert	5/22	3/18	0,696

	relative <i>IGF2R</i> mRNA-Expression in der Initialbiopsie		
	< Median	≥ Median	p-Wert
Child A/B/C (n)	25/14/13 ^b	28/11/12	0,666
Hepatische Grunderkrankung (viral/nicht-viral)	28/24	29/23	0,249
Mediane Anzahl TACE (Verteilungsbreite), n	5 (1-13)	5 (1-10)	0,888

^abei vier Patienten lagen keine Daten bezüglich der Knotenanzahl und des Tumorstadiums vor

^bbei einem Patienten lagen keine Daten bezüglich einer Leberzirrhose vor

In Tabelle 3 zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen einer vergleichsweise hohen relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und der medianen Nachbeobachtung, welche für die Überlebenszeit nach Diagnosestellung steht ($p=0,020$).

Die weiteren durchgeführten Analysen zeigten keinen Zusammenhang zwischen der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und patienten- sowie tumorspezifischen Daten.

4.3.2.2 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat

Einige der erhobenen Patienten- und Tumorcharakteristika, wie das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben oder die Anzahl und Größe der Tumorherde, wurden zum Zeitpunkt der Lebertransplantation und darüber hinaus erfasst und ermöglichen eine Beurteilung des Krankheitsverlaufs nach erfolgter Therapie mit TACE. Bei einer Korrelation mit diesen Parametern könnte die relative *IGF2R* mRNA-Expression als prognostisches Mittel zum weiteren Verlauf nach erfolgter Lebertransplantation eingesetzt werden.

Das TNM-Stadium und die genaue Ausdehnung des Tumors wurden bei erfolgter Lebertransplantation anhand des intraoperativen Befundes beschrieben. Sollte ein Zusammenhang zwischen der *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat und diesen Tumorcharakteristika herstellbar sein, könnte *IGF2R* eine Rolle als Biomarker zur Evaluation des Krankheitsverlaufs zukommen. Auch die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat wurde anhand des Medians in zwei Gruppen eingeteilt und auf mögliche Zusammenhänge mit Patienten- und Tumordaten geprüft.

Tabelle 4 Patienten- und Tumordaten in Abhängigkeit von der relativen IGF2R mRNA-Expression im Explantat

	relative <i>IGF2R</i> mRNA-Expression im Explantat		
	< Median	≥ Median	p-Wert
N	52	52	
Mediane Nachbeobachtung in Tagen (Verteilungsbreite)	1908 (77-4539)	2046 (91-6046)	0,210
Medianes rezidivfreies Überleben in Tagen (Verteilungsbreite)	1569 (41-4539)	1791 (91-6046)	0,314
Männlich/weiblich	36/16	45/7	0,057
Medianes Alter in Jahren (Verteilungsbreite)	60 (36-70)	59,5 (43-69)	0,519
Knoten (1-3/multiple/Nekrose), n	27/12/10 ^a	18/19/14	0,168
Tumordurchmesser (<3 cm/>3cm)	28/24	30/22	0,844
Medianer Tumordurchmesser in cm (Verteilungsbreite)	2,5 (0,0-8,0)	2,5 (0-6,5)	0,971
Grading gesamt (G1/G2/G3/G4/Gx), n	10/37/1/0/4	15/22/7/1/7	0,025
Grading bei Biopsie (n=19) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	4/6/0/0/0	4/2/1/1/1	0,291
Grading bei LTx (n=95) (G1/G2/G3/G4/Gx), n	6/31/1/0/4	11/20/6/0/6	0,050
Tumor-Klassifikation (T1/T2/T3/T4), n	31/15/2/1 ^a	22/27/2/0	0,138
AFP in ng/ml			
- vor TACE, Median (Verteilungsbreite)	26 (2,7-4191,0)	12 (2,3-3590,0)	0,465
- nach TACE, Median (Verteilungsbreite)	11 (2,2-788,0)	8,85 (2,0-913,0)	0,288
AFP hochreguliert/herunterreguliert	4/23	4/17	0,158
Child A/B/C (n)	20/17/14 ^b	33/8/11	0,051
Hepatische Grunderkrankung	31/21	26/26	0,296

	relative <i>IGF2R</i> mRNA-Expression im Explantat		
	< Median	≥ Median	p-Wert
(viral/nicht-viral)			
Mediane Anzahl TACE (Verteilungsbreite), n	5 (1-13)	5 (1-10)	0,831

^abei vier Patienten lagen keine Daten bezüglich der Knotenanzahl und des Tumorstadiums vor

^bbei einem Patienten lagen keine Daten bezüglich einer Leberzirrhose vor

Die Analysen in Tabelle 4 zeigen, dass in der Patientengruppe mit vergleichsweise höherer *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat der Anteil an G1-, Gx- und G3-Einstufungen größer ausfiel als in der Gruppe mit vergleichsweise niedrigerer *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat ($p=0,025$ im Gesamtvergleich; $p=0,050$ im Vergleich der Patienten, deren Grading im Explantat bestimmt wurde). Weiterhin konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen niedrigem Child-Stadium, somit guter Leberfunktion, und erhöhter *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat ($p=0,051$) hergestellt werden.

Alle weiteren Analysen erbrachten keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen bestimmten erkrankungsspezifischen Daten und vergleichsweise hoher oder niedriger *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat.

4.4 Behandlungserfolg der TACE und deren Effekt auf die *IGF2R* mRNA-Expression

Um einen möglichen prognostischen Nutzen von *IGF2R* in der Behandlung eines HCCs benennen zu können, wurde in den im folgenden Abschnitt abgebildeten Analysen 4.4.1 und 4.4.2 das Auftreten oder Ausbleiben eines Behandlungserfolgs auf einen Zusammenhang mit der Entwicklung der *IGF2R* mRNA-Expression untersucht.

Als Parameter für den Behandlungserfolg wurden hierbei das Auftreten von Rezidiven und das Therapieansprechen eingesetzt. In 7 Fällen lagen keine auswertbaren Daten zum Therapieansprechen der Patienten auf TACE vor.

4.4.1 Quantitative Veränderung der *IGF2R* mRNA-Expression in Zusammenhang mit dem Therapieansprechen

Einem Therapieansprechen entsprach ein, unter noch nicht abgeschlossener TACE-Therapie, radiologisch nachweisbarer Größenregress des Tumors. Kein Ansprechen auf TACE wurde beschrieben, wenn es zu einem Größenprogress oder neuen Rundherden kam.

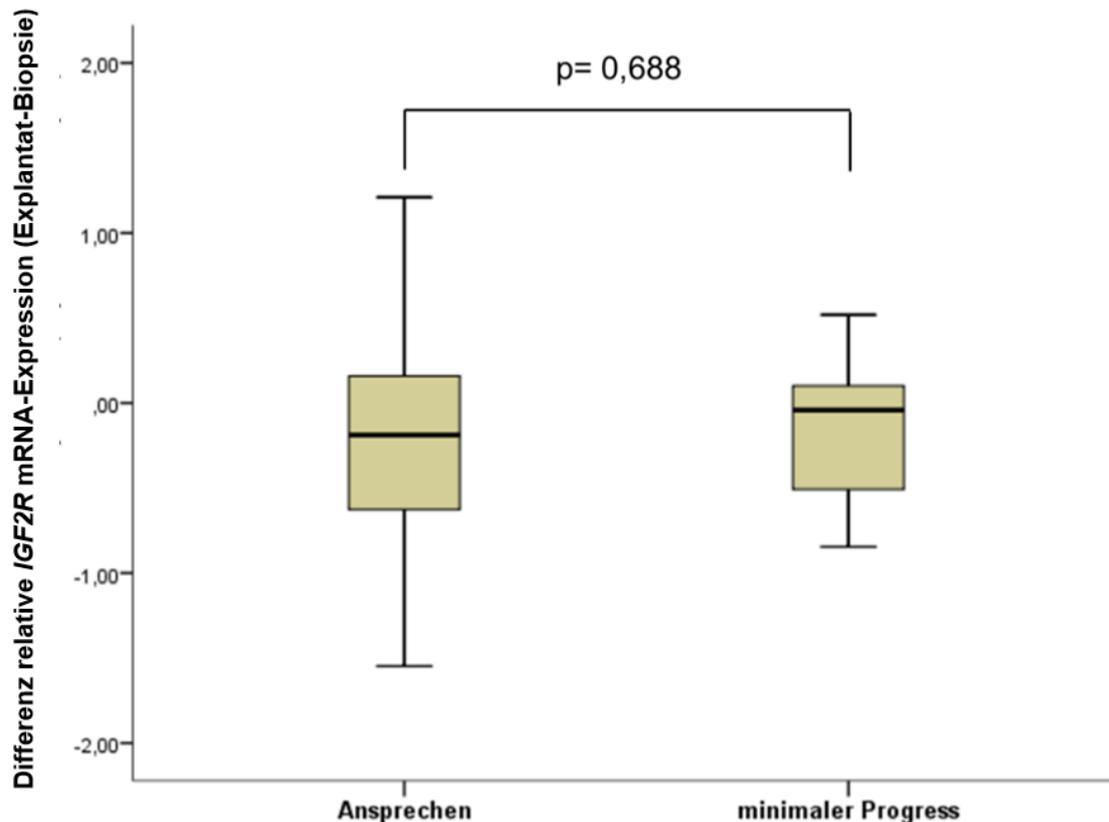


Abbildung 6: Vergleich der Differenz der relativen *IGF2R* mRNA-Expression anhand des Therapieansprechens auf TACE

Abbildung 6 zeigt eine Boxplotanalyse, in der die Differenz der relativen *IGF2R* mRNA-Expression, aufgeteilt anhand eines Therapieansprechens oder Krankheitsprogresses unter TACE, verglichen wurde. Der Median beider Boxplots liegt im negativen Bereich, was bedeutet, dass es in beiden Patientengruppen mehrheitlich zu einer Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression kam.

Der Vergleich beider Patientengruppen zeigt, dass keine Korrelation von Entwicklung der *IGF2R* mRNA-Expression und dem Behandlungserfolg einer TACE bestand ($p=0,688$).

4.4.2 Quantitative Veränderung der *IGF2R* mRNA-Expression in Zusammenhang mit der Rezidivfreiheit

Als Rezidiv wurden ein Größenprogress des Tumors oder neue Rundherde nach Behandlung mit TACE definiert.

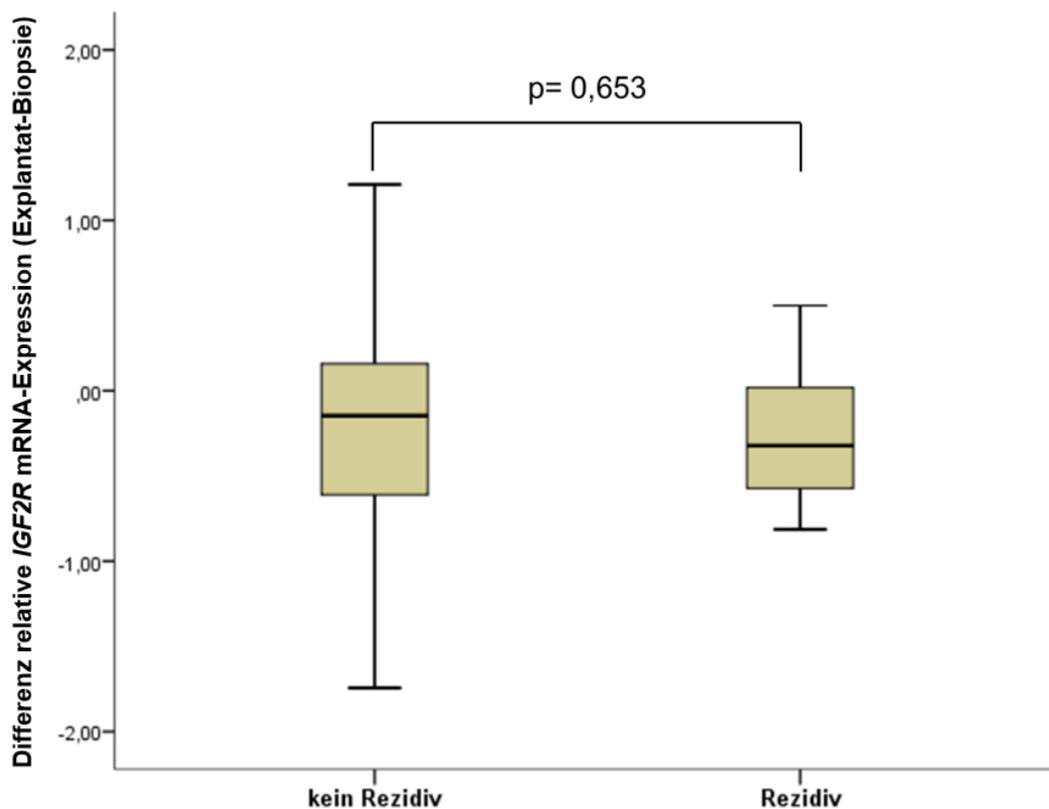


Abbildung 7: Vergleich der Differenz der relativen *IGF2R* mRNA-Expression anhand des Auftretens eines Rezidivs

Die Boxplots in Abbildung 7 zeigen sowohl in der Patientengruppe mit Rezidiv unter TACE-Therapie als auch in der rezidivfreien Gruppe eine Herunterregulierung der relativen *IGF2R* mRNA-Expression, wobei in der Gruppe mit Rezidiv eine stärkere Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression stattfand ($p=0,653$). Dieses Ergebnis ist nicht signifikant, weshalb kein Zusammenhang zwischen *IGF2R* mRNA-Expression und Auftreten eines Rezidivs herstellbar ist.

