

# Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS,  
FRCS Ed. Hon.

## **RNA-Interferenz gegen Midkine und der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die tumoreigene Midkine-Expression in Pankreaskarzinomzellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

### **vorgelegt von:**

Luisa Dietrich  
aus Guayaquil

Hamburg 2013

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
am: 29.07.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:** Prof. Dr. Dr. Maximilian Bockhorn

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. Tim Strate

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** PD Dr. Evita Mohr

Für meine Großmutter  
Charlotte Dietrich

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Arbeitshypothese und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Pankreaskarzinom.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Ätiologie.....	3
2.1.2 Risikofaktoren .....	4
2.1.3 Pathogenese.....	5
2.1.4 Epidemiologie .....	6
<b>2.2 Wachstumsfaktoren .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Der Wachstumsfaktor Midkine .....	7
2.2.2 Die Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$ und EGF .....	12
<b>2.3 RNA-Interferenz.....</b>	<b>14</b>
2.3.1 siRNA.....	15
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Zelllinien.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Geräte, Materialien, Chemikalien.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Geräte .....	19
3.2.2 Materialien .....	20
3.2.3 Chemikalien .....	21
3.2.4 siRNA.....	22
3.2.5 Antikörper .....	22
3.2.6 Wachstumsfaktoren.....	23
<b>3.3 Zellkultur .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Zellkultivierung.....	23
3.3.2 Passagieren der Zellen .....	23

3.3.3	Einfrieren der Zellen .....	24
3.3.4	Zellzahlbestimmung .....	25
<b>3.4</b>	<b>Zytokinstimulation .....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Zellaussaat .....	25
3.4.2	Behandlung mit TNF- $\alpha$ und EGF .....	25
3.4.3	Gewinnung von Zellkulturüberständen zur Bestimmung von MK .....	26
3.4.4	ELISA .....	26
<b>3.5</b>	<b>Depletion von Midkine durch RNA-Interferenz .....</b>	<b>28</b>
3.5.1	Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit siRNA .....	28
3.5.2	MTT-Test .....	30
<b>3.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.6.1	Herstellung von Proteinlysaten aus adhärenen Zellen .....	31
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	32
3.6.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
3.6.4	Western Blot .....	33
<b>3.7</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Wachstumsfaktoren TNF-<math>\alpha</math> und EGF stimulieren die MK-Expression in Pankreaskarzinomzellen .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Die siRNA-vermittelte Midkine-Depletion in Pankreaskarzinomzellen .....</b>	<b>39</b>
4.2.1	Etablierung des Transfektionsprotokolls .....	40
4.2.2	MK-Detektion in Zellysaten .....	42
4.2.3	MK-Detektion in Zellkulturüberständen .....	44
<b>4.3</b>	<b>Die Hemmung der MK-Expression beeinträchtigt die Zellproliferation von Pankreaskarzinomzellen .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Induktion der Midkine-Expression durch Wachstumsfaktoren .....</b>	<b>50</b>
5.1.1	Erhöhte MK-Konzentration im Zellkulturmedium nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ und EGF .....	51
5.1.2	Antagonisierung von MK .....	52
<b>5.2</b>	<b>RNA-Interferenz gegen Midkine .....</b>	<b>54</b>
5.2.1	Reduktion der MK-Konzentration durch siRNA in den Pankreastumorzelllinien PANC-1 und BxPC-3 .....	55
<b>5.3</b>	<b>Proliferationsfördernde Eigenschaften von Midkine .....</b>	<b>56</b>

5.3.1	Auswirkung der MK-Depletion auf die Zellproliferation .....	56
<b>5.4</b>	<b>Midkine und Chemoresistenz bei Pankreas-karzinomen .....</b>	<b>57</b>
5.4.1	Midkine als Biomarker beim Pankreaskarzinom? .....	60
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>62</b>
<b>6.1</b>	<b>Multitumor Tissue Microarray .....</b>	<b>62</b>
<b>6.2</b>	<b>Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Pankreas-, Ösophagus-, Kolon- und Bronchialkarzinom .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>VII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>VIII</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>IX</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms nach Klein et al. ....	4
Abb. 2.2 Genstruktur des humanen MK-Gens.....	8
Abb. 2.3 Dreidimensionale Darstellung von MK in der Domänenstruktur.....	8
Abb. 2.4 Rezeptorkomplex und intrazelluläre Signalkette von MK .....	11
Abb. 4.1 MK-Expression nach Serumentzug und Zugabe von FCS, TNF- $\alpha$ und EGF im Zellkulturüberstand .....	38
Abb. 4.2a+b Vergleich der MK-Konzentrationen im Zellkulturüberstand .....	39
Abb. 4.3a+b Zellkultur PANC-1.....	40
Abb. 4.4 Western Blot der MK-Expression nach siRNA-Transfektion von PANC-1 .....	41
Abb. 4.5 Vergleich der beiden verwendeten siRNAs gegen MK bei PANC-1 .....	41
Abb. 4.6 Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von PANC-1 .....	42
Abb. 4.7 a+b Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von PANC-1 .....	43
Abb. 4.8 Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von BxPC-3 .....	44
Abb. 4.9 Western Blot der Zellkulturüberstände von BxPC-3 .....	45
Abb. 4.10 Western Blot der Zellkulturüberstände von PANC-1 .....	45
Abb. 4.11 Western Blot der Zellkulturüberstände von BxPC-3 in zeitlicher Abhängigkeit .....	46
Abb. 4.12 Einfluss der MK-Depletion auf die Zellvitalität von PANC-1 .....	47
Abb. 4.13 a+b Relativer Wachstumsverlauf der Wildtyp Zellen und siRNA1 transfizierten Zellen im Vergleich der Messzeitpunkte 24h und 72h .....	48

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 3.1 Liste der verwendeten Geräte.....	19
Tab. 3.2 Liste der verwendeten Produkte .....	20
Tab. 3.3 Liste der verwendeten Chemikalien.....	22
Tab. 3.4 Liste der verwendeten siRNA .....	22
Tab. 3.5 Liste der verwendeten Antikörper .....	23
Tab. 3.6 Liste der verwendeten Wachstumsfaktoren.....	23
Tab. 6.1 Multi Tumor Array .....	63
Tab. 6.2 Mittlere und mediane Serum-MK-Konzentration bei Patienten mit Pankreas-, Ösophagus-, Kolon- und Bronchialkarzinom und bei Kontrollprobanden .....	64



## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	mRNA	messenger Ribonukleinsäure, messenger Ribonukleinsäure
ALK	Anaplastische Lymphatische Kinase		
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
AS	antisense		
Bp	Basenpaare	MW	Molekulargewicht
CEA	karzinoembryonales Antigen	NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells
DCK	Deoxycytidinekinase		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	NSCLC	Non-small-cell Lung Cancer
DMSO	Dimethylsulfoxid	PanIN	pankreatische intraduktale Neoplasie
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphate Buffered Saline
dsRNA	doppelsträngige RNA	PBS-T	PBS+Tween
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EGF	Epidermal Growth Factor	PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
EGFR	EGF-Rezeptor	PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition	PTP- $\zeta$	Protein-Tyrosin-Phosphatase- $\zeta$
Erk	Extracellular-signal Regulated Kinase	PVDF	Polyvinylidenfluorid
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma	Ras	Rat Sarcoma
FCS	Fetal Calf Serum	rb	rabbit
FGF	Fibroblast Growth Factor	RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
GFP	Green Fluorescent Protein	RISC	RNA-Induced Silencing Complex
GIST	gastrointestinale Stromatumoren	RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase	rpm	rounds per minute
HCC	hepatozelluläres Karzinom	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
HENT1	Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
HER2	Human Epidermal Growth Factor Rezeptor	shRNA	short hairpin RNA
HMVEC	humane microvaskuläre Endothelzellen	siRNA	short interfering RNA
HRP	Meerrettich-Peroxidase	TACE	TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme
kDa	Kilodalton	TEMED	Tetramethylethylendiamin
LRP	Lipoprotein Receptor Related Protein	TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
MHC	Major Histocompatibility Complex	TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
MK	Midkine	UKE	Universitäts Klinikum Eppendorf
MPNST	malignen Tumoren des peripheren Nervensystems	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
		ZEB1	Zinc finger E-box binding homebox transcription factor 1

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Diagnostik des Pankreaskarzinoms wird durch fehlende Frühsymptome hinausgezögert und die Therapie wird durch eine Infiltration in Nachbarstrukturen sowie eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung deutlich erschwert. Es zeichnet sich durch ein besonders aggressives und invasives Wachstum aus. Diese Tatsachen bedingen eine hohe Mortalität der Erkrankung. Deshalb sind zuverlässige Biomarker und Früherkennungsmethoden in der Klinik von besonderem Interesse und steter Mittelpunkt der klinischen Forschung. Besonders beim Pankreaskarzinom ist es von Interesse, mit einfachen Methoden das Auftreten der Erkrankung frühzeitig zu erkennen oder den Verlauf zu kontrollieren. Da der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Wachstumsfaktor Midkine (MK) als sezerniertes Protein mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auch im Serum nachgewiesen werden kann (Muramatsu et al., 1996), wird MK zu einem vielversprechenden Protein in der Etablierung neuer Tumormarker.

MK fördert das Wachstum von Tumorzellen. Demzufolge werden MK-Inhibitoren als Ansatzpunkte zur Tumorthherapie gesehen, um die Proliferation des Tumors zu inhibieren bzw. zu verlangsamen. Beim Pankreaskarzinom wurde eine Überexpression von MK-mRNA nachgewiesen, was auf ein vermehrtes Vorkommen des Proteins beim Pankreaskarzinom schließen lässt (Maeda et al., 2007, Ohhashi et al., 2009). MK stellt folglich einen aussichtsreichen Angriffspunkt in der Tumorbekämpfung und die Anwendung von siRNA zur Ausschaltung des Proteins einen potentiellen Kandidaten für die Therapie dar.

In neuesten veröffentlichten Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen der MK-Expression und der Chemoresistenz von Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Güngör et al., 2011). Dies zieht ein großes Problem in der adjuvanten oder palliativen Chemotherapie dieser Entität nach sich. Durch diesen Aspekt wird die Relevanz dieses

Proteins im Rahmen der Tumorbekämpfung speziell beim Pankreaskarzinom unterstrichen.

In Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe wurden erhöhte MK-Konzentrationen in Seren von Tumorpatienten im Vergleich zu Kontrollprobanden aufgezeigt. Zudem konnte in einem Multi Tumor Tissue Array des UKE gezeigt werden, dass verschiedene humane Gewebeproben von Pankreaskarzinomen eine erhöhte immunhistochemische MK-Färbung aufweisen. Ziel vorliegender Arbeit war, den Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktoren auf die Expression von Midkine in Pankreaskarzinomzellen darzustellen. Damit wird Aufschluss über die Wirkungsbeziehungen von MK mit diesen Wachstumsfaktoren geliefert. Zudem wurde untersucht, ob MK mittels RNA-Interferenz im Zellmodell unterschiedlicher Pankreaskarzinomzellen gehemmt werden kann und ob diese Hemmung Einfluss auf die Zellproliferation hat. So wird die Interaktion von Midkine mit der Tumorprogression beleuchtet.

Die Informationen dieser Arbeit sollen neue Therapieansätze bei der Behandlung von Pankreaskarzinomen unterstützen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Pankreaskarzinom

#### 2.1.1 Ätiologie

Das Pankreaskarzinom ist ein maligner, epithelialer Tumor der Bauchspeicheldrüse. In den meisten Fällen entartet der exokrine Anteil des Pankreas. Es handelt sich hier zu 90% um ein Adenokarzinom. Man teilt das Adenokarzinom in duktale und in azinäre Karzinome ein, wobei die duktales Karzinome mit 90% der Fälle den deutlich größten Teil ausmachen, während es sich in nur etwa 1% der Pankreaskarzinome um azinäre Karzinome handelt. Das Adenokarzinom ist in etwa 70% im Kopf-, in 20% im Korpus- und zu 10% im Schwanzbereich des Pankreas lokalisiert. Die endokrinen Tumoren, die von den Langerhans-Inseln ausgehen, nehmen mit 0,2% einen sehr geringen Anteil der Pankreastumoren ein. Den Rest machen Tumoren des Bindegewebes und unklassifizierbare Tumore aus. Insbesondere die Adenokarzinome sind bei Diagnosestellung bereits zu 80% metastasiert (Cubilla und Fitzgerald, 1985).

Die Entstehung des duktales Adenokarzinoms und der anderen exokrinen Pankreastumore ist nicht vollständig geklärt. Nach derzeitigem Wissensstand bildet die pankreatische intraduktale Neoplasie (PanIN) eine Vorstufe des exokrinen Pankreaskarzinoms (Hruban et al., 2001). Sie kann als hyperplastische Veränderung mit muzinösem (PanIN1A) oder papillärem (PanIN1B) Charakter auftreten oder sich als Dysplasie darstellen, die in ein *Carcinoma in situ* übergehen kann. Es wird zwischen der low grade (PanIN2) und der high grade Dysplasie (PanIN3) unterschieden (Hruban et al., 2001). Das pathologische Wachstum kommt dabei vor allem durch die Aktivierung von Onkogenen oder die Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen zustande. Hier werden vor allem Veränderungen in den Genen K-ras, p16, p53, dpc4 und brca2 verzeichnet (Klein et al., 2002).

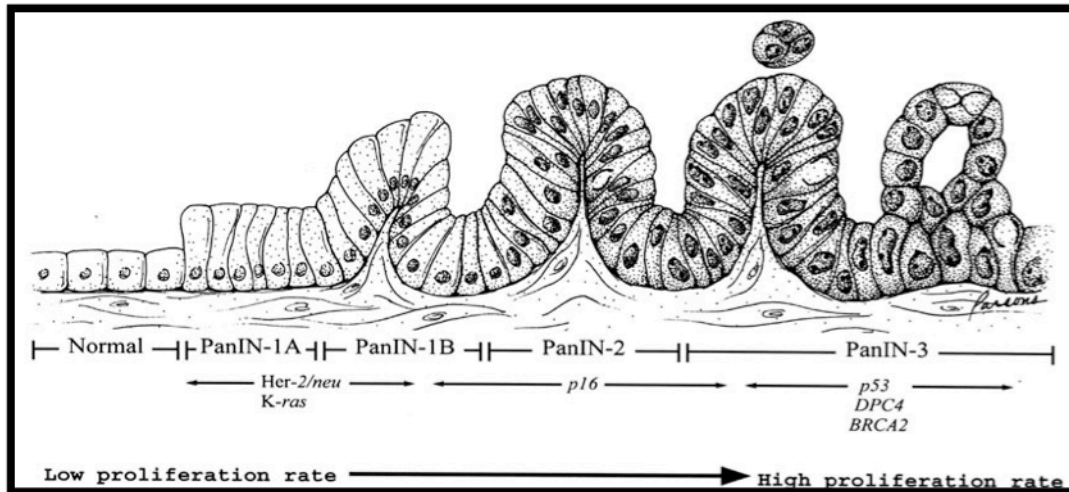


Abb. 2.1 Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms nach Klein et al. (Klein et al., 2002). Mit freundlicher Genehmigung von LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, INC.

### 2.1.2 Risikofaktoren

Als sichere Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms gelten Rauchen, eine fett- und fleischreiche Ernährung und die chronische Pankreatitis (Ahlgren, 1996, Lowenfels et al., 2000, Lyon et al., 1993). Über den Rauch von Zigaretten werden N-Nitrosamine aufgenommen, die mit der DNA reagieren und zu Fehlkodierungen und dadurch zur Aktivierung von Onkogenen, wie dem K-ras-Onkogen, führen (Silverman et al., 1994). Eine erhöhte Fettzufuhr in Nahrungsmitteln führt zu einer vermehrten Ausschüttung der gastrointestinalen Hormone Sekretin und Cholecystekinin. Diese üben wiederum eine hyperplastische Wirkung auf die Zellen der Bauchspeicheldrüse aus (Roebuck, 1992).

Zudem wurde eine genetische Prädisposition nachgewiesen (Hruban et al., 1998), nachdem ein gehäuftes Auftreten innerhalb von Familien beobachtet werden konnte. Das familiäre Pankreaskarzinom geht mit einem 60-fach erhöhten Risiko für die Entstehung einher. Weitere erbliche Krankheiten mit einem erhöhten Karzinomrisiko sind die familiäre Pankreatitis, das Peutz-Jeghers-Syndrom, das Familial Atypical Multiple Mole Melanoma (FAMMM), die zystische Fibrose, die chronische Pankreatitis, die familiäre Polyposis coli und das von Hippel-Lindau-Syndrom (Klein et al., 2001).

### 2.1.3 Pathogenese

In der Pathogenese des Pankreaskarzinoms spielen Mutationen von Onko- und Tumorsuppressorgenen eine Rolle. Onkogene sind Gene, die die Entstehung von Tumoren fördern. Sie entstehen durch Mutationen normaler Gene, die eine Rolle in der Zellteilung haben. Dadurch wird ihre ursprüngliche Funktion verändert. Tumorsuppressorgene haben die Aufgabe, den Zellzyklus zu kontrollieren oder die Apoptose auszulösen. Sie verhindern, dass durch einen Defekt eines Proteins in einer Zelle eine Tumorzelle entsteht. Mutationen und Fehlfunktionen dieser Gene erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung. Beim Adenokarzinom des Pankreas sind häufig Mutationen im K-ras- und p16-Gen und seltener im p53- und dpc4-Gen zu finden (Moskaluk et al., 1997). Diese Mutationen führen dazu, dass Wachstumsfaktoren vermehrt oder minder exprimiert werden oder sich deren Rezeptoren in der Anzahl ändern, was sich positiv auf die Karzinogenese auswirkt. Beim Pankreaskarzinom wurde bei 95-100% der Patienten eine Mutation im K-ras-Onkogen gefunden (Almoguera et al., 1988, Caldas et al., 1994, Rozenblum et al., 1997). Ras-Mutationen betreffen Aminosäuren, die mit der GTPase-Funktion bei der Signaltransduktion der Zelle interferieren und die Kontrolle des Zellwachstums stören. Die Ras-Proteine sind in inaktivem Zustand an GDP gebunden und werden aktiviert, indem sie GTP binden. In dieser Form wird das Wachstum der Zelle angeregt. Der aktive Zustand ist jedoch nur von sehr kurzer Dauer und wird durch eine intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins wieder beendet und inaktiviert. Wenn die Aktivität des Proteins allerdings nicht begrenzt wird, entsteht ein permanent wachstumsstimulierendes Signal auf die Zelle (Egan et al., 1993).

Das Pankreaskarzinom weist Ras-Mutationen meist im Codon 12 (nur selten am Codon 13) auf. Die meisten Mutationen bewirken einen Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin oder Aspartat. Ein Austausch durch Serin, der häufig bei anderen Karzinomen mit K-ras-Mutation auftritt, ist beim Pankreaskarzinom dagegen ungewöhnlich (Smit et al., 1988, Mariyama et al., 1989). In einer Studie von Rozenblum *et al.* war sogar in allen untersuchten Pankreaskarzinomen (n=42) eine K-

ras-Genmutation nachzuweisen (Rozenblum et al., 1997). Außerdem spielt die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53, p16, dpc4 und brca2 beim Pankreaskarzinom eine bedeutende Rolle. Eine Stilllegung dieser Gene führt zu Veränderungen im Zellzyklus und in verschiedenen Signalwegen, die die Tumorentstehung fördern. Beim Pankreaskarzinom sind auffallend häufig zudem die Inaktivierungen des p16- und dpc4-Gens zu beobachten (Hahn et al., 1996, Schutte et al., 1997). In den Tumorsuppressorgenen p16 war in 82%, im p53-Gen in 76%, im dpc4-Gen in 53% und im brca2-Gen in 10% eine Mutation auffällig (Li et al., 2004).

### 2.1.4 Epidemiologie

Laut Robert-Koch-Institut macht das Pankreaskarzinom in Deutschland etwa 3% aller Malignomfälle aus. Sie sind bei Männern für 6,3%, bei Frauen für 7,5% aller Krebstodesfälle verantwortlich und stehen an vierter Stelle der Krebssterbefälle bei Männern und Frauen in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei circa 70 Jahren und für Frauen bei 76 Jahren. Die Zahl der Neuerkrankungen an Pankreaskarzinomen in Deutschland wird für das Jahr 2012 auf 7800 bei Männern bzw. 7600 bei Frauen geschätzt. Die Frühsymptome der Erkrankung sind unspezifisch oder fehlen gänzlich, was häufig eine späte Diagnose in fortgeschrittenen Stadien nach sich zieht. Die Erkrankung weist eine ungünstige relative 5-Jahres-Überlebensrate auf, welche für Männer bei 8% und für Frauen bei 7% liegt. Die Überlebensraten des Pankreaskarzinom sind unter allen Krebserkrankungen die niedrigsten (Robert-Koch-Institut, 2012).

Eine Metastasierung findet frühzeitig statt, sodass bei Diagnosestellung bereits bei einem Großteil der Patienten Lymphknotenmetastasen gefunden werden. Eine Fernmetastasierung wird überwiegend in der Leber, dem Peritoneum, der Pleura und in dem Skelettsystem beobachtet (Bohmig und Rosewicz, 2004). Die frühe Metastasierung hat oft zur Folge, dass der Tumor zum Operationszeitpunkt nicht mehr resektabel ist. Das Karzinom entsteht zu 70% im Pankreaskopf und breitet sich von dort in das peripankreatische Gewebe aus. Eine Infiltration betrifft die Gallenwege, das Duodenum, die Bauchgefäße und Nerven. Makroskopisch ist der Tumor nur schwer zu erkennen und wird häufig als Pankreatitis, die sich peritumorös bildet, verkannt.

## 2.2 Wachstumsfaktoren

### 2.2.1 Der Wachstumsfaktor Midkine

#### 2.2.1.1 Protein- und Genstruktur

Der Wachstumsfaktor Midkine ist ein Zytokin. Seinen Namen erhielt das Molekül auf Grund seiner starken Expression in der Midgestionsperiode (midgestion) der Embryogenese von Mäusen. In adulten Mäusen war die Niere (kidney) der stärkste Expressionslokus (Muramatsu, 1993), hieran anlehnend erfolgte die Namenswahl. Eine Definition der Zytokine beschreibt Lappnow (Lappnow, 2001) in Anlehnung an Balkwill (Balkwill und Burke, 1989) folgend: „Zytokine sind regulatorische Proteine, die von Leukozyten und einer Reihe weiterer Zellen produziert werden; die pleiotropen Funktionen der Zytokine schließen zahlreiche Effekte auf Zellen des Immun-Systems und die Regulierung entzündlicher Prozesse ein“. Zytokine werden in Gruppen eingeteilt, deren Mitglieder eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Midkine gehört zusammen mit Pleiotropin zu einer neuen Gruppe von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren. Die beiden Proteine weisen eine zu 50% identische Aminosäuresequenz auf. In ihrer Funktion ähneln sie den ebenfalls an Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (Fibroblast Growth Factor) (Kurtz et al., 1995). Die Einteilung von MK und Pleiotropin in eine neue Gruppe erfolgte dennoch, da sie keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu den Proteinen der FGF-Gruppe aufweisen (Muramatsu, 1993).