4.5 IGF2R und rezidivfreies 5-Jahres-Überleben

Auch in Bezug auf das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der *IGF2R* mRNA-Expression und der Langzeitprognose des Patienten besteht.

Um den möglichen Effekt von Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression auf die (rezidivfreien) Überlebenszeiten zu analysieren, wurde das Patientenkollektiv im folgenden Abschnitt anhand der nominalen Einteilung in Hoch- und Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in zwei Gruppen eingeteilt.

4.5.1.1 Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben und *IGF2R* mRNA-Regulation

Abbildung 8 zeigt das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben ab Diagnosestellung in Abhängigkeit von der Hoch- oder Herunterregulierung von *IGF2R* mRNA im Verlauf der TACE.

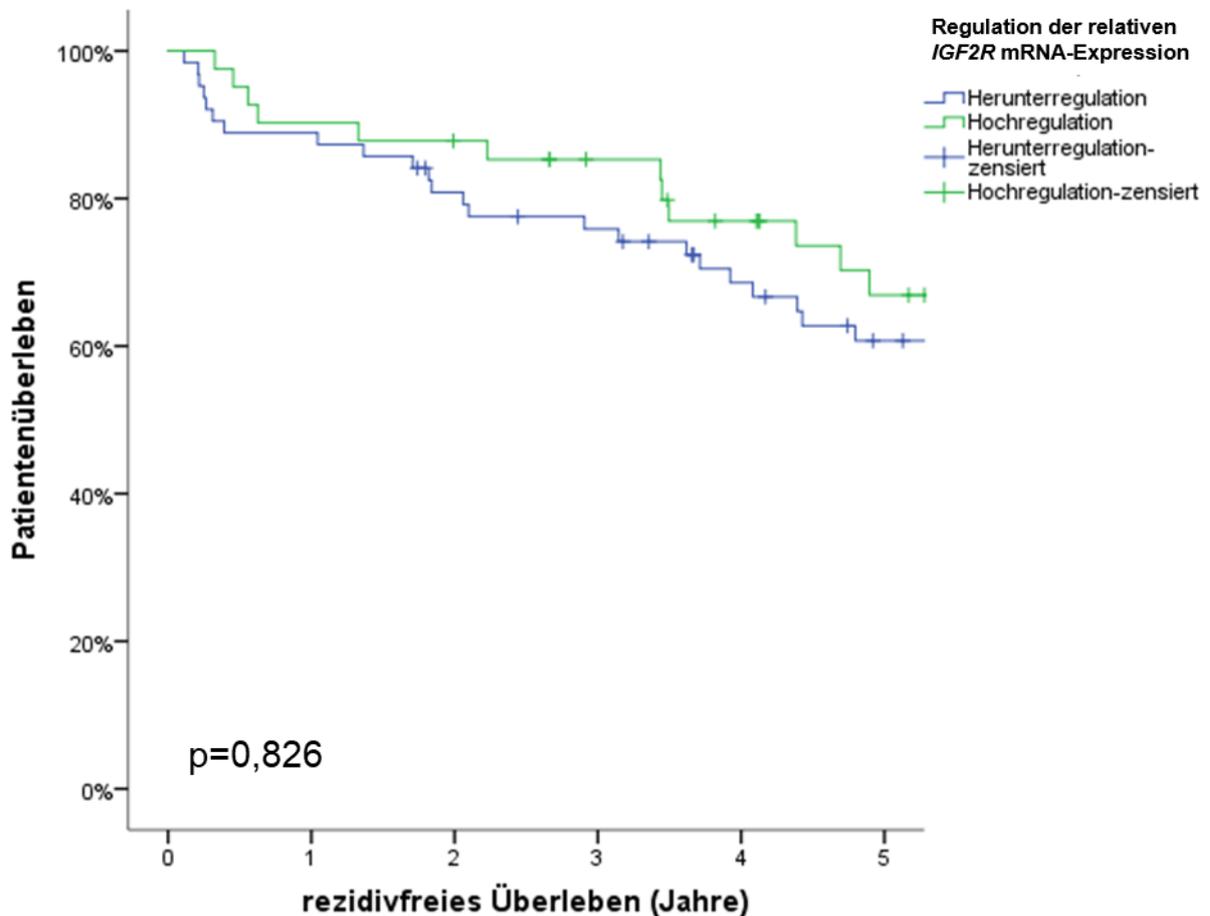


Abbildung 8: Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach hoch- und herunterregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression, Endpunkt: Tod und/oder Rezidiv

Die Analyse in Abbildung 8 zeigt, dass eine Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression keinen Überlebensvorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben und/oder das rezidivfreie Überleben verschaffte.

Während für die Analyse in Abbildung 8 sowohl ein Rezidiv als auch ein Tod infolge der HCC-Erkrankung als Rezidiv gewertet wurde, entsprach in Abbildung 9 nur das Auftreten eines Rezidivs in Form einer Größenprogredienz oder neu aufgetretener Läsionen als Endpunkt. Hierdurch soll nochmals differenzierter analysiert werden, inwiefern das Wachstumsverhalten des Tumors durch die Entwicklung der relativen *IGF2R* mRNA-Expression beeinflusst werden könnte.

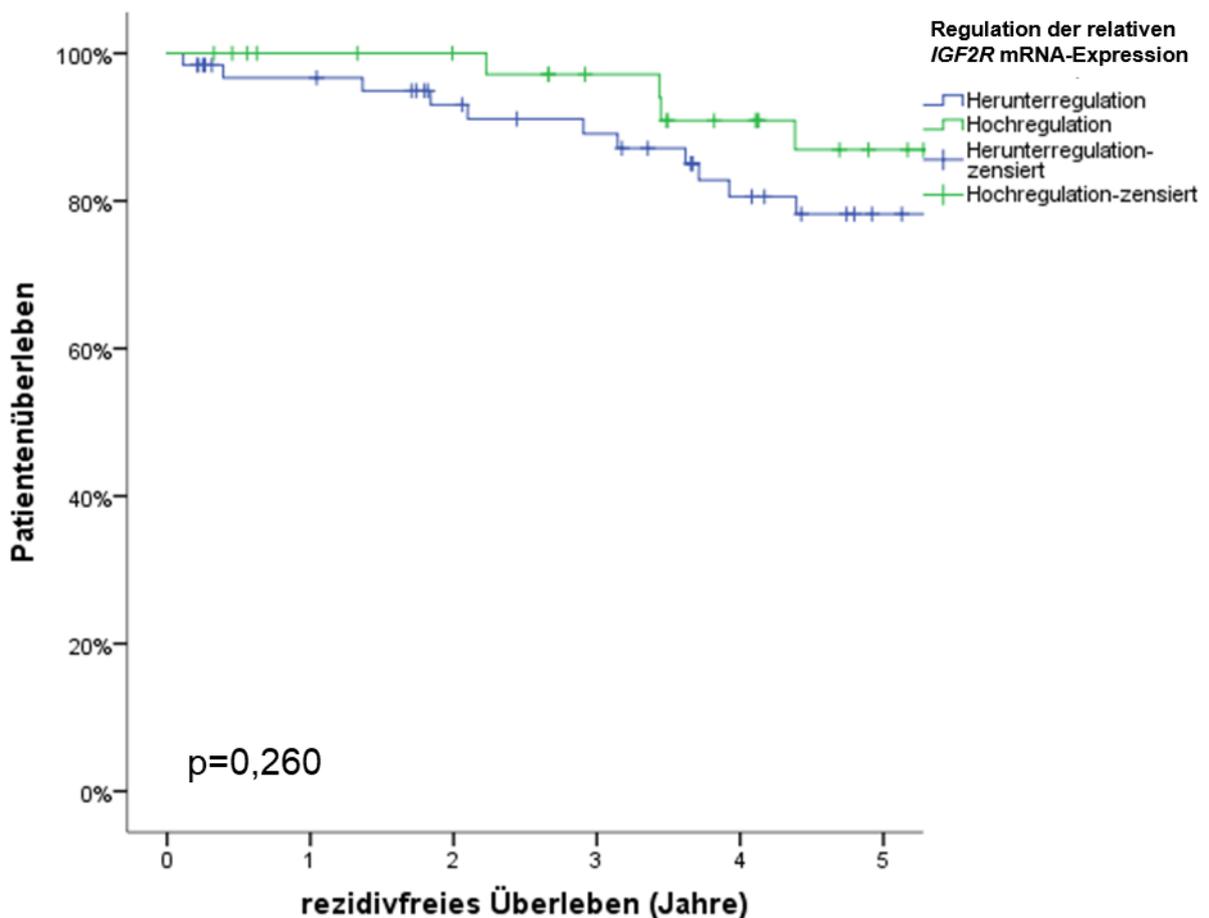


Abbildung 9: Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach hoch- und herunterregulierter relativer *IGF2R* mRNA-Expression, Endpunkt: Rezidiv

Abbildung 9 zeigt, dass auch ein ausschließliches Tumorrezidiv als Endpunkt nicht mit einer Hoch- oder Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression assoziiert war.

4.5.1.2 Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben und relative *IGF2R* mRNA-Konzentration in der Initialbiopsie

Lautem et al. zeigten, dass mit TACE behandelte Patienten eine höhere *IGF2R* mRNA-Expression und ein längeres rezidivfreies Überleben aufweisen als HCC-Patienten, die eine andere Therapie erhielten [9]. Im folgenden Abschnitt soll geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen *IGF2R* mRNA-Expression und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit HCC besteht und die *IGF2R* mRNA-Expression eine Vorhersage bezüglich der Mortalität von HCC-Patienten zulässt.

Für diese Analysen eignet sich die relative *IGF2R* mRNA-Konzentration in der Initialbiopsie, da diese bereits vor Beginn der TACE bestimmt wurde und somit unabhängig von der Therapie

mit TACE bereits frühzeitig nach Diagnosestellung als prognostischer Parameter eingesetzt werden könnte. In der folgenden Überlebenskurve wurden anhand des Medians der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie zwei Patientengruppen gebildet und in Bezug auf das rezidivfreie Gesamtüberleben miteinander verglichen.

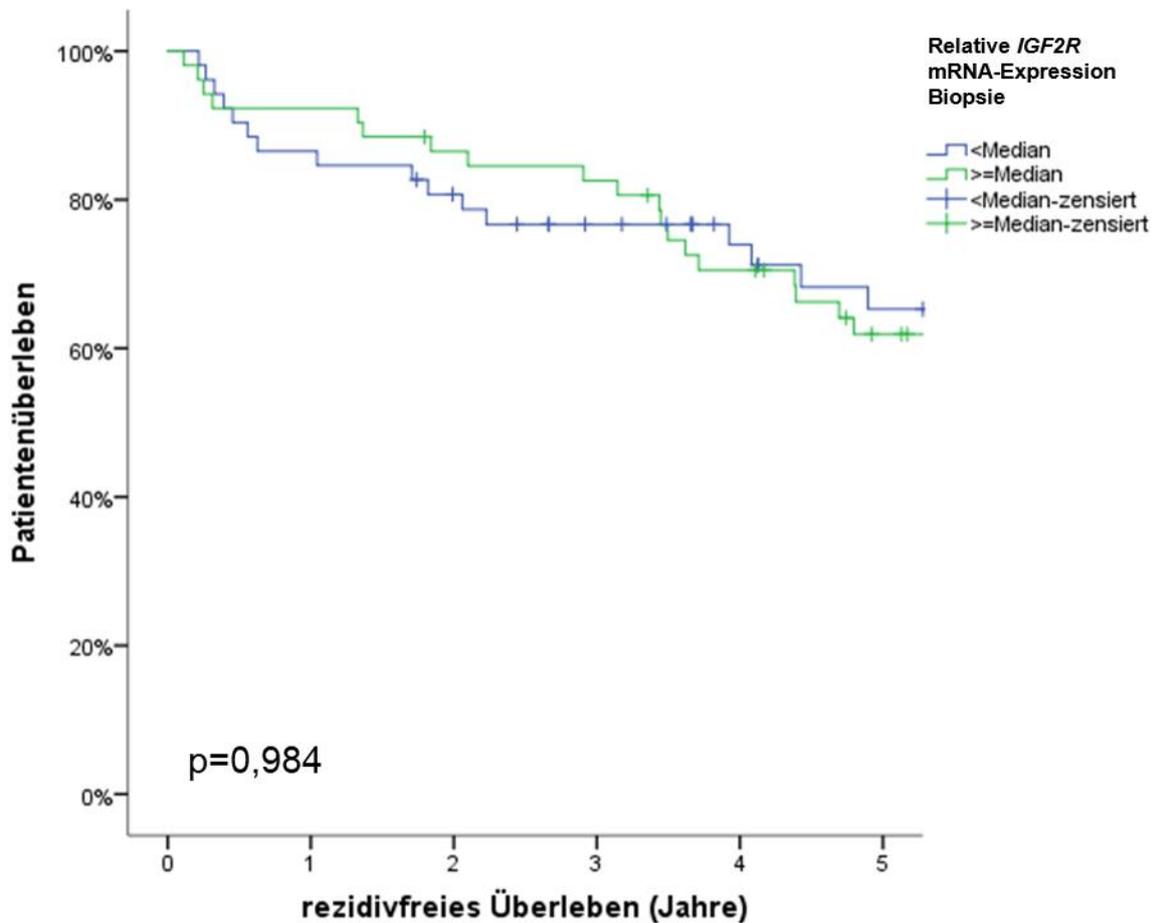


Abbildung 10: Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach relativer *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie, Endpunkt: Tod und/oder Rezidiv

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 10 zeigt keinen Zusammenhang zwischen vergleichsweise höher- oder niedriggradiger *IGF2R* mRNA-Expression zu Beginn der Erkrankung und dem rezidivfreien Überleben.