Die volle Gensequenz des Proteins konnten Muramatsu *et al.* 1990 identifizieren (Muramatsu, 1993). MK wurde zuerst als Produkt eines Gens beschrieben, welches durch Retinolsäure induzierbar ist und in frühen Phasen der Differenzierung von embryonalen Teratokarzinomzellen vorkommt. In späteren Stadien der Differenzierung kam es zu einer progressiven Verringerung der MK-Expression (Kadomatsu et al., 1988b). Das humane MK-Gen besteht aus 4 Exons und 3070 Basenpaaren und befindet sich auf dem kurzen Arm in Bande 11p11.2 des Chromosoms 11 (Kadomatsu et al., 1988a). Es hat eine Masse von 13 Kilodalton (kDa) (Muramatsu, 1993, Muramatsu, 2002).



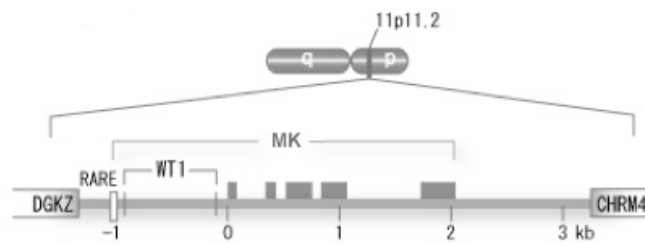


Abb. 2.2 **Genstruktur des humanen MK-Gens** (Muramatsu, 2002). Mit freundlicher Genehmigung der JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY.

Es ist reich an basischen Aminosäuren und Cystein (Matsubara et al., 1990). Das Molekül setzt sich aus zwei Domänen mit einem C-terminalen Ende und einem N-terminalen Ende zusammen. An der C-terminalen Domäne sind zwei Heparin-bindende Domänen lokalisiert (Asai et al., 1997). Die meiste biologische Aktivität befindet sich an der C-terminalen Domäne, daher ist zu vermuten, dass MK über diese Bindungsstellen seine Funktion ausübt (Iwasaki et al., 1997).

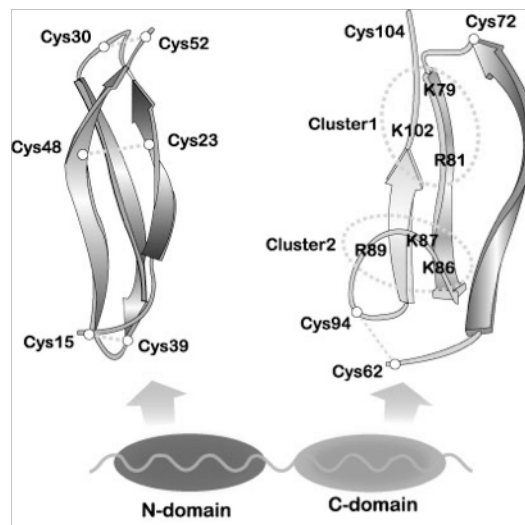


Abb. 2.3 **Dreidimensionale Darstellung von MK in der Domänenstruktur**. Die Heparin-Bindungsstellen der C-terminalen Domäne wurden eingekreist (Muramatsu, 2002). Mit freundlicher Genehmigung der JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY.

### 2.2.1.2 Biologische Aktivität

Dem Wachstumsfaktor MK wird eine wichtige biologische Funktion in der embryonalen Entwicklung, in der Angiogenese und in Entzündungsprozessen

zugeschrieben (Muramatsu et al., 1993, Kurtz et al., 1995). In der Embryogenese von Mäusen wurde die stärkste MK-Expression in der Mitte der Embryonalzeit nachgewiesen (Muramatsu, 1993). Bei adulten Mäusen und Menschen ist die Expression jedoch deutlich eingeschränkt. Dabei konnte das Protein in Nieren-, Hoden-, Magen- und Dünndarmgeweben nachgewiesen werden. Eine hohe Expression an MK-mRNA geht mit einer Sezernierung des Proteins ins extrazelluläre Milieu einher. Somit liegt die Annahme nahe, dass MK durch einen autokrinen Mechanismus die Tumorigenese beeinflusst (Matsubara et al., 1990, Tsutsui et al., 1993). Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen, Wundheilung und der Karzinogenese wird die MK-Expression erhöht oder neu induziert. Daneben nimmt MK eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration, Fibrinolyse und der Angiogenese ein (Muramatsu et al., 1993, Muramatsu, 2002, Matsubara et al., 1994). Am ausführlichsten ist die Funktion von MK in der Entwicklung von Nervengewebe verstanden. MK induziert eine erhöhte Überlebensrate in embryonalen Neuronen. In von embryonalen Mäusen und Ratten isolierten Neuronen ist MK für den Auswuchs von Neuriten und deren Differenzierung verantwortlich (Aridome et al., 1998, Kadomatsu und Muramatsu, 2004). In den Endothelzellen der Aorta tierischer Zellen erhöht MK die Plasminogenaktivator-Konzentration und infolgedessen die Aktivität von Plasmin. Dieses lässt auf seine Rolle in der Reparatur von Gewebe und Angiogenese schließen (Kojima et al., 1995). Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen spielt MK eine Rolle in der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und wird zudem von Makrophagen exprimiert (Takada et al., 1997, Narita et al., 2008, Muramatsu, 2010).

### **2.2.1.3 Signaltransduktion**

Der exakte Weg der Signaltransduktion, über den MK seine Wirkung erzielt, ist noch nicht vollständig erschlossen. Es konnten verschiedene Rezeptoren nachgewiesen werden, über die MK seine Wirkung entfaltet. Es wird angenommen, dass es über die Heparin-Bindungsstellen an das N-Syndecan, ein Heparan-Sulfat-Proteoglykan der extrazellulären Matrix, bindet. Mehrere Heparin-bindende Wachstumsfaktoren können sich an ein Heparansulfatmolekül anlegen, eine solche Oligomerisierung verstärkt die Aktivierung der Rezeptoren. Heparansulfate wirken teilweise auch direkt an der Signaltransduktion mit (Mitsiadis et al., 1995, Nakanishi et al., 1997). MK vermittelt

über die Bindung an die Protein-Tyrosin-Phosphatase- $\zeta$  (PTP- $\zeta$ ) zusammen mit dem Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein (LRP), dem  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin und dem  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin in einem Rezeptorkomplex die neuronale Migration. Der intrazelluläre Signalweg läuft auf diesem Weg über eine Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Extracellular-signal Regulated Kinase (Erk) ab (Maeda et al., 1999, Muramatsu et al., 2004). Ein weiterer Rezeptor, die Anaplastische Lymphatische Kinase (ALK), löst nach der Bindung von MK ebenfalls die Signalkaskade über PI3-Kinase und Erk aus (Stoica et al., 2002). Durch das LRP wird MK endozytotisch in die Zelle aufgenommen und gelangt anschließend in den Zellkern. Dort wirkt es fördernd auf das Überleben diverser Zellen (Ikematsu et al., 2000). Das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen Rezeptoren an den von MK übermittelten Wirkungen ist noch unklar (Kadomatsu und Muramatsu, 2004).

Aktuell wurde ein weiterer Signalweg identifiziert, über den MK seine Wirkung entfaltet. In duktalem Adenokarzinomzellen des Pankreas aktiviert MK den Notch-2 Rezeptor und induziert daraufhin die Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), bei der Epithelien die Eigenschaften von mesenchymalen Zellen annehmen (Güngör et al., 2011). Dieser Phänotypwechsel spielt eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen, die durch diese Wandlung ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie ihre Zellkontakte auflösen. Dadurch erlangen sie die Fähigkeit zur Migration und die Einwanderung ins Gewebe wird ermöglicht. Dies ist ein wichtiger Prozess für die Metastasierung der Tumorzellen (Wang et al., 2010). Beim Pankreaskarzinom wurde auch von Maier *et al.* ein klarer Zusammenhang der NF- $\kappa$ B- Aktivität und der Initiation der EMT, Migration und Invasion beschrieben (Maier et al., 2010).

Die Interaktion von MK mit dem Notch-2 Rezeptor führt zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges, indem dessen Genexpression gesteigert wird (Güngör et al., 2011, You et al., 2008). Der Notch-2 Rezeptor wird beim Kolonkarzinom und auch beim Pankreaskarzinom mit einer erworbenen Chemoresistenz in Verbindung gebracht (Meng et al., 2009, Güngör et al., 2011).

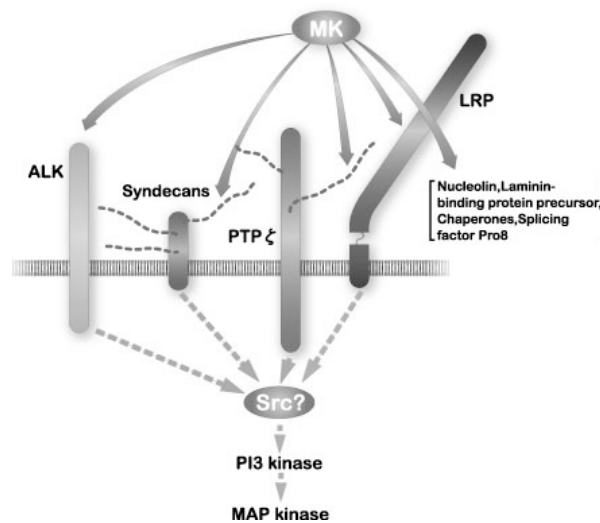


Abb. 2.4 **Rezeptorkomplex und intrazelluläre Signalkette von MK** (Muramatsu, 2002). Mit freundlicher Genehmigung der JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY.

#### 2.2.1.4 Midkine-Expression bei Tumorerkrankungen

Die Bedeutung von MK in der Kanzerogenese konnte durch verschiedene Untersuchungen dargestellt werden. Als mitogener Faktor agiert MK bei primitiven neuroektodermalen Tumoren (Nurcombe et al., 1992). Eine angiogenetische Wirkung wird bei der Proliferation von Brustkrebs (Choudhuri et al., 1997) und malignen Tumoren des peripheren Nervensystems (MPNST) beschrieben. Bei MPNST-Zellen übt MK zudem einen Schutz vor Apoptose aus (Friedrich et al., 2005, Güngör et al., 2011).

Eine MK-Überexpression wird mit verschiedenen Tumorerkrankungen assoziiert. In Gewebeproben von Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Leber- und Pankreaskarzinomen (Ohhashi et al., 2009, Tsutsui et al., 1993, Aridome et al., 1995, Kato et al., 2000), in Mammakarzinomen (Miyashiro et al., 1997, Garver et al., 1994) und in Tumoren der Lunge (Garver et al., 1993) ist die MK-Expression erhöht. Im Prostatakarzinom fördert MK das Überleben der Zellen über den NF-κB-Signalweg (You et al., 2008).

In einem Multitumor-Array aus dem Labor unserer Arbeitsgemeinschaft konnte ebenfalls eine stark erhöhte MK-Expression in Pankreastumoren festgestellt werden (Tab. 6.1).

Bereits in Präkanzerosen einiger Tumorentitäten wurde eine MK-Überexpression nachgewiesen. Bei den kolorektalen Adenomen mittlerer Dysplasie ergaben 50% erhöhte MK-Werte und bei intraepithelialer Neoplasie bei Prostatakarzinomen zeigten 75% eine vermehrte Expression (Konishi et al., 1999, Ye et al., 1999).

### 2.2.1.5 Midkine als Tumormarker

Eine erhöhte MK-Serumkonzentration konnte in einer Vielzahl von Karzinomen nachgewiesen werden (Ikematsu et al., 2000). In einer Studie von Ikematsu *et al.* sanken bei vier von fünf Patienten mit hepatozellulärem Karzinom die zuvor erhöhten MK-Spiegel im Serum nach Entfernung des Primärtumors wieder ab (Ikematsu et al., 2000). Beim Mammakarzinom wird diskutiert, dass MK im Plasma als neuer Marker dienen kann, der den derzeit angewandten konventionellen Tumormarkern, wie zum Beispiel dem karzinoembryonalen Antigen (CEA), als Tumormarker überlegen sein könnte (Ibusuki et al., 2009, Yu et al., 2004). Bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) korrelieren erhöhte MK-Serumwerte mit einer schlechteren Prognose und Überlebensrate (Rawnaq et al., 2010).

### 2.2.2 Die Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$ und EGF

Ebenfalls zur Gruppe der Zytokine zählen die Wachstumsfaktoren Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF).

TNF- $\alpha$  ist ein 26kDa schweres Protein, welches seinen Namen durch die Eigenschaft erlangte, in einem *in vivo* Modell bei Mäusen Nekrosen im Tumorgewebe auszulösen. Es wird von einem Gen auf dem Chromosom 6p21.3 kodiert, welches sich in einer hoch polymorphen MHC (Major Histocompatibility Complex) Region befindet (Hajeer und Hutchinson, 2000). TNF- $\alpha$  wird membrangebunden exprimiert und durch das Enzym TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme (TACE) in das aktive, 17kDa schwere Trimer gespalten. Es nimmt eine Rolle in der Tumorbekämpfung, Entzündungsprozessen, Immunmodulation, beim septischen Schock und bei der Hämatopoese ein. Es wird dabei hauptsächlich von Makrophagen im Rahmen von immunologischen Prozessen exprimiert (Vassalli, 1992). TNF- $\alpha$  wird zudem auch von vielen Tumorzellen produziert, wobei bei den prognostisch ungünstigen Tumoren erhöhte Konzentrationen im Serum gemessen

werden konnten. Bei einigen Tumoren wird angenommen, dass es fördernd auf das Wachstum, die Tumorinvasivität und das Metastasierungsverhalten wirkt (Balkwill, 2009).

EGF ist ein 6,2kDa schweres Protein und erhielt seinen Namen aufgrund seines Effektes beim Wachstum und der Reifeförderung auf Epithelien von Mäusen (Carpenter und Zengui, 1986). Das humane EGF-Gen befindet sich auf dem Chromosom 4. EGF wird zunächst als Proform exprimiert und ist in der Zellmembran verankert. Durch hydrolytische Spaltung wird die lösliche Form dann von der membrangebundenen Proform abgespalten (Bell et al., 1986). Hierfür sind Matrix-Metalloproteasen verantwortlich, die auch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus der gebundenen Form katalysieren (Dong et al., 1999). Das am besten untersuchte Enzym für die Prozessierung von EGF ist ebenfalls das TACE, das im Menschen zwar hauptsächlich die Freisetzung des Transforming Growth Factor alpha (TGF- $\alpha$ ) aus der EGF-Familie bewirkt, in geringem Maße aber auch die von EGF (Borrell-Pages et al., 2003, Hinkle et al., 2004, Sunnarborg et al., 2002). EGF vermittelt seine Signaltransduktion über den EGF-Rezeptor (EGFR), der zu der Familie der ErbB-Rezeptoren zählt. Dazu gehören außerdem noch der ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Die über diese Rezeptoren-Familie vermittelten Signale haben Einfluss auf Proliferation, Motilität, Invasion, Sekretion, Differenzierung, Mitose und Apoptose der Zelle (Singh und Harris, 2005). Beim Mammakarzinom kann bei einigen Patientinnen eine Überexpression vom HER2/Neu detektiert werden (Earp et al., 2003). Der Rezeptor gilt als prognostischer Marker bei dieser Tumorart und bietet einen Angriffspunkt in der Tumorbekämpfung, indem dieser durch einen monoklonalen Antikörper (AK), dem Herceptin, blockiert wird (Untch, 2006). Beim Lungenkarzinom ist der EGF-Rezeptor in allen Stadien der Karzinogenese nachzuweisen (Franklin et al., 2002). Es konnte auch beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Non-small-cell Lung Cancer, NSCLC) eine Überexpression des EGFR und/oder HER2/NEU beobachtet werden (Bunn und Franklin, 2002).

## 2.3 RNA-Interferenz

Die Ribonukleinsäure-Interferenz (RNAi) ist eine Technik zur sequenzspezifischen Ausschaltung von Genen, die genutzt wird, um die Rolle der Gene in den Regulationsmechanismen der Zellen zu untersuchen. Mit der Einschleusung einer RNA-Sequenz in die Zelle wird die zelleigene komplementäre mRNA so sehr reduziert, dass das anvisierte Protein herunter reguliert wird, obwohl dessen Gen weiterhin transkribiert wird. Eine Depletion wird somit durch den vermehrt vorzeitigen Abbau der mRNA erzielt und die Translation des entsprechenden Genproduktes vermindert.

Bei Untersuchungen an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* fanden Fire *et al.* 1998 erstmals heraus, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) für die RNA-Interferenz verantwortlich ist (Fire *et al.*, 1998). Für diese Entdeckung wurde Fire und Mello 2006 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/)). Beim Einschleusen von dsRNA in die Zelle konnte beobachtet werden, dass die Expression der komplementären mRNA herunter reguliert wird. Die injizierte dsRNA muss dabei homolog zu einer spezifischen Ziel-RNA in der Zelle gewählt werden, da schon die Fehlpaarung von einzelnen Basen die Effizienz drastisch senken kann.

An der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnte dann biochemisch gezeigt werden, dass die exogen eingeschleuste lange dsRNA in kurze Stränge von 21-23 Nukleotiden, den sogenannten short interfering RNA (siRNA), prozessiert wird. Nach diesem Prozess bilden sie mit der Endoribonuklease Dicer und zellulären Proteinen einen Multienzymkomplex, den RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Innerhalb dieses Komplexes wird die doppelsträngige siRNA durch eine Helikase-Aktivität in die beiden Einzelstränge zerlegt (Hammond *et al.*, 2001). Ein Strang verbleibt im RISC, der andere wird wieder entfernt. Welcher der beiden Stränge verbleibt, hängt von der thermodynamischen Struktur der siRNA ab. Der verbleibende Strang wird auch als „guide strand“ bezeichnet. Er bindet mittels komplementärer Paarung an die homologe Sequenz der Ziel-mRNA. Diese Bindung leitet die Spaltung der mRNA ein, die somit abgebaut wird. Der Effekt des Gen-Silencing wird somit auf posttranskriptionalem Weg

herbeigeführt, die Transkription des Gens wird nicht gehemmt. Die effektive Hemmung der Proteinbiosynthese führt also durch die Degradierung der mRNA zur Genregulation (Hannon, 2002). Mit der RNAi-Technik ist keine 100%ige Ausschaltung des Zielgens erreichbar, es bleibt eine 5-10%ige Restexpression des Proteins. Vermutlich ist die natürliche Funktion der RNA-Interferenz demnach als Abwehrmechanismus gegen fremde dsRNA zu verstehen, welche z.B. durch sich replizierende Viren produziert wird. Zudem dient sie der Protektion des Genoms gegenüber eigener unfunktionaler RNA.

### 2.3.1 siRNA

Doppelsträngige RNA löst bei Säugerzellen normalerweise eine Interferonantwort aus, welche zu einer unspezifischen Inhibition der Proteinbiosynthese und zu einem unselektierten Abbau von RNA führt. Dies resultiert in einer Stimulation der Apoptose und führt damit zum Zelltod. Dieser Mechanismus hat die Verwendung von eingeschleuster dsRNA in Säugerzellen zunächst verhindert. Elbashir *et al.* fanden einen Weg, um die Interferonantwort zu umgehen: Statt langer dsRNA wurde gleich eine RNA mit einer Länge von 21 Nukleotiden eingesetzt. Dadurch wurde keine Interferonantwort ausgelöst, sondern ein Einbau eines Stranges der siRNA in den RISC vermittelt (Elbashir *et al.*, 2001b). Damit konnte umgangen werden, dass es zu einer unspezifischen Aktivierung von doppelsträngigen RNA-abhängigen Proteinkinasen kommt, wie es bei längerer RNA der Fall ist (Stark *et al.*, 1998, Vickers *et al.*, 2003). Die Sequenz der siRNA muss für eine erfolgreiche RNAi dabei homolog zu der Sequenz des stillzulegenden Gens sein. Die Zielsequenz sollte sich 50 bis 100 Basenpaare (Bp) hinter dem Startcodon befinden (Elbashir *et al.*, 2001b). Es ist zu beobachten, dass eine gegen die Intron-Region des Gens gerichtete siRNA nicht wirksam ist (Zeng und Cullen, 2002).

Im Gegensatz zu einzelsträngiger RNA, die in biologischem Milieu sehr schnell zerfällt, ist doppelsträngige siRNA resistent gegen den biochemischen Abbau in menschlichem Plasma (Bertrand *et al.*, 2002). In proliferierenden Zellen hält die Aktivität der siRNA drei bis fünf Tage an (McManus und Sharp, 2002), bei ausdifferenzierten Zellen wie Neuronen konnte eine Aktivität über drei Wochen nachgewiesen werden (Omi *et al.*,



2004). Weil Säugerzellen im Gegensatz zu anderen Eukaryonten keine RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen, hängt der Effekt von der Menge der transfizierten siRNA ab, da ohne RNA-abhängige RNA-Polymerase die siRNA nicht transkribiert wird (Grishok und Mello, 2002). Hierbei ist anzunehmen, dass die Wirksamkeit nicht durch einen Abbau der siRNA bestimmt wird, sondern eher durch Verdünnungseffekte bei der Zellteilung limitiert wird (McManus und Sharp, 2002).

Es wurde berichtet, dass eine RNAi auch bei nicht anvisierten Genen eine Wirkung entfalten kann. Diese Effekte werden auch „off-target Effekte“ genannt. Die Effektivität der siRNA wird vor allem durch die Primärstruktur und die Erreichbarkeit der Zielsequenz beeinflusst, welche von der Sekundär- und Tertiärstruktur des anvisierten Abschnitts der siRNA abhängt. Die biologische Aktivität variiert von sehr aktiven siRNA-Konstrukten mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von etwa 0,2-0,5nM und inaktiven siRNA-Konstrukten ( $IC_{50} >1\mu M$ ) um das Tausendfache (Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel, 2003). Trotz dieser unvorhersehbaren Faktoren ist dennoch circa jede fünfte siRNA-Sequenz effektiv (Dallas und Vlassov, 2006). Mit Hilfe dieser Erkenntnisse wurde eine Liste erstellt, die die wahrscheinlich effektivsten Sequenzen beinhaltet. Das Whitehead Institute stellt eine Such-Software im Internet zur Verfügung (Yuan et al., 2004). Mit einem „BLAST-Search“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) sollte untersucht werden, ob die Sequenzen Homologien zu anderen Genen aufweisen, damit es zu keinen unerwünschten, gleichzeitigen Interferenzen kommt. Um den spezifischen Effekt der Suppression mittels RNAi zu belegen, ist es deshalb notwendig, eine Kontroll-Transfektion durchzuführen. Hierfür werden Kontroll-siRNAs verwendet, die in ihrer Sequenz keine signifikante Homologie zu einer Stelle des Genoms aufweisen. Damit kann kein spezifischer RNAi-Effekt auf das Gen-Produkt erzielt werden. Veränderungen nach Behandlung mit einer Kontroll-siRNA werden nicht auf das unterdrückte Protein zurückgeführt ("Whither RNAi", 2003).

Die Anwendbarkeit von RNAi mittels siRNA auf Säugerzellen, nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* wurde durch einige Experimente belegt und seitdem ist die RNAi ein wirkungsvolles Laborwerkzeug, um die Genexpression von Säugerzellen durch

eingeschleuste siRNA spezifisch zu inhibieren (Caplen et al., 2001, Elbashir et al., 2001a).

Bei Ovarialkarzinomen in Mäusen konnte das *in vivo* Tumorwachstum inhibiert werden, nachdem durch siRNA das Onkogen H-ras stillgelegt wurde (Yang et al., 2003). Hiermit wird der RNA-Interferenz als therapeutisches Konzept zur molekularen Hemmung des Wachstums von Tumoren in der Forschung ein hoher Stellenwert verliehen.

Vor diesem Hintergrund ist die Absicht der folgenden Versuche, den Einfluss der Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$  und EGF auf die MK-Expression darzustellen, sowie die funktionelle Rolle von MK in der Zellkultur von Pankreaskarzinomen in Hinsicht auf die Tumorpheriferation zu analysieren, indem es mittels RNAi herunterreguliert wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zelllinien

Für das *in vitro* Model eines exokrinen Pankreastumors wurden kommerziell erhältliche Zelllinien verwendet. Das Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie verfügt über den S1-Standard.

Die Pankreaszelllinie **PANC-1** aus der Gewebeprobe eines 56-Jahre alten Mannes kaukasischer Abstammung wurde 1975 von Lieber *et al.* etabliert. Histologisch ergab sich das Bild eines malignen undifferenzierten Tumors duktales Ursprungs. Die Zellen zeigen eine epitheliale Morphologie und wachsen als Monolayer in der Zellkultur. Sie sind groß und weisen einige multinukleäre Riesenzellen auf. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 52 Stunden (h) (Lieber *et al.*, 1975). Als Nährmedium für die PANC-1 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet. Dieses wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 200IU/ml Penicillin/Streptomycin versetzt.

Die Zelllinien PANC-1 wurden uns von der Universität Freiburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei den **BxPC-3** Zellen handelt es sich um eine Adenokarzinomzelllinie aus menschlichem Pankreasgewebe. Sie entstammt einer Biopsie einer 61-jährigen kaukasischen Frau, die an einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt war (Tan *et al.*, 1986). Für die BxPC-3 wurde Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) verwendet, welches ebenfalls mit 10% FCS und 200IU/ml Penicillin/Streptomycin bestückt wurde. Diese Zelllinie wurde von ATTC (American Type Culture Collection, Rockville, USA) bezogen.

## 3.2 Geräte, Materialien, Chemikalien

### 3.2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank 37°C, 5% CO <sub>2</sub>		Heraeus Instruments, Hanau
Filmkassette	x-ray cassette	rego, Augsburg
Gefrierschrank -20°C		Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C		Kryotec, Hamburg
Inkubator		Heraeus Instruments, Hanau
Kühlschrank +4°C		Linde, Unterschleißheim
Laufkammer		Bio-Rad, München
Magnetrührer	Ikamag RH	Jemke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader	MR 5000	DYNATECH, Rückersdorf
Mikroskop	Axiovert 40CFL	Zeiss, Oberkochen
Multichannel-Pipette	Finnpipette	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Pipetten	1000/200/100/20µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann, Eberstadt
SDS-Page Power Supply	PowerPac Universal	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Certomat MV	B. Braun Biotech International
Wärmebad	W6	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Wärmeschrank Zellkultur		Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 3.1 Liste der verwendeten Geräte

### 3.2.2 Materialien

Produkt	Modell	Hersteller
96-Loch-Platte		nunc, Langensfeld
Filterpapier	extra thick blot paper	Bio-Rad, München
Nitrozellulosemembran Trans Blot®	Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad, München
Pipettenspitzen, versch. Größen		Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	CellstarR	Falcon
Reaktionsgefäße, safe lock	0,1ml, 0,5 ml,	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Medical x-ray screen film	CEA, Hamburg
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )		BD Biocoat, Heidelberg
Zellkulturschalen	nunclon surface	nunc, Langensfeld
Zellschaber (Cell scraper)		nunc, Langensfeld

Tab. 3.2 Liste der verwendeten Produkte

### 3.2.3 Chemikalien

Produkt		Hersteller
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Medium	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
	DMEM	
	OptiMEM	
FCS	10%	
Penicillin/Streptomycin	200 IU/ml	
Trypsin	0,25% EDTA	
PBS PBS-T	Dilbecco's phosphate buffered saline Dilbecco's phosphate buffered saline+ Tween	
Trypanblau	Blue Stain 0,4%	
Gentamicin	10mg/ml	Biochrom AG, Berlin
GFP		Abcam, Cambridge, USA
Lipofectamine™		Invitrogen, Carlsbad, USA
Lyse Puffer	Ripa-Buffer und PIC (Protease-Inhibition-Cocktail)	PIERCE, Waltham, USA
Fettfreies Milchpulver	Blotting grade blocker non-fat dry milk	Bio-Rad, München
Tween 20		Serva, Heidelberg
Proteinstandard	Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad, München
Ladepuffer	Laemmli Sample Buffer	
Ponceau Rot	Ponceau S	Serva, Heidelberg
Blot Entwickler Substrat	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	PIERCE, Waltham, USA

BCA-Reagenz	Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit. Reducing Agent Compatible	PIERCE, Waltham, USA
Acrylamid	30%Acrylamid/Bis 37, 5:1	Bio-Rad, München
Tetramethylethylen-diamin	TEMED	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumperoxo-disulfat	APS	
Natriumdodecylsulfat	SDS	
MTT Reagenz	Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Fitchburg, USA
ELISA	Antigenix Human Midkine Super-X ELISA Kit	Antigenix AMERICA, New York, USA

Tab. 3.3 Liste der verwendeten Chemikalien

### 3.2.4 siRNA

RNA	Sequenz	Hersteller
anti-Midkine siRNA1	GGAGCCGACUGCAAGUACATT (21)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Sense	5'-[GGAGCCGACUGCAAGUACA]	
Antisense	5'-[UGUACUUGCAGUCGGCUCC]	
anti-Midkine siRNA2	CCGCGUCACCAAGCCCUGCTT (21)	
Kontroll-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT (21)	

Tab. 3.4 Liste der verwendeten siRNA

### 3.2.5 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
anti-Midkine Antikörper	Kaninchen	Abcam, Cambridge, USA
anti-Aktin Antikörper	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Aktin Antikörper	Maus	

anti-HRP Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-HRP Antikörper	Maus	

Tab. 3.5 Liste der verwendeten Antikörper

### 3.2.6 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Hersteller
TNF- $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
EGF	

Tab. 3.6 Liste der verwendeten Wachstumsfaktoren

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank unter keimarmen Bedingungen durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Um die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumswechsel vorgenommen. Hierzu wurde das Medium mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Vor jedem Wechsel wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf Konfluenz, eventuelle Kontamination und Wachstumsentwicklung überprüft.

Die Kulturmedien wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor Gebrauch einige Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (175cm<sup>2</sup>) unter Zugabe des verwendeten Mediums ausgesät und dann in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.3.2 Passagieren der Zellen

Erreichen Zellen in der Kulturflasche maximale Konfluenz, kommt es zur kontaktinduzierten Wachstumshemmung. Die Zellen teilen sich nicht mehr und sterben



ab. Deshalb wurden die Zellen bei hoher Konfluenzdichte in bestimmter Verdünnung auf ein neues Kulturgefäß überführt. Sobald die Zellen den Boden der Zellkulturflasche 80-90% konfluent besiedelten, erfolgte eine Subkultivierung. Zunächst wurde das Medium oberhalb des Zellrasens abgesaugt und die Kultur mit 10ml PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit 2ml Trypsin-EDTA bestückt. Trypsin ist ein Enzym, welches extrazelluläre Proteine spaltet und somit ein Ablösen der kultivierten Zellen vom Flaschenboden bewirkt. Die Flaschen wurden für einige Minuten im Brutschrank inkubiert, damit das Enzym wirken kann. Hierbei wurden die Zellen aus ihrem Monolayer gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und durch Klopfen auf die Flasche beschleunigt oder das Lösen mit einem Zellschaber vorgenommen. Nach vollständiger Ablösung der Zellen vom Flaschenboden und aus dem Zellverband wurde der Aufspaltungsprozess durch Zugabe von FCS-haltigem Nährmedium unterbrochen, da FCS Trypsin inhibiert. Der Flaschenboden wurde mit der Pipette mehrmals abgespült und die Suspension durchmischt. 3ml der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und mit frischem Nährmedium auf 15ml aufgefüllt.

#### **3.3.3 Einfrieren der Zellen**

Für die Langzeitlagerung wurden adhärent wachsende Zellen gewaschen, mit 2ml Trypsin abgelöst und mit Medium aufgefüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 10ml resultierte. Mit der Pipette wurde die Suspension durchmischt, vollständig abpipettiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 5000rpm (rounds per minute) 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und das Pellet in Einfriermedium Glycerin und Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Die Suspension wurde schließlich in ein Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C für 24 Stunden eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff zur Langzeitaufbewahrung eingefroren.

Zur Wiederverwendung in der Zellkultur wurden die Zellen zum Auftauen in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und dann in eine Kulturflasche mit 10ml Medium gegeben. Wegen der toxischen Wirkung von DMSO auf die Zellen wurde nach einem Tag ein Mediumswechsel vorgenommen.

### 3.3.4 Zellzahlbestimmung

100µl Zellsuspension wurden 100µl Trypanblau (0,4%) zugesetzt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Der Farbstoff ist nur für Membranen avitaler Zellen durchlässig und färbt diese isoliert blau an, vitale Zellen werden nicht angefärbt und somit kann die Anzahl vitaler Zellen durch Auszählen bestimmt werden. Die Zählung erfolgte unter dem Mikroskop, danach die Berechnung der Zellkonzentration pro Milliliter. Es wurden mindestens vier Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

## 3.4 Zytokinstimulation

### 3.4.1 Zellaussaat

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA gelöst und die Suspension nach dem Ablösen der Zellen mit FCS-haltigem Medium neutralisiert. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Berechnung des Suspensionsvolumens, welches  $2,5 \times 10^5$  Zellen enthält. Die errechnete Menge wurde dann in die Kavitäten einer 12-Loch-Makroplatte gegeben und mit serumhaltigem Medium auf 2ml aufgefüllt, um ein gutes Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Die Platte wurde für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.4.2 Behandlung mit TNF- $\alpha$ und EGF

16 Stunden nach Aussaat wurde das Medium abgesogen und die Zellschichten wurden mit 1ml serumfreiem Medium vorsichtig drei Mal gespült, um die Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die Stimulation durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und EGF durch den Einfluss von FCS auf die Zellen überlagert wird.

Für die Stimulation wurden 2ml Medium und 0,2µl der Stammlösung des jeweiligen Wachstumsfaktors in die Kavitäten der Makroplatte gegeben, sodass eine Konzentration

von 10ng/ml der Stimulanz resultierte. Je eine Kavität pro Zelllinie wurde mit 10%-FCS haltigem Medium bestückt, dies diente der Kontrolle, da Zellen einer Zellkultur zum Überleben und zum Wachsen FCS benötigen, andererseits wird auch von einem Effekt durch FCS auf die MK-Sekretion ausgegangen. Eine Kavität wurde pro Versuchsreihe mit serumfreiem Medium aufgefüllt und zusätzlich mit 0,2µl PBS, welches als Lösungsmittel der Zytokine verwendet wurde, bestückt. Dies diente ebenfalls der Kontrolle, dass das Lösungsmittel und das Medium keinen Einfluss auf die Proliferation haben. Die anderen beiden Versuchsreihen wurden mit TNF- $\alpha$  oder EGF versetzt.

#### **3.4.3 Gewinnung von Zellkulturüberständen zur Bestimmung von MK**

Nach der Zugabe der Wachstumsfaktoren oder FCS bzw. nach Vorbereitung der Kontrollzellen wurden die Zellen im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Gewinnung des Nährmediums erfolgte an vier Zeitpunkten nach Zugabe der Wachstumsfaktoren (0-Punkt, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden). Die konditionierten Medien wurden in Eppendorf-Röhrchen gefüllt und für fünf Minuten bei 1200rpm zentrifugiert, damit sich abgelöste Zellen und Zellreste am Boden absetzen. Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt und bei -20°C bis zur Weiterverwendung für die MK-Bestimmung im ELISA eingefroren.

#### **3.4.4 ELISA**

##### **3.4.4.1 Prinzip**

Zur Bestimmung der Midkine-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay durchgeführt. Wir verwendeten das Human Midkine „Super X“ ELISA Kit von Antigenix America entsprechend der Anleitung des Herstellers. Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Mittels zweier Antikörper erfolgt die Detektion des zu bestimmenden Proteins (hier Midkine). Der primäre Antikörper ist ein gegen MK spezifischer Antikörper, der chemisch an die ELISA-Mikrotiterplatte gebunden ist. Bestückt man die Platte mit der Probe, die eine unbestimmte Proteinkonzentration enthält, bindet MK nach einer Inkubationszeit an den

primären Antikörper. Damit erfolgt die Fixierung an die Mikrotiterplatte. Durch eine anschließende Waschung werden die ungebundenen, in Lösung verbliebenen Bestandteile der Probe entfernt. Nun wird die Zugabe des sekundären Antikörpers, ebenfalls ein gegen humanes Midkine gerichteter Detektionsantikörper, vorgenommen. Dieser erkennt ein anderes Epitop von MK als der primäre Antikörper und hat an seinem Ende ein Enzym, eine Meerrettichperoxidase, gebunden. Dieser Sekundärantikörper kann während der Inkubation an den fixierten Immunkomplex (MK mit Primärantikörper) binden. Ein erneuter Waschvorgang entfernt den überschüssigen Detektionsantikörper von der Platte. Im nächsten Schritt erfolgt die Detektion von MK durch die Zugabe eines zu der Meerrettichperoxidase passenden Substrates. Dieses wird in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt und eine Stopplösung beendet die Reaktion. Der Farbumschlag wird daraufhin photometrisch bei 450nm gemessen. Die Absorption ist dabei proportional zu der Konzentration von MK. Zur quantitativen Bestimmung dient eine Standardkurve, bei der eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen aufgetragen wurde. Die MK-Konzentration der verwendeten Probe kann mittels der Standardkurve errechnet werden (Muramatsu et al., 1996).

#### **3.4.4.2 ELISA Durchführung**

Die Reagenzien und die Standardreihe wurden nach Anleitung vorbereitet. Von den Überständen wurden 25µl für die Doppelbestimmung jeweils mit 225µl Verdünnungspuffer (50ml PBS, 50mg BSA (Bovine Serum Albumin) und 10µl TWEEN-20) hergestellt, dann 1:10 verdünnt und in die Kavitäten der ELISA-Platte gefüllt. Die Platte wurde anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 500rpm inkubiert. Danach erfolgte die fünfmalige Waschung mit Waschpuffer (PBS-T) pro Kavität. Der Antikörper (100µl) wurde hinzupipettiert und die Platte erneut für zwei Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erneut sechsmalig mit dem Waschpuffer gewaschen und daraufhin je Kavität 100µl Streptavidin zugefügt. Streptavidin ist ein Protein, das verwendet wird, um die Enzymaktivität der Meerrettichperoxidase anzuregen. Dieser Reaktionsschritt wurde 30 Minuten bei RT und 500rpm auf dem Schüttler inkubiert und danach sechs Mal gewaschen. Nun wurden pro Kavität 100µl Substrat hinzugefügt und für einen Zeitraum von 10 Minuten in einem abgedunkelten Raum bei RT ruhen gelassen. Die

Reaktion wurde mit 100µl Stopp-Lösung beendet und daraufhin der Farbumschlag mittels ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

## 3.5 Depletion von Midkine durch RNA-Interferenz

### 3.5.1 Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit siRNA

Die nachstehende RNA-Interferenz wurde an nativen PANC-1 und BxPC-3 Zellen durchgeführt und ist unabhängig von der zuvor beschriebenen Messung von MK nach Zugabe der Wachstumsfaktoren.

Um die siRNA in die Zelle einzuschleusen, haben wir als Transfektionsmethode die sogenannte Lipofektion durchgeführt. Hierbei wird die siRNA in Liposomen verpackt, die dann mit der Membran der Zielzelle fusionieren, sodass die Nukleinsäuren in die Zelle gelangen. Die Lipofektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) besteht aus kationischen Lipiden, die spontan mit der negativ geladenen RNA einen Komplex bilden. Die Komplexe binden an die Zelloberfläche, fusionieren mit der Zellmembran oder werden endozytotisch aufgenommen und transportieren so die siRNA ins Zytoplasma. Die siRNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Es wurden die in Tab. 3.4 aufgelisteten siRNAs verwendet. Es wurden mit der siRNA1 und der siRNA2 zwei spezifische Sequenzen zu dem humanen MK-Gen gewählt, die Kontroll-siRNA weist keinen Bezug zu der Gensequenz auf und ist somit in der spezifischen Depletion von MK unwirksam. Die gelieferte siRNA wurde in Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100µM eingestellt. Die rekonstituierte siRNA wurde bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Zellen auf eine 6-Loch-Platte ausgesät und 24-48 Stunden inkubiert, sodass sie adhärieren und eine ausreichende Konfluenz von 80-90% erreichen konnten. Wir stellten ein Gemisch von 10µl Lipofectamine und 200µmol Kontroll-siRNA oder 200µmol siRNA1 nach Anleitung des Herstellers in OptiMEM-Medium zusammen, welches wir mit GFP (Green Fluorescent Protein) versetzten, um die Effizienz der Transfektion fluoreszenzmikroskopisch überprüfen zu

können. GFP ist ein Protein, das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt und das bei Anregung mit blauem oder UV-Licht grün leuchtet (Shimomura, 2005). Somit kann nach 24 Stunden die intrazelluläre Fluoreszenz mittels UV-Licht überprüft werden. Das Lipofectamine-siRNA-Gemisch wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, die daraufhin für vier bis fünf Stunden im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit dem zuvor in der Kultur verwendeten Medium versetzt. Wir gewannen Proben des Mediums in 24-stündigen Abständen, die wir zur Analyse der Sekretion von Midkine verwendeten. Nach 72 Stunden wurden die Zellen gewonnen. Sie wurden in Anteilen für den MTT-Test verwendet oder für die Proteinbestimmung verarbeitet.

In unserer Forschungsgruppe war die Methode der RNA-Interferenz mit der Transfektionsreagenz Lipofectamine bereits etabliert und wurde standardmäßig angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren jedoch weiterentwickelt und modifiziert. Für die kommerziellen Pankreastumorzellen PANC-1 und BxPC-3 musste für die Versuche noch eine Titration zur Bestimmung der optimalen Behandlungsdosis und Dauer erfolgen. Um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen, wurden daraufhin verschiedene experimentelle Parameter untersucht und im Anschluss der Einfluss auf die relative Expression der MK-mRNA bzw. dessen Proteinprodukt überprüft. Dabei wurde sich an dem Protokoll der Firma Invitrogen orientiert. Anhand der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 wurden zwei verschiedene gegen MK gerichtete siRNAs in verschiedenen Konzentrationen verwendet und die Ergebnisse wurden mit der Kontroll-siRNA verglichen. Um eine Verbesserung der Effizienz zu erzielen, wurde ebenfalls eine Kombination beider siRNAs transfiziert, um zu untersuchen, ob ein besseres Ergebnis erzielt werden konnte. Zudem wurden die Lipofectamine-Konzentrationen, die Zelldichte und die Kulturdauer nach Transfektion variiert. Die effektivste Kombination aller Parameter ist im Teil Material und Methoden aufgeführt (3.5.1) und wurde als Standardprotokoll verwendet.

Wir haben in diesem Teil der Arbeit die Auswertung der Ergebnisse mit dem Western Blot durchgeführt. Da bei den Experimenten nur eine deutlich qualitative Depletion von MK für die Proliferationsuntersuchung weiterverwendet wurde, schien eine genaue

Nuancierung der Konzentration nicht relevant. Diese ist mit einem Western Blot nicht durchführbar. Ein Vorteil der Methode ist, dass durch die Gelelektrophorese die Antigene an verschiedenen, definierten Orten zur Verfügung stehen und dadurch mehrere Antigene einer Untersuchung zugänglich sind. Zudem ist diese Methode kostengünstig in der Durchführung. Der Nachteil, dass der Western Blot ein qualitatives bis semi-quantitatives Nachweisverfahren ist, wurde dabei akzeptiert.

#### 3.5.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test und wurde nach dem gelben Farbstoff Tetrazoliumsalz [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] benannt. Der Test beruht auf einer kalorimetrischen Reaktion, bei der mitochondriale Dehydrogenasen in biologischen Systemen das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT in blaues, wasserunlösliches Formazan quantitativ umsetzen (Mosmann, 1983).

Die zu untersuchenden Zellen werden *in vitro* mit dem Substrat behandelt, um nach einer Inkubation den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe der Zellen zu messen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Farbumschlag bei 490nm photometrisch gemessen. Die Absorption ergibt einen Wert, der proportional zur Zellzahl steht. Dadurch kann objektiv auf ihre Vitalität rückgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde der MTT-Test genutzt, um bei den transfizierten Zellen, bei denen die Expression von Midkine ausgeschaltet wurde, eine reduzierte Zellproliferation nachzuweisen.

Die transfizierten Zellen wurden von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst, vereinzelt und so verdünnt, dass eine Konzentration von  $50 \times 10^6$  Zellen/ml resultierte. Je 100µl der Zellsuspension wurde in vierfacher Ausführung in die gewünschte Anzahl von 96-Loch-Platten gefüllt. Dabei wurde für jeden Zeitpunkt der Messung eine Platte bestückt, je nach Zellzyklus der zu untersuchenden Zellen. Wir wählten fünf Zeitpunkte: Ausgangspunkt (0-Punkt), 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden. Bis zu der Messung wurden die Zellen im Wärmeschrank inkubiert. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. In jede Kavität der Platte wurden 20µl des Reagenz gefüllt. Eine Kavität wurde mit 100µl Medium ohne Zellen befüllt, um später die

Hintergrundsabsorption von den übrigen Werten abziehen zu können. Die Platte wurde für zwei Stunden in den Wärmeschrank gelegt, im Anschluss folgte die Absorptionsmessung mit dem Microplate reader bei 490nm. Um eventuelle Ungenauigkeiten auszugleichen, wurde der Mittelwert aus der vierfachen Bestimmung errechnet. Der Leerwert wurde subtrahiert. Damit sollte die Hintergrundsabsorption ausgeglichen werden, die durch das Nährmedium erzeugt wird. Die erhaltenen Werte sind direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen im Experiment.

Für die verschiedenen siRNAs wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des Experimentes zu belegen.

## 3.6 Proteinbiochemische Methoden

Die folgenden Methoden dienen der Analyse der MK-Expression in der verwendeten Zelllinie. Die transfizierten Zellen wurden lysiert, um die Proteine der Zelle zu gewinnen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen. Auf dieser Membran können die Proteinbanden immunologisch sichtbar gemacht werden.