Analog zur Analyse in Abbildung 9 wurde in der folgenden Abbildung 11 nur ein eingetretenes Tumorrezidiv als Ereignis gewertet.

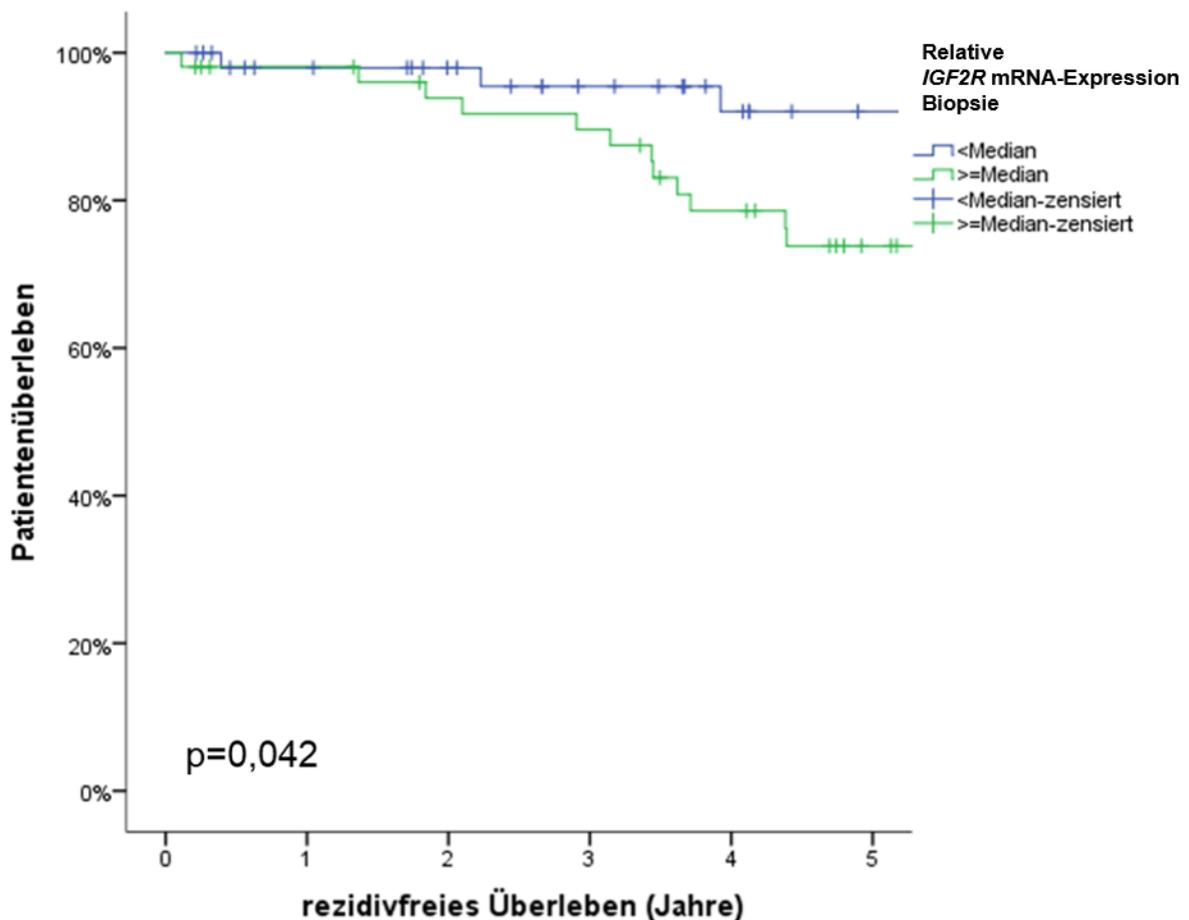


Abbildung 11: Rezidivfreies Überleben, aufgeteilt nach relativer *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie, Endpunkt: Rezidiv

Abbildung 11 zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und dem rezidivfreiem Überleben. Patienten mit einer vergleichsweise höheren relativen *IGF2R* mRNA-Expression im Biopsat wiesen hierbei ein schlechteres rezidivfreies Überleben auf.

Analog zu den beiden vorangegangenen Analysen wurden mögliche Zusammenhänge zwischen *IGF2R*-Expression im Explantat und der Rezidivfreiheit geprüft. Es gab weder in Bezug auf das Gesamtüberleben ($p=0,517$) noch auf ein Überleben ohne Eintritt eines Rezidivs ($p=0,870$) einen Anhalt für einen Zusammenhang mit der relativen *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die entsprechenden Grafiken nicht abgebildet.

4.5.2 5-Jahres-Überleben

Auch in der 5-Jahres-Überlebenskurve wurde die Hoch- oder Herunterregulierung von *IGF2R* im Verlauf der TACE eingesetzt, um sie auf mögliche Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten und der Krankheitsprognose zu prüfen.

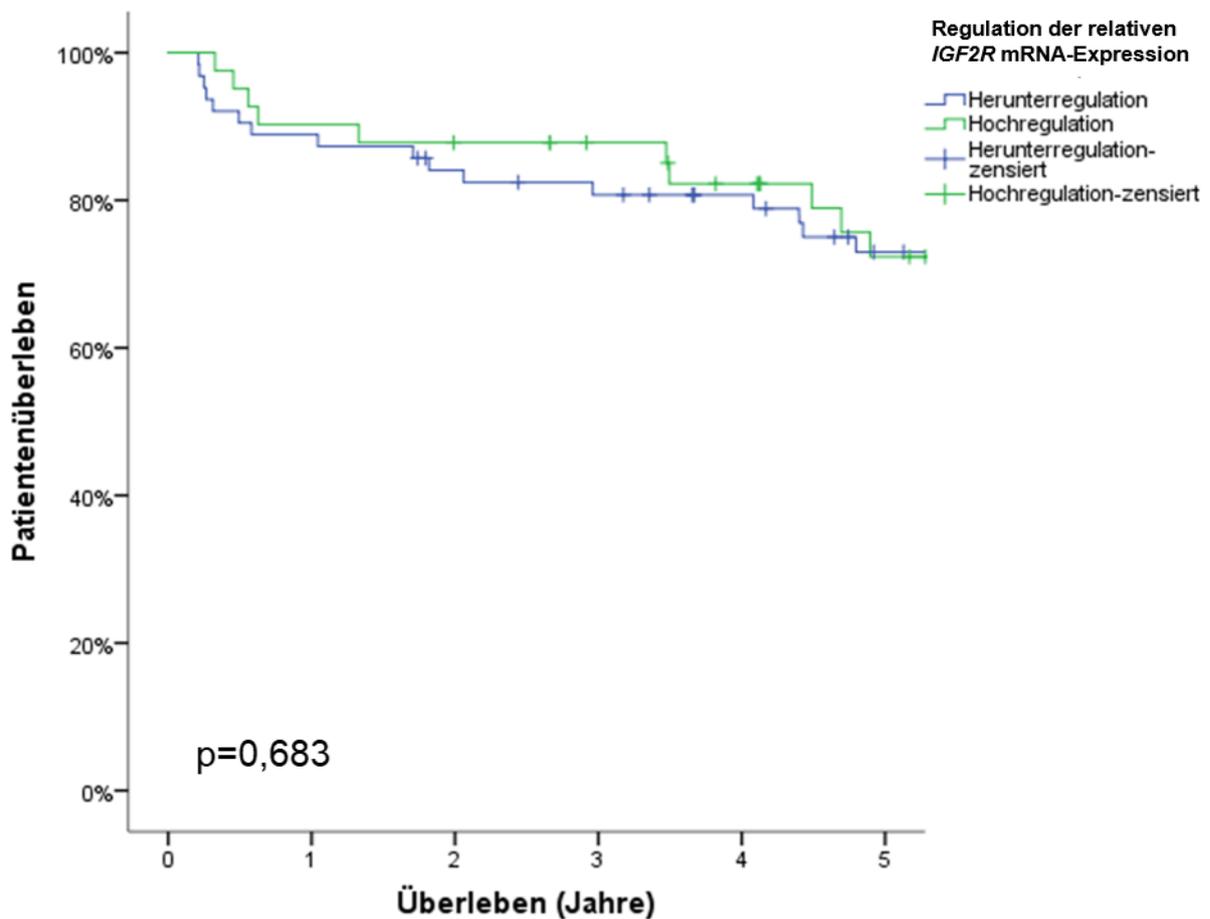


Abbildung 12: Gesamtüberleben, aufgeteilt nach Hoch- und Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression unter TACE

Abbildung 12 zeigt keine Korrelation von der Regulation des relativen *IGF2R* mRNA-Expressionsverhaltens mit dem Gesamtüberleben.

Auch in Bezug auf das Gesamtüberleben war es von Interesse zu klären, ob sich von der initial gemessenen relativen *IGF2R* mRNA-Expression eine prognostische Aussage ableiten lässt. Hierzu wurde das Patientenkollektiv ebenfalls anhand der Regulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in zwei Gruppen aufgeteilt und in Bezug auf die Überlebensdauer in einer Kaplan-Meier-Kurve analysiert (Abb. 13).

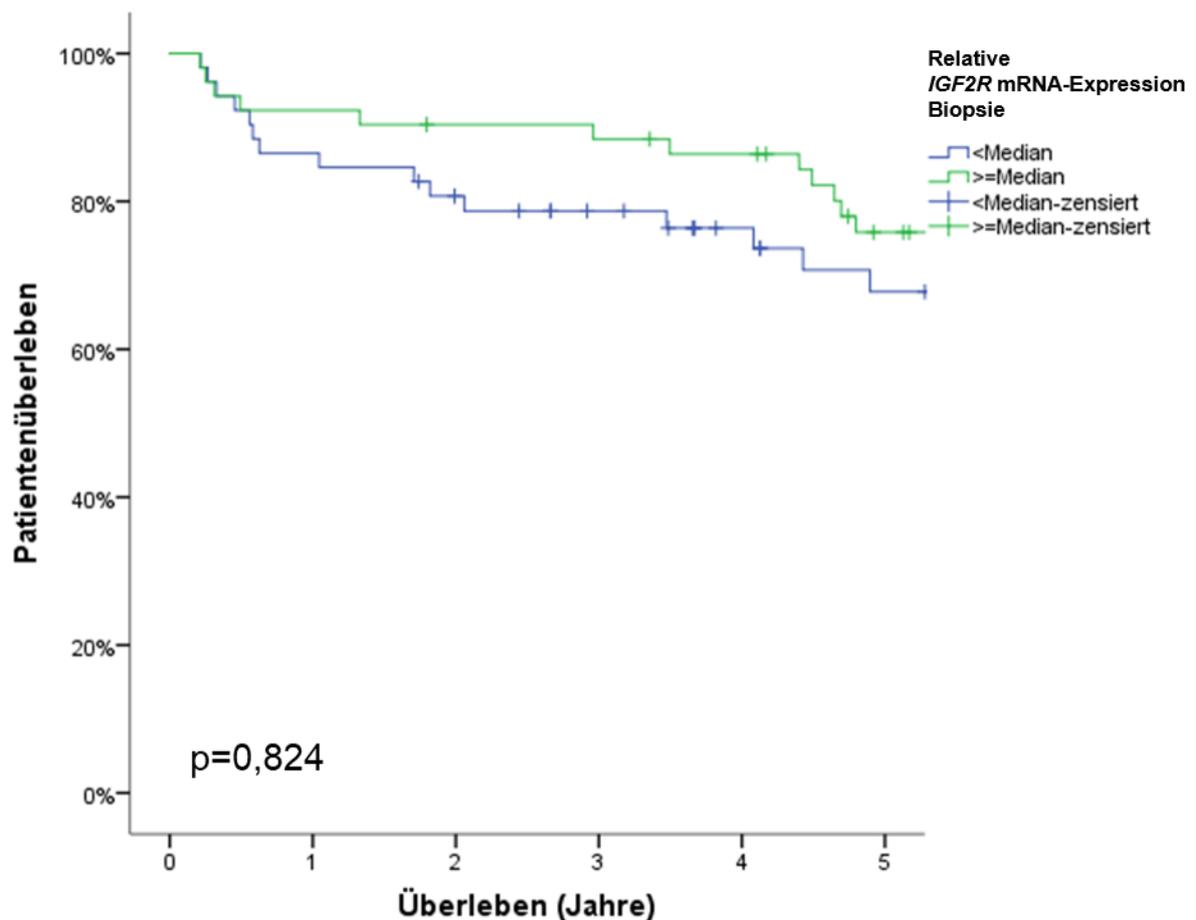


Abbildung 13: Gesamtüberleben, aufgeteilt nach relativer *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie

In Abbildung 13 wird ersichtlich, dass kein Zusammenhang zwischen Hoch- oder Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und einem Vorteil im Gesamtüberleben nachweisbar war.