### 3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus adhärennten Zellen

Bei der Herstellung von Proteinlysaten wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt, um einer Proteolyse vorzubeugen. Die transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium in Suspension gebracht und von der Zellkulturplatte abspült. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und fünf Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände abpipettiert, die Gefäße mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert, um ein festes Pellet zu erhalten. Das PBS wurde abgesogen und das Pellet, je nach Größe, mit 80-150µl Lysis-Puffer bestehend aus RIPA-Puffer (Radio Immunoprecipitation Assay) und PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten erfolgte eine Zentrifugation von 20 Minuten mit 14.000rpm bei 4°C. Im Überstand waren nun die wasserlöslichen Proteinlysate enthalten und der Überstand



wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Alle unlöslichen Proteine wurden im Pellet gesammelt, welches verworfen wurde.

#### **3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um SDS-PAGE Gele (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) mit definierten Proteinkonzentrationen beladen zu können, wurden die Proteinlysate mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers bei 490nm photometrisch gemessen und quantifiziert.

#### **3.6.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) auf und basiert auf der Theorie, dass die Mobilität der Moleküle in einem elektrischen Feld proportional zum Verhältnis von Ladung und Masse ist. Die Proteine binden dabei die Seife SDS und bilden negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Die Ladung der Komplexe hat dabei ein konstantes Verhältnis zur Masse. SDS denaturiert die Proteine und unterbindet damit die Bildung von Quartärstrukturen. Die SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wirkt das Polyacrylamid nach dessen Quervernetzung wie ein Molekularsieb und trennt die Proteinkomplexe nach ihrem hydrodynamischen Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Laemmli, 1970).

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird eine höhere Trennschärfe erreicht, indem ein grobporiges Sammelgel über ein engporiges Trenngel geschichtet wird. Die Herstellung der Sammelgele erfolgte aus 5%igem Acrylamid und dem Puffer Tetraethylenthylendiamid (TEMED, pH=6,8). Für das Trenngel wurden 12%iges Acrylamid und TEMED mit einem pH von 8,8 verwendet. Die Zugabe von TEMED löst die Vernetzung und damit die Porenbildung aus, deren Größe von der jeweiligen Acrylamid-Konzentration abhängig ist. Für die Auftrennung nach Größe müssen die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen. Diese kann durch Laemmli-Puffer erreicht werden, indem das errechnete Volumen der Proteinlysate mit dem Puffer aufgefüllt

wird und fünf Minuten bei 99,9°C erhitzt wird. Danach erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 4°C und mit 14.000rpm. Im gleichen Sinne wurde mit den Überständen der transfizierten Zellen vorgegangen, da Midkine ein Protein ist, welches sezerniert wird und somit auch extrazellulär anzufinden ist. Die SDS-Page wurde mit dem Mini Protean 3 Electrophoresis System durchgeführt. Die Taschen der Gele wurden nach der Proteinmessung entsprechend mit 20µl-30µl der Proben bestückt. Der Farbstoff Bromphenol des Laemmli-Puffers dient der visuellen Kontrolle. Des Weiteren kann man durch die Zugabe erkennen, wie weit die Proteine im Gel gewandert sind, da der Farbstoff ein sehr kleines Molekül ist und somit die Lauffront anführt. In jeweils eine Tasche pro Gel wurde 7µl Protein-Standard (Precision Plus Protein Standards Dual Color) pipettiert. Der Standard trennt sich in Banden auf, deren Molekulargewicht bekannt ist und die farblich sichtbar werden. Anhand dieser Banden kann auf die Größe des untersuchten Proteins zurückgeschlossen werden. Die Elektrophorese erfolgte nun bei 15mA, bis die Proteine das Sammelgel durchlaufen haben. Dann wurde eine Stromstärke von 30mA angelegt, unter der die Proteine das Trenngel durchwanderten.

#### 3.6.4 Western Blot

Die Proteine des SDS-Gels wurden mittels Elektrophorese auf eine adsorbierende PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Die hydrophobe PVDF-Membran eignet sich zum immunologischen Nachweis der Proteine, da sie mechanisch und chemisch stabil ist (Renart et al., 1979, Burnette, 1981). Es wurde das Semi-Dry-Blotting-Verfahren angewandt (Lane et al., 1992). Hierbei werden die Proteine aus der Gelmatrix auf eine Membran übertragen, indem ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung der Proteine angelegt wird. Diese sind dann auf der Membran gebunden.

In die Blotkammer wird zunächst ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier gelegt und darauf die PVDF-Membran geschichtet. Die PVDF-Membran wurde zuerst in Methanol gequell, da sie trocken nicht von wässrigen Lösungen benetzt wird. Das Gel wurde so auf der Membran platziert, dass keine Luftblasen verbleiben, da diese sonst eine Übertragung der Banden behindern würden. Ein weiteres getränktes Whatman-Papier rahmte das Gel und die Membran beidseitig ein. Das obere Papier

wurde von einer Seite zur anderen ausgestrichen, um Luftblasen zu entfernen. An diese Halbtrockenzelle wurde dann in der Blotkammer eine Stunde eine Spannung von 100V angelegt, um den elektrophoretischen Transfer durchzuführen.

#### **3.6.4.1 Proteinfärbung**

Zur Überprüfung der gleichmäßigen und erfolgreichen Übertragung wurde die Membran im Anschluss mit dem Azofarbstoff Ponceau S inkubiert. Der Farbstoff geht eine reversible Bindung mit den Aminosäuren der Proteine ein und behindert eine anschließende Immundetektion nicht. Im Anschluss wurde der Farbstoff mit PBS+ 0,1% Tween (PBS-T) ausgewaschen.

#### **3.6.4.2 Blocken**

Vor Zugabe des spezifischen Antikörpers auf die Membran wurden die restlichen freien Proteinbindungsstellen mit Milch, hergestellt aus 5%igem entfetteten Milchpulver, abgesättigt und für eine Stunde bei RT inkubiert. So bindet der Antikörper nur an das Zielprotein und geht keine unspezifische Bindung mit der Membran ein. Eine störende Hintergrunddetektion wird damit minimiert.

#### **3.6.4.3 Immundetektion**

Proteine, die auf eine Membran geblottet wurden, lassen sich mit Antikörpern anfärben. An die Antikörper sind Peroxidasen gebunden, welche die Oxidation von Luminol katalysieren und eine Chemolumineszenzreaktion auslösen, bei der Energie in Form von Licht abgegeben wird. Röntgenfilme können in kurzen Expositionszeiten von dieser Emission belichtet werden. Damit wird die Position des Antigens auf der Membran sichtbar und die Menge quantifizierbar. Der gegen MK gerichtete primäre Antikörper (rb anti-MK) wurde in 5%iger fettfreier Milch im Verhältnis 1:500 gelöst und bis zur Verwendung bei +4°C gelagert. Über Nacht wurde die Membran auf dem Schüttler bei +4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde ein dreistufiger Waschvorgang mit PBS-T vorgenommen. Nun wurde ein sekundärer, mit Meerrettich-Peroxidase markierter Antikörper (2nd rb-HRP) im Verhältnis 1:3000 verdünnt und für zwei Stunden auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation wurde der überschüssige sekundäre Antikörper ebenfalls dreimalig mit PBS-T abgewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurde der Blot entwickelt.

#### 3.6.4.4 Detektion

Im Anschluss an den letzten Waschschrift können die Banden mit Hilfe der ECL-Reaktion (Super Signal West Dur Extended Duration Substrate) nach Herstellerangaben dargestellt werden. In der Dunkelkammer wurde die Membran mit ECL-Substrat bestückt und in eine Plastikfolie verpackt. Die Röntgenfilme wurden mit unterschiedlicher Belichtungszeit (10 Sekunden bis 10 Minuten) auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt. Die Expositionszeit wurde der Signalstärke angepasst. Nach der Entwicklung erfolgte die Übertragung des Proteinstandards. Dies diente der Zuordnung der Proteinbanden zum spezifischen Molekulargewicht.

#### 3.6.4.5 Entfernung gebundener Antikörper von der PVDF-Membran (Stripping)

Ein gleichmäßiges  $\beta$ -Aktin-Signal dient zur Kontrolle, sodass nahezu identische Mengen an Protein aufgetragen wurden und eine Bandenvarianz nicht durch unterschiedliche Beladung hervorgerufen wurde.  $\beta$ -Aktin stellt ein Strukturprotein aus dem Zytoskelett eukaryontischer Zellen dar. Es wird in der Wissenschaft als Referenzgen oder auch als House-Keeping-Gen bezeichnet, da es in der Zelle ubiquitär vorkommt und durch experimentelle Faktoren in seiner Expression nicht beeinflusst wird. Es wird somit als Standard bei der relativen Quantifizierung von Proteinen verwendet (Bustin, 2000, Bustin und Nolan, 2004, Bruge et al., 2011). Die Menge an Aktin sollte somit zwischen den untersuchten Proben nicht variieren. In den aufgeführten Versuchen wurde sichergestellt, dass zwischen der siRNA und der Kontroll-siRNA keine signifikanten Abweichungen der  $\beta$ -Aktin-Expression auftraten (Abb. 4.4-Abb. 4.11).

Um eine Ladekontrolle mittels Aktin durchführen zu können, müssen die verwendeten Antikörper zunächst von der Membran entfernt werden. Hierzu wurde ein Stripping-Puffer (Restore Western Blot Stripping Buffer) auf die Membran gegeben und zweimal 20 Minuten auf dem Schüttler bei RT gewaschen. Nach gleichem Vorgehen wie bei der Detektion von Midkine wurde ein Antikörper gegen Aktin verwendet.

### 3.7 Auswertung

Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Scanner digitalisiert. Mit Hilfe des Programms ImageJ 1.44 für Macintosh (National Institutes of Health, Maryland, USA) wurde die Bandendichte densitometrisch (Farbmenge pro Flächeneinheit) gemessen und ausgewertet. Dabei wurde die jeweilige Kontrolle als 100% gesetzt und die Ergebnisse der jeweiligen Messungen daran normiert.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse sind als Mittelwerte (MV, mean value)  $\pm$  Standardabweichung (SD) des Mittelwertes einer bestimmten Anzahl (n) von Experimenten angegeben. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms Numbers (iwork 09, Apple Inc., Kalifornien, USA).

Der Vergleich der Daten zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe wurde mit dem T-Test errechnet. Hierbei wurde das Programm Statistical Package for Social Siences (SPSS<sup>®</sup>) für Macintosh Version 19.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc., Chigaco, Illinois, USA) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) in zweiseitigen Tests gesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$ und EGF stimulieren die MK-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Die MK-Konzentrationen im Zellkulturmedium wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden nach Zugabe von TNF- $\alpha$  und EGF gemessen. Wir wählten für diese Untersuchung konstante Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und setzten die Zeit als variablen Faktor. Es zeigte sich zunächst ein Anstieg der MK-Konzentration über 72 Stunden. Die Messungen 96 Stunden nach Stimulation zeigten für alle Stimulanzen der Versuchsreihe wieder abfallende Konzentrationen und sind hier nicht aufgeführt.

In Abb. 4.1 findet sich die grafische Darstellung der Messung von zwei unabhängigen Versuchen. Die jeweiligen Proben wurden in einer Doppelbestimmung gemessen. Die Graphen der vier Versuchsreihen zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Zum Ausgangszeitpunkt 0h konnten in den Überständen bereits kleine Mengen an MK detektiert werden, beim Serumentzug wurde eine Konzentration von 2,57ng/ml, FCS 2,1ng/ml, TNF- $\alpha$  2,48ng/ml und EGF 3,03ng/ml ermittelt. Die beiden Kontrollen mit FCS und Serumentzug geben einen kontinuierlich ansteigenden Kurvenverlauf über die 72-stündige Laufzeit wieder, wobei unter FCS-Zugabe bei allen vier Messzeitpunkten eine höhere MK-Konzentration in den Überständen detektiert wurde als unter dem Serumentzug. Zudem zeigt die FCS-Kurve einen steileren Anstieg. Unter Zugabe von TNF- $\alpha$  und EGF nehmen die Graphen einen wechselnden Verlauf an. TNF- $\alpha$  führt zunächst zu einem Anstieg der MK-Konzentration auf 35,5ng/ml zum Zeitpunkt 24h. In den weiteren 24 Stunden kam es zu einer minimalen Zunahme der MK-Konzentration auf 37,13ng/ml. Nach 72h lag die gemessene MK-Konzentration bei 58,22ng/ml. Nach Zugabe von EGF wurde der steilste Kurvenverlauf nach 24h verzeichnet, hier wurde eine Konzentration von 47,74ng/ml ermittelt. Zum Zeitpunkt 48h war das Maximum an

MK mit 63,92ng/ml erreicht. Im weiteren Messintervall sank die MK-Konzentration auf 37,02ng/ml und stellt mit diesem Wert einen abfallenden Kurvenverlauf dar.

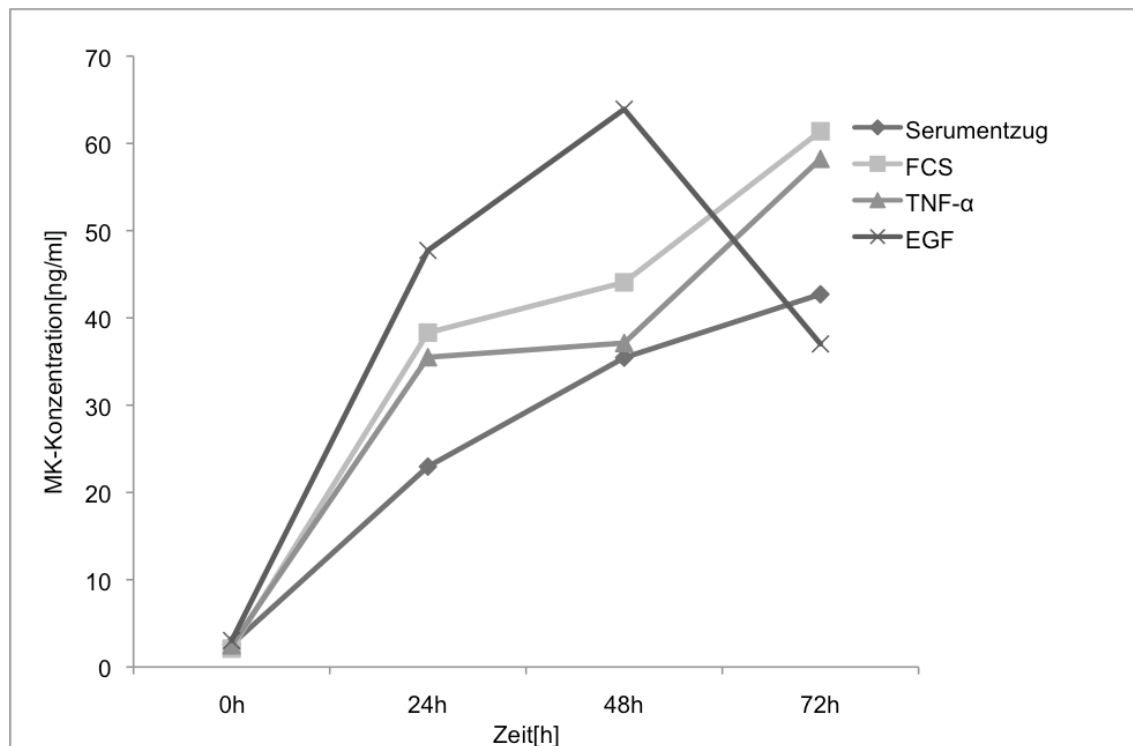


Abb. 4.1 **MK-Expression nach Serumentzug und Zugabe von FCS, TNF- $\alpha$  und EGF im Zellkulturüberstand:** Die Zellen wurden 72 Stunden ohne Behandlung, mit FCS, TNF- $\alpha$  oder EGF inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden in Abständen von 24 Stunden gewonnen und die MK-Konzentration mittels ELISA gemessen. Die Kurvenverläufe der beiden Kontrollen mit Serumentzug und mit FCS ergeben einen linearen Anstieg der MK-Konzentration. TNF- $\alpha$  und EGF zeigen einen wechselnden Verlauf. Es wurde eine zweifache Bestimmung der Proben durchgeführt. Es sind zwei unabhängige Versuche dargestellt.

In Abb. 4.2 werden zwei interessante Ergebnisse als Auszug der Stimulationsreihe präsentiert. Die Abb. 4.2a zeigt den Vergleich zwischen EGF und Serumentzug zum Messzeitpunkt nach 48 Stunden. Hier stellt sich das Konzentrationsmaximum von MK nach Zugabe von EGF mit 63,92ng/ml ein. Die Kontrollgruppe erreicht eine Konzentration von 35,45ng/ml. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Zellen und unbehandelten Zellen besteht ( $p=0,007$ ). Zu diesem Messzeitpunkt gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und TNF- $\alpha$  ( $p=0,5$ ) und wird hier nicht gesondert dargestellt. In Abb. 4.2b wird ein Vergleich zwischen der Kontroll-Zellreihe und der TNF- $\alpha$  Zellreihe nach 72h dargestellt. Der Serumentzug weist eine MK-Konzentration von 42,71ng/ml auf, während nach Zugabe von TNF- $\alpha$  die MK-

Konzentration bei 58,23ng/ml liegt und somit einen signifikanten Unterschied aufweist ( $p=0,042$ ). EGF zeigt nach 72h keinen signifikanten Unterschied zum Serumentzug ( $p=0,12$ ). Der Vergleich wird in Abb. 4.2 ebenfalls nicht aufgeführt.

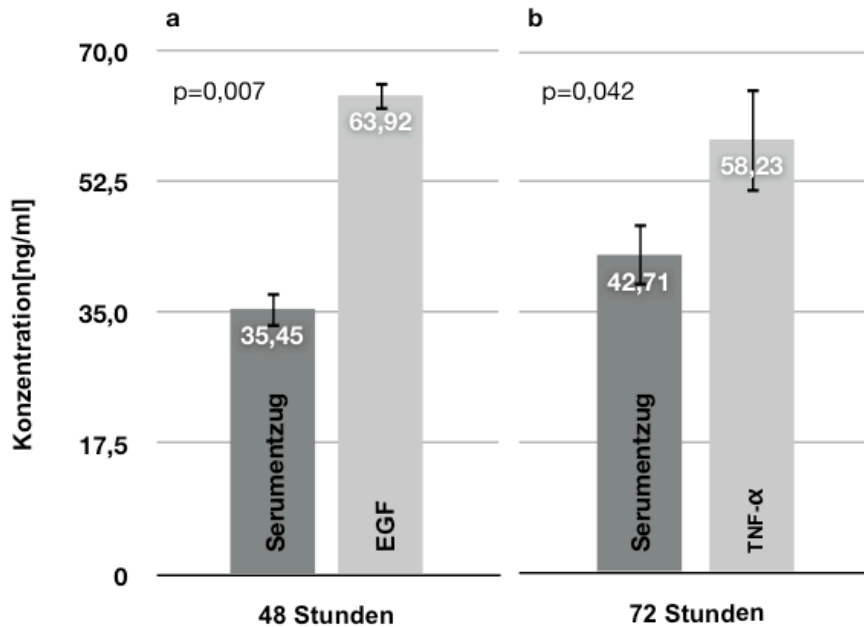


Abb. 4.2a+b **Vergleich der MK-Konzentrationen im Zellkulturüberstand:** In Abb. a wird 48 Stunden nach Zugabe von EGF eine Konzentration von 63,92ng/ml gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle (Serumentzug), deren MK-Konzentration bei 35,45ng/ml liegt, ist ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ( $p=0,007$ ). In Abb. b ist 72 Stunden nach Zugabe von TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle (Serumentzug) ein signifikanter Unterschied der MK-Konzentration (42,71ng/ml zu 58,23ng/ml) detektierbar ( $p=0,042$ ).

## 4.2 Die siRNA-vermittelte Midkine-Depletion in Pankreaskarzinomzellen

Der Effekt der siRNA-vermittelten Depletion von MK wurde mittels Western Blot in den Zelllysaten und Zellkulturüberständen der Zelllinien PANC-1 und BxPC-3 gemessen. Bei der Auswertung mittels Western Blot zeigte sich in allen Versuchen eine deutliche Bande im Bereich von 15kDa des Standards, welches dem Molekulargewicht (MW) von Midkine (13kDa) entspricht und weshalb davon ausgegangen werden kann,



dass der Antikörper MK-spezifisch ist. Wir haben an 20 Zellkulturen eine Transfektion durchgeführt, bei allen Versuchen zeigte sich eine positive GFP-Kontrolle. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich ein deutliches Leuchten der Zellen. Die beobachtete Intensität der Fluoreszenz unterschied sich zwischen den einzelnen Zellen minimal. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die transfizierte siRNA in gleichem Maße in die Zellen aufgenommen wurde.

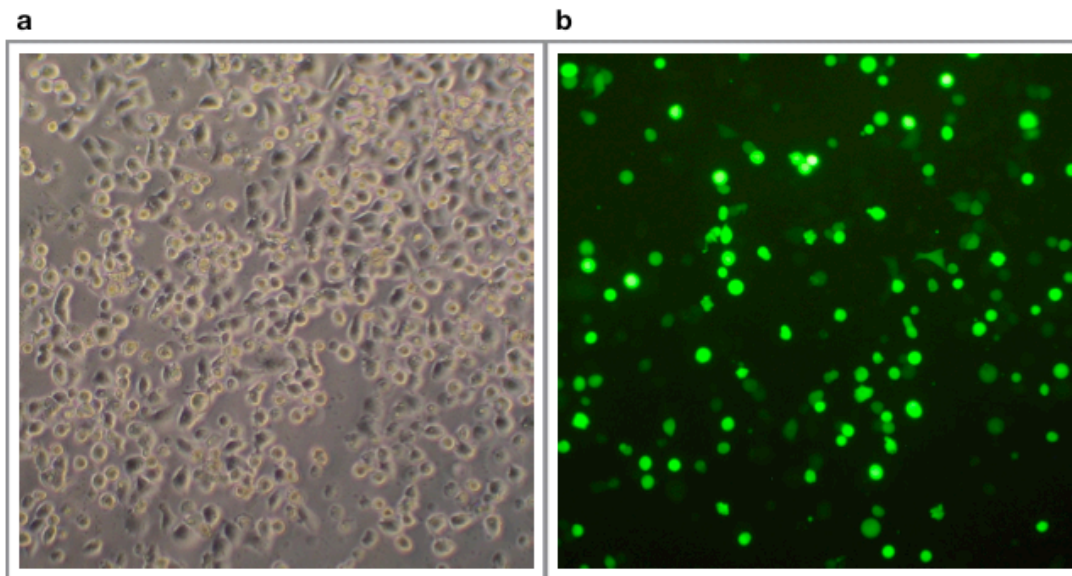


Abb. 4.3a+b **Zellkultur PANC-1**: Abb. a zeigt die konfluent wachsenden Zellen nach Transfektion mit siRNA1 und Abb. b stellt die fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Effektivität der Transfektion mittels GFP dar.