Die ebenfalls erstellten Überlebenskurven mit der ermittelten mRNA-Expression im Explantat erbrachten keine Hinweise auf eine mögliche Einflussnahme auf das Gesamtüberleben ($p=0,189$), auf die Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *IGF2R* mRNA im hepatozellulären Karzinom (HCC) vor und nach Behandlung mit transarterieller Chemoembolisation (TACE) untersucht. *IGF2R* wird allgemein als Tumorsuppressor angesehen und könnte in der Pathologie des hepatozellulären Karzinoms (HCC) eine wichtige Rolle spielen. Die transarterielle Chemoembolisation ist ein palliatives Therapieverfahren, bei dem durch Kombination der intravasalen Applikation von Chemotherapeutika und der Embolisation tumorversorgender Arterien das Fortschreiten des Tumorwachstums durch Chemotherapie und gleichzeitige mangelnde Sauerstoff- und Nährstoffversorgung so lange wie möglich unterdrückt werden soll. Der Einfluss der TACE auf die Expression von *IGF2R* wurde analysiert.

Diese Arbeit knüpft an Untersuchungen von *Lautem et al.* [9] an, durch die sowohl eine signifikant erhöhte Expression von *IGF2R* mRNA bei mit TACE behandelten HCC-Proben im Vergleich zu nicht mit TACE behandelten HCCs beschrieben wurde als auch eine signifikant erhöhte rezidivfreie Überlebenszeit bei HCC-Patienten mit höherer *IGF2R* mRNA-Expression.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass mit TACE behandelte Tumoren eine erhöhte endogene Tumorabwehr haben könnten. Da nicht jedes HCC mittels TACE behandelt wird, stellte sich außerdem die Frage, ob speziell für eine TACE infrage kommende Tumore bereits vor der Therapie eine vergleichsweise erhöhte *IGF2R* mRNA-Expression aufweisen, oder ob sich die Expression im Therapieverlauf ändert und sich hieraus ein möglicher Einsatz von *IGF2R* als prognostischem Marker ableiten lässt. Aber auch die Regulation der mRNA-Expression im Verlauf der TACE oder die bei Explantation gemessene *IGF2R* mRNA-Expression könnten für die weitere Betreuung der transplantierten Patienten von Bedeutung sein, sofern ein Zusammenhang mit Rezidivwahrscheinlichkeit, rezidivfreiem Überleben oder Langzeitüberleben besteht.

Der Großteil des von *Lautem et al.* untersuchten Kollektivs waren leberresezierte HCC-Patienten ohne vorangegangene Therapie, während lediglich 28% der Patienten lebertransplantiert waren und zuvor eine TACE erhalten hatten (n=26). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Daten von *Lautem et al.* in einem weiteren, größeren Kollektiv zu bestätigen und den Einfluss der TACE auf die Expression von *IGF2R* mRNA sowie die möglichen Funktionen von *IGF2R* als Tumorsuppressor und Biomarker im HCC zu untersuchen. Hierzu wurde auf ein Kollektiv von 104 lebertransplantierten, zuvor mit TACE behandelten Patienten zurückgegriffen (= Dissertationskollektiv), in dem von allen Patienten sowohl Tumorproben vor (Initialbiopsie zum Zeitpunkt der Diagnose) als auch nach TACE (im Explantat nach Lebertransplantation) zur Verfügung standen.

5.1 Vergleich der beiden Kollektive, Untersuchung der Regulation von IGF2R mRNA-Expression

Um die Vergleichbarkeit des Dissertationskollektivs mit dem von *Lautem et al.* analysierten Kollektiv gewährleisten zu können, wurden zunächst Untersuchungen zur relativen *IGF2R* mRNA-Expression durchgeführt. Die Analyse der Tumorexplantate zeigte im Dissertationskollektiv eine signifikant verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten, die nicht mit TACE behandelt worden waren ($p=0,004$). Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse von *Lautem et al.* [9] in einem größeren Kollektiv.

Auf der Vergleichbarkeit beider Kollektive aufbauend, und um die potenzielle Funktion von IGF2R als Tumorsuppressor aufzuklären, wurde daraufhin der Frage nachgegangen, ob die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat erfolgreich behandelter HCCs erst durch die Therapie mit TACE verstärkt wird oder bereits zu Therapiebeginn im Tumor erhöht ist. Im Vergleich der relativen Expression von *IGF2R* mRNA in Biopsie und Explantat zeigte sich, dass die Expression im Verlauf der Therapie mit TACE herunterreguliert wurde ($p=0,002$). Das bedeutet, dass *IGF2R* mRNA vor Beginn der Therapie mit TACE in vielen Tumoren sogar stärker exprimiert wurde als danach. Trotz dieser offensichtlichen Herunterregulation von *IGF2R* mRNA im Verlauf der TACE gilt es in diesem Zusammenhang zu beachten, dass die *IGF2R* mRNA Level nach der TACE-Behandlung insgesamt trotzdem deutlich über dem Niveau von nicht mit TACE behandelten HCCs lagen, wie im Vergleich der Tumorexplantate gezeigt werden konnte. Eine Analyse zur fallspezifischen Regulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression zeigte, dass in 60,6% der Fälle eine Herunterregulation und in 39,4% eine Hochregulation erfolgte, wobei das Ausmaß der Hoch- bzw. Herunterregulation sehr unterschiedlich ausfiel.

Als Ursache für das Regulationsverhalten von IGF2R unter dem Einfluss von TACE bieten Forschungsarbeiten zu den beiden Komponenten, Hypoxie und Zytostatikagabe, jeweils mögliche Erklärungsansätze. Die molekularen Mechanismen, die durch die TACE-Therapie beeinflusst werden, wurden bislang zwar nur wenig untersucht, es ist jedoch bekannt, dass Hypoxie eine Herunterregulation von Tumorsuppressoren wie p53 und dem von-Hippel-Lindau-Gen verursacht [56]. Die in der Literatur mehrfach beschriebene Expression von IGF2R als Tumorsuppressor [71] könnte daher, unter der mit TACE einhergehenden starken Hypoxie, ein ähnliches Expressionsverhalten aufweisen, wie andere Tumorsuppressoren. Daraus folgend könnte die durch TACE nochmals verstärkte Hypoxie im Tumor die Expression von *IGF2R* beeinflussen. Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen von *Horsman et al.* [72], welche zeigten, dass eine durch das schnelle und undifferenzierte Wachstum des Tumors entstehende Hypoxie in der Mikroumgebung des Tumors bei Therapie mit TACE

nochmals verstärkt wird. Durch Hypoxie wird das cAMP response element-binding protein, kurz CREB, induziert [56], ein Faktor, der durch die Inhibition des *IGF2R*-Promoters die *IGF2R*-Expression hemmt [18]. Unter dem hypoxischen Einfluss der TACE könnte dieser Mechanismus zur Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression führen, wie sie im hier untersuchten Kollektiv in knapp 60% der Fälle erfolgte. Es wäre daher möglich, dass die vielfach stärkere relative *IGF2R* mRNA-Expression, welche in der Initialbiopsie im Vergleich zu nicht behandelten HCCs gemessen wurde, sich durch den Einfluss von starker Hypoxie auf die *IGF2R*-Expression erklären lassen könnte.

Allerdings konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass die Expression von IGF2R in Zellen unter metabolischem Stress, wie Hypoxie, hochreguliert wird [73]. Auch bei Prostatakarzinomen und Osteosarkomen wurde eine Hochregulation von IGF2R beschrieben, es scheint also unabhängig von der Tumorart ein Zusammenhang zwischen malignen Tumoren und einer Mehrexpression von IGF2R zu bestehen [59, 60]. Welche molekularen Mechanismen dieses Expressionsverhalten verursachen, ist nicht bekannt. Dass in knapp 40% der Fälle im hier untersuchten Kollektiv eine Hochregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression erfolgte, lässt sich mit diesen Forschungsergebnissen jedoch ebenfalls erklären. Wie genau sich entscheidet, ob es unter TACE zu einer Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression kommt, ist allerdings noch unklar und muss in weitergehenden Untersuchungen gezeigt werden.

Auch die zytostatische Wirkung der TACE könnte einen Einfluss auf die Expression und die Regulation des Expressionsverhaltens von *IGF2R* haben. So fiel bei von *Ramakrishnan et al.* [61] durchgeführten *in vitro*-Versuchen an verschiedenen Tumorzelllinien auf, dass es im Rahmen der durch die Chemotherapie induzierten Autophagie zu einer Umverteilung der IGF2-Rezeptoren an die Tumorzelloberfläche kam. Die Autophagie ist ein Überlebensmechanismus bei metabolischem Stress, wie er durch das bei der TACE verabreichte Chemotherapeutikum ausgelöst wird. Hierbei wird zelleigenes Material verstoffwechselt, um die Energieversorgung trotz der starken Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels durch das Zytostatikum zu gewährleisten. IGF2R, als dem endosomalen Stoffwechsel zugehöriger Rezeptor, ist an der Autophagie unmittelbar beteiligt. Unter der Annahme, dass auch das bei der TACE verabreichte Chemotherapeutikum die HCC-Tumorzellen in die Autophagie übergehen lässt, wäre eine verstärkte Expression von IGF2R als hieran beteiligtem Rezeptor schlüssig. Eine Hochregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression erfolgte mit 39,4% in der Minderheit der hier untersuchten Fälle. Leider existieren gegenwärtig noch keine Forschungsarbeiten, in denen die molekularen Auswirkungen von Zytostatika auf das HCC untersucht wurden. Es müsste erforscht werden, ob auch im HCC eine Umverteilung der Rezeptoren stattfindet. Außerdem wäre es interessant zu erfahren, wie

genau sich die vermehrte *IGF2R* mRNA-Expression in mit TACE behandelten HCCs äußert. Ob hierdurch tatsächlich mehr Rezeptoren synthetisiert werden, und ob diese ein ähnliches Verteilungsmuster aufweisen wie bei *Ramakrishnan et al.*, wäre ebenfalls ein interessanter Aspekt für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit.

In der Regel erfolgt nur in denjenigen Fällen eine Lebertransplantation, in denen das HCC auf die TACE-Behandlung angesprochen hat, womit eine positive Tumorselektion hinsichtlich des Therapieerfolgs der TACE stattfindet. *Otto et al.* formulierten die Hypothese, dass durch die TACE-Behandlung vor einer Lebertransplantation weniger aggressive Tumore selektiert werden [25]. Unter dem Aspekt der tumorsupprimierenden Funktion von *IGF2R* und dem hier gemessenen Expressionsverhalten, insbesondere im Vergleich zu nicht mit TACE behandelten HCCs, erscheint es möglich, dass durch die TACE solche Tumore für eine anschließende Lebertransplantation selektiert werden könnten, die eine weniger aggressive Tumorbilogie aufweisen. Sollte sich diese Überlegung bestätigen, könnte nicht die TACE, sondern bereits der Selektionsprozess für die Therapie einen Einfluss auf die verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression im HCC haben.

Im Rahmen einer, aufgrund von weniger aggressivem Wachstum, möglicherweise weniger ausgeprägten Gewebshypoxie in den für eine Therapie mit TACE selektierten HCCs ließe sich außerdem die deutlich verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression in den hier untersuchten Initialbiopsien im Vergleich zu nicht mit TACE behandelten Tumoren erklären. Ausreichende Belege für diese Annahme müssen in weitergehenden Studien untersucht werden.

Im hier untersuchten Patientenkollektiv hatte die Anzahl der jeweils durchgeführten TACE-Therapien keinen Einfluss auf die Regulation der *IGF2R* mRNA-Expression (im Median erfolgten 5 TACE-Anwendungen sowohl bei Hoch- als auch Herunterregulation von *IGF2R* mRNA-Expression; $p=0,354$). Hierzu gilt es zu beachten, dass die Zahl der Therapiesitzungen ($n=1-13$) innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs stark variiert und unterschiedliche Chemotherapeutika zum Einsatz kamen. Eine Kohortenbildung anhand der Anzahl der TACE für weitergehende Analysen in diesem Zusammenhang bot sich aufgrund der geringen Fallzahlen nicht an. Es wäre denkbar, dass künftige Studien zur Generierung größerer Fallzahlen gegebenenfalls multizentrisch ein größeres Patientenkollektiv untersuchen, um dieser Fragestellung nachzugehen. Ein möglicher Einfluss der TACE auf die Regulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression, wie er in Bezug auf das Regulationsverhalten der relativen *IGF2R* mRNA-Expression vermutet und diskutiert wurde, lässt sich daher mit den hier gewonnenen Ergebnissen weder nachweisen noch widerlegen.

Auch andere patientenspezifische Parameter, wie virale oder nicht-virale hepatische Vorerkrankung ($p=0,304$) und Alter ($p=0,658$), hatten im hier untersuchten Kollektiv keinen

Einfluss auf eine Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression. Bei einer nicht-viralen hepatischen Grunderkrankung (57% der untersuchten Patienten) fiel der Anteil von Patienten mit einer Hochregulation mit 66% leicht größer aus als bei einer viralen Grunderkrankung (53%), das mediane Alter lag bei der Patientengruppe mit hochregulierter *IGF2R* mRNA-Expression (60 Jahre) zwei Jahre über dem der Gruppe mit Herunterregulation (58 Jahre).