### 4.2.1 Etablierung des Transfektionsprotokolls

Die PANC-1 Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz und 200µmol siRNA1 oder siRNA2 und 400µmol siRNA1 oder siRNA2 sowie einem Gemisch aus je 200µmol siRNA1+siRNA2 behandelt und 48 Stunden inkubiert (Abb. 4.4). Alle Versuchsbedingungen zeigten eine sichtbare Reduktion der detektierten Banden von ungefähr 60% im Vergleich zu der Kontroll-siRNA. Die Verwendung der siRNA2 sowie einer Kombination der beiden siRNAs brachte bei den Versuchen keine zusätzliche Verminderung des Proteinsignals in den Zelllysaten und Zellkulturüberständen (Abb. 4.5).

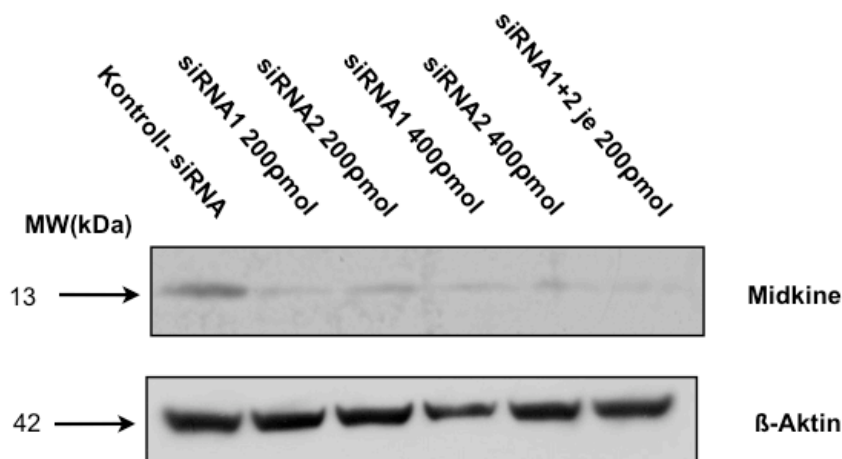


Abb. 4.4 **Western Blot der MK-Expression nach siRNA-Transfektion von PANC-1:** Zur Etablierung einer optimalen Transfektionseffizienz wurden Zellen mit einem Gemisch von 10 $\mu$ l Lipofectamine+ 200 $\mu$ mol Kontroll-siRNA, 200 $\mu$ mol oder 400 $\mu$ mol siRNA1, 200 $\mu$ mol oder 400 $\mu$ mol siRNA2 oder einem Gemisch aus je 200 $\mu$ mol siRNA1 und siRNA2 behandelt. Die MK-Banden mit einem Molekulargewicht (MW) von 13kDa befinden sich auf Höhe der Standardbande mit einem MW von 15kDa, die  $\beta$ -Aktin-Bande war zwischen den Standardbanden mit einem MW von 37 und 50kDa positioniert.

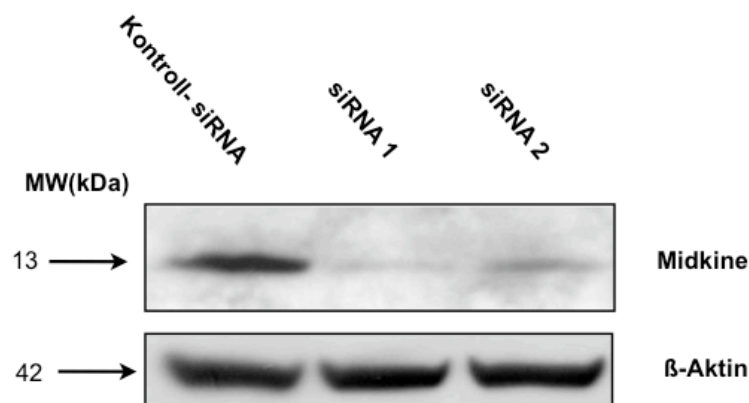


Abb. 4.5 **Vergleich der beiden verwendeten siRNAs gegen MK bei PANC-1:** Die MK-Bande der siRNA1 ist im Vergleich zu der Kontroll-siRNA deutlich vermindert. Auch die Bande der siRNA2 ist im Bezug zur Kontroll-siRNA schmäler, allerdings in geringerem Ausmaß als die siRNA1. Das weist eine deutlich verminderte Expression des Proteins bei der Transfektion gegenüber der Kontroll-siRNA nach.

Die Daten des Western Blots in Abb. 4.6 zeigen deutlich, dass durch eine Erhöhung der Konzentration von siRNA1 keine zusätzliche Reduktion der Expression erreicht werden konnte. Alle folgenden Experimente wurden deshalb mit einer Konzentration von 200 $\mu$ mol der siRNA1 durchgeführt. Unter Berücksichtigung der durchgeführten

Versuche war die siRNA1 mit einer Konzentration von 200µmol für die Inhibierung der MK-Proteinbiosynthese am besten geeignet, da in der alleinigen Konstellation der siRNA1 die effizienteste Depletion erzielt wurde (Abb. 4.5).

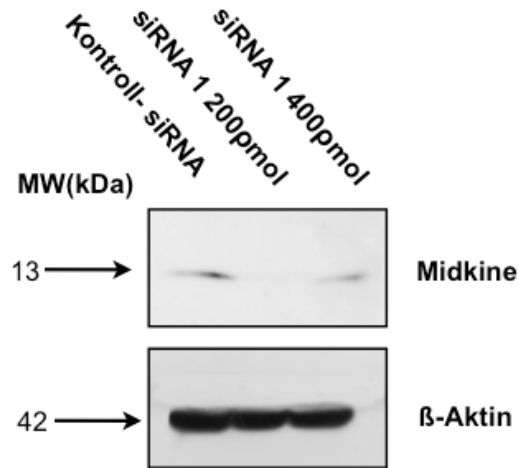


Abb. 4.6 **Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von PANC-1:** Die MK-Bande der siRNA1 in der Konzentration von 200µmol ist im Vergleich zu der Kontroll-siRNA deutlich vermindert. Auch die Bande der siRNA1 mit einer Konzentration von 400µmol ist im Bezug zur Kontroll-siRNA leicht vermindert, jedoch in geringerem Maße als bei der niedrigeren Konzentration.

## 4.2.2 MK-Detektion in Zelllysaten

### 4.2.2.1 PANC-1

Durch transiente siRNA-Transfektion mit siRNA1 konnte eine bis zu 81%ige Reduktion der MK-Expression erreicht werden. Als Vergleich zu der siRNA1 diente die MK-Detektion in Kontroll-siRNA transfizierten PANC-1 Zellen. Die Intensitäten der Western Blot Banden werden in Abb. 4.7 dargestellt. Bei der Zelllinie PANC-1 mittels Transfektion mit siRNA1 wurde eine MK-Depletion von 81% auf Proteinebene erzielt. Damit konnte belegt werden, dass die RNAi gegen MK in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zu einer statistisch signifikanten Reduktion der MK-Proteinbiosynthese führt ( $p=0,044$ ). Zur Sicherung gleicher Ladungsmengen wurde die Aktin-Detektion ebenfalls dargestellt. Sie zeigt lediglich einen Unterschied von 7% zwischen den beiden Banden. Der p-Wert wurde hier mit  $p=0,63$  bestimmt, womit kein signifikanter Unterschied der Bandendichte besteht.

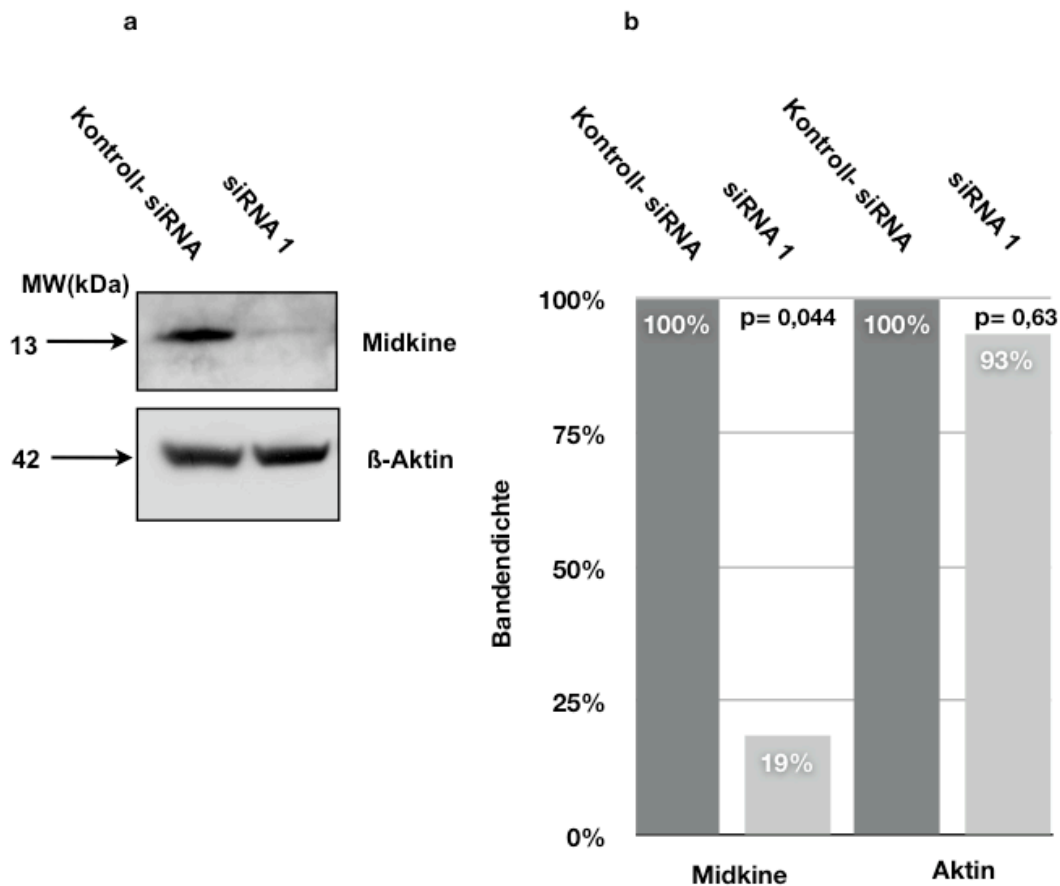


Abb. 4.7 a+b **Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von PANC-1** und densitometrische Darstellung der Banden. Abb. a zeigt das Ergebnis der Transfektion mit der Kontroll-siRNA und der siRNA1. Abb. b stellt die densitometrische Auswertung des Western Blots dar, indem der Grauwert quantifiziert wurde. Die Kontroll-siRNA wurde als Referenzwert genommen. Die Quantifizierung der siRNA1 Bande ergibt im Vergleich zur Kontroll-siRNA ein 19%iges Signal. Es konnte somit eine signifikante Reduktion ( $p=0,044$ ) der MK-Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich der Aktin Banden stellt sich ein Unterschied von 7% dar. Dies ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied der Kontroll-siRNA zu der siRNA1 ( $p=0,63$ ).

#### 4.2.2.2 BxPC-3

An diese Erkenntnisse anlehnend wurde eine weitere Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 nach dem ermittelten Standardprotokoll transfiziert. Ebenfalls wurde eine eindeutige MK-Depletion nachgewiesen. Diese fiel jedoch nicht so stark aus, wie sie bei PANC-1 erreicht werden konnte.

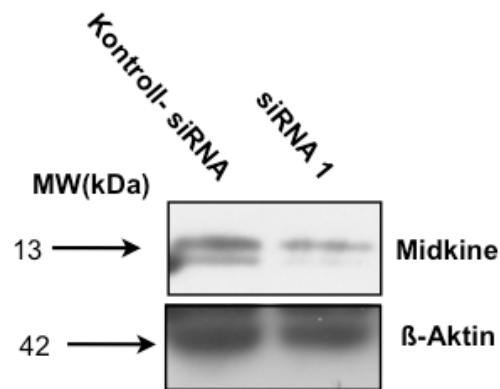


Abb. 4.8 **Western Blot der Transfektion mit siRNA1 von BxPC-3:** Bei der Transfektion von siRNA1 in der Zelllinie BxPC-3 konnte ebenfalls eine MK-Depletion erzielt werden. Im Vergleich zu PANC-1 ist die Bande der MK-depletierten Zelllysate stärker ausgeprägt, was annehmen lässt, dass in den BxPC-3 Zellen weniger Protein herunterreguliert wurde.

### 4.2.3 MK-Detektion in Zellkulturüberständen

Außerdem haben wir untersucht, ob die einfache Zugabe des Transfektionsreagenzes ohne eine siRNA zu einer unspezifischen Veränderung der MK-Expression führt. Hierzu wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine und GFP kotransfiziert, jedoch ohne die siRNA inkubiert. Die Überstände wurden 48 Stunden nach Transfektion gewonnen und wurden mit den Überständen der mit Kontroll-siRNA und der mit siRNA1 transfizierten Zellen in einem Western Blot verglichen. Zudem wurden die Überstände von Wildtyp Zellen ohne Behandlung im Western Blot aufgetragen und die MK-Expression detektiert. In den Überständen der Wildtyp-Zellen, der mit Lipofectamine behandelten Zellen ohne siRNA und der transfizierten Zellen mit Kontroll-siRNA konnte eine annähernd gleiche MK-Sezernierung nachgewiesen werden. Die mit siRNA1 transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zu dem Wildtyp ohne Behandlung, der Transfektion ohne siRNA und der Kontroll-siRNA eine deutlich geringere Detektion von MK (Abb. 4.9).

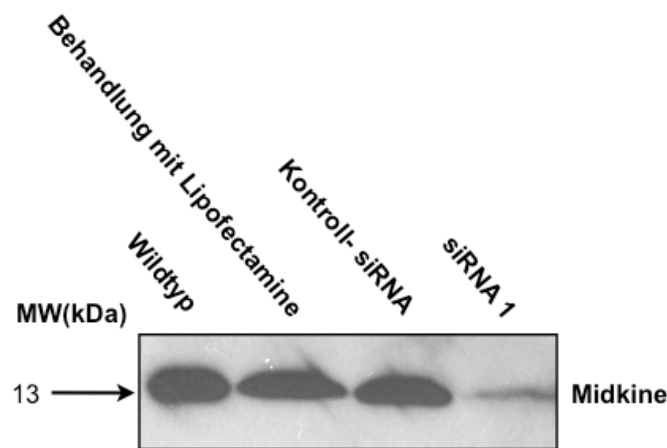


Abb. 4.9 **Western Blot der Zellkulturüberstände von BxPC-3:** Die Abb. stellt die Analyse der Wirkung von Lipofectamine auf die MK-Depletion dar. Der unbehandelte Wildtyp, die mit Lipofectamine behandelten Zellen und die Kontroll-siRNA weisen eine annähernd gleiche MK-Expression in den Kulturüberständen auf. Im Vergleich dazu zeigen die siRNA1 transfizierten Zellen eine deutliche Verminderung der MK-Expression in den Überständen.

In Abb. 4.10 wird der Western Blot der Zellkulturüberstände von PANC-1 72 Stunden nach Transfektion mit Kontroll-siRNA, 200µmol siRNA1 und 400µmol siRNA1 aufgeführt. Bei der Kontroll-Transfektion kann eine deutliche MK-Bande bei 13kDa detektiert werden, auf der Spur der 200µmol siRNA1 ist die MK-Bande kaum nachweisbar und auf der Spur der 400µmol siRNA1 kommt die Bande im Vergleich zur Kontroll-siRNA sichtbar abgeschwächt zum Vorschein.

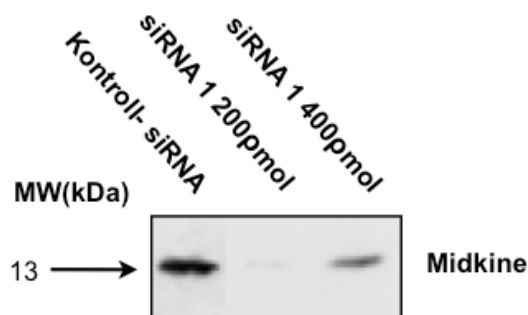


Abb. 4.10 **Western Blot der Zellkulturüberstände von PANC-1:** Unterschiedliche MK-Expression 72 Stunden nach Transfektion. Bei der siRNA1 in einer Konzentration von 200µmol ist die MK-Bande kaum detektierbar. Die Konzentration von 400µmol siRNA1 bewirkt eine deutliche Abschwächung der Bande im Vergleich zu der Kontroll-siRNA.

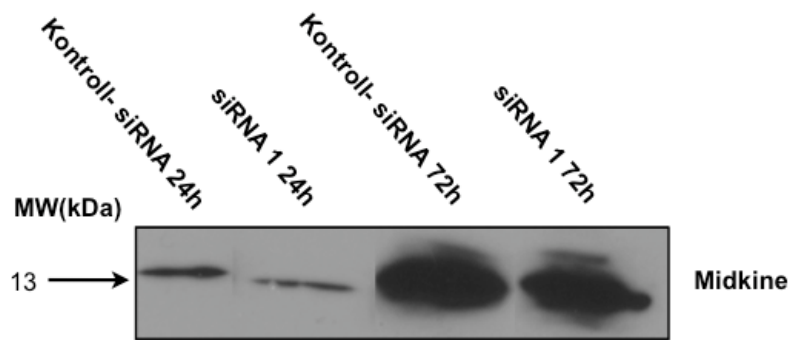


Abb. 4.11 **Western Blot der Zellkulturüberstände von BxPC-3 in zeitlicher Abhängigkeit:** Eine Reduktion der MK-Expression im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen konnte bis 72 Stunden nach Transfektion in den Überständen gezeigt werden.

Die Abb. 4.11 zeigt den Western Blot von Zellkulturüberständen der Zelllinie BxPC-3. Es werden die MK-Expression 24h und 72h nach Transfektion verglichen. Die Bande der siRNA ist bei BxPC-3 Zellen 24h nach Durchführung der Transfektion verschmälert. Auch nach 72h ist die siRNA1 Bande im Vergleich zur Kontroll-siRNA weiterhin weniger stark ausgeprägt. Der Effekt der Behandlung war bis 72h zu beobachten. Die Transfektion konnte durch diese Untersuchung nachweisbar über mehrere Zellzyklen konserviert werden. Dies entspricht der erwarteten Wirkungsdauer für Transfektionen mittels siRNA.

### 4.3 Die Hemmung der MK-Expression beeinträchtigt die Zellproliferation von Pankreaskarzinomzellen

Die Untersuchung der funktionellen Auswirkung der zellulären MK-Inhibierung zeigte folgende Ergebnisse: Im Vergleich zur Kontroll-siRNA und dem unbehandelten Wildtyp wiesen die transfizierten PANC-1 Zellen eine deutliche Reduktion der Proliferation auf. Nach dem ersten Messintervall zum Zeitpunkt 24h war die Anzahl vitaler Wildtyp-Zellen um den Faktor 1,76 gestiegen, die Zellen der Kontroll-siRNA um den Faktor 1,96 und die siRNA1 transfizierten Zellen um das 1,44-fache vermehrt. Die siRNA1 war im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert ( $p=0,044$ ). Beim zweiten Messintervall zeigten die Wildtypzellen einen Wachstumsanstieg auf 224%, die Kontroll-siRNA auf 271% und die siRNA1 transfizierten Zellen auf 207%. Eine

statistische Signifikanz lag zu diesem Zeitpunkt nicht vor ( $p=0,34$ ). Nach 72 Stunden wiesen die mit siRNA1 transfizierten Zellen eine relative Restvitalität von 72% im Vergleich zu den Kontrollen auf. Eine statistische Signifikanz konnte nicht bestätigt werden ( $p=0,303$  im Vergleich zum Wildtyp;  $p=0,37$  im Vergleich zur Kontroll-siRNA). Die Abb. 4.12 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

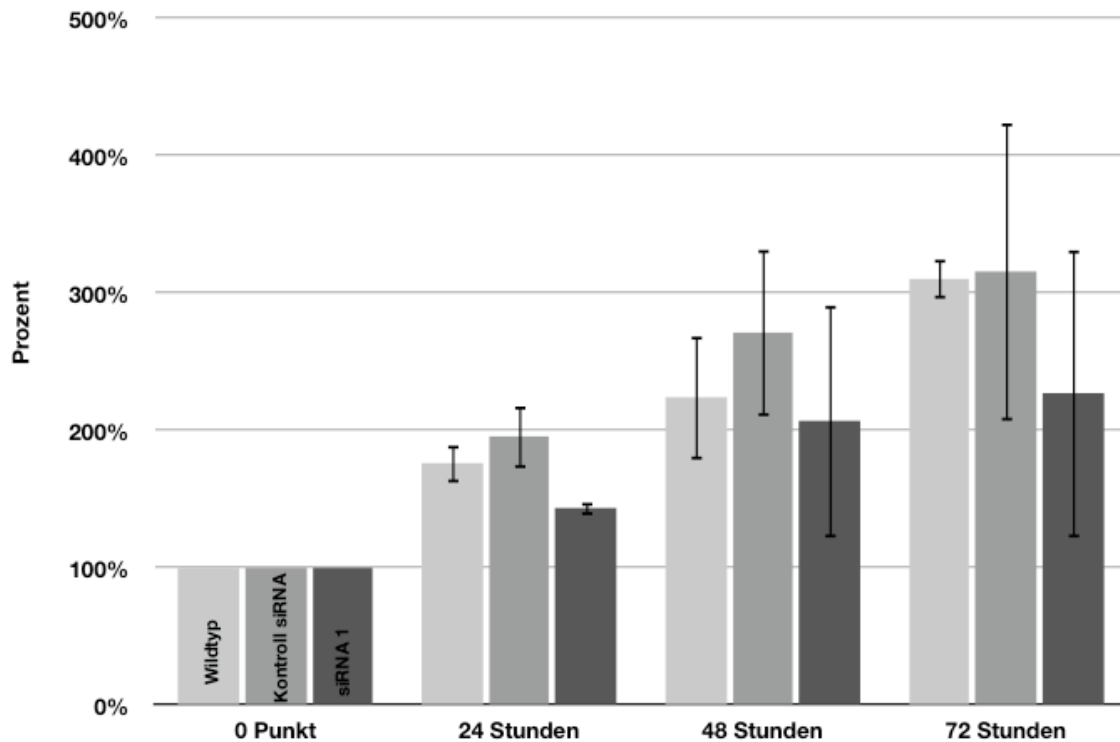


Abb. 4.12 Einfluss der MK-Depletion auf die Zellvitalität von PANC-1: Der MTT-Test zeigt die relative Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen der siRNA transfizierten Proben (dunkelgraue Balken) im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle (hellgraue Balken) und der Kontroll-siRNA (mittelgraue Balken). PANC-1 wurde nach dem Standardprotokoll transfiziert und für 72 Stunden kultiviert und folgend wurde die Vitalität der Zellen im Abstand von 24 Stunden gemessen. Die hier gezeigten Daten sind die Mittelwerte in Prozent von drei voneinander unabhängigen Versuchen mit der entsprechenden absoluten Standardabweichung ( $MV \pm SD$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und siRNA1 transfizierten Zellen bestand nach 24h ( $p=0,044$ ), zu den Zeitpunkten 48h und 72h war dieser nicht fortbestehend ( $p=0,347$ ;  $p=0,303$ ).

In BxPC-3 Zellen konnte ein solcher wachstumsinhibierender Effekt nicht beobachtet werden. Die siRNA1 transfizierten Zellen zeigten keine Wachstumsverringering im Vergleich zu dem Wildtyp oder der Kontroll-transfizierten Gruppe (Daten nicht aufgeführt).



Die nachstehende Abb. 4.13 stellt den zeitlichen Vergleich des Wachstums der Wildtyp und der siRNA1 transfizierten Zellen dar. Der Wildtyp zeigt nach 24h eine Zunahme der Zellzahl auf 176% und nach 72h auf 310% im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt 0-Punkt. Nach 24h konnten 144% der siRNA1 transfizierten und nach 72h konnten 227% der Zellen bezogen auf den Ausgangszeitpunkt 0-Punkt detektiert werden.

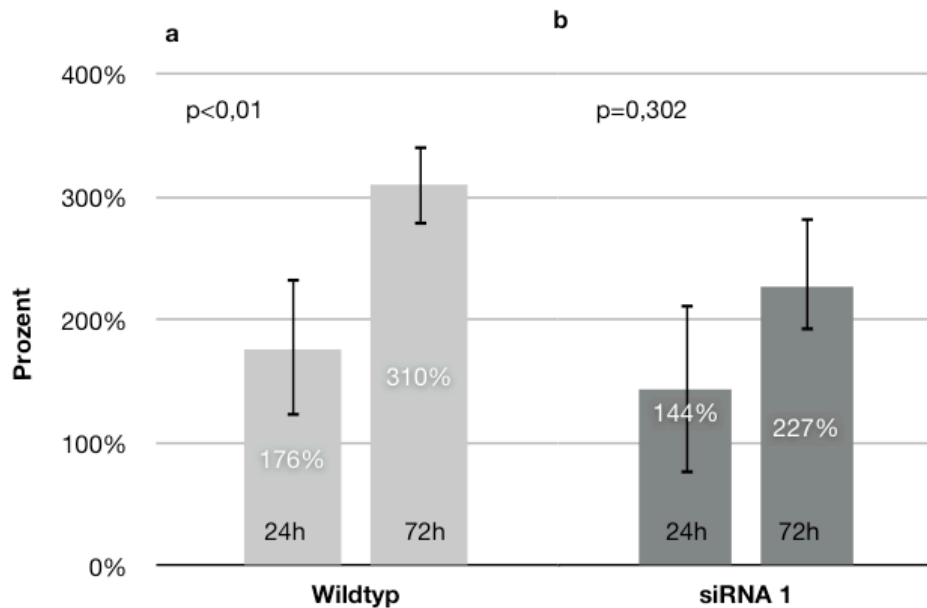


Abb. 4.13 a+b **Relativer Wachstumsverlauf der Wildtyp Zellen und siRNA1 transfizierten Zellen im Vergleich der Messzeitpunkte 24h und 72h:** In Abb. a weisen die Wildtypzellen nach 24h eine Wachstumsrate von 176% und nach 72h eine Rate von 310% auf. Der Unterschied der Zellzahl zwischen 24h und 72h ist signifikant ( $p < 0,01$ ). Abb. b zeigt den Vergleich der siRNA1 transfizierten Zellen zum Zeitpunkt 24h und 72h. Nach 24h ist eine 1,44-fache und nach 72h eine 2,27-fache Zunahme der Zellzahl messbar. Zwischen diesen Werten konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ( $p = 0,302$ ).

Im Vergleich der beiden Gruppen untereinander wird in der Wildtyp-Gruppe ein signifikanter Anstieg des Wachstums verzeichnet ( $p = 0,003$ ), während in der siRNA1-Gruppe kein signifikanter Anstieg des Wachstums zu beobachten war ( $p = 0,302$ ). Damit konnte eine Wachstumsinhibierung der transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

Das Protein Midkine (MK), ein heparinbindender Wachstumsfaktor, wird verstärkt in der Embryonalzeit exprimiert. Es übt zahlreiche Funktionen während der Embryogenese aus. Vor allem die Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems wurde bisher eingehend erforscht (Matsumoto et al., 1994a, Matsumoto et al., 1994b, Kadomatsu und Muramatsu, 2004). Asai *et al.* konnten belegen, dass MK die neuronale Differenzierung und Migration stimuliert (Asai et al., 1997). Die Ergebnisse vieler Studien erlauben die Annahme, dass MK das Überleben von Tumorzellen, das Wachstum, die Migration und auch die Angiogenese von Tumorzellen forciert und somit die Tumorprogression entscheidend beeinflusst (Dai et al., 2007, Kurtz et al., 1995, Friedrich et al., 2005). In gesunden adulten Zellen ist MK nur in einigen Geweben nachzuweisen, während es bei entzündlichen Prozessen, Wundheilung und der Kanzerogenese hochreguliert wird (Matsubara et al., 1990, Matsubara et al., 1994, Muramatsu et al., 1993, Kadomatsu et al., 1988b). Im Pankreaskarzinom konnte eine erhöhte MK-Konzentration nachgewiesen werden (Maeda et al., 2007). Eine starke MK-Expression in Tumoren konnte zudem beim Harnblasenkarzinom, aber auch in Neuroblastomen belegt werden (O'Brien et al., 1996, Nakagawara et al., 1995). Aufgrund dieser und zahlreicher anderer Studien wird MK als vielversprechender Tumormarker bzw. therapeutisches Zielmolekül in der Tumorthherapie gehandelt.

In einem Multi Tumor Array des UKE wurden 60 Entitäten auf eine MK-Expression untersucht (siehe Anhang). Hierbei wurde ein monoklonaler MK-Antikörper verwendet. Die Ergebnisse der untersuchten Pankreasgewebeproben werden in der Tab. 6.1 aufgeführt. 73% (41 von 56) der duktaalen Adenokarzinome des Pankreas zeigten eine starke Färbung für MK. Die papillären Adenokarzinome waren in 82% (23 von 28) stark positiv und die neuroendokrinen Pankreaskarzinome gingen in 68% (13 von 19) mit einer stark positiven Färbung einher. Aufgrund der Stärke der Färbung können Rückschlüsse auf die MK-Expression der Gewebeproben gezogen werden. Eine starke

Färbung lässt annehmen, dass eine vermehrte MK-Konzentration in diesen Geweben vorhanden ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit veröffentlichten Studien überein, dass MK von einigen Tumoren vermehrt exprimiert wird. Besonders bei Pankreaskarzinomen, aber auch bei Bronchialkarzinomen wurde eine verstärkte MK-Expression detektiert. Es liegt also nahe, den Wachstumsfaktor MK auf seine Rolle beim Tumorwachstum zu untersuchen.

## **5.1 Induktion der Midkine-Expression durch Wachstumsfaktoren**

Vor einiger Zeit konnten You *et al.* zeigen, dass FCS sowie die Wachstumsfaktoren EGF und TNF- $\alpha$  die Sezernierung von MK in Prostatakarzinomzellen induzieren (You *et al.*, 2008). Dabei war TNF- $\alpha$  unter den 14 getesteten Zytokinen und Wachstumsfaktoren der stärkste Induktor der MK-Expression bei LNCaP-Zellen. Hierbei wurde die Induktion über den NF- $\kappa$ B-Signalweg hervorgerufen. MK inhibiert teilweise die TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose in den Prostatakarzinomzellen. Zudem wurde bei fortgeschrittenem Prostatakrebs eine erhöhte MK-Konzentration nachgewiesen, was mit zuvor berichteten hohen TNF- $\alpha$ -Serumpegeln bei late-stage Prostatakarzinomen einhergeht (Michalaki *et al.*, 2004).

Absicht der vorliegenden Arbeit war es unter anderem anhand der Analyse von Faktoren, die die MK-Expression induzieren bzw. beeinflussen, weitere mögliche therapeutische Zielstrukturen für das Pankreaskarzinom zu identifizieren. Da PANC-1 Zellen MK stark überexprimieren (Ohhashi *et al.*, 2009), erschien eine genauere Untersuchung der Regulierbarkeit von Midkine bei diesen Zellen sinnvoll. Der Stimulationsversuch von MK wurde erstmalig an einer Zelllinie dieser Tumorentität vorgenommen. Der Aufbau wurde von anderen Forschungsgruppen etabliert und ist ein publiziertes Verfahren, welches von uns aufgenommen und modifiziert worden ist.

### 5.1.1 Erhöhte MK-Konzentration im Zellkulturmedium nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ und EGF

Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen zeigten die mit EGF stimulierten Zellen einen deutlich höheren Anstieg der MK-Expression im Vergleich zu den mit FCS stimulierten Zellen im Zeitraum bis 48h nach Behandlung. FCS zeigt sich ebenfalls als Induktor von MK in PANC-1 Zellen. Dieser Effekt stellt sich am stärksten nach 72h dar. TNF- $\alpha$  bewirkt im Vergleich zur Behandlung mit FCS oder EGF nur eine geringe Zunahme von MK. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Serumentzug) war bei allen drei Versuchsgruppen eine erhöhte MK-Konzentration in den Zellkulturüberständen zu messen. Dieses Verhalten der MK-Expression stimmt nicht mit den Beobachtungen von You *et al.* an Prostatakarzinomzellen überein. Der Unterschied zu den von You *et al.* erlangten Ergebnissen ist am ehesten dadurch zu erklären, dass eine andere Zellentität verwendet wurde und dass in der Versuchsdurchführung Unterschiede in der Methode existieren.

In unserem Versuchsaufbau haben wir die Zellen mit serumfreien Medium inkubiert, um die Effekte von FCS auf die Sekretion von MK zu limitieren und den isolierten Effekt der Faktoren auf dessen Expression zu detektieren. Zudem wurde dadurch der Effekt der im FCS vorhandenen Faktoren ausgeschaltet. Außerdem sollte vermieden werden, dass fetales MK aus dem Kälberserum die Messwerte verfälscht, da MK als sezerniertes Protein auch im Serum zu finden ist und einer Detektion durch humanen MK-Antikörper entgeht. Wir wählten eine Stimulationszeit von insgesamt 96 Stunden und ein Messintervall von 24 Stunden, da ein Effekt in Voruntersuchungen erst nach 48 Stunden beobachtet werden konnte. Diese Schritte wurden von der Arbeitsgruppe um You *et al.* nicht durchgeführt und könnten die unterschiedlichen Beobachtungen erklären.

Nach Zugabe von EGF konnte in unseren Versuchsreihen ein stimulierender Effekt auf die MK-Sekretion zu zwei Messzeitpunkten (24h und 48h) verzeichnet werden. Nach 72h war die Konzentration von MK deutlich abgefallen und es wurde weniger MK als zu den beiden vorherigen Messzeitpunkten gemessen. Vermutlich ist hier die relativ kurze Halbwertszeit von EGF die Ursache für diesen Wirkverlust, da in einer anderen

Studie MK bei einem Stimulationsversuch durch TNF- $\alpha$  zu den late-response Genen zu gehören scheint. Somit wäre eine kontinuierliche Bestückung mit EGF notwendig, um den Effekt auf das spät reagierende MK-Gen zu bewirken. Diese Beobachtungen wurden in den Arbeiten von Zhou *et al.* vermerkt (Zhou et al., 2002). Insbesondere für weiterführende Versuche im Hinblick auf eine mögliche Antagonisierung wäre es notwendig, die Halbwertszeit und den Signalweg, über den EGF seine Stimulation vermittelt, zu ermitteln. Zu diesen Gesichtspunkten gibt es bislang keine Forschungsergebnisse.

Ein anderer Aspekt wiederum ist, dass ein Serumentzug die Zellen unter massiven Stress setzt, da der Entzug an Nährmedien die Zellen in eine katabole Stoffwechsellage versetzt. Unter diesem Stress wäre es denkbar, dass die Zellen nach Zugabe von MK-stimulierenden Faktoren mit einer Überexpression reagieren. Es scheint plausibel, dass die Zellen mit einer übermäßigen Produktion versuchen, dem Zelltod entgegenzuwirken und sich dabei auch den anti-apoptischen bzw. den pro-survival Effekt von MK zu Nutze machen. Dies könnte erklären, warum sich auch in der Serumentzugskontrolle hohe Konzentrationen an MK messen lassen.

### 5.1.2 Antagonisierung von MK

Neuere Studien beschäftigen sich mit der Möglichkeit einer Neutralisation von MK, indem Antikörper oder Antisense-DNA gegen das Protein verwendet werden und daraufhin das Tumorwachstum geblockt wird (Takei et al., 2001, Maehara et al., 2007). So werden zum Beispiel der Antikörper Bevacizumab, der spezifisch gegen VEGF wirkt, oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib oder Axitinib benutzt, um der Angiogenese entgegenzuwirken. Denn Angiogenesehemmer blockieren nicht nur die Angiogenese an sich, sondern verstärken zudem die Tumorabwehr (Kerzerho et al., 2010). Dies macht die MK-vermittelte Angiogenese als Angriffspunkt interessant, um hier zum Beispiel die Metastasierung bei Tumoren zu limitieren.

In ähnlicher Weise wäre nun auch eine Behandlung mit einem TNF- $\alpha$ -Antagonisten wie die bereits zahlreich eingesetzten Wirkstoffe Infliximab, Adalimumab und Etanercept denkbar, um einer gesteigerten MK-Expression entgegenzuwirken. TNF- $\alpha$  und VEGF-

Antagonisten werden bereits in der Behandlung von Makuladegeneration und Rheumatoiden Arthritis eingesetzt, die ebenfalls mit einer gesteigerten Angiogenese einhergehen (Holash et al., 2002, Nguyen et al., 2006, Mohler et al., 1993, Goldenberg, 1999). TNF- $\alpha$  induziert die Expression vieler Gene über den NF- $\kappa$ B-Signalweg (You et al., 2001). Vor diesem Hintergrund antagonisierten You *et al.* den MK-stimulierenden Effekt von TNF- $\alpha$  mit einem NF- $\kappa$ B-Inhibitor und konnten dadurch die stimulierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die MK-Proteinbiosynthese aufheben (You et al., 2008).

Dennoch scheint die Rolle von MK in der Tumorigenese komplexer zu sein als zunächst in vielen Studien angenommen. So hat die Forschungsgruppe um van der Horst *et al.* einen anti-angiogenetischen Effekt von MK kombiniert mit VEGF-A auf HMVEC-Zellen (humane microvaskuläre Endothelzellen) nachgewiesen (van der Horst et al., 2008). Im Kontrast zu den meisten publizierten Studien, die zum größten Teil eine Überexpression belegen, zeigten die Resultate dieser Veröffentlichung, dass MK die pro-angiogenetischen Eigenschaften von VEGF-A *in vitro* und *in vivo* negativ beeinflusst. Dies wirft ein gänzlich neues Licht auf die Rolle von MK in Bezug auf die Angiogenese in epithelialen Tumorentitäten.

Zudem zeigen einige Studien, dass eine Kombination mit TNFerade<sup>TM</sup>, einem Adenovirusvektor für das humane TNF- $\alpha$ -Gen und Gemcitabine eine bis zu 80% Tumorstillung bewirken kann, indem es in den Tumor injiziert wurde und dort lokal erhöhte Konzentrationen erzielt wurden (Murugesan et al., 2009, McLoughlin et al., 2005). Hier wird die Eigenschaft von TNF- $\alpha$  eingesetzt, um die Apoptose von Tumorzellen einzuleiten (Kulik et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die von uns untersuchten Pankreaskarzinomzellen PANC-1 auf die Zugabe der Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$  und EGF in das Zellkulturmedium mit unterschiedlich starker, jedoch vermehrter MK-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe reagieren. Ebenfalls wird durch die Zugabe von FCS eine gesteigerte MK-Expression hervorgerufen. Betrachtet man nun die allgemeinen wachstumsfördernden und anti-apoptischen Wirkungen von MK kann man davon ausgehen, dass die von uns untersuchten Faktoren einen zusätzlichen Effekt

auf das Tumorwachstum und die Tumorprogression von Karzinomzellen haben, wenn durch ihr Einwirken eine gesteigerte MK-Konzentration in Tumorzellen bzw. im Serum hervorgerufen wird.

Interessant wäre es nun zu untersuchen, welchen Einfluss die von uns gemessene Zytokin-induzierte MK-Erhöhung auf die Proliferation der Tumorzellen ausübt. Zudem liegt es nahe ein Experiment durchzuführen, das untersucht, wie sich ansteigende Konzentrationen der Wachstumsfaktoren auf die MK-Sezernierung auswirken. Dies wird Thema für zukünftige Arbeiten unseres Forschungslabors sein.

### 5.2 RNA-Interferenz gegen Midkine

Der Wachstumsfaktor MK wirkt fördernd auf Mitose und Angiogenese der Tumorzellen, wirkt der Apoptose entgegen und fördert somit das Tumorwachstum. MK wird in einer Vielzahl von Tumorentitäten verstärkt synthetisiert (Ikematsu et al., 2000), so konnte auch beim Pankreaskarzinom eine Überexpression der MK mRNA nachgewiesen werden (Ohhashi et al., 2009, Maeda et al., 2007). MK erweckt große Aufmerksamkeit in der Behandlung von malignen Krankheiten. Außerdem werden MK-Inhibitoren als nützliche Therapeutika in der Bekämpfung von Karzinomen angesehen (Takei et al., 2001). In Prostatakarzinomzellen gelang es bereits Takei *et al.*, die MK-Sekretion und -Expression herunterzuregulieren und infolgedessen eine Suppression des Tumorwachstums zu erzielen (Takei et al., 2006).

Für das Pankreaskarzinom existieren noch keine befriedigenden Therapiemöglichkeiten. Es zeichnet sich unter anderem durch schnelles Wachstum und eine früh einsetzende Metastasierung aus. Bauchspeicheldrüsenkrebs ist in 95% nicht heilbar (Gudjonsson, 2002). Die Tumoresektion erhöht in frühen Stadien die Überlebenschancen. Zudem haben prospektive Studien gezeigt, dass durch adjuvante Chemotherapie ein zusätzlicher Überlebenseffekt erzielt werden kann (Beger et al., 2008). Häufig wird das Karzinom aber erst in einem Stadium erkannt, in dem es einer operativen Therapie nicht mehr zugänglich ist.

Takei *et al.* konnten die MK-mRNA und den Proteinlevel in Prostatazelllinien mittels siRNA-Transfektion herunterregulieren und eine signifikante Inhibierung der Zellproliferation beobachten (Takei *et al.*, 2006).

Da das Pankreaskarzinom eine starke Überexpression des Wachstumsfaktors MK aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Modell entwickelt, um die MK-Proteinbiosynthese zu hemmen und somit seine Rolle in der Progression des Pankreaskarzinoms hervorzuheben.

### **5.2.1 Reduktion der MK-Konzentration durch siRNA in den Pankreastumorzelllinien PANC-1 und BxPC-3**

In unseren Versuchen gelang es erfolgreich siRNA Moleküle in die primären Pankreaskarzinomzellen PANC-1 und BxPC-3 zu transfizieren. In den durchgeführten Western Blots wurden sichtbar verschmälerte oder nahezu vollständig eliminierte Banden detektiert. Die tatsächliche Menge an MK war somit in den transfizierten Zellen deutlich vermindert. Dieses Experiment führt zu der Erkenntnis, dass ein siRNA Effekt auf Proteinebene erzielt werden konnte. Es wurde eine signifikante MK-Reduktion von 81% erzielt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine wirksame *in vitro* Methode zur Ausschaltung der MK-Proteinsynthese in Pankreaskarzinomzellen gefunden wurde. Es konnte ebenfalls experimentell nachgewiesen werden, dass es weder durch die Inkubation der Zellen mit Lipoectamine und der gleichzeitigen Kotransfektion mit GFP noch durch die Transfektion mit der Kontroll-siRNA zu einer Beeinflussung der MK-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Wildtyp) kommt. Lediglich die Behandlung der Zellen mit gegen MK gerichteter siRNA1 führt zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Proteins in den Zellkulturüberständen.

Es sind verschiedene Methoden zu der in dieser Arbeit angewandten transienten Transfektion von siRNA-Molekülen bekannt. Nicht jedes Protokoll ist für jede Zelllinie geeignet und die Wirksamkeit der eingeschleusten siRNA hängt zudem von den Kulturbedingungen und der Zusammensetzung der Transfektionslösung ab. Eine große Schwierigkeit liegt nun darin, die wirksamste Inhibierung mit einer möglichst geringen



Menge an siRNA zu erzielen. Wir haben eine geeignete siRNA gefunden und für die MK-Depletion in Pankreaskarzinomzellen deren effizienteste Konzentration ermittelt.

### **5.3 Proliferationsfördernde Eigenschaften von Midkine**

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung einer MK-Depletion mittels RNA-Interferenz auf das Wachstum von Pankreastumorzelllinien. Ziel war es, daraus neue Erkenntnisse über die Relevanz des Proteins auf die Proliferation der Zellen zu erlangen.

#### **5.3.1 Auswirkung der MK-Depletion auf die Zellproliferation**

Die Intention unserer Untersuchungen war in diesem Schritt nicht die Herunterregulierung der MK-mRNA, sondern die Aufklärung der Funktion des Proteins. Deshalb wurde auf eine quantitative Bestimmung der mRNA mittels Real-time PCR verzichtet und gleich das Produkt der inhibierten mRNA untersucht, da es nicht immer der Fall sein muss, dass eine verminderte mRNA mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass die effektive Menge von MK in PANC-1 verringert war. Über diese reduzierte Anhäufung von MK konnte im Anschluss die gestörte Funktion des Proteins in PANC-1 *via* Zellproliferation nachgewiesen werden. Damit ist auszuschließen, dass in dieser Zelllinie andere oder verwandte Proteine die Funktion von MK in der Zellproliferation vollständig ersetzen, wenn dieses Protein ausgeschaltet wird. Eine Restmenge von circa 20% reicht nicht aus, um die normalen Abläufe des Wachstums der Zelle aufrechtzuerhalten.

In BxPC-3 Zellen wurde nach MK-Depletion kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation beobachtet. Dies kann damit erklärt werden, dass die Abfolge von mRNA Verminderung mit darauf folgender Proteinreduktion nicht immer in einer Änderung auf funktioneller Ebene resultieren muss. Ein linearer Zusammenhang der Proteinbiosynthesereduktion mit anschließendem Funktionsverlust besteht hierbei nicht. In dieser Zelllinie konnte im Vergleich zu PANC-1 durch siRNA-Transfektion auch nur eine geringe Reduktion der Bandenstärke im Western Blot erzielt werden.