Interessanterweise kam es jedoch bei Frauen mit 82,6% der untersuchten Fälle deutlich häufiger zu einer Herunterregulation von *IGF2R* mRNA als bei den männlichen Patienten, bei denen nur in 54,3% der Fälle eine Herunterregulation erfolgte ($p=0,016$). Hierfür gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutige Erklärung. Es ist möglich, dass der geringe Anteil weiblicher Patienten (22,1%) am untersuchten Kollektiv zu diesem deutlichen Unterschied beigetragen hat. In Mammakarzinomen war eine durch Estradiol induzierte, vermehrte Expression von IGF2R beschrieben worden [54]. Dieser Effekt ließ sich hier in den Tumorbiopsien als nativem Tumormaterial nicht nachweisen, im Vergleich zu den Biopsien der männlichen Patienten ($p=0,155$) fiel kein Unterschied in der Expression von IGF2R-mRNA auf. Dies kann daran liegen, dass der Altersdurchschnitt der Patientinnen bei 56 Jahren lag und daher in einem Großteil der Fälle von einem postmenopausalen Östrogenhaushalt ausgegangen werden kann. Es ist bisher ungeklärt, ob und inwiefern eine Erkrankung der Leber, ein HCC-Tumorleiden, eine Behandlung mit TACE oder ähnliche Therapieverfahren die Estradiolproduktion oder den estradiolabhängigen Effekt auf die Bildung von IGF2R beeinflusst. Auch ist derzeit unklar, ob es andere Faktoren gibt, die unabhängig vom perimenopausalen Stoffwechsel geschlechtsabhängig die Expression von *IGF2R* mRNA beeinflussen. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem keine Unterschiede in der *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsien ($p=0,155$) und Explantaten ($p=0,057$) von weiblichen und männlichen Patienten. Daher werden erst zukünftige Untersuchungen zum perimenopausalen IGF2R-Stoffwechsel bei Patientinnen dabei helfen können, die hier gewonnenen Ergebnisse eindeutig zu bewerten.

Um Ursachen für die Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression unter Therapie mit TACE zu finden, müssen weitere Forschungsarbeiten an den hier durchgeführten Analysen anknüpfen und diesbezügliche Limitationen, möglicherweise durch größere Patientenkollektive, umgehen. Bei ausreichend großen Patientenzahlen könnten beispielsweise Kohortenanalysen durchgeführt werden, bei denen die Fälle anhand der Anzahl von TACE, Grunderkrankung und weiteren tumor- und patientenspezifischen Parametern gruppiert auf einen Zusammenhang mit dem Ausmaß der Regulation von *IGF2R* mRNA geprüft werden. Auch die kombinierte Wirkung von Hypoxie und Chemotherapeutikum auf das

Tumorgewebe und die Genexpression im Rahmen der TACE zu erforschen, könnte zur Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse beitragen.

5.2 IGF2R als möglicher Tumormarker

Da sich die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Verlauf der TACE veränderte und im vorliegenden Kollektiv außerdem ein Therapieerfolg mit einer reduzierten oder zumindest konstant gehaltenen Tumorlast gegeben war, stellte sich die Frage nach einer möglichen Funktion von *IGF2R* als Tumormarker beim HCC unter Therapie mit TACE.

Bisher sind in der Behandlung des HCCs nur wenige Biomarker bekannt, hiervon hat das alpha-Fetoprotein (AFP) die höchste Relevanz. Es kann ab einem Schwellenwert von 20 ng/ml mit der Tumorlast korrelieren und als Tumormarker eingesetzt werden. Um die Verwendbarkeit von *IGF2R* als Tumormarker zu prüfen, stellte sich zunächst die Frage, ob in den Fällen, in denen AFP als Tumormarker angewendet werden konnte (n=48), auch eine Regulation von AFP im Verlauf der Behandlung stattfindet. *Peng et al.* [21] beschrieben, dass HCC-Tumore mit hohem AFP-Serumspiegel (>20 ng/ml) häufiger ein hohes Grading, große Tumordurchmesser sowie gefäßinvasives Wachstum aufweisen, was auf eine aggressive Tumorbiologie schließen lässt. Dass der Anteil AFP-positiver Tumore im untersuchten Kollektiv mit 46% weniger als die Hälfte des Kollektivs abbildet, spricht abermals für eine mögliche positive Selektion weniger aggressiver Tumore durch die TACE [25]. Die dieser Untersuchung zugrunde liegende Hypothese war, dass ein vergleichbares Expressionsverhalten beider Proteine für die mögliche Funktion von *IGF2R* als Tumormarker sprechen könnte. AFP-positive Tumore wiesen eine Herunterregulation des AFP i.S. um 42% im Rahmen der TACE auf, wobei es in 83% der Fälle zu einer Herunterregulation und in 17% der Fälle zu einer Hochregulation des AFP i.S. im Therapieverlauf mit TACE kam ($p < 0,01$). Die AFP-Serumkonzentration hatte in den analysierten Fällen zu Therapiebeginn den Grenzwert von 20 ng/ml überschritten, weshalb von einer Korrelation der gemessenen AFP-Konzentration mit dem Krankheitsverlauf ausgegangen werden kann [14]. Da die TACE bei fast allen Patienten zu einem Rückgang des Tumorwachstums und einer ausgeprägten Nekrose des Tumorgewebes führt, ist der Rückgang der AFP-Serumkonzentration im Rahmen der TACE ein plausibles Ergebnis.

Da bei AFP als Tumormarker im HCC ebenfalls eine Herunterregulation im Rahmen der TACE erfolgte, stellte sich die Frage, ob die *IGF2R* mRNA-Expression in den betroffenen Tumoren ähnlich reguliert wurde. Ein ähnliches Regulationsverhalten könnte die Hypothese von *IGF2R* als Tumormarker stützen und darüber hinaus dabei helfen, die möglichen Mechanismen hinter

dem Regulationsverhalten zu erforschen. Die relative *IGF2R* mRNA-Expression wurde bei Patienten mit hochreguliertem AFP i.S. (n=8 Patienten) im Rahmen der Therapie mit TACE in je 50% der Fälle hoch- und herunterreguliert, während bei einer Herunterregulation von AFP (n=40 Patienten) in 65% der Fälle auch eine Herunterregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression erfolgte (p=0,451). Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz. Da sich kein Zusammenhang zwischen der Regulation von *IGF2R* mRNA und AFP zeigte, scheint es unwahrscheinlich, dass *IGF2R* eine Aussage zur Tumorlast bei Tumorerkrankungen mit korrelierendem AFP i.S. zulässt. Unter dem Aspekt, dass AFP insbesondere bei HCCs mit einer aggressiven Tumorbilologie den Grenzwert im Serum erreicht, ist eine Rolle von *IGF2R* als Tumormarker in HCCs mit niedrigerem Grading und weniger invasivem Wachstumsverhalten dennoch denkbar. Dass die Expression beider Gene unter Therapie mit TACE ähnlich reguliert wurde, sollte auch in zukünftigen Arbeiten in diesem Themengebiet weiterhin Anlass sein, eine Funktion von *IGF2R* als Tumormarker zu prüfen. Auch hier empfiehlt sich ein größeres Patientenkollektiv, um ein statistisch zuverlässigeres Ergebnis zu erzielen.

Im hier untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich im Weiteren keine signifikante Korrelation von einer Hoch- oder Herunterregulation von *IGF2R* mRNA mit bestimmten tumorspezifischen Eigenschaften. Bei einem Tumordurchmesser unter 3 cm kam es in 63% der Fälle zu einer Herunterregulation, bei mehr als 3 cm in 56% der Fälle (p=0,786). Auch die Anzahl der Knoten (p=0,91), das Grading (n=19 Grading bei Biopsie, p=0,307; n=95 Grading bei Transplantation, p=0,224) oder ein bestimmtes Child-Stadium (p=0,742) zeigten keinen Zusammenhang mit einer Hoch- oder Herunterregulation von *IGF2R*. Dass die Regulation der *IGF2R* mRNA-Expression direkt von Tumorwachstum, -ausdehnung, Malignität oder Beeinträchtigung der verbliebenen Leberfunktion abhängt, wie dies bei einem Tumormarker zu erwarten wäre, konnte im hier untersuchten Kollektiv demnach nicht bestätigt werden.

Mit Hinblick auf eine mögliche Funktion als Tumormarker wurde auch die relative *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie oder Explantat als Einzelwert auf einen Zusammenhang mit Patienten- sowie Tumorcharakteristika untersucht. Hierzu wurde die Expression anhand des Medians als Schwellenwert als vergleichsweise stärker oder schwächer eingestuft und nachfolgend analysiert.

Zwischen der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie und patienten- sowie tumorspezifischen Daten zeigte sich hierbei kein Hinweis auf eine Funktion als Tumormarker. Weder Geschlecht (p=0,155), noch Alter (p=0,757), Grunderkrankung (p=0,249), Child-Stadium (p=0,666), Anzahl der erfolgten TACE (p=0,888), Anzahl (p=0,470) und Größe (p=0,238) der Knoten, Grading bei Biopsie (p=0,243) und Explantat (p=0,155) sowie TNM-

Einteilung ($p=0,436$) zeigten im untersuchten Kollektiv einen Bezug zu einer vergleichsweise stärkeren oder schwächeren *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie. Somit ist anhand der in der Initialbiopsie gemessenen *IGF2R* mRNA Expression nach den hier gewonnenen Erkenntnissen kein Rückschluss auf Tumorlast, Invasivität oder Aggressivität des Tumors oder ähnliche, für den Therapieverlauf und Therapieentscheidungen wichtige Parameter zu ziehen. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Einteilung einer verstärkten oder schwächeren relativen *IGF2R* mRNA-Expression anhand des Medians als Schwellenwert nur eine Möglichkeit darstellt, um sie auf Zusammenhänge mit patienten- und tumorspezifischen Daten zu prüfen.

Einige Tumormarker, wie AFP oder SCCA, haben erst ab Erreichen eines Schwellenwerts eine Aussagekraft zu Erkrankungsverlauf und Prognose [22], ein solcher Wert ist für IGF2R nicht bekannt und bislang auch noch nicht erforscht. Bisherige Arbeiten bewerteten die Stärke der IGF2R-Expression im Vergleich zu tumorumgebendem Gewebe bei Untersuchungen an humanen Tumorproben [9, 57] oder anhand immunhistochemischer Kriterien, in erster Linie bei in-vitro durchgeführten Studien [18, 55, 74]. Das erschwert eine Einordnung der hier gewonnenen Erkenntnisse zur relativen Expression im Tumorgewebe. Künftige Studien, die sich mit der Identifizierung eines möglichen Schwellenwerts für IGF2R befassen, könnten die Messung der relativen *IGF2R* mRNA-Expression weiter etablieren und über den Hinzugewinn weiterer Messwerte in weiteren Patientenkollektiven eine bessere Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen. Damit einhergehend könnten sie auch weiteren Aufschluss über die Eignung von IGF2R als Biomarker geben.

Die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat, nach TACE, fiel im untersuchten Kollektiv um 38% geringer aus als in der Initialbiopsie. In Bezug auf die anhand des Medians als vergleichsweise verstärkt oder schwächer bezeichnete Expression zeigte sich kein Zusammenhang zwischen patienten- sowie tumorabhängigen Parametern, wie sie bei einem Biomarker möglicherweise auftreten könnte. Geschlecht ($p=0,057$), Alter ($p=0,519$), Anzahl ($p=0,168$) und Durchmesser ($p=0,844$) der Knoten, TNM-Einteilung ($p=0,138$) sowie hepatische Grunderkrankung ($p=0,296$) korrelierten demnach nicht mit einer vergleichsweise verstärkten oder geringeren relativen *IGF2R* mRNA-Expression nach abgeschlossener TACE.

Es zeigte sich jedoch, dass Tumore mit einem G2- Grading nach TACE vergleichsweise weniger *IGF2R* mRNA exprimieren. Die Expression lag im Tumorexplantat bei 62% der G2-Tumore unterhalb des Medians ($p=0,025$). Das bedeutet, dass HCCs, die ein weniger entdifferenziertes Tumorstadium aufweisen, nach TACE weniger *IGF2R* mRNA exprimierten als HCCs mit einem höheren oder niedrigeren Grading. Die Expression im Explantat könnte daher möglicherweise Rückschlüsse auf das Grading und damit den Erkrankungsverlauf zulassen, was eine Funktion von IGF2R als Tumormarker ermöglichen

könnte. In Initialbiopsien von Bronchialkarzinomen war eine verstärkte *IGF2R* Expression mit einem niedrigen Grading assoziiert [55], was in Anbetracht der tumorsupprimierenden Wirkung von IGF2R auch im vorliegenden Kollektiv zu erwarten gewesen wäre. Im von *Lautem et al.* untersuchten Patientenkollektiv wurde die *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat in Bezug zur Expression des tumorumgebenden Gewebes beschrieben. In HCCs mit einem G1- oder G2-Grading waren dort etwas häufiger eine verstärkte Expression (64% bzw. 65%) im Vergleich zum Normalgewebe aufgefallen als bei G3 oder Gx (53% bzw. 20%, $p=0,233$). Diese Ergebnisse zeigten zwar keine statistische Signifikanz, aber dennoch eine ähnliche Tendenz in einem anderen Patientenkollektiv mit gleicher Tumorerkrankung. Es bleibt zu beachten, dass im Kollektiv von *Lautem et al.* nur 28% der Patienten zuvor eine Therapie mit TACE erhalten hatten, während im hier untersuchten Kollektiv alle Patienten erfolgreich mit einer TACE therapiert wurden. Denkbar wäre, dass die Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression besonders bei Tumoren mit niedrigem Grading durch die TACE beeinflusst wird. Leider war das Grading der hier untersuchten Tumore nicht einheitlich im Tumorexplantat oder der Initialbiopsie bestimmt worden, sodass dieser Hypothese nicht durch vergleichende Untersuchungen mit dem Grading und der *IGF2R* mRNA-Expression in den Biopsien weiter nachgegangen werden kann. Eine abschließende Interpretation des möglichen Zusammenhangs zwischen Grading und relativer *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat sollte demnach auch erst mit in kommenden Studien neu hinzugewonnenen Daten, durch größere Fallzahlen, erfolgen.

Eine gute Leberfunktion im Sinne eines Child A-Stadiums war in 62% der Fälle mit einer vergleichsweise höheren *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat verknüpft ($p=0,051$), was in Bezug auf eine mögliche Eignung von IGF2R als Tumormarker hinweisen könnte. 68% der Patienten mit einem Child B- und 56% der Fälle mit Child C-Stadium hatten eine im Vergleich zum tumorumgebenden Gewebe schwächere *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat. Dieses Ergebnis erreichte keine Signifikanz ($p=0,614$). Die Child-Pugh Klassifikation bewertet die Synthesefunktion der Leber sowie die gegebenenfalls vorhandene Aszitesmenge und Ausprägung der ebenfalls möglichen Enzephalopathie. Eine Child A-Einteilung geht mit einem besseren Gesamtüberleben unter Behandlung mit TACE einher [75], was bedeutet, dass genug gesundes Lebergewebe den Funktionsverlust der im Rahmen der Zirrhose bereits fibrosierten Areale ausgleicht. Zur Fibrosierung von Lebergewebe, die einer Zirrhose vorausgeht [13], kommt es durch eine chronische Entzündung des Lebergewebes. Hierbei werden unter anderem auch im gesunden Lebergewebe vorkommende Ito-Zellen, Zytokine und andere Botenstoffe, wie der Transkriptionsfaktor Nrf-2 [76], PDGF [13] oder Matrix Metalloproteinasen (MMPs) [13], aktiviert, um abgestorbenes Lebergewebe mit Narbengewebe zu ersetzen. MMP-2 und MMP-9 können in ihrer Funktion als Enzyme zur

Inflammation beitragen [63]. MMP-9 wird unter anderem durch *IGF2R* induziert [64] und aktiviert gemeinsam mit MMP-2 TGF- β 1 [19], ein Zytokin, das in prämaligmem Lebergewebe über die Aktivierung von Apoptosesignalen und Inhibition von Zellproliferation eine Funktion als protektiver Faktor in Bezug auf die Entstehung einer Zirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms hat [19]. Es besteht die Möglichkeit, dass eine verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression im HCC einen protektiven Effekt auf das tumorumgebende Gewebe ausübt, indem sie über diese und gegebenenfalls noch unbekanntes Signalkaskaden im tumorumgebenden Gewebe einer Zirrhose entgegenwirkt.

In mehreren Studien zum HCC und der Tumorumgebung zeigte sich, dass Tumor und umliegende Gewebszellen auf multifaktorielle Weise miteinander kommunizieren und besonders die Mikroumgebung das HCC in seiner Tumorbilogie beeinflusst [19]. Hierzu zählen beispielsweise Itozellen, die als Bindegewebszellen in der gesunden Leber vorkommen, aber auch bei der Entstehung der Leberzirrhose über die Synthese extrazellulärer Matrix mitwirken und im HCC die Zellproliferation der Tumorzellen anregen [19]. Auch TGF- β 1, MMPs, inflammatorische Zytokine und Proteine der extrazellulären Matrix, die auch an der Entstehung einer Zirrhose beteiligt sind, gehören in der tumorumgebenden Mikroumgebung einem komplexen System vielfältig verschalteter Signalkaskaden an, welches das Wachstum des HCC, je nach betroffenem Signalweg, inhibieren oder fördern kann. Ein weiterer hierbei involvierter Faktor ist das cAMP response element-binding protein (CREB) [77]. Es wird unter anderem durch Hypoxie induziert. Es aktiviert Ito-Zellen, ist an der Inflammationsreaktion beteiligt und regt die Bildung von extrazellulärer Matrix an [77]. Darüber hinaus inhibiert es über die Bindung des *IGF2R* Promoters die *IGF2R*-Expression [18]. Für die vergleichsweise stärkere *IGF2R* mRNA-Expression in HCCs mit einer noch gut kompensierten Leberzirrhose könnte die (noch) geringe Induktion von CREB, beispielsweise durch eine gute Gefäß- und damit Sauerstoffversorgung, eine mögliche Erklärung bieten. Es gibt nach derzeitigem Kenntnisstand keine weiteren Interaktionswege in der Mikroumgebung des HCCs, die eine verstärkte oder abgeschwächte *IGF2R*-Expression zur Folge hat. Die hier genannten Erkenntnisse zur Entstehung von Leberfibrose und der Mikroumgebung des HCCs lassen jedoch die Überlegung zu, dass HCCs, die von fibrotisch verändertem Lebergewebe umgeben sind, zu einer verstärkten *IGF2R* mRNA-Expression angeregt werden könnten.

Um diesen beiden Hypothesen nachgehen zu können, wäre es interessant zu sehen, ob sich die verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat auch im tumorumgebenden Gewebe nachweisen lässt. Immunhistochemische Untersuchungen beider Gewebe könnten darüber hinaus Aufschluss über die Menge und das Verteilungsmuster der synthetisierten IGF2-Rezeptoren geben. Ebenso könnten die an der Entstehung und dem Voranschreiten

einer Leberzirrhose beteiligte Faktoren quantitativ auf einen Zusammenhang mit der relativen *IGF2R* mRNA-Expression geprüft werden.

Um eine Eignung von IGF2R als Tumormarker zuverlässig bewerten zu können, sollte in weiterführenden Arbeiten eine Überprüfung der *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie oder Explantat auf einen Zusammenhang mit der zeitgleich beschriebenen Tumorlast erfolgen. Leider lagen im hier untersuchten Kollektiv nur Angaben zur Tumorlast und -ausbreitung zum Zeitpunkt der Transplantation, nach abgeschlossener Therapie vor. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die bildgebenden Verfahren die Tumorausdehnung zwar sehr genau abbilden, aber dem intraoperativen Befund in der Genauigkeit unterlegen sind. Daher wird der genaue Lokalbefund intraoperativ erhoben und dokumentiert, während die bildgebenden Verfahren im Verlauf der Therapie zur Einschätzung des Therapieerfolgs eingesetzt werden. Diese Analyse ist mit den hier vorhandenen Daten leider nicht umsetzbar. Sie sollte dennoch in künftigen Studien durchgeführt werden, beispielsweise mithilfe eines im Voraus erstellten und in der Verlaufsdagnostik angewandten Klassifikationssystems, welche die bildgebenden Befunde analog einer Zuordnung des intraoperativen Befunds im TNM-System einteilt.

Die Anwendbarkeit von IGF2R als Tumormarker erscheint anhand der bisherigen Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Die mögliche Korrelation zwischen relativer *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat und dem Tumorgrading sowie dem Child-Stadium schließt eine Funktion von IGF2R als Tumormarker jedoch nicht aus und bietet durchaus einen Ansatz für weiterführende Studien. Hierbei könnten vergleichende Analysen zwischen erfolgreich therapierten HCCs und solchen mit ausbleibendem Therapieerfolg der TACE durchgeführt werden. Auch ein einheitlicher Zeitpunkt, zu dem das Grading erfolgt, wäre für weitergehende Forschungsarbeiten empfehlenswert.

Diese Arbeit sollte nicht nur eine mögliche Funktion von IGF2R als Biomarker, sondern auch die Funktion als Tumorsuppressor im HCC unter TACE untersuchen. Studien zeigten bereits, dass eine im Vergleich zu Normalgewebe verstärkte *IGF2R*-Expression im Tumorgewebe mit einem besseren Gesamtüberleben [55] und rezidivfreien Überleben [9] assoziiert ist.

In Initialbiopsien von HCCs, die mittels TACE einer kompletten Remission zugeführt wurden, beschrieben *Gaba et al.* eine Mehrexpression der mRNA von rund 60 verschiedenen Genen (wie ATF4, BAX, CCNE1, KIF11, NFX1, PPP3CA, SNX1, TOP2A, and TOP2B), die in ihrer Funktion direkt an Mitose und Apoptose beteiligt sind. Aufgrund der funktionalen Einbindung dieser Gene in den Zellzyklus lässt sich von der Stärke ihrer Expression im Tumor auf dessen Chemosensitivität und hieraus auf die Prognose der Behandlung mit TACE schließen [65]. *Tian et al.* wiesen in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eine *IGF2R*-assoziierte erhöhte Chemosensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin nach [55]. Im hier untersuchten

Kollektiv wurde eine im Vergleich zum Tumorexplantat und nicht mit TACE behandelten HCCs deutlich verstärkte relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie gemessen. Die in der Literatur vorbeschriebenen Zusammenhänge zwischen einer Mehrexpression von IGF2R und dem Therapieansprechen sowie rezidivfreiem Überleben lassen auf einen prognostischen Nutzen von IGF2R schließen.

5.3 IGF2R als Tumorsuppressor und seine prognostische Relevanz

Um diese mögliche prognostische Relevanz und die vielfach vorbeschriebene tumorsupprimierende Funktion [46, 78] von IGF2R im hier untersuchten Kollektiv abzubilden, wurde die *IGF2R* mRNA-Expression in Biopsie und Explantat sowie das Regulationsverhalten in Bezug auf das (rezidivfreie) Patientenüberleben analysiert.

Eine Hochregulation der relativen *IGF2R* mRNA-Expression im Verlauf der TACE führte im untersuchten Patientenkollektiv zu einem 5-Jahres-Überlebensvorteil von 10% hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven ($p=0,260$). In Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit hoch- und herunterregulierter Expression ($p=0,826$). Beide Ergebnisse zeigten keine statistische Signifikanz und lassen daher nicht unmittelbar auf eine tumorsupprimierende oder prognostische Funktion von IGF2R schließen. Da in dieser Arbeit erstmalig das Regulationsverhalten von *IGF2R* anhand von Messungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im gleichen Tumorgewebe beschrieben wurde, lassen sich die hier gewonnenen Erkenntnisse nicht anhand vergleichbarer Daten aus der aktuellen Literatur bewerten. *Lautem et al.* hatten die Überlegung angestellt, dass im Rahmen einer TACE-Behandlung ein bestimmter Faktor, möglicherweise *IGF2R*, induziert werden könnte, der zum Erlangen und Erhalt einer stabilen Erkrankungssituation beiträgt. Da Patienten mit einer Hochregulation der *IGF2R* mRNA-Expression unter TACE im hier untersuchten Kollektiv einen Überlebensvorteil in Bezug auf das Auftreten von Rezidiven zeigten, sollte dieser Hypothese auch in künftigen Forschungsarbeiten nachgegangen werden. Hierfür wäre nicht nur ein größeres Patientenkollektiv, sondern auch eine zusätzliche Untersuchung der Tumorproben auf Anzahl und Verteilung der IGF2-Rezeptoren in den Zellen ein möglicher Ansatz. Hierdurch ließe sich gleichzeitig erforschen, inwiefern sich die hochregulierte *IGF2R* mRNA-Expression im Tumor umsetzt und am Erhalt einer stabilen Erkrankungssituation beteiligt sein könnte.

Dass eine Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression keine Auswirkung auf das rezidivfreie Gesamtüberleben zeigte, spricht nicht für die tumorsupprimierende Funktion von IGF2R. Dennoch gilt es zu beachten, dass in dieser Arbeit nur erfolgreich transplantierte, mit TACE therapierte Patienten untersucht wurden. Es wäre empfehlenswert, in Folgestudien

auch Tumorproben von Patienten ohne Therapieerfolg in Analysen mit einzubeziehen, um den Effekt einer Hoch- oder Herunterregulation der *IGF2R* mRNA-Expression auf das Gesamtüberleben besser beurteilen zu können.

Eine vergleichsweise hohe relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie resultierte in einem längeren medianen Nachbeobachtungszeitraum von 2476 Tagen. Die Einteilung in eine stärkere oder schwächere relative *IGF2R* mRNA-Expression erfolgte anhand des Medians. Patienten mit initial verstärkter *IGF2R* mRNA-Expression wurden 970 Tage länger nachbeobachtet als solche mit schwächerer Expression zu Therapiebeginn ($p=0,020$). Auch bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einer im Vergleich zu Normalgewebe verstärkten *IGF2R*-Expression war eine bessere Überlebensprognose gegenüber Patienten mit einer schwächeren Expression aufgefallen [55]. Hierbei muss beachtet werden, dass die mediane Nachbeobachtung nicht exakt mit dem Gesamtüberleben gleichzustellen ist, da auch nicht mit der Tumorerkrankung assoziierte Ursachen einen Ausschluss aus der Nachbeobachtungsgruppe zur Folge haben können. Dazu gehören sowohl Tod durch andere Erkrankungen als auch fehlende Kontaktierbarkeit des Patienten bei Wegzug und ähnliche Umstände. Dennoch weist dieses Ergebnis auf einen tumorsupprimierenden Effekt und einen prognostischen Nutzen von IGF2R hin.

Eine vergleichsweise höhere oder niedrigere relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie ($p=0,824$), als direkt zu Therapiebeginn messbarem Wert, sowie das Regulationsverhalten ($p=0,683$) hatten dennoch keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben. Gleichzeitig zeigten Patienten mit einer *IGF2R* mRNA-Expression unterhalb des Medians in der Initialbiopsie einen Vorteil von 20% im 5-Jahres-Überleben in Bezug auf das Auftreten von Rezidiven ($p=0,042$). Dieses Ergebnis entspricht nicht der vielfach beschriebenen Funktion von IGF2R als Tumorsuppressor und gibt Anlass, diese Annahme in Bezug auf mit TACE therapierte HCC-Tumoren zu hinterfragen. Leider finden sich in der Literatur keine direkt vergleichbaren Daten, da in dieser Arbeit erstmalig die relative *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie, vor Therapiebeginn, bestimmt wurde. *Lautem et al.* stellten ein verlängertes rezidivfreies Überleben bei Patienten fest, deren Tumorexplantate eine im Vergleich zum tumorumgebenden Gewebe verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression hatten [9]. Allerdings wurden im von *Lautem et al.* untersuchten Kollektiv auch Tumorproben analysiert, bei denen keine Behandlung mit TACE erfolgt war. Es ist aufgrund der unterschiedlichen Behandlungsstrategien beider Patientenkollektive möglich, dass die (erfolgreiche) Behandlung mit TACE einen Einfluss auf die tumorsupprimierende Wirkung von IGF2R hat.

Eine Funktion von IGF2R als prognostischem Parameter wurde in der Literatur bereits in Betracht gezogen [9, 55]. Sie ist in Bezug auf den Zusammenhang zwischen einer

schwächeren Expression in der Initialbiopsie und einem besseren rezidivfreien Überleben auch im hier untersuchten Kollektiv denkbar. Die mögliche prognostische Bedeutung der *IGF2R* mRNA-Expression in Bezug auf das rezidivfreie Überleben scheint allerdings nicht in Zusammenhang mit einer tumorsupprimierenden Wirkung von IGF2R zu stehen. Um davon auszugehen, wäre ein besseres rezidivfreies Überleben bei Patienten mit einer Expression oberhalb des Medians zu erwarten gewesen. Auch hier wäre ein Vergleich mit erfolglos therapierten HCC-Proben ein möglicher Schritt, um etwaige Effekte der Selektion für eine TACE und der Therapie an sich auf die tumorsupprimierende und prognostische Funktion von IGF2R näher zu untersuchen. Auch die Tatsache, dass sich in Bezug auf das Gesamtüberleben kein deutlicher Unterschied zwischen hoch- und herunterregulierter *IGF2R* mRNA-Expression und einer am Median orientierten verstärkten oder schwächeren Expression in der Initialbiopsie ausmachen ließ, lässt keine Rückschlüsse auf eine prognostische Relevanz oder tumorsupprimierende Funktion von IGF2R zu.

Da sich die relative *IGF2R* mRNA-Expression im Zeitraum zwischen Initialbiopsie und Auftreten des Rezidivs oder Versterben des Patienten weiter verändern kann, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht eindeutig gegen die tumorsupprimierende Funktion von IGF2R. Ob eine Messung der relativen *IGF2R* mRNA-Expression in der Initialbiopsie einen prognostischen Nutzen hat, ist aufgrund der eher widersprüchlichen Auswirkungen auf die Nachbeobachtung und das rezidivfreie Überleben nicht sicher bewertbar.

Es sind viele Ursachen möglich, die die deutliche Mehrexpression von *IGF2R* mRNA in Tumoren speziell nach Therapie mit TACE im Vergleich zu HCCs ohne TACE bedingen. Da sich die Expression in jedem hier untersuchten Tumor im zeitlichen Verlauf bis zur Transplantation veränderte, wurde zusätzlich zur Initialbiopsie auch die im Explantat gemessene relative *IGF2R* mRNA-Expression auf einen prognostischen Nutzen hinsichtlich des weiteren Erkrankungsverlaufs beim transplantierten Patienten untersucht.

In den Tumorexplantaten zeigte sich kein Überlebensvorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($p=0,189$) oder rezidivfreien Überlebens ($p=0,870$) bei vermehrt oder vermindert exprimierter *IGF2R* mRNA. Auch hier lässt sich durch den zeitlichen Abstand von der Transplantation zum Auftreten eines Rezidivs nur bedingt ein Rückschluss auf die Eignung von *IGF2R* als Tumorsuppressor ziehen. Im von *Lautem et al.* untersuchten Kollektiv fiel ein verlängertes rezidivfreies Überleben bei Patienten mit vergleichsweise höherer *IGF2R* mRNA-Expression im Tumorexplantat auf, in Bezug auf das Gesamtüberleben war kein deutlicher Unterschied in höher oder niedriger exprimierenden Tumoren nachweisbar [9]. Die verstärkte Expression war im Kollektiv von *Lautem et al.* im Vergleich zu tumorumgebendem Gewebe gemessen worden, während in den hier durchgeführten Analysen nur die Expression im

Tumorgewebe vergleichend untersucht wurde. Zudem waren nur 28% der untersuchten Tumore mittels TACE behandelt worden. Das lässt die Vermutung zu, dass die Expression von *IGF2R* mRNA bei den mit TACE behandelten Tumoren bereits so viel stärker als bei nicht mit TACE behandelten HCCs ausfällt, dass innerhalb des TACE-Kollektivs eine vergleichsweise vermehrte oder geringere Expression keine weitere Auswirkung auf das rezidivfreie Überleben hat. Dieser Überlegung muss in weiterführenden Arbeiten über den direkten Vergleich von mit und ohne TACE therapierten HCC-Tumorexplantaten nachgegangen werden. Sie stützt die Überlegung von *Otto et al.*, dass es zu einer positiven Selektion von HCC-Tumoren durch die Therapie mit TACE kommen könnte [25].

Um die genauen Mechanismen zwischen *IGF2R* mRNA-Expression und den hier beschriebenen Effekten auf den Krankheitsverlauf und die Prognose des HCC unter TACE zu eruieren, könnten sich kommende Studien mit der genaueren Erforschung des *IGF2R*-Gens im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) befassen. Die bislang noch wenig bekannten molekularen Interaktionsmechanismen zwischen IGF2R und weiteren Proteinen, Zellen und Zytokinen des HCC- und Zirrhose-Stoffwechsels könnten außerdem mittels Proteom-Analysen genauer analysiert werden. Hierdurch könnten die Effekte einer vermehrten IGF2R-Expression auf damit verknüpfte Signalkaskaden und somit auf den Verlauf und die Prognose einer HCC-Erkrankung benannt werden.

Da die *IGF2R* mRNA-Expression im Explantat keine Auswirkung hinsichtlich des Patientenüberlebens hat, kann die tumorsupprimierende Funktion von IGF2R weder bestätigt noch widerlegt werden. Daher bleibt auch hier nur, die weitere Forschung am HCC unter Behandlung mit TACE abzuwarten und die hier gewonnenen Erkenntnisse anschließend gegebenenfalls neu zu bewerten. Eine fortwährende Kontrolle der Expression von *IGF2R* mRNA im Verlauf einer Therapie mit TACE zur Abschätzung der Überlebensprognose des Patienten empfiehlt sich nach den hier gewonnenen Ergebnissen nicht, ebenso lassen sie keinen Rückschluss auf die Rolle von *IGF2R* als Tumorsuppressor zu.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Überlebenszeitanalysen, auch in Hinblick auf das Auftreten von Rezidiven, lassen nicht vermuten, dass IGF2R eine Rolle als prognostischer Marker in der Behandlung des HCC mit TACE einnimmt. Auch die tumorsupprimierende Funktion konnte, zumindest über die Dauer der Behandlung mit TACE, nicht bewiesen werden. Es gilt zu beachten, dass im untersuchten Kollektiv nur Patienten untersucht wurden, bei denen die Therapie mit TACE erfolgreich verlief und eine anschließende Lebertransplantation ermöglichte. Dass einige Ergebnisse, wie das anderen Tumorsuppressoren ähnelnde Expressionsverhalten von *IGF2R* im hypoxischen Milieu unter TACE, deutlich für die tumorsupprimierende Funktion von IGF2R sprechen, sowie das Ausbleiben von deutlich

gegenteiligen Ergebnissen lassen weiterhin von IGF2R als Tumorsuppressor im HCC ausgehen.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Messung der Expression von *IGF2R* mRNA in Biopsie oder Explantat oder ihrer Regulation bei HCCs ohne erfolgreiche Therapie mit TACE ebenfalls keine prognostische Relevanz hat. Da es sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen und vergleichenden Analysen größtenteils um Untersuchungen handelte, die in dieser Form, vor und nach einer Therapie mit TACE, noch nie zuvor durchgeführt worden sind, existieren bislang noch keine vergleichbaren Forschungsarbeiten zu diesem Thema, anhand derer man die Ergebnisse in einem größeren Kontext interpretieren könnte. Weitere Forschungsarbeiten müssen zeigen, ob sich die hier formulierten Erklärungsansätze bestätigen lassen oder gegebenenfalls ganz andere Zusammenhänge den hier gewonnenen Erkenntnissen zugrunde liegen. Für den klinischen Alltag scheint IGF2R als prädiktiver oder prognostischer Marker für das HCC jedenfalls nicht geeignet zu sein.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die prädiktive und prognostische Relevanz des Tumorsuppressors IGF2R bei mit TACE behandelten HCCs zu untersuchen. Grundlage für diese Fragestellungen war die vorangegangene Studie von *Lautem et al.* an lebertransplantierten oder -resezierten HCC-Patienten, in deren Tumoren eine deutlich verstärkte *IGF2R* mRNA-Expression in mit TACE vorbehandelten Tumoren im Vergleich zum tumorumgebenden Gewebe und anderweitig therapierten HCC-Explantaten aufgefallen war.

Hierfür wurde in Tumorproben von 104 Patienten der Universitätsmedizin Mainz mittels mRNA-Extraktion und Realtime-PCR die relative Expression von *IGF2R* mRNA in der Initialbiopsie, vor Beginn der Therapie mit TACE, sowie im Tumorexplantat, nach Therapieende, bestimmt. Die ermittelten Werte wurden außerdem auf eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf, patientenspezifischen Daten sowie der Krankheitsprognose geprüft.

Im hier untersuchten Patientenkollektiv exprimierten die Tumore nach abgeschlossener Therapie mit TACE mehr *IGF2R*-mRNA als anderweitig behandelte HCCs. Die relative *IGF2R* mRNA-Expression wurde im Verlauf der Therapie mit TACE mehrheitlich (60,6%) herunterreguliert und wies daher vor Therapiebeginn noch höhere Expressionslevel auf. Die Funktion von IGF2R als Tumorsuppressor, wie sie in der Literatur beschrieben wird [71, 78, 79], konnte im hier untersuchten Patientenkollektiv nicht bestätigt werden. Ebenso gab es keine eindeutigen Anhaltspunkte für eine prognostische Relevanz der Messung von IGF2R mRNA mit Hinblick auf das Überleben und auf die Rezidivwahrscheinlichkeit. Eine Eignung als Tumormarker konnte im hier untersuchten Kollektiv ebenso wenig festgestellt werden.

Es sind zahlreiche mögliche Gründe für die verstärkte Expression sowie das Regulationsverhalten von *IGF2R* mRNA unter TACE denkbar. Hierzu zählen eine Selektion von HCCs mit weniger aggressiver Tumorbiologie durch eine Therapie mit TACE [25], die in der Literatur bereits beschriebenen Wirkungen der beiden Komponenten Hypoxie und Chemotherapeutikum auf den Metabolismus des Tumors [56, 61], die Funktion als Tumorsuppressor [9, 78, 79] und die Interaktion des Tumors mit dem Mikroenvironment [19]. Ob diese Faktoren das Expressionsverhalten von IGF2R im HCC unter TACE begründen, ließ sich anhand der durchgeführten Analysen nicht klar beantworten. Daher war auch nicht eruierbar, ob eine Einflussnahme dieser Faktoren nur im Einzelnen, in Wechselwirkung mit dem Tumor, miteinander oder in Abhängigkeit von der TACE stattfindet.

Da hier nur erfolgreich mit TACE therapierte HCCs untersucht wurden, ist eine Einflussnahme der Patientenselektion für diese Therapie sowie der Wirkung der TACE möglich und sollte in an diese Arbeit anschließende Studien weitergehend analysiert werden.

Hier könnten auch bislang noch weitgehend ungeklärte Themen erforscht werden, wie die Wechselwirkung zwischen HCC und Mikroenvironment und meist zirrhotischem Lebergewebe sowie deren möglichem Einfluss auf den *IGF2R*-Stoffwechsel im Tumor.

7 Literaturverzeichnis

1. Talia C, Connolly L, Fowler PA: The insulin-like growth factor system: A target for endocrine disruptors? *Environment international* 2021, 147:106311.
2. LeRoith D, Roberts CT, Jr.: The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003, 195(2):127-137.
3. Bruchim I, Attias Z, Werner H: Targeting the IGF1 axis in cancer proliferation. *Expert Opin Ther Targets* 2009, 13(10):1179-1192.
4. Scharf JG, Braulke T: The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res* 2003, 35(11-12):685-693.
5. Elmashad N, Ibrahim WS, Mayah WW, Farouk M, Ali LA, Taha A, Elmashad W: Predictive value of serum insulin-like growth factor-1 in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015, 16(2):613-619.
6. Wu J, Zhu AX: Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *Journal of hematology & oncology* 2011, 4:30.
7. Dong Z, Yao M, Wang L, Yan X, Gu X, Shi Y, Yao N, Qiu L, Wu W, Yao D: Abnormal expression of insulin-like growth factor-I receptor in hepatoma tissue and its inhibition to promote apoptosis of tumor cells. *Tumour Biol* 2013, 34(6):3397-3405.
8. De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Orton TC, Jirtle RL: M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nature genetics* 1995, 11(4):447-449.
9. Lautem A, Simon F, Hoppe-Lotichius M, Mittler J, Vollmar J, Schad A, Duber C, Galle PR, Otto G, Zimmermann T *et al*: Expression and prognostic significance of insulinlike growth factor-2 receptor in human hepatocellular carcinoma and the influence of transarterial chemoembolization. *Oncol Rep* 2019, 41(4):2299-2310.
10. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015, 136(5):E359-386.
11. Della Corte C, Aghemo A, Colombo M: Individualized hepatocellular carcinoma risk: the challenges for designing successful chemoprevention strategies. *World J Gastroenterol* 2013, 19(9):1359-1371.
12. Greten TF, Manns MP, Malek N: [Sorafenib for the treatment of HCC--the beginning of a new era in the treatment of HCC]. *Z Gastroenterol* 2009, 47(1):55-60.
13. Bataller R, Brenner DA: Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2005, 115(2):209-218.
14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/S3-HCC-OL-Langversion-V1.0.pdf]
15. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH: Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog* 2017, 16:1.
16. Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A: A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res* 2004, 64(4):1338-1346.
17. Nahon P, Zucman-Rossi J: Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2012, 57(3):663-674.
18. Chen WK, Kuo WW, Hsieh DJ, Chang HN, Pai PY, Lin KH, Pan LF, Ho TJ, Viswanadha VP, Huang CY: CREB Negatively Regulates IGF2R Gene Expression and Downstream Pathways to Inhibit Hypoxia-Induced H9c2 Cardiomyoblast Cell Death. *Int J Mol Sci* 2015, 16(11):27921-27930.

19. Yang JD, Nakamura I, Roberts LR: The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2011, 21(1):35-43.
20. Zhao YJ, Ju Q, Li GC: Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2013, 1(4):593-598.
21. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC: High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer* 2004, 112(1):44-50.
22. AISalloom AA: An update of biochemical markers of hepatocellular carcinoma. *International journal of health sciences* 2016, 10(1):121-136.
23. Majno PE, Adam R, Bismuth H, Castaing D, Ariche A, Krissat J, Perrin H, Azoulay D: Influence of preoperative transarterial lipiodol chemoembolization on resection and transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Surg* 1997, 226(6):688-703.
24. Lencioni R, Petruzzi P, Crocetti L: Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Semin Intervent Radiol* 2013, 30(1):3-11.
25. Otto G, Herber S, Heise M, Lohse AW, Monch C, Bittinger F, Hoppe-Lotichius M, Schuchmann M, Victor A, Pitton M: Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2006, 12(8):1260-1267.
26. Shin SW: The current practice of transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Korean J Radiol* 2009, 10(5):425-434.
27. Wang YX, De Baere T, Idee JM, Ballet S: Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences. *Chin J Cancer Res* 2015, 27(2):96-121.
28. Vogl TJ, Zangos S, Balzer JO, Nabil M, Rao P, Eichler K, Bechstein WO, Zeuzem S, Abdelkader A: [Transarterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma: technique, indication and results]. *Rofo* 2007, 179(11):1113-1126.
29. Qin S, Bai Y, Lim HY, Thongprasert S, Chao Y, Fan J, Yang TS, Bhudhisawasdi V, Kang WK, Zhou Y *et al*: Randomized, multicenter, open-label study of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin versus doxorubicin as palliative chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma from Asia. *J Clin Oncol* 2013, 31(28):3501-3508.
30. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS: Hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Disease primers* 2021, 7(1):6.
31. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE: The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000, 21(3):215-244.
32. Daughaday WH, Rotwein P: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989, 10(1):68-91.
33. Monzavi R, Cohen P: IGFs and IGFbps: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002, 16(3):433-447.
34. Chun YS, Huang M, Rink L, Von Mehren M: Expression levels of insulin-like growth factors and receptors in hepatocellular carcinoma: a retrospective study. *World J Surg Oncol* 2014, 12:231.
35. Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Kalabis J, Herlyn M: Insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by interleukin-8 induction. *Cell Growth Differ* 2002, 13(2):87-93.
36. Su TS, Liu WY, Han SH, Jansen M, Yang-Fen TL, P'Eng F K, Chou CK: Transcripts of the insulin-like growth factors I and II in human hepatoma. *Cancer Res* 1989, 49(7):1773-1777.
37. Mazziotti G, Sorvillo F, Morisco F, Carbone A, Rotondi M, Stornaiuolo G, Precone DF, Cioffi M, Gaeta GB, Caporaso N *et al*: Serum insulin-like growth factor I evaluation as a useful tool for predicting the risk of developing hepatocellular carcinoma in patients

- with hepatitis C virus-related cirrhosis: a prospective study. *Cancer* 2002, 95(12):2539-2545.
38. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992, 70(4):523-526.
 39. Lin SB, Hsieh SH, Hsu HL, Lai MY, Kan LS, Au LC: Antisense oligodeoxynucleotides of IGF-II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF-II. *J Biochem* 1997, 122(4):717-722.
 40. Song BC, Chung YH, Kim JA, Lee HC, Yoon HK, Sung KB, Yang SH, Yoo K, Lee YS, Suh DJ: Association between insulin-like growth factor-2 and metastases after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Cancer* 2001, 91(12):2386-2393.
 41. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D: Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(16):8318-8323.
 42. Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M: The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer* 2015, 14:43.
 43. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE: Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16(4-5):421-439.
 44. Jirtle RL, Hankins GR, Reisenbichler H, Boyer IJ: Regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptors and transforming growth factor beta during liver tumor promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis* 1994, 15(8):1473-1478.
 45. Brown J, Jones EY, Forbes BE: Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitam Horm* 2009, 80:699-719.
 46. Scott CD, Firth SM: The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal? *Horm Metab Res* 2004, 36(5):261-271.
 47. Chu CH, Tzang BS, Chen LM, Kuo CH, Cheng YC, Chen LY, Tsai FJ, Tsai CH, Kuo WW, Huang CY: IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via Galphaq interaction and protein kinase C-alpha/CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Endocrinol* 2008, 197(2):381-390.
 48. Dennis PA, Rifkin DB: Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(2):580-584.
 49. O'Gorman DB, Costello M, Weiss J, Firth SM, Scott CD: Decreased insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor expression enhances tumorigenicity in JEG-3 cells. *Cancer Res* 1999, 59(22):5692-5694.
 50. Hankins GR, De Souza AT, Bentley RC, Patel MR, Marks JR, Iglehart JD, Jirtle RL: M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 1996, 12(9):2003-2009.
 51. Leboulleux S, Gaston V, Boule N, Le Bouc Y, Gicquel C: Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Endocrinol* 2001, 144(2):163-168.
 52. Kong FM, Anscher MS, Washington MK, Killian JK, Jirtle RL: M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 2000, 19(12):1572-1578.
 53. Jamieson TA, Brizel DM, Killian JK, Oka Y, Jang HS, Fu X, Clough RW, Vollmer RT, Anscher MS, Jirtle RL: M6P/IGF2R loss of heterozygosity in head and neck cancer associated with poor patient prognosis. *BMC Cancer* 2003, 3:4.
 54. Bannoud N, Carvelli FL, Troncoso M, Sartor T, Vargas-Roig LM, Sosa M: Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor expression and distribution are influenced by estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2018, 13(8):e0201844.
 55. Tian Z, Yao G, Song H, Zhou Y, Geng J: IGF2R expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC. *Cell Physiol Biochem* 2014, 34(5):1578-1588.

56. Wu XZ, Xie GR, Chen D: Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22(8):1178-1182.
57. Sue SR, Chari RS, Kong FM, Mills JJ, Fine RL, Jirtle RL, Meyers WC: Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1995, 222(2):171-178.
58. Piao Z, Choi Y, Park C, Lee WJ, Park JH, Kim H: Deletion of the M6P/IGF2r gene in primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 1997, 120(1):39-43.
59. Vaillant O, El Cheikh K, Warther D, Brevet D, Maynadier M, Bouffard E, Salgues F, Jeanjean A, Puche P, Mazerolles C *et al*: Mannose-6-phosphate receptor: a target for theranostics of prostate cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015, 54(20):5952-5956.
60. Geller DS, Morris J, Revskaya E, Kahn M, Zhang W, Piperdi S, Park A, Koirala P, Guzik H, Hall C *et al*: Targeted therapy of osteosarcoma with radiolabeled monoclonal antibody to an insulin-like growth factor-2 receptor (IGF2R). *Nucl Med Biol* 2016, 43(12):812-817.
61. Ramakrishnan R, Huang C, Cho HI, Lloyd M, Johnson J, Ren X, Altiock S, Sullivan D, Weber J, Celis E *et al*: Autophagy induced by conventional chemotherapy mediates tumor cell sensitivity to immunotherapy. *Cancer Res* 2012, 72(21):5483-5493.
62. Sheng J, Qin H, Zhang K, Li B, Zhang X: Targeting autophagy in chemotherapy-resistant of hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research* 2018, 8(3):354-365.
63. Hernandez-Aquino E, Quezada-Ramirez MA, Silva-Olivares A, Ramos-Tovar E, Flores-Beltran RE, Segovia J, Shibayama M, Muriel P: Curcumin downregulates Smad pathways and reduces hepatic stellate cells activation in experimental fibrosis. *Annals of hepatology* 2020, 19(5):497-506.
64. Chang MH, Kuo WW, Chen RJ, Lu MC, Tsai FJ, Kuo WH, Chen LY, Wu WJ, Huang CY, Chu CH: IGF-II/mannose 6-phosphate receptor activation induces metalloproteinase-9 matrix activity and increases plasminogen activator expression in H9c2 cardiomyoblast cells. *Journal of molecular endocrinology* 2008, 41(2):65-74.
65. Gaba RC, Groth JV, Parvinian A, Guzman G, Casadaban LC: Gene expression in hepatocellular carcinoma: pilot study of potential transarterial chemoembolization response biomarkers. *J Vasc Interv Radiol* 2015, 26(5):723-732.
66. Feramisco JR, Smart JE, Burrige K, Helfman DM, Thomas GP: Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *J Biol Chem* 1982, 257(18):11024-11031.
67. Colman A, Byers MJ, Primrose SB, Lyons A: Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography. *Eur J Biochem* 1978, 91(1):303-310.
68. Temin HM, Mizutani S: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970, 226(5252):1211-1213.
69. Baltimore D: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970, 226(5252):1209-1211.
70. Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL: Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, 68(11):2843-2845.
71. DaCosta SA, Schumaker LM, Ellis MJ: Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, a bona fide tumor suppressor gene or just a promising candidate? *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, 5(1):85-94.
72. Horsman MR, Vaupel P: Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in oncology* 2016, 6:66.
73. Shneor D, Folberg R, Pe'er J, Honigman A, Frenkel S: Stable knockdown of CREB, HIF-1 and HIF-2 by replication-competent retroviruses abrogates the responses to hypoxia in hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2017, 24(2):64-74.
74. Chen Z, Ge Y, Landman N, Kang JX: Decreased expression of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor promotes growth of human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2002, 2:18.

75. Zeeneldin AA, Salem SE, Tabashy RH, Ibrahim AA, Alieldin NH: Transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: a single center experience including 221 patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 2013, 25(3):143-150.
76. Galicia-Moreno M, Lucano-Landeros S, Monroy-Ramirez HC, Silva-Gomez J, Gutierrez-Cuevas J, Santos A, Armendariz-Borunda J: Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants* 2020, 9(10).
77. Li G, Jiang Q, Xu K: CREB family: A significant role in liver fibrosis. *Biochimie* 2019, 163:94-100.
78. Hebert E: Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor expression and tumor development. *Bioscience reports* 2006, 26(1):7-17.
79. Yu S, Wang Y, Jing L, Claret FX, Li Q, Tian T, Liang X, Ruan Z, Jiang L, Yao Y *et al*: Autophagy in the "inflammation-carcinogenesis" pathway of liver and HCC immunotherapy. *Cancer Lett* 2017, 411:82-89.

8 Danksagung

Wenige, aber wichtige Worte des Danks an...

...meine „Doktor-Löwenmutter“- für Deinen Humor, Deine Geduld, Deine Zeit, Dein offenes Ohr- und Deinen Optimismus, der meine Motivation des Öfteren aus einer kleinen Sinnkrise gezogen hat.

...meinen „Doktor-Onkel“ - danke für die Unterstützung bei allen technischen Fragen, Deinen Frohsinn und die Hilfe beim (Schlumpf-) Proben betreuen!

...meine Familie, für all eure Aufmerksamkeit, euren Rückhalt, Problemlöse-Strategien, eure Liebe und das Wissen, mich darauf- unabhängig von Dissertationen- immer verlassen zu können.