Es ist möglich zu denken, dass aufgrund der Heterogenität der Zelllinien eine unterschiedliche Effizienz der siRNA-vermittelten Transfektion resultiert. Bei BxPC-3 Zellen könnte der MK-Verlust durch andere Wachstumsfaktoren kompensiert werden, die zu einer gesteigerten Zellproliferation führen und damit den Effekt der siRNA abschwächen. Zudem wäre es möglich, dass die limitierte Menge an siRNA bei der Transfektion in diesen Zellen nicht dazu geführt hat, dass alle Transkripte der MK mRNA abgebaut wurden. Infolgedessen reicht das verbleibende Protein aus, um eine normale Zellproliferation zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der RNAi in der vorliegenden Arbeit weisen den funktionellen Effekt der siRNA in PANC-1 nach. Es konnte eine Proliferationsminderung von 300% auf 200% nach 72 Stunden erzielt werden. Die Proteinfunktion von MK bei der gesteigerten Zellproliferation in Tumorzellen konnte reduziert werden. Die deutlich verringerte Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nach MK-Depletion stärkt die Annahme, dass die Überexpression von Midkine in Pankreaskarzinomen mit einem gesteigerten Wachstum verbunden ist.

### **5.4 Midkine und Chemoresistenz bei Pankreaskarzinomen**

Interessant sind diese Erkenntnisse über die Ausschaltung von Midkine bezüglich seines Einflusses auf die Chemoresistenz beim Pankreaskarzinom.

Die Behandlung mit Zytostatika spielt in der Therapie des Pankreaskarzinoms eine wichtige Rolle. Wegen seiner schwer zugänglichen Lage und der anfangs unspezifischen Beschwerden der Erkrankung werden Pankreastumoren oft erst in Stadien diagnostiziert, in denen das Tumorleiden durch eine Resektion bereits nicht mehr heilbar ist. Deswegen ist vor allem die Behandlung mit Chemotherapeutika ein sehr wichtiger Aspekt in der Therapie dieser Erkrankung. Der Erfolg einer Chemotherapie wird jedoch durch die native oder erworbene Resistenzentwicklung gegenüber den gängigen Zytostatika limitiert. Die Gründe für die Entwicklung von

Resistenzen beim Pankreaskarzinom sind bisher noch weitestgehend unentdeckt. Für eine genauere Analyse der Resistenzmechanismen ist es daher von Bedeutung die hierfür verantwortlichen Mechanismen und Moleküle zu erforschen.

In Veröffentlichungen unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass MK eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabine beim Adenokarzinom des Pankreas spielt (Güngör et al., 2011). Es wurde nachgewiesen, dass Midkine über eine Interaktion und Aktivierung des Notch-Signalweges die Chemoresistenz gegenüber Gemcitabine deutlich fördert. Dieser Signalweg ist bekanntlich bei der Progression duktaler Pankreaskarzinome von Bedeutung (De La und Murtaugh, 2009). Die Signalkaskade wird durch die Bindung der nativen Liganden Delta, Jagged1 und Jagged2 an den Notch-Rezeptor aktiviert, was zu einer intrazellulären proteolytischen Spaltung des Rezeptors führt. Daraufhin kann der zytoplasmatische Teil des Rezeptors in dem Zellkern Notch-abhängige Gene regulieren (Güngör et al., 2011, Ranganathan et al., 2011). Eine erhöhte Notch-Aktivität kann bei verschiedenen Karzinomen beobachtet werden, wobei der genaue Mechanismus noch weitgehend ungeklärt ist (Ranganathan et al., 2011). Brabletz *et al.* haben in diesem Zusammenhang einen interessanten Mechanismus entdeckt, durch den sich die vermehrte Notch-Aktivität unter anderem beim Pankreaskarzinom erklären lässt (Ghonem et al., 2011, Brabletz et al., 2011). Hierbei konnte dargestellt werden, dass ZEB1 (Zinc finger E-box binding homebox transcription factor 1) bei Krebszellen über eine Feedbackschleife mit ZEB1/miR-200 den Notch-Signalweg induziert, indem über die Inhibition der Expression der microRNA miR-200 die Expression von Komponenten der Notch-Kaskade stabilisiert. ZEB1 ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher einen Zinkfingerkomplex enthält und an die Enhancer Box einer DNA-Sequenz bindet und durch diese Bindung die Transkription des Gens initiiert. In Tumorzellen führt eine erhöhte Expression von ZEB1 zu einer Induktion der EMT und einer erhöhten Metastasierungsrate (Liu et al., 2008).

Auch beim Magenkarzinom konnten Kang *et al.* zeigen, dass MK in den von ihnen untersuchten chemoresistenten Magenkarzinomzellen deutlich überexprimiert war und

zu einer Multidrug-Resistenz führen kann (Kang et al., 2004). Beim Prostatakarzinom konnten Takei *et al.* bereits mittels siRNA einen Knock-down von MK erreichen. Die Behandlung mit einer MK-siRNA hat in dieser Studie das Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* supprimiert. Zudem konnte eine kombinierte Behandlung von siRNA und dem Chemotherapeutikum Paclitaxel die Apoptose in PC-3-Mäusen, einer Prostatakarzinomzelllinie, hervorrufen. Hier wurde gezeigt, dass eine Kombination von MK-siRNA und Paclitaxel eine effektive Krebstherapie darstellt und zudem keine adversen Nebenwirkungen hervorruft (Takei et al., 2006). Eine duale Therapie kann in diesem Sinne eine Dosisreduktion der Chemotherapie ermöglichen, da die Toxizität und die hiermit assoziierten Nebenwirkungen die Behandlung limitieren oder zu einem Abbruch der Therapie führen.

Ähnliche Effekte konnte durch eine antisense-Oligonukleotid-Therapie (AS) bei Mäusen mit hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet werden. Mit einer solchen Methodik ist es ebenfalls möglich den Proteinlevel von MK herunterzuregulieren. MK-AS erhöhte in einer Studie die Effektivität des Chemotherapeutikums Doxorubicin *in vitro* und *in vivo* (Dai et al., 2007). Die Wachstumsrate von hepatozellulären Karzinomzellen konnte stärker inhibiert werden als durch eine alleinige Behandlung mit dem Chemotherapeutikum. Als einen weiteren Ansatz in der Therapie des HCC konnte eine Publikation von Inoh *et al.* aus dem Jahre 2006 einen an Doxorubicin gebundenen Anti-MK monoklonalen Antikörper identifizieren, da dieser das Wachstum von HepG2-Zellen *in vitro* signifikant verhindern konnte (Inoh et al., 2006).

So kann mit der Kombination verschiedener Angriffspunkte, wie zum Beispiel die Ausschaltung bestimmter Gene mittels siRNA und die gleichzeitige medikamentöse Chemotherapie deutliche Vorteile in der Tumorbekämpfung bringen. Damit kann eine spezifische Ausschaltung von MK in Tumorzellen bezüglich eines verzögerten Wachstums sowie auch einer verminderten Resistenzentwicklung beim Pankreaskarzinom von wissenschaftlichem und klinischem Interesse sein.

### 5.4.1 Midkine als Biomarker beim Pankreaskarzinom?

In den letzten Jahren ist es immer wichtiger geworden molekulare Biomarker in der multimodalen Tumorthherapie zu identifizieren. In der adjuvanten Therapie sind prognostische Biomarker von entscheidender Rolle, denn diese erlauben Aussagen darüber, ob ein Patient eine anti-tumorale Therapie erhalten sollte. Bei der neo-adjuvanten Therapie sind hingegen prädiktive Biomarker informativ, denn sie geben Auskunft, mit welchem Medikament bzw. in welcher Dosierung die Behandlung durchgeführt werden sollte. Es konnten immer mehr mögliche prognostische und prädiktive Marker beschrieben werden, allerdings können im klinischen Alltag bislang aufgrund fehlender prospektiver Studien bislang nur wenige Biomarker auch genutzt werden (Messmer et al., 2012). Als prominentestes Beispiel ist hier die K-ras-Mutationsanalyse zu nennen, die als prädiktiver und prognostischer Marker beim kolorektalen Karzinom effektiv zum Einsatz kommt.

In der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms konnte gezeigt werden, dass die Kombination von zwei Biomarkern eine prognostische Bedeutung hat, indem sie aufwiesen, dass eine hohe Expression des Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (HENT1) und Deoxycytidinekinase (DCK) mit einem verbesserten klinischen Outcome einhergehen (Wang et al., 2011a, Marechal et al., 2010, Wang et al., 2011b). In der Arbeit von Marechal *et al.* wird in einer retrospektiven Studie belegt, dass niedrige Level an DCK beim Pankreaskarzinom mit einem schlechten klinischen Outcome nach adjuvanter Chemotherapie mit Gemcitabine einhergehen. Gemcitabine ist ein Prodrug, das durch die DCK phosphoryliert wird und so von Nukleotid-Kinasen in das aktive Metabolit überführt werden kann. Ein weiteres bekanntes Protein in Zusammenhang mit dem Metabolismus von Gemcitabine ist der HENT1. Dieser Transporter ist maßgeblich an der Aufnahme des Chemotherapeutikums beteiligt und korreliert signifikant mit einem verbesserten Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Gemcitabine von Pankreaskarzinomen (Marechal et al., 2009, Farrell et al., 2009). Die Bestimmung des HENT1 kann die Qualität eines Ansprechens auf eine Gemcitabine-Therapie prognostizieren. In ähnlicher Weise könnte MK Aufschluss auf das Potenzial einer Resistenzentwicklung in der Therapie des Pankreaskarzinoms liefern.

Da MK nicht nur intrazellulär vorkommt, sondern auch in den Zellkulturüberständen gemessen werden kann, ist es besonders für den therapeutisch-medikamentösen Ansatz des Pankreaskarzinoms attraktiv, da dessen Konzentrationsmessung in Körperflüssigkeiten als Marker für eine Therapie-Effektivität und Verlaufskontrolle zukünftig ausgenutzt werden könnte.

## 6 Anhang

### 6.1 Multitumor Tissue Microarray

In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass MK intrazellulär und in den Überständen von Pankreaskarzinomzellen nachzuweisen ist. In weiteren Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurde zudem belegt, dass MK auch in humanen Tumorpräparaten und in Seren von Patienten mit einem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden kann. Dieses wird im nachstehenden Anhang aufgeführt.

Es wurden insgesamt 103 Primärtumoren des Pankreas in einem Multitumor Array mit einem Antikörper gegen humanes MK angefärbt und anschließend ausgewertet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde durch drei unabhängige Untersucher vorgenommen. Es erfolgte eine semiquantitative Beurteilung bezüglich der Intensität der Färbung (0, 1+, 2+, 3+) und des prozentualen Anteils positiver Zellen. Für die statistische Auswertung wurde keine Färbung als negativ gewertet, 1+ und 2+ Färbung in  $\leq 30\%$  wurden als schwach positiv gezählt und 2+ Färbung  $\geq 30\%$  oder 3+ Färbung wurden als stark positiv beurteilt.

In 41 der 56 (73%) untersuchten Gewebeproben aus duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte eine stark positive Färbung beobachtet werden, 10 (18%) zeigten eine schwach positive Färbung und bei 5 (9%) war die Färbung negativ. 23 der 28 (82%) papillären Adenokarzinome waren stark positiv, 4 (14%) schwach positiv und 1 (4%) zeigte keine Färbung auf. Bei den neuroendokrinen Pankreaskarzinomen waren 13 (68%) stark positiv, 2 (11%) schwach positiv und 2 (21%) negativ gefärbt (Tab. 6.1).

Tumorentität	Midkine Immunfärbung (in%)			
	n	negativ	schwach	stark
Pankreaskarzinom				
duktales Adenokarzinom	56	5(9)	10(18)	41(73)
papilläres Adenokarzinom	28	1(4)	4(14)	23(82)
neuroendokrines Karzinom	19	4(21)	2(11)	13(68)

Tab. 6.1 **Multi Tumor Array**: Aufführung der untersuchten Pankreastumorentitäten mit Auflistung der Gesamtanzahl (n) der Proben und die Anzahl an MK negativ, schwach und stark positiv gefärbten Tumorproben in Prozent

## 6.2 Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Pankreas-, Ösophagus-, Kolon- und Bronchialkarzinom

Es wurden die Seren von Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden mittels ELISA auf MK-Konzentration untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in Tab. 6.2 aufgeführt. Die mittlere Serum-MK-Konzentration ( $\pm$ Standardabweichung) und die mediane Serum-MK-Konzentration (25. und 75. Perzentile) aller untersuchten Probanden waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden erhöht. Die mittlere Serum-MK-Konzentration bei den Pankreaskarzinom-Patienten betrug 1200pg/ml ( $\pm$ 1712), während bei den Kontrollprobanden eine mittlere Konzentration von 128pg/ml ( $\pm$ 115) gemessen wurde. Die mediane Serum-MK-Konzentration (25. und 75. Perzentile) lag bei den Pankreaskarzinom-Patienten bei 721pg/ml (409 und 1107), im Gegensatz dazu fand sich bei den gesunden Probanden ein Wert von 99pg/ml (33 und 198).



Tumorentität	Anzahl	Mittlere Serum-MK-Konzentration ( $\pm$ SD) (pg/ml)	Mediane Serum-MK-Konzentration (25. und 75. Perzentile) (pg/ml)
Kontrollprobanden	148	128 $\pm$ 115	99 (33 und 198)
Pankreaskarzinom	37	1200 $\pm$ 1712	721 (409 und 1107)
Ösophaguskarzinom	38	896 $\pm$ 1111	705 (705 und 1013)
Kolonkarzinom	42	609 $\pm$ 414	518 (351 und 750)
Bronchialkarzinom	40	2630 $\pm$ 3121	2015 (1336 und 2505)

Tab. 6.2 **Mittlere und mediane Serum-MK-Konzentration bei Patienten mit Pankreas-, Ösophagus-, Kolon- und Bronchialkarzinom und bei Kontrollprobanden**

## 7 Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom geht mit einer hohen Mortalitätsrate einher. Das Fehlen von Frühsymptomen schränkt die operative Therapie durch eine lokale Invasion und das hohe Metastasierungspotenzial erheblich ein. Ein Down-Staging des Tumors ist aufgrund einer hohen Chemoresistenz häufig nicht erfolgversprechend.

In unseren Untersuchungen konnte belegt werden, dass mittels siRNA die Expression des Wachstumsfaktors Midkine in den Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und BxPC-3 herunterreguliert werden kann. Weiterhin wurde präsentiert, dass eine MK-Depletion antiproliferativ auf die Zelllinie PANC-1 wirksam ist. Die transiente Transfektion von MK-siRNA führte zu einem deutlich langsameren Zellwachstum *in vitro*. Dies könnte die beobachtete schnelle Proliferation bei Pankreaskarzinomen erklären, die eine Überexpression von MK aufweisen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, welchen Effekt die Wachstumsfaktoren TNF- $\alpha$  und EGF auf die MK-Expression im Zellmodell haben. Unter EGF-Stimulation war dabei, abhängig vom Zeitpunkt, ein insgesamt höherer Anstieg der MK-Konzentration zu messen als unter TNF- $\alpha$ -Stimulation oder Zugabe von FCS. Ein längerer Effekt konnte jedoch mittels TNF- $\alpha$ - und mittels FCS-Inkubation erzielt werden.

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass die zelluläre MK-Depletion mit verminderter Proliferation in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 einhergeht. In der Zelllinie BxPC-3 erwies sich eine MK-Depletion nicht als signifikant wachstumshemmend.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle von MK in Pankreaskarzinomzellen, insbesondere der Zelllinie PANC-1, zu untersuchen. Das Verständnis wichtiger Zusammenhänge in der biologischen Funktion von

Wachstumsfaktoren in Tumorzellen liefert wichtige Informationen für neue therapeutische Ziele in der Tumorbekämpfung.

Es ist in der multimodalen Tumorthherapie von zunehmender Bedeutung geworden, dass mehrere molekulare Angriffspunkte der Tumorzellen kombiniert werden, um das Tumorstadium einzudämmen. Vor allem angesichts der Tatsache, dass Pankreaskarzinome zunehmend Resistenzen gegen das first-line Chemotherapeutikum Gemcitabine entwickeln und MK die Entwicklung von Resistenzen beeinflusst, ist es notwendig diesem Mechanismus entgegenzuwirken. So konnte in einer Phase II Studie die Kombination des Tyrosinkinase-Inhibitors Axitinib und Gemcitabine ein gutes Ansprechen in der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms erzielen (Spano et al., 2008). Jedoch konnte in einer darauffolgenden Phase III Studie die Evidenz einer verbesserten Überlebensrate nach Behandlung mit der Kombination gegenüber der Gemcitabine-Monotherapie nicht belegt werden. In Anlehnung an dieses Therapiekonzept liefert die vorliegende Arbeit verschiedene Aspekte, um mögliche Ansätze für neue Therapiestrategien aufzugreifen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen somit im Vorfeld Informationen für *in vivo* Versuche liefern. In weiterführenden Experimenten soll im Anschluss der Einfluss von MK auf die Tumorigenität und das Metastasierungspotential im Mausmodell untersucht werden. In nachfolgenden Experimenten soll eine stabile Transfektion von MK in Pankreaskarzinomzellen mittels shRNA (short hairpin RNA) erfolgen, damit die Relevanz einer MK-Depletion im orthotopen Mausmodell *in vivo* zu analysieren ist.

## 8 Literaturverzeichnis

2003. Whither RNAi? *Nat Cell Biol*, 5, 489-90.
- AHLGREN, J. D. 1996. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol*, 23, 241-50.
- ALMOGUERA, C., SHIBATA, D., FORRESTER, K., MARTIN, J., ARNHEIM, N. & PERUCHO, M. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53, 549-54.
- ARIDOME, K., TAKAO, S., KANAME, T., KADOMATSU, K., NATSUGOE, S., KIJIMA, F., AIKOU, T. & MURAMATSU, T. 1998. Truncated midkine as a marker of diagnosis and detection of nodal metastases in gastrointestinal carcinomas. *Br J Cancer*, 78, 472-7.
- ARIDOME, K., TSUTSUI, J., TAKAO, S., KADOMATSU, K., OZAWA, M., AIKOU, T. & MURAMATSU, T. 1995. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res*, 86, 655-61.
- ASAI, T., WATANABE, K., ICHIHARA-TANAKA, K., KANEDA, N., KOJIMA, S., IGUCHI, A., INAGAKI, F. & MURAMATSU, T. 1997. Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 66-70.
- BALKWILL, F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 9, 361-71.
- BALKWILL, F. R. & BURKE, F. 1989. The cytokine network. *Immunol Today*, 10, 299-304.
- BEGER, H. G., RAU, B., GANSAUGE, F., LEDER, G., SCHWARZ, M. & POCH, B. 2008. Pancreatic cancer--low survival rates. *Dtsch Arztebl Int*, 105, 255-62.
- BELL, G. I., FONG, N. M., STEMPIEN, M. M., WORMSTED, M. A., CAPUT, D., KU, L. L., URDEA, M. S., RALL, L. B. & SANCHEZ-PESCADOR, R. 1986. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res*, 14, 8427-46.
- BERTRAND, J. R., POTTIER, M., VEKRIS, A., OPOLON, P., MAKSIMENKO, A. & MALVY, C. 2002. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 1000-4.
- BOHMIG, M. & ROSEWICZ, S. 2004. [Pancreatic carcinoma]. *Z Gastroenterol*, 42, 261-8.
- BORRELL-PAGES, M., ROJO, F., ALBANELL, J., BASELGA, J. & ARRIBAS, J. 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J*, 22, 1114-24.
- BRABLETZ, S., BAJDAK, K., MEIDHOF, S., BURK, U., NIEDERMANN, G., FIRAT, E., WELLNER, U., DIMMLER, A., FALLER, G., SCHUBERT, J. & BRABLETZ, T. 2011. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J*, 30, 770-82.
- BRUGE, F., VENDITTI, E., TIANO, L., LITTARRU, G. P. & DAMIANI, E. 2011. Reference gene validation for qPCR on normoxia- and hypoxia-cultured human

- dermal fibroblasts exposed to UVA: is beta-actin a reliable normalizer for photoaging studies? *J Biotechnol*, 156, 153-62.
- BUNN, P. A., JR. & FRANKLIN, W. 2002. Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, 29, 38-44.
- BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- BUSTIN, S. A. & NOLAN, T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15, 155-66.
- CALDAS, C., HAHN, S. A., HRUBAN, R. H., REDSTON, M. S., YEO, C. J. & KERN, S. E. 1994. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res*, 54, 3568-73.
- CAPLEN, N. J., PARRISH, S., IMANI, F., FIRE, A. & MORGAN, R. A. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9742-7.
- CARPENTER, G. & ZENDEGUI, J. G. 1986. Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res*, 164, 1-10.
- CHOU DHURI, R., ZHANG, H. T., DONNINI, S., ZICHE, M. & BICKNELL, R. 1997. An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*, 57, 1814-9.
- CUBILLA, A. L. & FITZGERALD, P. J. 1985. Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects. *CA Cancer J Clin*, 35, 2-18.
- DAI, L. C., WANG, X., YAO, X., LU, Y. L., PING, J. L. & HE, J. F. 2007. Enhanced therapeutic effects of combined chemotherapeutic drugs and midkine antisense oligonucleotides for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13, 1989-94.
- DALLAS, A. & VLASSOV, A. V. 2006. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit*, 12, RA67-74.
- DE LA, O. J. & MURTAUGH, L. C. 2009. Notch and Kras in pancreatic cancer: at the crossroads of mutation, differentiation and signaling. *Cell Cycle*, 8, 1860-4.
- DONG, J., OPRESKO, L. K., DEMPSEY, P. J., LAUFFENBURGER, D. A., COFFEY, R. J. & WILEY, H. S. 1999. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6235-40.
- EARP, H. S., 3RD, CALVO, B. F. & SARTOR, C. I. 2003. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 114, 315-33; discussion 333-4.
- EGAN, S. E., GIDDINGS, B. W., BROOKS, M. W., BUDAY, L., SIZELAND, A. M. & WEINBERG, R. A. 1993. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363, 45-51.

- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ELBASHIR, S. M., MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20, 6877-88.
- FARRELL, J. J., ELSALEH, H., GARCIA, M., LAI, R., AMMAR, A., REGINE, W. F., ABRAMS, R., BENSON, A. B., MACDONALD, J., CASS, C. E., DICKER, A. P. & MACKEY, J. R. 2009. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 136, 187-95.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FRANKLIN, W. A., VEVE, R., HIRSCH, F. R., HELFRICH, B. A. & BUNN, P. A., JR. 2002. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol*, 29, 3-14.
- FRIEDRICH, C., HOLTKAMP, N., CINATL, J., JR., SAKUMA, S., MAUTNER, V. F., WELLMAN, S., MICHAELIS, M., HENZE, G., KURTZ, A. & DRIEVER, P. H. 2005. Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency. *Int J Oncol*, 27, 1433-40.
- GARVER, R. I., JR., CHAN, C. S. & MILNER, P. G. 1993. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9, 463-6.
- GARVER, R. I., JR., RADFORD, D. M., DONIS-KELLER, H., WICK, M. R. & MILNER, P. G. 1994. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer*, 74, 1584-90.
- GHONEM, N., YOSHIDA, J., STOLZ, D. B., HUMAR, A., STARZL, T. E., MURASE, N. & VENKATARAMANAN, R. 2011. Treprostinil, a prostacyclin analog, ameliorates ischemia-reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant*, 11, 2508-16.
- GOLDENBERG, M. M. 1999. Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clin Ther*, 21, 75-87; discussion 1-2.
- GRISHOK, A. & MELLO, C. C. 2002. RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*). *Adv Genet*, 46, 339-60.
- GUDJONSSON, B. 2002. Survival statistics gone awry: pancreatic cancer, a case in point. *J Clin Gastroenterol*, 35, 180-4.
- GÜNGÖR, C., ZANDER, H., EFFENBERGER, K. E., VASHIST, Y. K., KALININA, T., IZBICKI, J. R., YEKEBAS, E. & BOCKHORN, M. 2011. Notch signaling activated by replication stress-induced expression of Midkine drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*.
- HAHN, S. A., SCHUTTE, M., HOQUE, A. T., MOSKALUK, C. A., DA COSTA, L. T., ROZENBLUM, E., WEINSTEIN, C. L., FISCHER, A., YEO, C. J., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 271, 350-3.

- HAJEER, A. H. & HUTCHINSON, I. V. 2000. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*, 50, 216-28.
- HAMMOND, S. M., CAUDY, A. A. & HANNON, G. J. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2, 110-9.
- HANNON, G. J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 244-51.
- HINKLE, C. L., SUNNARBORG, S. W., LOISELLE, D., PARKER, C. E., STEVENSON, M., RUSSELL, W. E. & LEE, D. C. 2004. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem*, 279, 24179-88.
- HOLASH, J., DAVIS, S., PAPADOPOULOS, N., CROLL, S. D., HO, L., RUSSELL, M., BOLAND, P., LEIDICH, R., HYLTON, D., BUROVA, E., IOFFE, E., HUANG, T., RADZIEJEWSKI, C., BAILEY, K., FANDL, J. P., DALY, T., WIEGAND, S. J., YANCOPOULOS, G. D. & RUDGE, J. S. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11393-8.
- HRUBAN, R. H., ADSAY, N. V., ALBORES-SAAVEDRA, J., COMPTON, C., GARRETT, E. S., GOODMAN, S. N., KERN, S. E., KLIMSTRA, D. S., KLOPPPEL, G., LONGNECKER, D. S., LUTTGES, J. & OFFERHAUS, G. J. 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, 25, 579-86.
- HRUBAN, R. H., PETERSEN, G. M., HA, P. K. & KERN, S. E. 1998. Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surg Oncol Clin N Am*, 7, 1-23.
- IBUSUKI, M., FUJIMORI, H., YAMAMOTO, Y., OTA, K., UEDA, M., SHINRIKI, S., TAKETOMI, M., SAKUMA, S., SHINOHARA, M., IWASE, H. & ANDO, Y. 2009. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci*, 100, 1735-9.
- IKEMATSU, S., YANO, A., ARIDOME, K., KIKUCHI, M., KUMAI, H., NAGANO, H., OKAMOTO, K., ODA, M., SAKUMA, S., AIKOU, T., MURAMATSU, H., KADOMATSU, K. & MURAMATSU, T. 2000. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer*, 83, 701-6.
- INOH, K., MURAMATSU, H., TORII, S., IKEMATSU, S., ODA, M., KUMAI, H., SAKUMA, S., INUI, T., KIMURA, T. & MURAMATSU, T. 2006. Doxorubicin-conjugated anti-midkine monoclonal antibody as a potential anti-tumor drug. *Jpn J Clin Oncol*, 36, 207-11.
- IWASAKI, W., NAGATA, K., HATANAKA, H., INUI, T., KIMURA, T., MURAMATSU, T., YOSHIDA, K., TASUMI, M. & INAGAKI, F. 1997. Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *EMBO J*, 16, 6936-46.
- KADOMATSU, K. & MURAMATSU, T. 2004. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett*, 204, 127-43.
- KADOMATSU, K., TOMOMURA, M. & MURAMATSU, T. 1988a. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 151, 1312 - 1318.
- KADOMATSU, K., TOMOMURA, M. & MURAMATSU, T. 1988b. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages

- of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 151, 1312-8.
- KANG, H. C., KIM, I. J., PARK, J. H., SHIN, Y., KU, J. L., JUNG, M. S., YOO, B. C., KIM, H. K. & PARK, J. G. 2004. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*, 10, 272-84.
- KATO, M., SHINOZAWA, T., KATO, S., AWAYA, A. & TERADA, T. 2000. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 848-52.
- KERZERHO, J., ADOTEVI, O., CASTELLI, F. A., DOSSET, M., BERNARDEAU, K., SZELY, N., LANG, F., TARTOUR, E. & MAILLÈRE, B. 2010. The angiogenic growth factor and biomarker midkine is a tumor-shared antigen. *J Immunol*, 185, 418-23.
- KLEIN, A. P., HRUBAN, R. H., BRUNE, K. A., PETERSEN, G. M. & GOGGINS, M. 2001. Familial pancreatic cancer. *Cancer J*, 7, 266-73.
- KLEIN, W. M., HRUBAN, R. H., KLEIN-SZANTO, A. J. & WILENTZ, R. E. 2002. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol*, 15, 441-7.
- KOJIMA, S., MURAMATSU, H., AMANUMA, H. & MURAMATSU, T. 1995. Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 9590-6.
- KONISHI, N., NAKAMURA, M., NAKAOKA, S., HIASA, Y., CHO, M., UEMURA, H., HIRAO, Y., MURAMATSU, T. & KADOMATSU, K. 1999. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology*, 57, 253 - 257.
- KRETSCHMER-KAZEMI FAR, R. & SCZAKIEL, G. 2003. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 31, 4417-24.
- KULIK, G., CARSON, J. P., VOMASTEK, T., OVERMAN, K., GOOCH, B. D., SRINIVASULA, S., ALNEMRI, E., NUNEZ, G. & WEBER, M. J. 2001. Tumor necrosis factor alpha induces BID cleavage and bypasses antiapoptotic signals in prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res*, 61, 2713-9.
- KURTZ, A., SCHULTE, A. M. & WELLSTEIN, A. 1995. Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog*, 6, 151-77.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANE, K. B., ZOIA, O. & DAVIDSON, J. M. 1992. Semidry electrophoretic transfer of RNA to membranes. *Biotechniques*, 12, 340-2, 346.
- LAPPNOW 2001. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*, 42, 12-27.
- LI, D., XIE, K., WOLFF, R. & ABBRUZZESE, J. L. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet*, 363, 1049-57.
- LIEBER, M., MAZZETTA, J., NELSON-REES, W., KAPLAN, M. & TODARO, G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*, 15, 741-7.



- LIU, Y., EL-NAGGAR, S., DARLING, D. S., HIGASHI, Y. & DEAN, D. C. 2008. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*, 135, 579-88.
- LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P. & WHITCOMB, D. C. 2000. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*, 84, 565-73.
- LYON, J. L., SLATTERY, M. L., MAHONEY, A. W. & ROBISON, L. M. 1993. Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2, 513-8.
- MAEDA, N., ICHIHARA-TANAKA, K., KIMURA, T., KADOMATSU, K., MURAMATSU, T. & NODA, M. 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem*, 274, 12474-9.
- MAEDA, S., SHINCHI, H., KURAHARA, H., MATAKI, Y., NOMA, H., MAEMURA, K., ARIDOME, K., YOKOMINE, T., NATSUGOE, S., AIKOU, T. & TAKAO, S. 2007. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer*, 97, 405-11.
- MAEHARA, H., KANAME, T., YANAGI, K., HANZAWA, H., OWAN, I., KINJOU, T., KADOMATSU, K., IKEMATSU, S., IWAMASA, T., KANAYA, F. & NARITOMI, K. 2007. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 757-62.
- MAIER, H. J., SCHMIDT-STRASSBURGER, U., HUBER, M. A., WIEDEMANN, E. M., BEUG, H. & WIRTH, T. 2010. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett*, 295, 214-28.
- MARECHAL, R., MACKEY, J. R., LAI, R., DEMETTER, P., PEETERS, M., POLUS, M., CASS, C. E., SALMON, I., DEVIERE, J. & VAN LAETHEM, J. L. 2010. Deoxycytidine kinase is associated with prolonged survival after adjuvant gemcitabine for resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 116, 5200-6.
- MARECHAL, R., MACKEY, J. R., LAI, R., DEMETTER, P., PEETERS, M., POLUS, M., CASS, C. E., YOUNG, J., SALMON, I., DEVIERE, J. & VAN LAETHEM, J. L. 2009. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 15, 2913-9.
- MARIYAMA, M., KISHI, K., NAKAMURA, K., OBATA, H. & NISHIMURA, S. 1989. Frequency and types of point mutation at the 12th codon of the c-Ki-ras gene found in pancreatic cancers from Japanese patients. *Jpn J Cancer Res*, 80, 622-6.
- MATSUBARA, S., TAKE, M., PEDRAZA, C. & MURAMATSU, T. 1994. Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem*, 115, 1088-96.
- MATSUBARA, S., TOMOMURA, M., KADOMATSU, K. & MURAMATSU, T. 1990. Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem*, 265, 9441-3.

- MATSUMOTO, K., WANAKA, A., MORI, T., TAGUCHI, A., ISHII, N., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T. & TOHYAMA, M. 1994a. Localization of pleiotrophin and midkine in the postnatal developing cerebellum. *Neurosci Lett*, 178, 216-20.
- MATSUMOTO, K., WANAKA, A., TAKATSUJI, K., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T. & TOHYAMA, M. 1994b. A novel family of heparin-binding growth factors, pleiotrophin and midkine, is expressed in the developing rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res*, 79, 229-41.
- MCLOUGHLIN, J. M., MCCARTY, T. M., CUNNINGHAM, C., CLARK, V., SENZER, N., NEMUNAITIS, J. & KUHN, J. A. 2005. TNFerade, an adenovector carrying the transgene for human tumor necrosis factor alpha, for patients with advanced solid tumors: surgical experience and long-term follow-up. *Ann Surg Oncol*, 12, 825-30.
- MCMANUS, M. T. & SHARP, P. A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 3, 737-47.
- MENG, R. D., SHELTON, C. C., LI, Y. M., QIN, L. X., NOTTERMAN, D., PATY, P. B. & SCHWARTZ, G. K. 2009. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res*, 69, 573-82.
- MESSMER, K., JÄHNE, JOACHIM, KÖNIGSRÄINER, ALFRED 2012. *Was gibt es Neues in der Chirurgie? Jahresband 2012: Berichte zur chirurgischen Fort- und Weiterbildung*.
- MICHALAKI, V., SYRIGOS, K., CHARLES, P. & WAXMAN, J. 2004. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*, 90, 2312-6.
- MITSIADIS, T. A., SALMIVIRTA, M., MURAMATSU, T., MURAMATSU, H., RAUVALA, H., LEHTONEN, E., JALKANEN, M. & THESLEFF, I. 1995. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*, 121, 37-51.
- MIYASHIRO, I., KANAME, T., SHIN, E., WAKASUGI, E., MONDEN, T., TAKATSUKA, Y., KIKKAWA, N., MURAMATSU, T., MONDEN, M. & AKIYAMA, T. 1997. Midkine expression in human breast cancers: expression of truncated form. *Breast Cancer Res Treat*, 43, 1-6.
- MOHLER, K. M., TORRANCE, D. S., SMITH, C. A., GOODWIN, R. G., STREMLER, K. E., FUNG, V. P., MADANI, H. & WIDMER, M. B. 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*, 151, 1548-61.
- MOSKALUK, C. A., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. 1997. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 57, 2140-3.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MURAMATSU, H., SHIRAHAMA, H., YONEZAWA, S., MARUTA, H. & MURAMATSU, T. 1993. Midkine, a retinoic acid-inducible

- growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol*, 159, 392-402.
- MURAMATSU, H., SONG, X. J., KOIDE, N., HADA, H., TSUJI, T., KADOMATSU, K., INUI, T., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S. & MURAMATSU, T. 1996. Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas. *J Biochem*, 119, 1171-5.
- MURAMATSU, H., ZOU, P., SUZUKI, H., ODA, Y., CHEN, G. Y., SAKAGUCHI, N., SAKUMA, S., MAEDA, N., NODA, M., TAKADA, Y. & MURAMATSU, T. 2004. alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci*, 117, 5405-15.
- MURAMATSU, T. 1993. Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. *Int J Dev Biol*, 37, 183-8.
- MURAMATSU, T. 2002. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem*, 132, 359-71.
- MURAMATSU, T. 2010. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86, 410-25.
- MURUGESAN, S. R., KING, C. R., OSBORN, R., FAIRWEATHER, W. R., O'REILLY, E. M., THORNTON, M. O. & WEI, L. L. 2009. Combination of human tumor necrosis factor-alpha (hTNF-alpha) gene delivery with gemcitabine is effective in models of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*, 16, 841-7.
- NAKAGAWARA, A., MILBRANDT, J., MURAMATSU, T., DEUEL, T. F., ZHAO, H., CNAAN, A. & BRODEUR, G. M. 1995. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res*, 55, 1792-7.
- NAKANISHI, T., KADOMATSU, K., OKAMOTO, T., ICHIHARA-TANAKA, K., KOJIMA, T., SAITO, H., TOMODA, Y. & MURAMATSU, T. 1997. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem*, 121, 197-205.
- NARITA, H., CHEN, S., KOMORI, K. & KADOMATSU, K. 2008. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg*, 47, 1322-9.
- NGUYEN, Q. D., SHAH, S. M., HAFIZ, G., QUINLAN, E., SUNG, J., CHU, K., CEDARBAUM, J. M. & CAMPOCHIARO, P. A. 2006. A phase I trial of an IV-administered vascular endothelial growth factor trap for treatment in patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 113, 1522 e1-1522 e14.
- NURCOMBE, V., FRASER, N., HERLAAR, E. & HEATH, J. K. 1992. MK: a pluripotential embryonic stem-cell-derived neuroregulatory factor. *Development*, 116, 1175-83.
- O'BRIEN, T., CRANSTON, D., FUGGLE, S., BICKNELL, R. & HARRIS, A. L. 1996. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res*, 56, 2515-8.

- OHHASHI, S., OHUCHIDA, K., MIZUMOTO, K., EGAMI, T., YU, J., CUI, L., TOMA, H., TAKAHATA, S., NABAE, T. & TANAKA, M. 2009. Midkine mRNA is overexpressed in pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*, 54, 811-5.
- OMI, K., TOKUNAGA, K. & HOHJOH, H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*, 558, 89-95.
- RANGANATHAN, P., WEAVER, K. L. & CAPOBIANCO, A. J. 2011. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*, 11, 338-51.
- RAWNAQ, T., KUNKEL, M., BACHMANN, K., SIMON, R., ZANDER, H., BRANDL, S., SAUTER, G., IZBICKI, J. R. & KAIFI, J. T. 2010. Serum Midkine Correlates with Tumor Progression and Imatinib Response in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Ann Surg Oncol*.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008.
- ROEBUCK, B. D. 1992. Dietary fat and the development of pancreatic cancer. *Lipids*, 27, 804-6.
- ROZENBLUM, E., SCHUTTE, M., GOGGINS, M., HAHN, S. A., PANZER, S., ZAHURAK, M., GOODMAN, S. N., SOHN, T. A., HRUBAN, R. H., YEO, C. J. & KERN, S. E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 57, 1731-4.
- SCHUTTE, M., HRUBAN, R. H., GERADTS, J., MAYNARD, R., HILGERS, W., RABINDRAN, S. K., MOSKALUK, C. A., HAHN, S. A., SCHWARTE-WALDHOFF, I., SCHMIEGEL, W., BAYLIN, S. B., KERN, S. E. & HERMAN, J. G. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, 57, 3126-30.
- SHIMOMURA, O. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*, 217, 1-15.
- SILVERMAN, D. T., DUNN, J. A., HOOVER, R. N., SCHIFFMAN, M., LILLEMOR, K. D., SCHOENBERG, J. B., BROWN, L. M., GREENBERG, R. S., HAYES, R. B., SWANSON, G. M. & ET AL. 1994. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst*, 86, 1510-6.
- SINGH, A. B. & HARRIS, R. C. 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*, 17, 1183-93.
- SMIT, V. T., BOOT, A. J., SMITS, A. M., FLEUREN, G. J., CORNELISSE, C. J. & BOS, J. L. 1988. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res*, 16, 7773-82.
- SPANO, J. P., CHODKIEWICZ, C., MAUREL, J., WONG, R., WASAN, H., BARONE, C., LETOURNEAU, R., BAJETTA, E., PITHAVALA, Y., BYCOTT, P., TRASK, P., LIAU, K., RICART, A. D., KIM, S. & RIXE, O. 2008. Efficacy of gemcitabine plus axitinib compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: an open-label randomised phase II study. *Lancet*, 371, 2101-8.

- STARK, G. R., KERR, I. M., WILLIAMS, B. R., SILVERMAN, R. H. & SCHREIBER, R. D. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67, 227-64.
- STOICA, G. E., KUO, A., POWERS, C., BOWDEN, E. T., SALE, E. B., RIEGEL, A. T. & WELLSTEIN, A. 2002. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*, 277, 35990-8.
- SUNNARBORG, S. W., HINKLE, C. L., STEVENSON, M., RUSSELL, W. E., RASKA, C. S., PESCHON, J. J., CASTNER, B. J., GERHART, M. J., PAXTON, R. J., BLACK, R. A. & LEE, D. C. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*, 277, 12838-45.
- TAKADA, T., TORIYAMA, K., MURAMATSU, H., SONG, X. J., TORII, S. & MURAMATSU, T. 1997. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem*, 122, 453-8.
- TAKEI, Y., KADOMATSU, K., GOTO, T. & MURAMATSU, T. 2006. Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts. *Cancer*, 107, 864-73.
- TAKEI, Y., KADOMATSU, K., MATSUO, S., ITOH, H., NAKAZAWA, K., KUBOTA, S. & MURAMATSU, T. 2001. Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res*, 61, 8486-91.
- TAN, M. H., NOWAK, N. J., LOOR, R., OCHI, H., SANDBERG, A. A., LOPEZ, C., PICKREN, J. W., BERJIAN, R., DOUGLASS, H. O., JR. & CHU, T. M. 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*, 4, 15-23.
- TSUTSUI, J., KADOMATSU, K., MATSUBARA, S., NAKAGAWARA, A., HAMANOUE, M., TAKAO, S., SHIMAZU, H., OHI, Y. & MURAMATSU, T. 1993. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res*, 53, 1281 - 1285.
- UNTCH, M. 2006. Adjuvant Treatment with Trastuzumab in Patients with Breast Cancer. *Dtsch Arztebl International*, 3406-.
- VAN DER HORST, E. H., FRANK, B. T., CHINN, L., COXON, A., LI, S., POLESSO, F., SLAVIN, A., RUEFLI-BRASSE, A. & WESCHE, H. 2008. The growth factor Midkine antagonizes VEGF signaling in vitro and in vivo. *Neoplasia*, 10, 340-7.
- VASSALLI, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-52.
- VICKERS, T. A., KOO, S., BENNETT, C. F., CROOKE, S. T., DEAN, N. M. & BAKER, B. F. 2003. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem*, 278, 7108-18.
- WANG, H., WORD, B. R. & LYN-COOK, B. D. 2011a. Enhanced efficacy of gemcitabine by indole-3-carbinol in pancreatic cell lines: the role of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Anticancer Res*, 31, 3171-80.

- WANG, Z., LI, Y., KONG, D. & SARKAR, F. H. 2010. The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr Drug Targets*, 11, 745-51.
- WANG, Z. H., CHEN, H., GUO, H. C., TONG, H. F., LIU, J. X., WEI, W. T., TAN, W., NI, Z. L., LIU, H. B. & LIN, S. Z. 2011b. Enhanced antitumor efficacy by the combination of emodin and gemcitabine against human pancreatic cancer cells via downregulation of the expression of XIAP in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 39, 1123-31.
- YANG, G., THOMPSON, J. A., FANG, B. & LIU, J. 2003. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. *Oncogene*, 22, 5694-701.
- YE, C., QI, M., FAN, Q. W., ITO, K., AKIYAMA, S., KASAI, Y., MATSUYAMA, M., MURAMATSU, T. & KADOMATSU, K. 1999. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 79, 179-84.
- YOU, Z., DONG, Y., KONG, X., BECKETT, L., GANDOUR-EDWARDS, R. & MELAMED, J. 2008. Midkine is a NF-kappaB-inducible gene that supports prostate cancer cell survival. *BMC Medical Genomics*, 1, 6.
- YOU, Z., OUYANG, H., LOPATIN, D., POLVER, P. & WANG, C. 2001. Nuclear factor-kappa B-inducible death effector domain-containing protein suppresses tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting caspase-8 activity. *J Biol Chem*, 276, 26398 - 26404.
- YU, L., YAMAMOTO, N., KADOMATSU, K., MURAMATSU, T., MATSUBARA, S., SAKIYAMA, S. & TAGAWA, M. 2004. Midkine promoter can mediate transcriptional activation of a fused suicide gene in a broader range of human breast cancer compared with c-erbB-2 promoter. *Oncology*, 66, 143-9.
- YUAN, B., LATEK, R., HOSSBACH, M., TUSCHL, T. & LEWITTER, F. 2004. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res*, 32, W130-4.
- ZENG, Y. & CULLEN, B. R. 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 8, 855-60.
- ZHOU, J., JIN, Y., GAO, Y., WANG, H., HU, G., HUANG, Y., CHEN, Q., FENG, M. & WU, C. 2002. Genomic-scale analysis of gene expression profiles in TNF-alpha treated human umbilical vein endothelial cells. *Inflamm Res*, 51, 332 - 341.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit

8.1

## **Danksagung**

Ich möchte hiermit allen Menschen danken, die mich auf verschiedenste Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben und beim Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Für die Bereitstellung der materiellen Voraussetzungen und technischen Geräte sowie aller erforderlichen Daten danke ich dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS, FRCS Ed. Hon.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Bockhorn, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Betreuung sowie für die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Frau Dr. med. T. Rawnaq für die Betreuung und ihren Rat bei der Planung der Experimente sowie Unterstützung bei Schwierigkeiten und organisatorischen Problemen bedanken. Herrn C. Güngör danke ich für die Anleitung der Experimente und nicht zuletzt für die aufgebrachte Geduld, Hilfestellung und Beistand in der Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Angestellten Frau A. Heinecke sowie Frau M. Trochimiuk für ihre Hilfe und Einweisung in die Laborarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und Kollegin Maïke Steiner für die unvergesslichen gemeinsamen und langen Labortage sowie für die ideelle Unterstützung im Studium und bei dieser Dissertation.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich meiner Mutter Hilke Dietrich, meinem Onkel Wulf Dietrich und meiner Freundin Lara Iffland. Vielen Dank für die konstruktiven Anmerkungen.

Einen ganz persönlichen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Hilke und Robert Dietrich aussprechen, die mir das Studium ermöglicht haben und mich mit ihrer bedingungslosen Unterstützung und ihrem Glauben in meine Fähigkeiten durch das Studium begleitet haben.



## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: