

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
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 Ösophaguskarzinomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Maike Steiner, geb. Frank

aus Lüneburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

am: 19.03.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Fehse

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. R. Simon

Für meinen Ehemann
Henning

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
LITERATURVERZEICHNIS	IX
DANKSAGUNG	XIX
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XX

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1 Ösophaguskarzinome	2
2.1.1 Plattenepithelkarzinome des Ösophagus	2
2.1.2 Adenokarzinome des Ösophagus	3
2.1.3 Karzinome des gastroösophagealen Übergangs	4
2.1.4 Symptome	5
2.1.5 Diagnostik.....	5
2.1.6 UICC-Klassifikation.....	6
2.1.6.1 TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome	6
2.1.6.2 Grading von Ösophaguskarzinomen	6
2.1.6.3 Staging von Ösophaguskarzinomen	7
2.1.7 Therapie	7
2.1.8 Prognose	9
2.2 Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine	10
2.2.1 Allgemeine Beschreibung und molekularer Aufbau.....	10
2.2.2 Rezeptoren und Signaltransduktion	11
2.2.2.1 PTP ζ , DNER, Integrine.....	11
2.2.2.2 Anaplastic lymphoma kinase (ALK)	12
2.2.2.3 Notch2	12
2.2.2.4 Lipoprotein related receptor protein 1 (LRP1).....	13
2.2.3 Eigenschaften und Funktionen	13
2.3 Die Wachstumsfaktoren TNF- α und EGF	16

2.3.1	TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)	16
2.3.2	EGF (Epidermal Growth-Factor).....	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Tumorzelllinien.....	18
3.1.1.1	OE 19 (Synonym: JROECL19)	18
3.1.1.2	OE 33 (Synonym: JROECL33)	18
3.1.1.3	PT 1590 und LN 1590	19
3.1.2	Zellkulturmedien	19
3.1.3	Antikörper	19
3.1.4	Wachstumsfaktoren	20
3.1.5	Small interfering Ribonucleic Acid (siRNA).....	20
3.1.6	Puffer, Lösungen und andere Chemikalien	20
3.1.7	Kits	20
3.1.8	Geräte	21
3.1.9	Software.....	21
3.1.9.1	MikroWin 2000.....	21
3.1.9.2	ImageJ.....	22
3.1.10	Verbrauchsmaterial.....	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Zellkultur	23
3.2.2	Passagieren der Zellen.....	23
3.2.3	Transfektion und RNA-Interferenz.....	23

3.2.4	SDS-Page und Western-Blot	27
3.2.5	MTT-Proliferationstest	32
3.2.6	Stimulation mit Wachstumsfaktoren (TNF- α , EGF)	34
3.2.7	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	34
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Ergebnisse der Vorversuche	36
4.2	Midkine-Depletion	37
4.3	Proliferation	40
4.4	Stimulation der Midkine-Expression.....	41
5.	DISKUSSION	43
5.1	RNA-Interferenz und Midkine-Depletion.....	43
5.2	Proliferation nach Midkine-Depletion	44
5.3	Midkine als Tumor- und Prognosemarker	44
5.4	Induktion von Midkine durch Wachstumsfaktoren (TNF- α , EGF).....	47
5.5	Midkine als therapeutisches Target.....	48
6.	ZUSAMMENFASSUNG	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALK	anaplastic lymphoma kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	bicinchoninic acid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body-Mass-Index
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CT	Computertomographie
ddH₂O	double-distilled water
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DNER	Delta/Notch-like EGF-related receptor
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	double stranded DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
h	hour (Stunde)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM	Intercellular adhesion molecules
I.E.	Internationale Einheit
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
LN	Lymphknoten
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
mA	Milliampère
MEM	Minimum Essential Media
MHC	Major Histocompatibility Complex
MK	Midkine
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mo	mouse (Maus)
MPNST	maligne periphere Nervenscheidentumoren
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

n	number (Anzahl)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
OE	Ösophagus
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PES	Phenazethosulfat
PET	Positronenemissionstomographie
PET-CT	Positronenemissionstomographie kombiniert mit Computertomographie
pmol	Picomol
PT	Primärtumor
PTN	Pleiotrophin
PTPζ	Protein-Tyrosin-Phosphatase ζ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QK	Qualitätskontrolle
rb	Rabbit (Kaninchen)
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	Short Hairpin Ribonucleic Acid
siRNA	Small Interfering Ribonucleic Acid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUM	Tumormedium
UICC	Union for International Cancer Control
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF-C	vascular endothelial growth factor C
WR Puffer	Working Reconstitution Puffer

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: LAGE DER ÖSOPHAGUSENGEN	3
ABBILDUNG 2: STRUKTUR VON MIDKINE (MODIFIZIERT NACH MURAMATSU 2002).....	10
ABBILDUNG 3: AUSWAHL AN BISHER IDENTIFIZIERTEN MIDKINE-REZEPTOREN (KADOMATSU ET AL. 2013).....	11
ABBILDUNG 4: VORKOMMEN UND EFFEKTE VON MIDKINE	15
ABBILDUNG 5: SERUM-MIDKINE-KONZENTRATION BEI PATIENTEN MIT ÖSOPHAGUSKARZINOM I	15
ABBILDUNG 6: WESTERN BLOT: AUFBAU (SCHEMATISCH)	30
ABBILDUNG 7: MTT-TEST: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG.....	32
ABBILDUNG 8: MIDKINE-DEPLETION IN OE 19	38
ABBILDUNG 9: MIDKINE-DEPLETION IN OE 33	38
ABBILDUNG 10: MIDKINE IN ÜBERSTÄNDEN NACH DEPLETION IN PT 1590	39
ABBILDUNG 11: MIDKINE IN ÜBERSTÄNDEN NACH DEPLETION IN LN 1590	40
ABBILDUNG 12: ERGEBNISSE DES PROLIFERATIONSESSAYS.....	41
ABBILDUNG 13: ZELLWACHSTUM NACH STIMULATION BEI ZELLEN DER LINIE OE 19	42

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: TNM-KLASSIFIKATION ÖSOPHAGUSKARZINOME (MOD. N. WITTEKIND UND OBERSCHMID 2010)...	6
TABELLE 2: GRADING VON KARZINOMEN DES ÖSOPHAGUS (WITTEKIND UND OBERSCHMID 2010).....	7
TABELLE 3: STAGING VON ÖSOPHAGUSKARZINOMEN (WITTEKIND UND OBERSCHMID 2010).....	7
TABELLE 4: TUMORZELLINIEN	18
TABELLE 5: ZELLKULTURMEDIEN	19
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG TUM	19
TABELLE 7: ANTIKÖRPER	19
TABELLE 8: WACHSTUMSFAKTOREN	20
TABELLE 9: SIRNA.....	20
TABELLE 10: MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN UND ANDERE CHEMIKALIEN	20
TABELLE 11: KITS	20
TABELLE 12: GERÄTE	21
TABELLE 13: VERBRAUCHSMATERIAL.....	22
TABELLE 14: STANDARD-PIPETTIERSHEMA FÜR PROTEIN ASSAY KIT	27
TABELLE 15: PIPETTIERSHEMA FÜR DIE GELHERSTELLUNG (TRENN- UND SAMMELGEL)	28
TABELLE 16: STANDARD-PIPETTIERSHEMA FÜR ELISA KIT	35
TABELLE 17: SERUM-MIDKINE-KONZENTRATION BEI PATIENTEN MIT ÖSOPHAGUSKARZINOM II.....	36
TABELLE 18: MULTI-TUMOR-ARRAY FÜR KARZINOME DES ÖSOPHAGUS	36
TABELLE 19: OE 19 ZELLKULTUR NACH TRANSFEKTION UNTER DURCHLICHT/FLUORESZENZMIKROSKOPISCH....	37

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Ösophaguskarzinom belegt Platz sechs bei der Häufigkeit krebsbedingter Todesursachen weltweit. Die Prognose ist meist schlecht, da es wegen fehlender Frühsymptome häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Ein Ösophaguskarzinom breitet sich rasch lokal aus, metastasiert frühzeitig lymphogen und spät hämatogen. Bislang gibt es keine spezifischen zuverlässigen Tumormarker oder effektive Methoden der Früherkennung.

Der Wachstumsfaktor Midkine (MK) fördert Mitosen in Tumorzellen, treibt die Angiogenese an, wirkt der Apoptose entgegen und fördert somit das Tumorwachstum. MK wird in einer Vielzahl von Tumorentitäten verstärkt exprimiert. So konnte auch beim Ösophaguskarzinom eine Überexpression des MK-Gens nachgewiesen werden.

Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente war festzustellen, ob die MK-Expression mittels RNA-Interferenz im Zellmodell verschiedener Ösophaguskarzinomzellen herunterreguliert werden kann und welchen Einfluss dieses auf die Proliferation der Zellen hat. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Expression von MK in der Zellkultur überprüft. Der Einfluss von MK auf die Tumorigenität wurde genauer hinterfragt. Durch das bessere Verständnis über die Möglichkeiten der Stimulation und Depletion von MK könnte eventuell nach weiteren, diesem Projekt angeschlossenen, Experimenten mit stabiler Depletion des MK-Gens ein therapeutischer Nutzen generiert werden.

Im Zellmodell wurde die MK-Expression über *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) unterbunden und die dadurch veränderte Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt. Eine gegen MK gerichtete siRNA wurde mittels Lipofektion in die Zellen eingeschleust und der Erfolg der Transfektion im Western Blot überprüft. Die verminderte MK-Sezernierung wurde nach Depletion des Gens auch in den Zellkulturüberständen detektiert. Im Anschluss an die Depletion wurde die Proliferation der Zellen in einem MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Proliferations-Test ermittelt. Zusätzliches Interesse galt dem Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Expression von MK. Daher wurden Zelllinien in der Zellkultur mit normalem Wachstumsmedium mit und ohne fetalem Kälberserum (FCS) und mit alleiniger Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren inkubiert und mittels anschließendem *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) die MK-Konzentration gemessen. Es sollte festgestellt werden, welche Faktoren die MK-Expression in welchem Ausmaß beeinflussen.

2. Einleitung

2.1 Ösophaguskarzinome

Weltweit betrachtet belegt das Ösophaguskarzinom den sechsten Platz bei der Häufigkeit krebsbedingter Todesursachen. In Europa hat es eine Inzidenz von 8:100.000 pro Jahr. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Betroffenen beträgt 5:1 (Herold 2010).

Bei der Inzidenz von Ösophaguskarzinomen ist zu beachten, dass es starke regionale Unterschiede gibt. So findet sich das Plattenepithelkarzinom vermehrt in China, Chile und Südafrika und das Adenokarzinom eher in der westlichen Welt (Ke 2002, Siewert 2006). Neben den unterschiedlichen Regionen spielen auch das Alter, die ethnische Zugehörigkeit und andere Risikofaktoren, wie zum Beispiel gewisse Lebensgewohnheiten und Nahrungsmittel eine wichtige Rolle (Ghadirian 1987, Blot 1994, Corley und Buffler 2001).

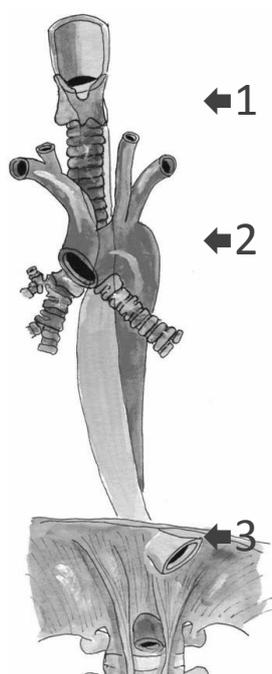
Histologisch unterscheidet man Adeno- und Plattenepithelkarzinome. Neben diesen Formen finden sich in sehr seltenen Fällen auch andere, nicht weiter differenzierte Karzinome der Speiseröhre. Letztere machen weniger als 5 % aller Ösophaguskarzinome aus.

2.1.1 Plattenepithelkarzinome des Ösophagus

Plattenepithelkarzinome des Ösophagus treten gehäuft in einigen Regionen Frankreichs, Nordchinas oder Südafrikas auf (Holmes und Vaughan 2007). Darüber hinaus existiert auch ein sogenannter Ösophagus-Karzinom-Gürtel („*esophageal cancer belt*“), welcher sich vom Norden Irans über Zentralasien nach Nordchina erstreckt. Bezogen auf einen beobachteten Zeitraum von 1994 bis 2003 waren knapp 80 % der hier beobachteten Ösophaguskarzinome Plattenepithelkarzinome (Gholipour et al. 2008). Als Ursache wird ein dort häufig vorliegendes Risikoverhalten und risikobehaftete Lebensumstände mit schlechtem Ernährungsstatus durch zu wenig Obst und Gemüse oder das vermehrte und wiederholte Trinken von heißen Getränken diskutiert (Engel et al. 2003). In der westlichen Welt sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms in der Speiseröhre konzentrierter Alkohol und Nikotinabusus (Engel et al. 2003, Siewert 2007).

Weltweit nimmt der relative Anteil von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus an der Gesamtheit aller Ösophaguskarzinome ab, da der Anteil der Adenokarzinome in den letzten Jahrzehnten exponentiell zunimmt (Bollschweiler und Ell 2004). Plattenepithelkarzinome

kommen in allen Abschnitten des Ösophagus vor, vorzugsweise allerdings an den drei physiologischen Engen, welche sich am Ösophaguseingang, an der Kreuzung des Aortenbogens mit dem linken Hauptbronchus und an der Durchtrittsstelle des Zwerchfells befinden (Abbildung 1). Die Häufigkeit in den unterschiedlichen Abschnitten der Speiseröhre verteilt sich folgendermaßen: oberes Drittel 15 %, mittleres Drittel 35 % und unteres Drittel 50 % (Bommas-Ebert et al. 2011). Im Gegensatz zu den Adenokarzinomen des Ösophagus handelt es sich in der Pathogenese der Plattenepithelkarzinome zunächst um eine epitheliale Dysplasie mit einem nachfolgendem Carcinoma in situ und einem im Anschluss folgenden invasiven Karzinom (Alexandrou et al. 2002, Mariette et al. 2005, Siewert und Ott 2007).



**Abbildung 1: Lage der Ösophagusengen
(modifiziert nach Thurnher et al. 2011)**

Die Speiseröhre weist drei Engstellen auf: Die obere Enge liegt hinter dem Ringknorpel des Kehlkopfes (← 1), die mittlere Enge ist bedingt durch die Nähe zu Aortenbogen und Trachea (← 2) und die untere Enge entsteht beim Durchtritt durch das Zwerchfell (← 3).

Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags

2.1.2 Adenokarzinome des Ösophagus

Adenokarzinome hingegen kommen vor allem bei Männern kaukasischen Ursprungs im Alter um 65 Jahre vor. Die Inzidenz der Adenokarzinome des Ösophagus zeigt, ebenso wie die des Barrett-Syndroms, steigende Tendenzen (Devesa et al. 1998, Blot und McLaughlin 1999, Bollschweiler et al. 2001). Eine Ursache hierfür ist zunehmende Wohlstandsgesellschaft mit häufigerem Auftreten von Übergewicht und Adipositas. Es gibt einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten BMI (*Body-Mass-Index*) und dem Auftreten von Adenokarzinomen des Ösophagus. Je höher der BMI, desto deutlicher ist dabei die Korrelation, welche für Männer und Frauen gleichermaßen gilt (Kubo und Corley 2006). Die meisten Adenokarzinome des Ösophagus entwickeln sich aus Barrett-Syndromen, welche auf dem Boden einer

chronischen gastroösophagealen Refluxkrankheit entstehen. Aus diesem Grund finden sich die Adenokarzinome meist im distalen Ösophagus. Ein Barrett-Ösophagus stellt eine Präkanzerose dar und muss engmaschig kontrolliert werden, damit eine maligne Entartung frühzeitig erkannt wird. Lagergren et al. veröffentlichten 1999 das Ergebnis einer Fall-Kontroll-Studie, bei der Patientengruppen in Schweden mit gastroösophagealem Reflux klinisch verfolgt wurden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass ein starker kausaler Zusammenhang zwischen gastroösophagealem Reflux und dem Auftreten von Adenokarzinomen des Ösophagus bestehen muss. Je häufiger, schwerwiegender und lange vorbestehend die Refluxbeschwerden sind, desto höher ist das Risiko des Auftretens eines Adenokarzinoms des Ösophagus (Lagergren et al. 1999). Bezüglich der Pathogenese wird für die Adenokarzinome im Gegensatz zu den Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus beschrieben, dass es als Folge einer persistierenden gastroösophagealen Refluxkrankheit zu einer intestinalen Metaplasie und im weiteren Verlauf zunächst zur Dysplasie mit letztendlich nachfolgender Malignität kommt (Alexandrou et al. 2002, Mariette et al. 2005, Siewert und Ott 2007).

2.1.3 Karzinome des gastroösophagealen Übergangs

Bei Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs handelt es sich um eine Sonderform, welche je nach Lokalisation entweder zu den Magenkarzinomen oder zu den Ösophaguskarzinomen gerechnet wird und entsprechend der Gruppenzugehörigkeit therapiert wird. Die gastroösophagealen Übergangskarzinome werden nach Siewert in 3 Typen zugeordnet, die Einteilung erfolgte dabei nach Sitz des Tumorzentrums. Beim Typ I befindet sich das Tumorzentrum im Bereich des distalen Ösophagus, etwa 1-5 cm oral der Z-Linie. Typ II-Karzinome haben den Sitz des Tumorzentrums auf Höhe der Z-Linie (1 cm oberhalb bis 2 cm unterhalb davon) und bei Typ III-Karzinomen liegt das Zentrum 2-5 cm unterhalb der Z-Linie. Typ I zählt zu den Ösophaguskarzinomen, Typ III typischerweise zu den Magenkarzinomen (Inauen und Ruhstaller 2009). Bei Typ II-Karzinomen ist die Zugehörigkeit umstritten. Siewert *et al.* werteten 2005 im Rahmen einer Untersuchung Histologien von entnommenen Karzinomen von 100 Patienten aus der Kategorie II aus und stellten dabei fest, dass in den meisten Fällen ein Karzinom von der Magenschleimhaut auszugehen scheint und dass ein Zusammenhang zum Barrett-Ösophagus nicht eindeutig zu belegen ist (Siewert et al. 2005).

2.1.4 Symptome

Ösophaguskarzinome führen häufig erst im Spätstadium zu Symptomen. Die meist zur Diagnose führende Dysphagie tritt als Spätsymptom normalerweise erst dann auf, wenn bereits zwei Drittel des Ösophaguslumens verlegt sind oder wenn das passierbare Lumen bereits auf 11 mm eingengt ist. Als Frühsymptome sind das retrosternale Brennen und das Globusgefühl zu nennen, diese führen allerdings selten zur Diagnose, da sie unspezifisch sind. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht meist schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einem wandüberschreitenden Tumor mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen. Zu diesem Zeitpunkt ist der klinische Zustand der Patienten durch B-Symptomatik (mit Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust bis hin zur Kachexie) sowie Schmerzen und Heiserkeit geprägt.

Durch das späte Auftreten der Symptome wird die Diagnose häufig erst spät gestellt. Die Entdeckung von Frühkarzinomen ist eher die Ausnahme und tritt höchstens als Zufallsbefund oder im Rahmen von Screeninguntersuchungen auf (Siewert 2006).

2.1.5 Diagnostik

Bei Beschwerden im Bereich des Ösophagus ist die Endoskopie das diagnostische Werkzeug der Wahl. Vorteilhaft hierbei ist, dass eine Probe direkt aus verdächtigen Arealen entnommen und histologisch untersucht werden kann. Somit kann sowohl rasch eine histologische Sicherung erfolgen als auch eine Aussage über den Tumortyp und seine Wachstumseigenschaften getroffen werden. Aus diesen Gründen wird die Endoskopie bei der Erstuntersuchung von Patienten mit Verdacht auf ein Ösophaguskarzinom immer attraktiver und die früher übliche Röntgenkontrastdarstellung gerät in den Hintergrund.

Neben der Diagnostik lokal am Ösophagus selbst, müssen auch mögliche Metastasen gesucht werden. Diese Suche beginnt mit einer gründlichen körperlichen Untersuchung mit Konzentration auf cervicale, supraclaviculäre und axilläre Lymphknoten. Außerdem wird meist eine Computertomographie von Thorax und Abdomen durchgeführt. Die höchste Sensitivität für Fernmetastasen hat die Positronenemissionstomographie in Kombination mit der Computertomographie („PET-CT“).

Für Ösophaguskarzinome ist kein spezifischer Tumormarker bekannt, unspezifische Marker werden dennoch als Verlaufsmarker bestimmt. Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

eignet sich hier das SCC (*Squamous-Cell-Carcinoma*)-Antigen, bei Adenokarzinomen das CEA (Carcinoembryonales Antigen).

2.1.6 UICC-Klassifikation

Die UICC (*Union for International Cancer Control*) wurde 1993 gegründet. Sie ist eine internationale Organisation mit Sitz in der Schweiz, die sich mit der Forschung, Prävention und Behandlung unterschiedlicher Krebserkrankungen beschäftigt. Für Krebserkrankungen generiert die UICC regelmäßig Klassifikationen, welche unter anderem die Planung der Therapie vereinfachen sollen.

2.1.6.1 TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome

Mit der TNM-Methode werden maligne Tumoren klassifiziert.

T-Kategorie: Primärtumor	
T _{is}	Carcinoma in situ/hochgradige intraepitheliale Neoplasie
T1	T1a Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae
	T1b Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	T4a Tumor infiltriert Pleura, Perikard oder Zwerchfell
	T4b Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N-Kategorie: Lymphknotenmetastasen	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden
N1	Lymphknotenmetastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten
N2	Lymphknotenmetastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten
N3	Lymphknotenmetastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M-Kategorie: Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Vorhandensein von Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Ösophaguskarzinome (mod. n. Wittekind und Oberschmid 2010)

„T“ beschreibt die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, „N“ gibt Auskunft über Lymphknotenmetastasen, „M“ über Fernmetastasen.

Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags

2.1.6.2 Grading von Ösophaguskarzinomen

Das *Grading* von Tumoren kann nur durch einen Pathologen erfolgen, da es sich um histopathologische Eigenschaften des Tumors handelt, die erst nach operativer Entfernung des Tumorgewebes oder *post mortem* bestimmt werden können. Es wird der Differenzierungs-

grad der Karzinome beschrieben, der für die Prognose und die Therapie bedeutend ist. Beim *Grading* unterscheiden sich Plattenepithelkarzinome von den Adenokarzinomen des Ösophagus. Diese beiden Entitäten werden daher im Folgenden getrennt betrachtet:

	Plattenepithelkarzinome des Ösophagus	Adenokarzinome des Ösophagus
G1	reichlich Verhornung, gut erkennbare Interzellularbrücken, deutliche Schichtung der tumorösen Epithelverbände	gleichförmige drüsige Struktur, die häufig einem metaplastischen intestinalen Epithel ähneln
G2	Zwischenstellung zwischen G1 und G3	strukturell weder ähnlich G1 noch G3
G3	Verhornung, Interzellularbrücken und Schichtung nur gering ausgeprägt oder vollständig fehlend	irreguläre, kaum erkennbare Drüsen oder einzelne Zell-Ballen, z. T. Schleimbildung
G9	Grad der Differenzierung nicht beurteilbar	Grad der Differenzierung nicht beurteilbar

Tabelle 2: Grading von Karzinomen des Ösophagus (Wittekind und Oberschmid 2010)

Das Grading beschreibt den Differenzierungsgrad eines Karzinoms und ist häufig entscheidend für Prognose und Therapie der Erkrankung.

Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags

2.1.6.3 Staging von Ösophaguskarzinomen

Das „*Staging*“ bezeichnet die Stadieneinteilung maligner Tumoren. Die unterschiedlichen Stadien unterscheiden sich in ihrer Prognose.

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie	
I A	1	0	0	
	B	2	0	
II A	3	0	0	
	B	1,2	1	
III A	4a	0	0	
	3	1	0	
	1,2	2	0	
	B	3	2	0
		4a	1,2	0
	C	4b	jedes	0
jedes		3	0	
IV	jedes	jedes	1	

Tabelle 3: Staging von Ösophaguskarzinomen (Wittekind und Oberschmid 2010)

Die Stadieneinteilung von Ösophaguskarzinomen erfolgt anhand der entsprechenden Kombinationen der TNM-Klassifikation.

Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags

2.1.7 Therapie

Wenn die Diagnostik abgeschlossen ist und nach Zusammenschau aller Befunde eine vollständige Entfernung des Tumors möglich scheint, gilt die chirurgische Therapie als

erstrebenswert. Aus chirurgischer Sicht ist es zweckmäßig, die Karzinome nach ihrer Lage zur Trachealbifurkation zu unterteilen. Man unterscheidet daher Malignome, die oberhalb der Trachealbifurkation liegen von denen, die sich unterhalb davon befinden.

Tumoren oberhalb der Trachealbifurkation sind häufig nur im Stadium T1 und T2 radikal resezierbar. Bei Tumoren in weiter fortgeschrittenen Stadien muss einer möglichen chirurgischen Therapie beispielsweise eine Radiochemotherapie vorangestellt werden, die den Tumor idealerweise verkleinert und ihn somit resezierbar, also einer sekundären chirurgischen Therapie zugänglich macht.

Tumoren im Bereich unterhalb der Trachealbifurkation sind häufig auch dann noch primär radikal operabel, wenn schon ein T3-Stadium vorliegt. Im gesicherten T4-Stadium muss allerdings beispielsweise eine Chemotherapie vorausgehen.

Wegen des möglichen submukösen longitudinalen Metastasierungsweges ist bei der chirurgischen Therapie von Ösophaguskarzinomen stets die subtotale Ösophagektomie unter Belassung eines nur kurzen proximalen Ösophagusrestes indiziert. Bei der chirurgischen Therapie werden verschiedene Techniken unterschieden: *Standardösophagektomie* (Entfernung des Ösophagus mit transthorakalem Zugang), *En-bloc-Ösophagektomie* (Entfernung des Ösophagus inklusive der mediastinalen Lymphknoten mit transthorakalem Zugang) und *transmediastinale (transhiatale) Ösophagektomie* (stumpfe Auslösung des Ösophagus ohne Thorakotomie mit transabdominellen-transcervicalen Zugang). Bei letzterer ist wegen des Zugangsweges eine Lymphadenektomie nur begrenzt möglich.

Bei einer kompletten Lymphadenektomie werden sowohl die mediastinalen als auch die Lymphknoten im Bereich des *Truncus coeliacus* entfernt. Dieses Vorgehen wird auch als 2-Feld-Lymphadenektomie bezeichnet. Ist die Exstirpation der Lymphknoten der Abflussbahnen des Ösophagus am Hals notwendig, so wie es bei proximal gelegenen Karzinomen der Fall ist, spricht man von einer 3-Feld-Lymphadenektomie.

Die Rekonstruktion erfolgt wenn möglich mit der Interposition eines Magenschlauchs. Ist dies nicht möglich, kann auch ein Teil des Colons (vorzugsweise *Colon transversum* mit linker Colonflexur) zur Rekonstruktion der Speisepassage verwendet werden. Aufgrund der ungünstigen vaskulären Versorgung wird ein Dünndarminterponat nur in absoluten Ausnahmen verwendet. Die Gefäßversorgung wird hierbei in aufwändigen mikrovaskulären Anschlüssen an cervicale Gefäße gesichert (Siewert 2006).

Neue und optimierte Therapieverfahren sind derzeit Thema aktueller Studien und Diskussionen. Es wurden bereits verschiedene Techniken in vergleichenden Studien gegenübergestellt und bewertet. Dabei ist zu sagen, dass Patienten, deren Ösophaguskarzinome resezierbar sind, von einer vorangehenden Radiochemotherapie zu profitieren scheinen. In einer Studie von Stahl *et al.* wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem Adenokarzinom des Ösophagus in zwei Gruppen eingeteilt. In beiden Gruppen war eine Operation vorgesehen, in der einen Gruppe mit vorangehender Radiochemotherapie, in der anderen Gruppe mit vorangehender Chemotherapie ohne Strahlentherapie. Es konnte ein signifikant besseres Ansprechen bei vorangegangener Radiochemotherapie gezeigt werden. Eine bessere 3-Jahres-Überlebensrate war im Trend abzusehen, jedoch ohne Signifikanz (Stahl *et al.* 2009).

Das optimale Regime einer Radiochemotherapie vor der Operation ist allerdings noch offen. Bei Patienten, die einer Resektion unterzogen wurden ohne neoadjuvante Therapie wird eine postoperative Therapie in Form von Chemo- oder Radiochemotherapie empfohlen (Adelstein *et al.* 2009, Bédard *et al.* 2001, Minsky 1999).

2.1.8 Prognose

Gelingt die komplette Entfernung des Tumors, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate immerhin 40 %. Schließt man die nicht vollständig resezierten Karzinome mit ein, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 20 %. Prägend für die Prognose ist das Tumorstadium bei Diagnose des Karzinoms. Als wichtigster Faktor ist hierbei das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen anzusehen. Hinsichtlich der Prognose unterscheiden sich Plattenepithel- und Adenokarzinome nur im Stadium I (Siewert 2006).

2.2 Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine

2.2.1 Allgemeine Beschreibung und molekularer Aufbau

Midkine (MK) ist ein basisches sekretorisches Protein mit einer Größe von 13 kDa und Heparin-bindender Aktivität (Tomomura et al. 1990). Es besteht aus zwei Domänen, welche durch mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Entdeckt wurde das Mitglied der Familie der Heparin-bindenden Wachstumshormone in den späten 1980er Jahren (Kadomatsu et al. 1988). Sein Gen wurde 1991 entschlüsselt (Uehara et al. 1991). Die MK-Expression ist durch Retinsäure embryonal induziert. Ursprünglich wurde die MK-RNA nur in reifenden Embryonen von Mäusen und in adulten Nierenzellen nachgewiesen, welches für die Namensgebung des Gens verantwortlich war: „*midgestation embryo and kidney (MK) gene*“.

Midkine ist aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne aufgebaut. Jede Domäne bildet eine β -Faltblatt-Struktur aus jeweils drei Strängen, die untereinander über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 2). Iwasaki et al. (1997) zeigten, dass vor allem die C-terminale Domäne für die biologischen Aktivitäten verantwortlich ist.

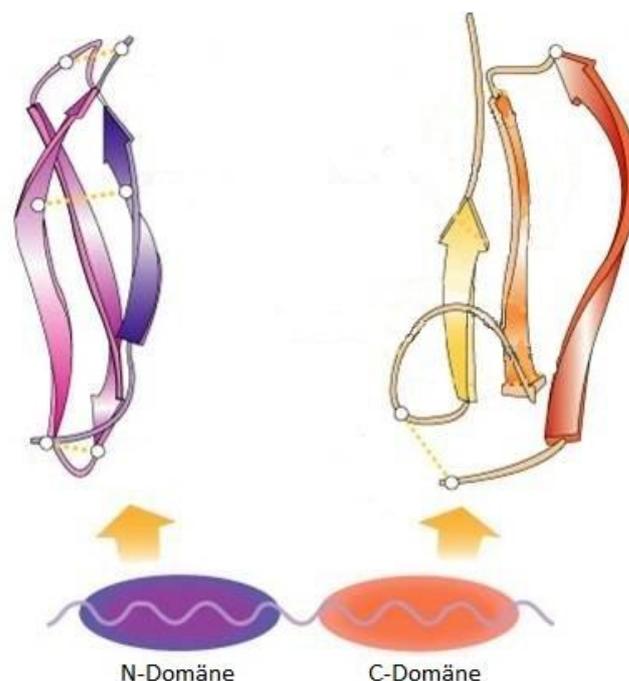


Abbildung 2: Struktur von Midkine (modifiziert nach Muramatsu 2002)

Midkine ist aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne aufgebaut. Jede Domäne bildet eine β -Faltblatt-Struktur aus jeweils drei Strängen, die untereinander über Disulfidbrücken (gestrichelte Linien) miteinander verbunden sind.

Mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press

Das humane MK-Gen befindet sich auf Chromosom 11p11.2, bei Mäusen liegt es auf Chromosom 2 (Simon-Chazottes et al. 1992, Muramatsu 2002). Die Struktur von Midkine ähnelt sehr stark dem Zytokin Pleiotropin. 65 % der Aminosäuresequenzen stimmen bei Midkine und Pleiotropin überein, diese werden deshalb zu einer Familie zusammengefasst (Fabri et al. 1993).

2.2.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

Bisherige Beobachtungen erlauben den Verdacht, dass für Midkine verschiedene Rezeptoren beziehungsweise Rezeptorkomplexe existieren. Einige hiervon sind bereits identifiziert. Eine Übersicht über diese Rezeptorkomplexe gibt Abbildung 3:

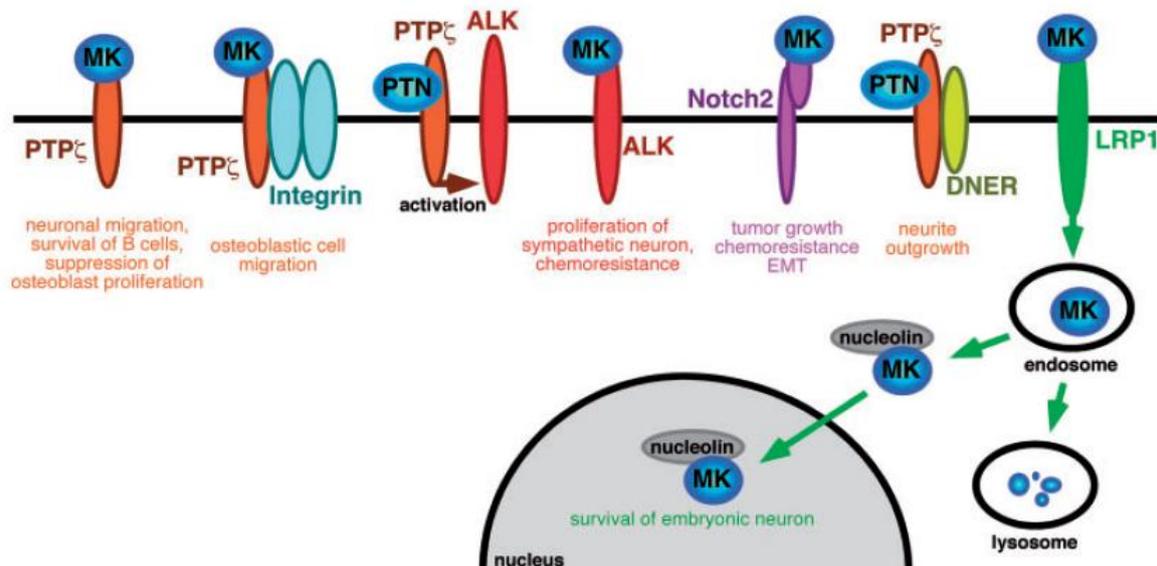


Abbildung 3: Auswahl an bisher identifizierten Midkine-Rezeptoren (Kadomatsu et al. 2013)

Die Abbildung zeigt die bisher identifizierten Rezeptoren für Midkine: Protein-Tyrosin-Phosphatase ζ (PTP ζ) als MK-Rezeptor, in Interaktion mit Integrinen und als Pleiotrophin (PTN)-Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung der anaplastic lymphoma kinase (ALK) sowie als PTN-Rezeptor in Interaktion mit dem delta/notch-like EGF-related receptor (DNER); Notch2 als MK-Rezeptor und lipoprotein related receptor1 (LRP1) als MK-Rezeptor mit nachfolgender Endozytose und Shuttle-Transfer über nucleolin in den Zellkern. Farblich passend zum jeweiligen Rezeptor sind die Funktionen der jeweiligen Rezeptoren aufgeführt.

Mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press

2.2.2.1 PTP ζ , DNER, Integrine

Protein-Tyrosin-Phosphatase ζ (PTP ζ) fungiert als MK-Rezeptor. MK bindet an die extrazellulär gelegenen Chondroitinsulfat-Ketten dieser transmembranösen Tyrosin-Phosphatase (Maeda et al. 1994). Der heparin-bindende Wachstumsfaktor Pleiotrophin (PTN), ein Verwandter von MK, greift nach Bildung eines Komplexes mit PTP ζ und delta/notch-like EGF

related receptor (DNER) in die Neuritogenese ein. DNER wird normalerweise nach Bindung eines Signalmoleküls endozytiert und bewirkt eine Hemmung des Wachstums bei Nervenzellen. Durch eine Bindung von Pleiotrophin an PTP ζ kommt es aber zu einer gesteigerten Phosphorylierung von DNER, wodurch die Endozytose von DNER gehemmt wird. Daraus resultiert eine Unterdrückung der Hemmung, also eine indirekt gesteigerte Neuritogenese (Fukazawa et al. 2008).

Eine weitere Interaktion mit PTP ζ als MK-Rezeptor ist für Integrine bei Ratten beobachtet worden. MK bindet an $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_1$ -Integrine und induziert im Komplex mit PTP ζ die Migration von osteoblastischen Zellen in Ratten (Muramatsu et al. 2004, Qi et al. 2001).

2.2.2.2 Anaplastic lymphoma kinase (ALK)

Die anaplastic lymphoma kinase (ALK) ist eine Tyrosin-Kinase, deren exakte Rolle in der Interaktion mit MK schwer zu fassen ist (Kadomatsu 2013). Kuo et al. konnten zeigen, dass eine MK-Bindung an ALK eine Phosphorylierung von *insulin receptor substrate 1* zur Folge hat und über eine Aktivierung des MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Signalweg zur Transformation von 32D Zellen aus dem Knochenmark führen kann. Unter anderem spielt hier auch der Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) eine entscheidende Rolle (Kuo et al. 2007). Auch Stoica et al. untersuchten ALK als MK-Rezeptor und beobachteten, dass es schwächer an ALK bindet als PTN (Stoica et al. 2002).

2.2.2.3 Notch2

Der Notch-Rezeptor wurde zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Beobachtungen zufolge führte eine Mutation des Rezeptors zu einer Kerbe (eng. „notch“) in den Flügeln der Fliege, daher erhielt der Rezeptor diesen Namen. Bolós et al. beleuchteten die Tatsache, dass Notch-Rezeptoren sowohl als Tumor-Suppressorgene als auch als Onkogene fungieren können. Entscheidend für die Funktion sind zahlreiche Einflussfaktoren wie Zellart, Signalstärke und Umgebung. Notch-Rezeptoren spielen außerdem in der Entwicklung des Nervensystems, des kardivaskulären Systems und im endokrinen Bereich eine wichtige Rolle (Bolós et al. 2007). Ein entscheidendes Merkmal für die Funktion von Notch-Rezeptoren ist die „laterale Hemmung“ bei der die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der aktivierten Zelle gehemmt werden.

Güngör *et al.* konnten 2011 interessante Beobachtungen zu diesem Thema machen. Die Interaktion von MK mit dem Notch-Rezeptor scheint laut der Studie zum einen für eine Chemoresistenz und zum anderen als Vermittler einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in Pankreaskarzinomzellen verantwortlich zu sein. Zellen mit Chemoresistenz exprimieren vermehrt Notch2-Rezeptoren (Güngör *et al.* 2011). Durch EMT erlangen die Zellen neue Eigenschaften wie beispielsweise die Fähigkeit zur Migration. Eine durch MK induzierte EMT in Keratinozyten mit einer Signaltransduktion über Notch2/Jak2-Stat3 ist bereits belegt (Huang *et al.* 2008).

2.2.2.4 Lipoprotein related receptor protein 1 (LRP1)

Das *Lipoprotein related receptor protein 1* (LRP1) gehört zur LDL-Rezeptor-Familie (LDL = *low density lipoprotein*). MK bindet hochaffin an LRP1. Daraufhin erfolgt die Endozytose des Komplexes und der Transport mittels eines Shuttle-Proteins (nuclein) in den Zellkern, in dem MK seine Funktion ausübt (Shibata *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2004).

Eine detailliertere Beschreibung der Signaltransduktion ist zum aktuellen Stand der Wissenschaft noch nicht möglich, wird aber intensiv beforscht, sodass in naher Zukunft mit weiteren Erkenntnissen zu rechnen ist.

2.2.3 Eigenschaften und Funktionen

Der Wachstumsfaktor Midkine hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und wird auch in Zukunft von großem Interesse in der Erforschung und Therapie maligner Tumoren unterschiedlichster Entitäten sein. Physiologisch ist die MK-Konzentration im Serum nur während der Embryonalzeit oder in Ausnahmesituationen erhöht (Kadomatsu *et al.* 1990, Matsubara *et al.* 1990, Nakamoto *et al.* 1992). Midkine spielt unter anderem eine entscheidende Rolle im Wachstum und in der Entwicklung von Zellen neuronalen Ursprungs (Muramatsu und Muramatsu 1991, Asai *et al.* 1997, Mishima *et al.* 1997).

Aber nicht nur bei der neuronalen Entwicklung, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben kann unter bestimmten Umständen eine erhöhte MK-Konzentration gefunden werden. Zu diesen bestimmten Umständen gehören pathologische Vorgänge bei Entzündungen, Heilungsprozessen und vor allem bei malignen Tumoren. Aus dem Gastrointestinaltrakt wurde dieses Phänomen bereits bei folgenden Karzinomen beobachtet: Speiseröhre, Magen, gastrointestinale Stromatumoren (GIST), Dickdarm und Enddarm

(Aridome et al. 1995, Ye et al. 1999, Miyauchi et al. 1999, Kaifi et al. 2007). Für GIST konnte dabei auch eine besonders schlechte Prognose für betroffene Patienten mit erhöhter MK-Expression im Gewebe gezeigt werden (Kaifi et al. 2007). Bei Karzinomen, die den Magen betreffen, wurde festgestellt, dass MK als ein direkter Stimulator für die gesteigerte Proliferation der malignen Zellen agiert (Xu et al. 2009). Auch Karzinome des Pankreas und hepatozelluläre Karzinome (HCC) weisen eine erhöhte MK-Sezernierung auf (Aridome 1995, Koide et al. 1999, Kato et al. 2000, Maeda et al. 2007, Ohhashi et al. 2008) und die MK-Überexpression scheint für die gesteigerte Proliferation der Pankreaskarzinomzellen verantwortlich zu sein (Güngör et al. 2010 und 2011).

Karzinome der Lunge, des Gallengangs und der Schilddrüse gehen ebenfalls mit einem erhöhten MK-Spiegel im Serum der betroffenen Patienten einher (Ikematsu et al. 2000, Kato 2000). Das gleiche gilt für Wilms-Tumoren sowie Mamma- und Ovarialkarzinome (Tsutsui et al. 1993, Nakanishi et al. 1997, Qin et al. 2011). MK ist in Wilms-Tumoren dafür verantwortlich, dass die Tumorzellen einer therapeutisch erwünschten Apoptoseinduktion durch Cisplatin über die Regulierung der Bcl-2 Expression widerstehen können (Qi et al. 2000). Auch in Karzinomen der Prostata und der Harnblase ist die MK-Serum-Konzentration erhöht und es hat sich gezeigt, dass eine besonders stark erhöhte Konzentration des Proteins bei Harnblasenkarzinomen mit einer schlechteren Prognose einhergeht als bei nur moderater oder geringer Erhöhung von MK im Patientenserum (O'Brien et al. 1996, You et al. 2008).

MK spielt in der Karzinogenese mehrere wichtige Rollen mit verschiedenen Angriffspunkten. Durch MK wird die Zellproliferation gesteigert. Außerdem werden die Migration, Mitogenese, Angiogenese und die Interaktion mit Endothel- und glatten Muskelzellen gefördert (Choudhuri et al. 1997, Ratovitski et al. 1998, Yukio et al. 2002, Dai et al. 2007). Im Tiermodell mit Ratten konnte gezeigt werden, dass durch eine über einen Gentransfer erreichte verstärkte MK-Sezernierung nach einem Myokardinfarkt das Remodeling verhindert wird. Entsprechend behandelte Ratten zeigten außerdem eine weniger ausgeprägte kardiale Dysfunktion als Ratten der Kontrollgruppe (Sumida et al. 2010).

Auch die Fibrinolyse wird von MK beeinflusst. Durch eine Anregung der Bildung von Plasminogenaktivatoren kommt es zu einer gesteigerten Spaltung von Fibrinpolymeren (Kojima et al. 1995). In Abbildung 4 sind das Vorkommen erhöhter MK-Konzentrationen im Patientenserum und die Funktionen dieses Proteins zusammengefasst:

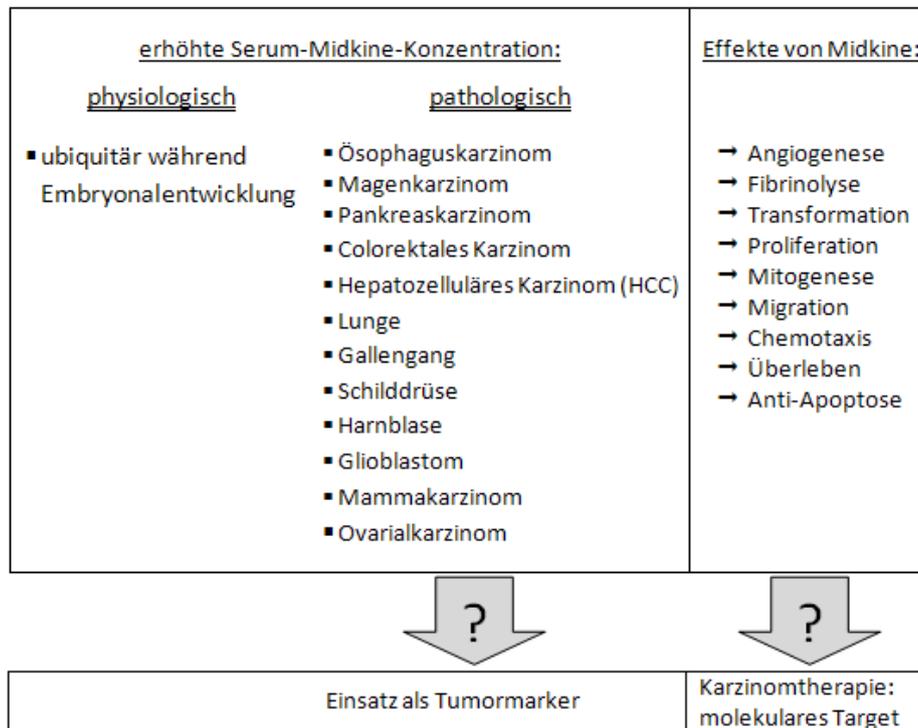


Abbildung 4: Vorkommen und Effekte von Midkine

Erhöhte Midkine-Konzentrationen im Serum können sowohl physiologisch als auch pathologisch sein. Letzteres könnte möglicherweise in der Zukunft für den Einsatz von Midkine als Tumormarker von Bedeutung sein. Außerdem könnte Midkine in der Therapie eine entscheidende Rolle spielen, denn wenn es gelingt, Midkine als molekulares Target auszuschalten, kann es die genannten Funktionen nicht mehr ausüben und daher zur Verkleinerung und zum Absterben des Tumors führen.

Dass die Midkine-Konzentration im Serum von Patienten mit Ösophaguskarzinom im Vergleich zur Midkine-Konzentration im Serum gesunder Patienten erhöht ist, konnten Ikematsu et al. bereits zeigen (2000, Abbildung 5).

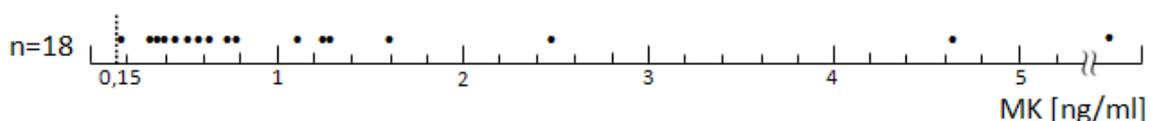


Abbildung 5: Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Ösophaguskarzinom I

Bei 18 Patienten mit Ösophaguskarzinom wurde die MK-Konzentration im Serum bestimmt. Jeder Punkt stellt die jeweilige MK-Serum-Konzentration eines Patienten dar. Die gepunktete Senkrechte (bei 0,15 ng/ml) markiert die durchschnittliche Serumkonzentration von Midkine bei Gesunden (Ikematsu et al. 2000).

Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group

Es erscheint also durchaus sinnvoll, weitere Untersuchungen anzustellen um die Rolle, die MK in der Genese von Ösophaguskarzinomen spielt, besser darstellen und verstehen zu können.

2.3 Die Wachstumsfaktoren TNF- α und EGF

2.3.1 TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)

Der Tumornekrosefaktor- α wurde ursprünglich im Serum von Mäusen entdeckt, welchen zuvor das als Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose bekannte Bacillus Calmette-Guérin (BCG) und Endotoxin injiziert wurde. Es wurde beobachtet, dass das Serum dieser Tiere für gewisse Zelllinien aus Menschen oder Mäusen toxisch war und hämorrhagische Nekrosen verursachen konnte. In einigen Fällen konnte eine komplette Regression von zuvor in die Mäuse transplantierten Tumoren gezeigt werden (Pennica et al. 1984, Shirai et al. 1985). TNF- α gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen. Ein veralteter Name für TNF- α lautet Kachektin. Diese Bezeichnung leitet sich davon ab, dass TNF- α einen katabolen Stoffwechsellzustand herbeiführt, welcher eine Kachexie begünstigt.

Hauptproduzenten von TNF- α sind Makrophagen, welche bei inflammatorischen Reaktionen eine entscheidende Rolle spielen. Die Rezeptoren von TNF- α lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Rezeptoren der ersten Gruppe veranlassen über intrazelluläre Signale den programmierten Zelltod einer betroffenen Zelle. Bindet TNF- α an einen Rezeptor aus der zweiten Gruppe kommt es zur Stimulation und zu einer gesteigerten Transkription weiterer inflammatorischer Mediatoren (Rohleder 2013).

You *et al.* konnten 2008 zeigen, dass die Midkine-Expression in Zellen eines Prostatakarzinoms (LNCaP) durch TNF- α enorm gesteigert werden konnte. Ob dieser Effekt auch bei Zellen von Ösophaguskarzinomen erzielt werden kann war bisher jedoch nicht bekannt.

2.3.2 EGF (*Epidermal Growth-Factor*)

EGF ist ein Wachstumsfaktor, der aus einem Polypeptid mit einer Länge von 53 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von insgesamt 6045 Da aufgebaut ist (Savage et al. 1972). EGF wurde ursprünglich im Speicheldrüsensekret von Mäusen isoliert. Cohen konnte bei Mäusen nach täglicher Injektion von EGF-haltigem Speicheldrüsensekret feststellen, dass dies zum vorzeitigen Öffnen der Augenlider und zum verfrühten Zahndurchbruch führte. EGF erhielt daher zunächst den Namen „Zahn-Lid-Faktor“ (Cohen 1962). Außerdem zeigte Cohen 1965, dass EGF einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation epidermaler Zellen hat. Auch Boonstra *et al.* zeigten 1995 über den Nachweis von „*membrane ruffles*“, dass EGF stimulierend auf die Zellproliferation wirkt. Vergleicht man die Zusammensetzung von EGF

bei Menschen, Schweinen, Ratten und der Mäusen kommt man zu dem Ergebnis, dass 64 % der Aminosäuren übereinstimmen (Jørgensen et al. 1998). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EGF funktionell betrachtet *in vivo* die Proliferation epidermalen Gewebes wie in der Haut, in Epithelien der Luftröhre, der Lunge, der Hornhaut des Auges und des Gastrointestinaltraktes stimuliert (Yates 1991). Genauer untersucht wurde der Einfluss von EGF auf die Darmmukosa, insbesondere beim Vorhandensein von Ulcera. Hierbei wurde beobachtet, dass in der näheren Umgebung der Ulcera befindliche Mukosazellen vermehrt EGF produzierten und es dadurch über eine vermehrte Zellteilung zur Genesung der Schleimhautläsionen kam (Konturek et al. 1988). Zusätzlich wurde beschrieben, dass EGF eine verminderte Magensäuresekretion bewirkt und somit ebenfalls zur Genesung pathologisch veränderter Schleimhaut beiträgt (Olsen et al. 1984).

Auch auf die Midkine-Expression hat EGF offenbar einen Einfluss. You *et al.* konnten 2008 für EGF einen positiven Effekt auf die Midkine-Expression in Prostatakarzinomzellen (LNCaP) nachweisen. Dieser Effekt war allerdings nicht so ausgeprägt wie unter dem Einfluss von TNF- α .

EGF entfaltet seine Wirkung nach Bindung an EGF-Rezeptoren. Letztere sind Transmembranrezeptoren, die eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen. EGF-Rezeptoren können auf der Oberfläche verschiedener Karzinomzellen überexprimiert vorliegen. EGF kann in einem solchen Fall vermehrt binden und wirken, so dass der Tumor in kurzer Zeit an Größe zunimmt. Diese Tatsache macht man sich bereits in der gezielten Karzinomtherapie zu Nutze. Der monoklonale Antikörper *Cetuximab (Erbix®)* beispielsweise bindet an den EGF-Rezeptor HER-1, verhindert somit die Bindung von EGF und blockiert dadurch die weitere Signaltransduktion und die entsprechenden stimulierenden Effekte auf die Proliferation der betroffenen Zellen. Cetuximab wird bereits beim kolorektalen Karzinom in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan eingesetzt (sofern keine Mutation im K-ras-Gen vorliegt). Eine Ausdehnung der Zulassung der Therapie ist für bestimmte Formen des Bronchialkarzinoms bereits beantragt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tumorzelllinien

<i>Linie</i>	<i>Organ</i>	<i>Status</i>	<i>Herkunft</i>
OE 19	humanes Adenokarzinom des Ösophagus	etabliert	ATCC
OE 33	humanes Adenokarzinom des Ösophagus	etabliert	ATCC
PT 1590	humanes Adenokarzinom des Ösophagus (Primärtumor)	Primärzelllinie	Labor Allgemein-chirurgie UKE
LN 1590	humanes Adenokarzinom des Ösophagus (Lymphknotenmetastase)	Primärzelllinie	Labor Allgemein-chirurgie UKE

Tabelle 4: Tumorzelllinien

Übersicht über die Tumorzelllinien

3.1.1.1 OE 19 (Synonym: JROECL19)

Diese Zelllinie wurde 1993 etabliert und hat ihren Ursprung in einem Adenokarzinom des Ösophagus im Bereich des gastroösophagealen Übergangs. Der zugehörige Patient war männlich und bei Entnahme der Tumorzellen 72 Jahre alt. Das moderat differenzierte Karzinom wurde pathologisch dem UICC-Stadium III zugeordnet. Zellen der Linie OE 19 exprimieren konstitutiv folgende HLA-Antigene (MHC-Klasse I): HLA-A, HLA-B und HLA-C. Eine Behandlung mit γ -Interferon induziert bei diesen Zellen die Expression von ICAM-1 (CD54). Außerdem exprimieren OE 19-Zellen epitheliale Zytokeratine und sind tumorigen in nackten Mäusen (Rockett et al. 1997).

3.1.1.2 OE 33 (Synonym: JROECL33)

Zellen der Linie OE 33 stammen ursprünglich aus dem Adenokarzinom des unteren Ösophagusdrittels (Barrett-Metaplasie) einer bei Entnahme 73-jährigen Patientin. Pathologisch entspricht der Tumor dem UICC-Stadium IIa und ist gering differenziert. Die Zellen dieser Linie exprimieren neben den HLA-Antigenen der MHC-Klasse I HLA-A, HLA-B und HLA-C auch konstitutiv ICAM-1. OE 33-Zellen exprimieren ebenso wie die Zellen der Linie OE 19 epitheliale Zytokeratine und haben in nackten Mäusen ebenfalls tumorigene Eigenschaften (Rockett et al. 1997).

3.1.1.3 PT 1590 und LN 1590

Die Zellen der Linie PT 1590 und LN 1590 stammen von einem Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus. Die Zelllinien wurden 1997 im Forschungslabor des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) etabliert. „PT“ steht für Primärtumor, „LN“ für Lymphknoten. Das UICC-Stadium dieses Tumors ist IIb (pT₁pN₁M₀). Der Lymphknoten, aus dem die Zellen der Linie LN 1590 stammen, war makroskopisch tumorfrei, aber enthielt drei Ber-Ep4-positive Zellen (von etwa 10⁵ Lymphknotenzellen), also Mikrometastasen (Hosch et al. 2000).

3.1.2 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Hersteller	Produkt
RPMI	GIBCO	RPMI 1640 + Glutamax-I
DMEM	GIBCO	DMEM + Glutamax-I
Tumormedium (TUM)	siehe Tabelle 7	

Tabelle 5: Zellkulturmedien

Liste der verwendeten Zellkulturmedien

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
RPMI 1640 Medium	---	417,5 ml	GIBCO
FCS	10 %	50 ml	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	200 I.U./ml	5 ml	GIBCO
Transferrin	10 µmol/ml	2,5 ml	SIGMA
Gentamycin	10 ng/ml	5 ml	Biochrom AG
Insulin	1 µg/ml	5 ml	SIGMA
Basic Fibroblast Growth Factor human	1 µg/ml	5 ml	Pepro Tech
Epidermal Growth Factor	1 µg/ml	5 ml	Pepro Tech

Tabelle 6: Zusammensetzung TUM

Das Tumormedium (TUM) für die Zelllinien PT 1590 und LN 1590 wurde im Labor frisch zubereitet.

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verwendung
anti-Midkine-Antikörper	Kaninchen	primär
anti-(α-)Aktin-Antikörper	Kaninchen	primär
anti-(α-)Aktin-Antikörper	Maus	primär
anti-HRP-Antikörper	Kaninchen	sekundär
anti-HRP-Antikörper	Maus	sekundär

Tabelle 7: Antikörper

Liste der verwendeten Antikörper

3.1.4 Wachstumsfaktoren

<i>Wachstumsfaktor</i>	<i>Hersteller</i>
TNF- α	R&D Systems
EGF	R&D Systems

Tabelle 8: Wachstumsfaktoren

Liste der verwendeten Wachstumsfaktoren

3.1.5 Small interfering Ribonucleic Acid (siRNA)

<i>siRNA</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Hersteller</i>
anti-Midkine-siRNA 1	5'- GGAGCCGACUGCAAGUACA -3'	Eurofins MWG Operon
anti-Midkine siRNA 2	5'- CCGCGUCACCAAGCCCUGC -3'	Eurofins MWG Operon
Mock-siRNA (Kontrolle)	5'- UUCUCCGAACGUGUCACGU -3'	Eurofins MWG Operon

Tabelle 9: siRNA

Liste der verwendeten siRNA

3.1.6 Puffer, Lösungen und andere Chemikalien

<i>Reagenzien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Produkt</i>
Tween	Serva	
Laemmli Proben-Puffer	Bio-Rad	
Trypsin	GIBCO	0,25 % Trypsin EDTA
PBS	GIBCO	DPBS
FCS	GIBCO	10 %
Trypanblau	GIBCO	Trypan Blue Stain 0,4 %
Penicillin/Streptomycin	GIBCO	200 I.U./ml
GFP	Abcam	

Tabelle 10: Medien, Puffer, Lösungen und andere Chemikalien

Liste weiterer Reagenzien

3.1.7 Kits

<i>Methode</i>	<i>Kit</i>
Proteinmessung	Pierce® BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible
ELISA	BioVendor® Midkine Human ELISA
	Antigenix® Human Midkine Super-X ELISA Kit
Blot-Entwicklung	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate
MTT-Assay	Promega: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Tabelle 11: Kits

Liste der verwendeten Kits

3.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller	Modell/Bemerkungen
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments	Hera safe
Wärmebad	Medingen/störck tronic	W6
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 40 CFL
Vorschaltgerät	Zeiss	mbq 52 ac
Mikroskop (hinten)	Wilovert S	
Microplate-Reader	Dynatech	MR 5000
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotina 35R
Zentrifuge	ependorf	Centrifuge 5417R
Absauggerät	vacuubrand	BVC 21
Schüttler	Heidolph	Rotamax 120
Vortexer	B. Braun Biotech	Certomat MW
Waage	sartorius laboratory	TE 153S
ELISA-Schüttler	stuart	microtitre plate shaker SSM5
Thermocycler	Biometra	T3
Wärmeschrank Zellkultur	Heraeus Instruments	37°C, 5 % CO ₂
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	pipetus®
Pipettierhilfe	Drummond	pipetaid
Multipipette	Thermo Electron Corporation	Finnpipette (30-300µl)
Spannungsgerät	BIO RAD	PowerPac Universal TM
Magnetrührer	Jemke & Kunkel	Ikamag RH
Glasplatten	BIO RAD	Mini Protean 3
Plastikkämme für die Gele	BIO RAD	
Gießkammern der Gele	BIO RAD	Casting stand
SDS-PAGE-Kammern	BIO RAD	Mini Protean 3
Filmkassette	rego	x-ray cassette 24x30 cm

Tabelle 12: Geräte

Liste der benutzten Geräte

3.1.9 Software

3.1.9.1 MikroWin 2000

Mikro-Win 2000 ist ein Programm zur Auswertung von photometrischen Messungen, die in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Mit seiner Hilfe können Templates erstellt und Daten übersichtlich ausgewertet werden.

3.1.9.2 ImageJ

Mit Hilfe von ImageJ können Blotergebnisse in Zahlen ausgedrückt werden. Das Programm erfasst die unterschiedlichen Farbintensitäten der gescannten Filme und berechnet so die unterschiedlichen Blot-Ergebnisse. Die in Prozent angegebenen Werte beziehen sich auf die unterschiedliche Farbintensität, welche vom Programm in Pixel gemessen wird. 100 % entsprechen in dieser Arbeit 40.000 Pixel.

3.1.10 Verbrauchsmaterial

<i>Pipetten etc.</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Modell</i>
Pipetten	eppendorf	1000er/200er/100er/20er
Pipettenspitzen	Falcon	10/5/2ml
	Sarstedt	10/5/2ml
	Biosphere	Filter Tips
	eppendorf	epT.I.P.S Box
Zellkulturflaschen	BD Biocoat	75ml
Wannen für Multichannel Pipette	eppendorf	Reagent Reservoirs
Zählkammer	Labor Optik	Neubauer

Tabelle 13: Verbrauchsmaterial
Liste des Verbrauchsmaterials

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien PT 1590 und LN 1590 wurden im allgemein chirurgischen Forschungslabor am Universitätsklinikum Eppendorf etabliert. Es handelt sich um Zellen des Primärtumors (PT) und um Zellen einer Lymphknotenmetastase (LN) aus einem am UKE operierten Patienten. Die Primärzelllinien PT 1590 und LN 1590 wurden mit Tumormedium (TUM) ernährt.

Bei OE 19 und OE 33 handelt es sich um etablierte Zelllinien. Beide wurden in RPMI-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und einer Kombination aus Penicillin und Streptomycin (200 I.U./ml) kultiviert.

3.2.2 Passagieren der Zellen

Alle Zellen wurden beim Passagieren zunächst in Abhängigkeit von verwendeten Zellkulturflaschen mit 10-20 ml DPBS (Gibco®) gewaschen und im Anschluss mit 25 prozentigem Trypsin-EDTA (Gibco®) etwa 3 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen sichtbar vom Boden der Zellflasche gelöst haben. Mit FCS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert, die restlichen Zellen vom Flaschenboden abgespült und die Zellsuspension aufgenommen und – je nach Splitverhältnis – entsprechend in neue, bereits mit Medium gefüllte, Zellkulturflaschen überführt.

3.2.3 Transfektion und RNA-Interferenz

Die relativ neue Technik der RNA-Interferenz wurde 2003 von Wacheck und Vornlocher genauer beschrieben. Hierbei wird der Einsatz dieser Technik *in vitro* und *in vivo* beschrieben und ein möglicher zukünftiger Nutzen als Therapeutikum in Aussicht gestellt (Wacheck und Vornlocher 2003).

Vorbereitung

Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden steril unter dem Abzug vorgenommen. Die Transfektionen der Zellen wurden mittels Lipofektion durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen aus 75cm²-Zellflaschen, die zu 70-80 % konfluent bewachsen waren, verwendet. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen der Zellen mit 10 ml PBS wurden 2 ml Trypsin zugegeben und 3-5 Minuten Inkubationszeit bei 37°C abgewartet. Mit Hilfe des

Lichtmikroskops wurde der Erfolg der Zellablösung überprüft. Der gesamte Flascheninhalt (6 ml) wurde im nächsten Arbeitsschritt mehrfach mit einer leicht schräg aufgesetzten 10ml-Pipette auf eine sterile Petrischale gespült, wobei die Zellen sorgfältig mechanisch vereinzelt wurden.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten überführt. In jedes *Well* wurden zuvor 2 ml entsprechendes Nährmedium vorgelegt. Da in jedem *Well* genau die gleiche Anzahl an Zellen anwachsen sollte, wurde jeweils exakt 300 (500) μ l aus der Petrischale in die *Wells* pipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen innerhalb der einzelnen *Wells* wurden die 6-Well-Platten im Kreuzmuster leicht geschwenkt. Die Platten inkubierten über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C und die Zellen wurden adhärent.

Transfektion

Für die Transfektion wurde das Lipofectamine2000® zunächst leicht gemischt und jeweils 10 μ l davon zusammen mit je 250 μ l Opti-MEM® in insgesamt sechs 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In sechs weitere 1,5ml-Reaktionsgefäße wurde während dieser Inkubationszeit jeweils 250 μ l Opti-MEM® mit 1,5 μ l GFP und unterschiedlichen Mengen der siRNA bzw. der Kontroll-siRNA gegeben.

Das GFP (*green fluorescent protein*) diente hierbei als Marker-Protein für eine erfolgreiche Transfektionseffizienz. Es wurde 1961 entdeckt und aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura et al. 1962). Dieses Protein hat eine Molekülmasse von 26,9 kDa und fluoresziert nach optischer Anregung mit blauem Licht mit einer Wellenlänge von 475 nm (Shimomura 1979).

Für die Kontroll-siRNA wurden immer 200 pmol und bei der siRNA 100, 200, 300 oder 400 pmol verwendet. Die Inhalte der *Tubes* wurden vorsichtig gemischt und mit jeweils einem der anderen zuvor angelegten *Tubes* vereint und wieder vorsichtig gemischt. Der Schritt der Vereinigung musste dabei innerhalb der folgenden 25 Minuten fertiggestellt werden. Die Probengemische wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit binden die positiv geladenen Lipidvesikel an die negativ geladenen Ribonukleinsäuren beziehungsweise siRNA. Diese Komplexe („Liposomen“) werden anschließend von den Zielzellen aufgenommen.

Die am Vortag vorbereiteten 6-Well-Platten mussten folgendermaßen für die nachfolgende Transfektion präpariert werden: Das Medium wurde verworfen, jedes *Well* vorsichtig mit je

2 ml PBS gewaschen und in jedes *Well* wurde je 1 ml serumfreies Opti-MEM® zugegeben. Nach Ablauf der 20 Minuten Inkubationszeit wurde jeweils ein vorbereitetes Transfektions-*Tube* in ein *Well* der 6-*Well*-Platte gut verteilt aufgetropft. Die Platten wurden in der Regel 4-6 Stunden im Wärmeschrank inkubiert. Während dieser Zeit konnte die in Liposomen verpackte siRNA mit den Membranen der Zielzellen fusionieren und so in die Zelle diffundieren. Im Anschluss wurde die gesamte Transfektionslösung aus den *Wells* abgesaugt, jedes *Well* mit jeweils 2 ml PBS gewaschen, wodurch das vollständige Entfernen der sonst toxisch wirkenden Transfektionsmischung gewährleistet wurde. Danach wurden zu jedem *Well* je 1 ml gewöhnliches Nährmedium gegeben (inklusive FCS und Pen/Strep). Die 6-*Well*-Platte wurde über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

Am Folgetag wurde zunächst der Erfolg der Transfektion mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops überprüft. Zu diesem Zweck wurde am Vortag die Ko-Transfektion mit siRNA und GFP durchgeführt.

Nach der Überprüfung wurden die *Wells* mit neuem Nährmedium versorgt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium gewonnen, da der Knockdown nicht nur in den Zelllysaten, sondern auch in den Überständen überprüft werden sollte. Diese Entscheidung wurde getroffen, da es sich bei Midkine um ein sezerniertes Protein handelt und daher auch eine Abnahme der Midkine-Konzentration in den Überständen erwartet werden konnte. Die Überstände wurden bis zur Verwendung für die Detektion bei -20°C gelagert. Nach Gewinnung der Überstände wurde jedes *Well* mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und den Zellen dann pro *Well* jeweils 1 ml frisches Medium zugeführt.

Trypsinierung

Am darauf folgenden Tag mussten die transfizierten Zellen geerntet werden. Die *Tubes* für die Ernte wurden auf Eis gelegt, damit zu hohe Temperaturen vermieden wurden, welche die Proteolyse des zu detektierenden Proteins Midkine hätten zur Folge haben können.

Die Überstände in der 6-*Well*-Platte wurden wie gewohnt gewonnen und eingefroren. Die Zellen in den *Tubes* wurden mit jeweils 1 ml FCS gewaschen, um vermeintliche FCS-Reste, welche die folgende Ablösung mit Trypsin behindern könnten, vollständig zu entfernen. Für das Ablösen der Zellen vom Boden wurde in jedes *Well* jeweils 300 µl Trypsin zugeben. Nach einer Wartezeit von 2 bis 3 Minuten wurden die *Wells* mit je 300 µl PBS pro *Well* gespült. Die Platte wurde dabei schräg gehalten, die nach unten gespülte Zellsuspension mit der Pipette

aufgezogen und in zuvor vorbereitete *Tubes* pipettiert. Der Schritt des Abspülens mit je 300µl PBS wurde ca. 4 Mal wiederholt, bis keine Zellen mehr in den *Wells* vorhanden waren und die *Tubes* vollständig gefüllt waren. Bei jedem Schritt musste eine neue Pipettenspitze verwendet werden.

Die *Tubes* wurden nun für 5 Minuten bei 4°C mit 2000 UpM zentrifugiert. Dabei setzten sich die Zellen in Form kleiner *Pellets* am Boden der *Tubes* ab. Die Überstände wurden abpipettiert und verworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die *Pellets* nicht beschädigt wurden. Die *Tubes* wurden bis zur Oberkante mit PBS aufgefüllt und erneut 5 min bei 4°C zentrifugiert. Bei diesem Durchgang wurde die Geschwindigkeit auf 5000 UpM erhöht, damit das *Pellet* noch fester wurde. Die Überstände mussten erneut vorsichtig abpipettiert und wieder verworfen werden.

Im Falle der Fortführung der Experimente zu einem späteren Zeitpunkt wurden die *Pellets* erneut 5 Minuten bei 4°C und 5000 UpM zentrifugiert und eventuelle restliche Überstände vollständig entfernt. Im Anschluss wurden die *Pellets* bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Herstellung der Lysate

Zu den wie oben beschrieben gewonnenen *Pellets* wurden je nach Größe jeweils 80-100µl Lysis-Puffer zugegeben. Der Puffer bestand aus RIPA Puffer und einem Protease-Inhibitor-Cocktail, welcher in der Verdünnung 100x zugegeben wurde. Der RIPA Puffer bewirkte die Permeabilisierung der Zellmembranen, sodass die Zellen aufgeschlossen wurden. Da verhindert werden musste, dass Midkine dabei proteolysiert wurde, wurde der Protease-Inhibitor-Cocktail zugefügt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden die Gemische 20 Minuten bei 4°C und 14.000 UpM zentrifugiert. Die Überstände mit der löslichen Proteinfraction wurden in neue *Tubes* pipettiert, die *Pellets* wurden verworfen. Die Proben wurden nun bei -20°C aufbewahrt oder es wurde direkt mit der Proteinmessung fortgefahren.

Konzentrationsmessung der Proteinlysate

Für die Proteinmessungen der Lysate wurde das *Pierce® BCA Protein Assay Kit* verwendet. Mit Hilfe der entsprechenden Reagenzien wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Nach der Chelatbildung von Kupfer mit dem Protein, die mit einer Blaufärbung einhergeht (Biuret-Reaktion), wird Bicinchoninsäure (BCA) zugegeben. Diese Säure reagiert mit dem zuvor entstandenen

Komplex und bewirkt so einen Farbumschlag. Nach photometrischer Messung lassen sich die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben bestimmen.

Der BSA-Standard (*bovine serum albumine*) wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Gefäß	ddH ₂ O (SIGMA)[μ l]	BSA-Lösung/Probengefäß [μ l]	Konzentration [μ g/ml]
A	0	500 von fertiger Lösung	2,000
B	125	375 von fertiger Lösung	1,500
C	200	200 von fertiger Lösung	1,000
D	200	200 aus Gefäß B	750
E	200	200 aus Gefäß C	500
F	200	200 aus Gefäß E	250
G	200	200 aus Gefäß F	125

Tabelle 14: Standard-Pipettierschema für Protein Assay Kit

Diesem Schema entsprechend wurde der Standard hergestellt.

Im Anschluss wurde der *Working Reconstitution Puffer* (WR Puffer) hergestellt. Der WR Puffer bestand aus den Komponenten A und B, die im Verhältnis A:B = 50:1 zusammen gemischt wurden.

Eine 96-Well-Platte wurde mit jeweils 200 μ l WR Puffer und 5 μ l Lysat-Probe bestückt und bei 37°C im Inkubator für 15 Minuten gelagert.

Danach wurde die Absorption in einem *Microplate-Reader* bei 490 nm gemessen und die entsprechenden Protein-Konzentrationen quantifiziert. Standardmäßig wurden 90 μ g Protein aufgetragen.

3.2.4 SDS-Page und Western-Blot

Herstellung der SDS-Page-Gele

Für die SDS-Page wurden zehnpromtente Trenn- und vier vierpromtente Sammelgele verwendet. Die Erstellung erfolgte mit Hilfe von Glasscheiben, die als Gelkassette in einen Gelrahmen eingespannt wurden, womit jeweils zwei Gele gleichzeitig gegossen werden konnten.

Zunächst wurde die Apparatur aufgebaut und die Glasplatten mit Hilfe von Aceton gereinigt, um vermeintliche Protein-Reste auszufällen und somit zu entfernen.

Das zehnpromtente Gel wurde nach folgenden Rezepten hergestellt:

Trenngel		Sammelgel	
	10 %; 2 Gele		4 %; 2 Gele
Acrylamid	3,3 ml	Acrylamid	1,34 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml	0,5M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	4 µl
ddH ₂ O	4 ml	ddH ₂ O	6 ml
Gesamtmenge	10 ml	Gesamtmenge	10 ml

Tabelle 15: Pipettierschema für die Gelherstellung (Trenn- und Sammelgel)

Trenn- und Sammelgel-Lösungen werden separat hergestellt und in der Apparatur vereint. SDS=Sodium Dodecyl Sulfate; APS=Ammoniumperoxodisulfat; TEMED=Tetramethylethylendiamin

Die angegebenen Reagenzien wurden in Erlenmeyer-Kolben gemischt. TEMED wurde jeweils als letzte Zutat hinzugegeben und das Gemisch danach zügig in die Apparatur gefüllt, weil ab diesem Zeitpunkt bereits die Quervernetzung beginnt und das Gel auspolymerisiert. Beim Befüllen der Apparatur wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen oder dass diese vor Auspolymerisierung des Gels entfernt wurden.

Nach Einfüllen des Trenngels wurde eine Schicht Isopropanol pipettiert, welches für einen glatten Abschluss des Gels sorgt. Nach circa 20 Minuten Inkubationszeit war das Gel polymerisiert und das Sammelgel konnte hinzu pipettiert werden. Zuvor musste das Isopropanol abgegossen, die Kammer zwei Mal mit Wasser (ddH₂O) gespült und abgetrocknet werden.

Nach Zugabe des Sammelgels in die Kammern wurden die Kämme eingesteckt, die die Entstehung der Taschen gewährleisten. Nach weiteren 20 Minuten war auch diese Schicht des Gels polymerisiert und die Gele konnten der Apparatur entnommen werden. Bei nicht sofortiger Verwendung wurden die Gele im Kühlschrank bei +4°C für maximal zwei Wochen gelagert. Dabei wurden die Gele in sehr feuchte Tücher gewickelt, um einer Austrocknung vorzubeugen.

Vorbereitung SDS-Page

Für die SDS-Page wurden die Lysate wenn nötig aufgetaut und je nach Experiment jeweils 30-90 µg Protein mit 5-10 µl *Laemmli Sample Puffer* in kleine Eppendorf-Tubes pipettiert und

im Anschluss 5 Min bei 99,99°C im Thermocycler gekocht. Dies bewirkte eine Hitze-denaturierung der Proteine, die dann das im *Laemmli Sample-Puffer* enthaltene SDS binden und so negativ geladen vorliegen. Nach Abschluss des Kochvorgangs wurden die Proben 1 Minute bei 14.000 UpM zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich die Probe vollständig am Boden des *Tubes* befindet, sodass sich nach Aufsaugen mit der Pipette keine Reste mehr in den *Tubes* befinden.

Aus den vorbereiteten Gelen wurden die Kämme gezogen, die Taschen wurden mit SDS-Puffer ausgewaschen und die Lauf-Kammer wurde zusammengebaut. Der innere Teil der Kammer wurde vollständig mit Lauf-Puffer gefüllt, der äußere Teil der Lauf-Kammer wurde zu circa einem Drittel befüllt, sodass die Elektroden sicher bedeckt waren.

Mit Hilfe von extra langen Gel-Beladungs-Pipettenspitzen wurden die Taschen der Gele mit den denaturierten Lysat-Laemmli-Puffer-Mischungen beladen. Um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden wurde die gefüllte Pipettenspitze kurz in der mit Lauf-Puffer gefüllten Mittelkammer gespült. Außerdem wurden die Proben sehr langsam und unter Vermeidung von Luftblasen in die Taschen pipettiert. Eine Tasche wurde immer mit 9 µl Protein-Marker befüllt.

Nach Beladung aller Taschen wurde der Stromkreis geschlossen und Strom angeschlossen.

Bei der parallelen Durchführung einer SDS-Page von zwei Gelen wurde zunächst eine Stromstärke in Höhe von 30 mA gewählt, welche für ungefähr 30 Minuten beibehalten wurde – je nachdem, wie viel Zeit benötigt wurde, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Danach wurde mit einer Stromstärke von 60 mA fortgefahren. Der Page-Vorgang wurde gestoppt, wenn die Banden der Standard-Spur deutlich und ausreichend weit gelaufen waren. Dies war nach ungefähr 45 Minuten der Fall. Zu lange Laufzeiten mussten in jedem Fall vermieden werden, da es sich bei Midkine um ein sehr kleines Protein handelt (15 kDa) und man sonst Gefahr lief, dass das Protein wieder aus dem Gel herauslaufen und damit verlorengehen könnte.

Western Blot

Die Apparatur wurde auseinander gebaut und die Gele vorsichtig aus den Glasscheiben herausgelöst und in eine Schale mit PBS gelegt. Für den folgenden Blot wurde pro Gel eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) zugeschnitten, beschriftet, für circa 2 Minuten in Methanol eingelegt, in Wasser gewaschen und schließlich in *Blotting Puffer* eingelegt.

Das Einlegen in Methanol ist unbedingt notwendig, da die Membran unbehandelt hydrophob ist und durch die Einwirkung des Ethanol hydrophile Eigenschaften erhält. Außerdem wurden pro Gel je zwei *Blotting Schwämme* und je zwei *Whatman-Papiere* in *Blotting Puffer* eingelegt.

Der Zusammenbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema:



Abbildung 6: Western Blot: Aufbau (schematisch)

Beim Western Blot erfolgte der Aufbau immer nach dem gleichen Schema: Angefangen wird mit einem Schwamm-Kissen, auf das eine Whatman-Membran gelegt wird. Darauf wird das Gel und die PVDF-Membran positioniert. Den Abschluss bilden eine weitere Whatman-Membran und ein zweites Schwamm-Kissen. Dieser Stapel wird in die entsprechende Apparatur gesetzt.

Die Apparatur für den Western Blot wurde zusammengebaut. Zum Kühlen wurde entweder bei -80°C gefrorenes Wasser oder gehacktes Eis verwendet. Der Blot wurde im Kühlraum durchgeführt, wobei auch der verwendete *Blotting Puffer* vorgekühlt war. Geblottet wurde bei 100 V für 60 Minuten im Kühlraum (4°C).

Ponceau-Rot-Färbung

Die Membranen wurden nach dem Blotten nach einem kurzen Waschvorgang mit PBS-T mit Ponceau-Rot benetzt, um die Banden des Blots sichtbar zu machen und sicherzustellen, dass Banden auf der Membran vorhanden waren. Der Farbstoff wurde wieder mit PBS-T gründlich abgewaschen.

Blocken und Antikörper-Zugabe

Im nächsten Schritt wurde die Membran mit fettfreier Milch geblockt. Die Milch wurde als fünfprozentige Lösung mit „*Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk*“-Pulver und PBS-T angerührt und vor Benutzung filtriert. Nach einer Block-Zeit von 45 bis 60 Minuten wurde die Milch verworfen und die frisch hergestellte Antikörper-Mischung auf die Membranen gegeben. Pro Box und Membran wurden 10 ml Antikörper-Milch-Lösung verwendet, welche mit einer 1:500-Verdünnung hergestellt wurde. Dieser primäre Antikörper richtete sich gegen humanes Midkine und wurde in Kaninchen synthetisiert. Die Boxen wurden mit

Parafilm verschlossen, damit keine Flüssigkeit durch Verdunstung verloren geht, und über Nacht im Kühlraum auf dem Schüttler verwahrt. Am nächsten Tag wurden die Membranen nach Verwerfen des Antikörpers gründlich mit PBS und PBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem sekundären Antikörper benetzt. Dieser wurde mit einer 1:3.000-Verdünnung angesetzt. Die Membranen wurden für insgesamt zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit diesem zweiten Antikörper, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war, inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membranen erfolgte die Entwicklung der Filme. Die HRP katalysiert die Reaktion, bei der Luminol in seine oxidierte Form umgesetzt wird und dessen Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen registriert werden kann.

Entwicklung der Filme

Eine Membran wurde mit Hilfe von Papiertüchern leicht getrocknet, auf zugeschnittener Frischhaltefolie platziert und mit einer Mischung aus jeweils 700 µl der Komponenten A und B des *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*[®] bedeckt. Die Membran und das Substrat wurden zügig in der Frischhaltefolie verpackt und mit Klebeband in der Entwicklungskassette fixiert. Nun wurde nur noch unter der Rotlichtlampe weitergearbeitet. Die Filme wurden unterschiedlich lang auf die verpackte Membran gelegt und der Chemilumineszenz entsprechend lang exponiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Filme in der Entwicklermaschine.

Strippen der Membran

Um die Proteine auf den Membranen für den Aktin-Antikörper zugänglich machen zu können, war es erforderlich, zuvor gebundene Antikörper wieder zu lösen. Dieser Vorgang wird auch als „*Strippen*“ bezeichnet. Hierzu wurden die Membranen vorsichtig aus der Folie befreit und kurz mit PBS-T gespült. Zum *Strippen* wurden die Membranen zwei Mal für 20 Minuten mit *Restore Western Blot Stripping Puffer*[®] auf dem Schüttler inkubiert.

Aktin-Detektion

Nach kurzem Waschen mit PBS wurde der Aktin-Antikörper zugegeben. Dieser wurde 1:15.000 verdünnt und wurde entweder in Kaninchen oder in Mäusen generiert. Die Boxen wurden wieder mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlraum auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen erneut mehrfach gewaschen um anschließend für zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper für die Aktin-Detektion inkubiert

zu werden. Dieser hatte je nach verwendetem ersten Antikörper seinen Ursprung entweder in Kaninchen oder in Mäusen und wurde in einer 1:3.000-Verdünnung hergestellt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Membranen insgesamt 30 Minuten mit PBS und PBS-T gewaschen und anschließend wie oben beschrieben in der Dunkelkammer entwickelt.

3.2.5 MTT-Proliferationstest

Um feststellen zu können, ob die gesteigerte MK-Expression einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat, wurden Wildtyp-Zellen und sowohl siRNA-MK transfizierte Zellen als auch mit einer Kontroll-siRNA transfizierte Zellen mit Hilfe des *MTT-Proliferationsassays* getestet. Mittels MTT-Test kann die Zellviabilität, also die Anzahl der lebenden Zellen in einer gewissen Zellpopulation, bestimmt werden. Lebende Zellen können mit diesem Test farbmetrisch quantitativ erfasst werden. Im folgenden Abschnitt wird der Funktionsmechanismus dieser Methode beschrieben (Abbildung 7).

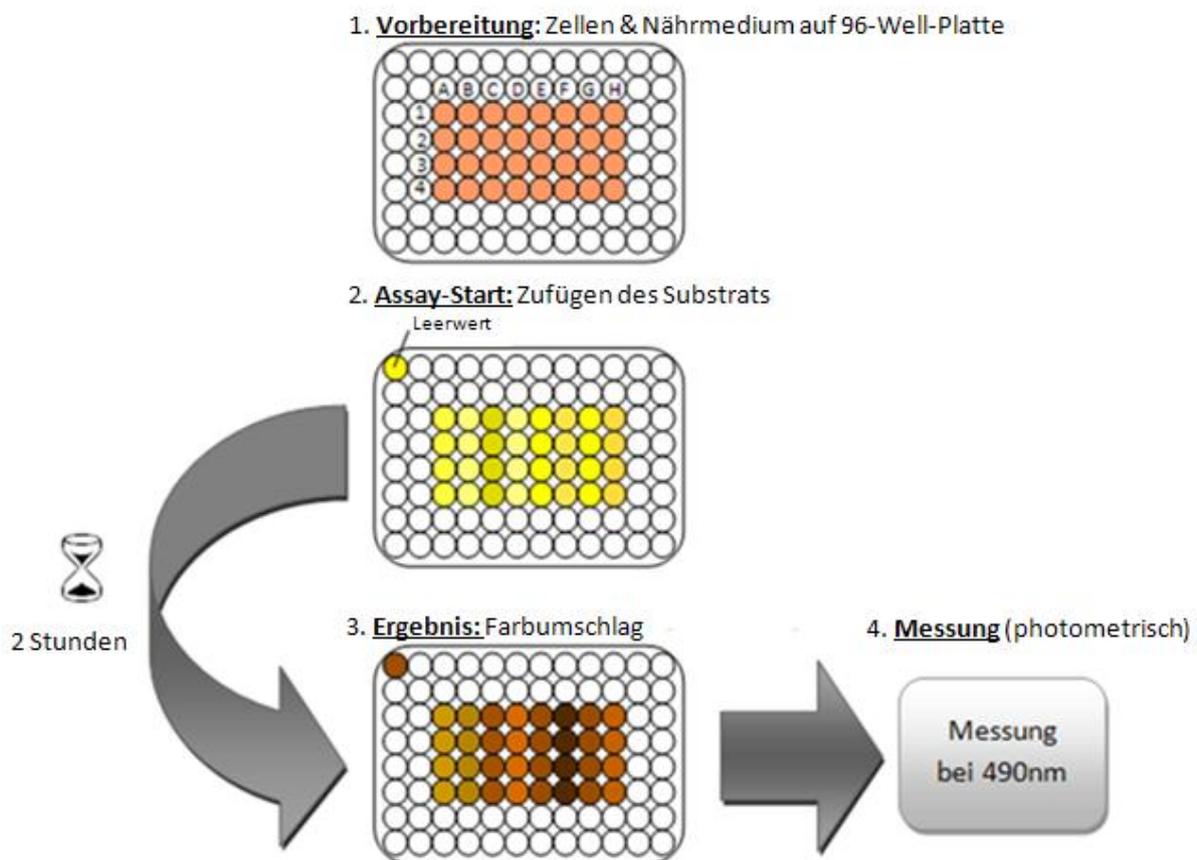


Abbildung 7: MTT-Test: Schematische Darstellung

Die Zellen werden wie im Text beschrieben auf der 96-Well-Platte verteilt und zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Substrat versehen. Nach einer Wartezeit von 2 Stunden erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption und die Berechnung der daraus folgenden Zellzahlen pro Well.

Das MTS-Gemisch wird von lebenden Zellen zu einem im Nährmedium löslichen farbigen Formazan-Produkt reduziert. Man nimmt an, dass diese Umwandlung unter Einfluss von NADPH oder NADH erreicht wird, welches in metabolisch aktiven Zellen von Dehydrogenasen produziert wird. So können Rückschlüsse auf die Anzahl der lebenden Zellen in den verschiedenen *Wells* getroffen werden. Die Substrat-Lösung bestand aus einem Tetrazolium-Gemisch, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-Tetrazolium, und einem Elektronen-koppelnden Reagenz: Phenazin Ethosulfat (PES).

Eine definierte Zellzahl wurde in die *Wells* einer 96-*Well*-Platte gegeben und mit zugehörigem Nährmedium versetzt. Zur genauen Zellquantifizierung wurden die jeweiligen Zellen gezählt und nach entsprechend berechneter Zugabe von Zellmedium auf gleiche Zellzahlen verdünnt. Nach sorgfältiger Vereinzelung der Zellen im Medium war die gleichmäßige, im Vorfeld berechnete, Verteilung der Zellen auf die einzelnen Kavitäten sichergestellt. Es musste darauf geachtet werden, dass zu Beginn des Experiments so wenig Zellen in die *Wells* gegeben werden, dass diese genug Platz zum Wachsen hatten und es nicht wegen Platzmangel zum Absterben von Zellen und somit Verfälschung der Ergebnisse kommen konnte. In den durchgeführten MTT-Tests wurden jeweils 3.000 und 5.000 Zellen pro *Well* verwendet. Zur Validierung wurden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Nach der Bestückung der Proben-*Wells* wurden die umliegenden leeren *Wells* wegen des Feuchtigkeitshaushalts mit PBS gefüllt. Die Platten mussten identisch in fünffacher Ausführung erstellt werden, da es fünf Messzeitpunkte gibt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h). Nach einer ersten Phase über Nacht, in der die Zellen anwachsen konnten, wurde die erste Messung durchgeführt. Dazu wurde in der ersten 96-*Well*-Platte aus den mit den Zellen belegten *Wells* das Medium abgesaugt, jedes *Well* vorsichtig, ohne die Zellen vom Boden abzulösen, mit je 100 µl PBS gewaschen und wieder abgesaugt. Danach wurden die *Wells* mit je 100 µl Medium befüllt. Ein nicht mit Zellen besetztes *Well* musste ebenfalls geleert und mit 100 µl Medium gefüllt werden. Der in diesem *Well* gemessene Wert diente als Leerwert. In die Proben-*Wells* und das „Leerwert-*Well*“ wurde dann jeweils 20 µl Substrat gegeben. Die Substratlösung musste gekühlt und lichtgeschützt gelagert werden. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Mit der Absorption wurde die Menge von Formazan gemessen, die direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen in der Zellkultur war. Diese Messungen wurden in 24-h-Abständen wieder-

holt, bis der Zeitpunkt „96 h“ erreicht war. Anhand der unterschiedlichen Zeitpunkte wurde für jede Probe ein entsprechendes Proliferationsdiagramm erstellt.

3.2.6 Stimulation mit Wachstumsfaktoren (TNF- α , EGF)

Für die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren wurden Zellen vom Wildtyp in definierter Anzahl gleichmäßig auf 24-Well-Platten gesplittet und nach der Anwachszeit von 16 Stunden bei 37°C gewaschen und im Anschluss mit FCS-freiem Medium ernährt, um den Einfluss von FCS auf das Wachstum auszuschalten. Die Platten blieben dann für weitere 24 Stunden im Wärmeschrank. Nach Absaugen des Mediums in jedem Well wurde wieder FCS-freies Medium zugegeben. Außerdem wurden den Zellen die unterschiedlichen Stimulanzen zugeführt: FCS zehnpromig, 25 ng/ μ l TNF- α , 1 ng/ μ l EGF. Im Anschluss wurden direkt die ersten Überstände gewonnen, welche die Ausgangskonzentrationen von Midkine enthielten („0 h“). Alle gewonnenen Überstände wurden bis zur Weiterverwendung im ELISA bei -20°C gelagert. Zunächst wurden die Überstände engmaschig im Verlauf von 4, 8 und 12 Stunden nach Zugabe der Wachstumsfaktoren gewonnen. Da die Ergebnisse wenig aussagekräftig waren, wurden die Überstände in den folgenden Experimenten nach 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Wachstumsfaktorzugabe gewonnen. Vor der Messung der Midkine-Konzentration im ELISA wurden die aufgetauten Proben 5 Minuten bei 4°C mit 14.000 UpM zentrifugiert.

3.2.7 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde mit Kits verschiedener Firmen durchgeführt. Zunächst wurde das „Human ELISA-Kit“ der Firma BioVendor® benutzt, danach wurde das „Human Midkine Super-X ELISA Kit“ der Firma Antigenix® verwendet. Beide Kits folgten einem gleichen Schema der Durchführung mit dem alleinigen Unterschied, dass bei dem Kit der Firma Antigenix® das Streptavidin und der Standard neu angesetzt werden mussten, während diese beim Kit der Firma BioVendor® bereits in fertiger, verwendungsbereiter Form vorlagen.

Zunächst musste der Standard erstellt werden, was nach folgendem Schema erfolgte:

Menge des Standards	Verdünnungs-Puffer	Konzentration
Ursprungslösung	-	200 ng/ml
50 µl von der Ursprungslösung	950 µl	10 ng/ml
150 µl von „10ng/ml“	150 µl	5 ng/ml
150µl von „5ng/ml“	225 µl	2 ng/ml
150µl von „2ng/ml“	150 µl	1 ng/ml
150µl von „1ng/ml“	150 µl	0,5 ng/ml
150µl von „0,5 ng/ml“	225 µl	0,2 ng/ml

Tabelle 16: Standard-Pipettierschema für ELISA Kit

Nach dieser Tabelle wurde die Standardreihe hergestellt.

Die Waschlösung, der Verdünnungs-Puffer und die Qualitätskontrolle (QK) wurden wie im Kit angegeben hergestellt. Die MK-Antigen beschichtete ELISA-Platte wurde dann mit dem Standard, der Qualitätskontrolle und den Proben (Überstände/Serum) bestückt. Dabei wurden die Proben 1:5 oder 1:10 verdünnt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Unsere Arbeitsgruppe hat im Rahmen mehrerer Vorversuche zu unserem Projekt zeigen können, dass die Midkine-Konzentration im Serum von Patienten mit Ösophaguskarzinom im Vergleich zur Midkine-Konzentration im Serum gesunder Patienten deutlich erhöht ist (Tabelle 17) und somit die Beobachtungen von Ikematsu *et al.* (2000) bestätigt. Unsere Arbeitsgruppe hat Gewebeproben aus Ösophaguskarzinomen im Multi-Tumor-Array untersucht und konnte eine zum Teil starke, in einigen Proben aber auch negative, Expression von Midkine zeigen (Tabelle 18).

	Kontrollen	Ösophaguskarzinom
gesamt	148	38
<u>Geschlechterverteilung [%]</u>		
männlich	66	84
weiblich	34	16
Serum-MK [ng/ml]	0,128	0,896

Tabelle 17: Serum-Midkine-Konzentration bei Patienten mit Ösophaguskarzinom II

Zusätzlich zur Serum-Midkine-Konzentration von gesunden Patienten (Kontrollen) und Patienten mit Ösophaguskarzinom ist die Geschlechterverteilung gezeigt.

Ösophaguskarzinom	Midkine Immunfärbung			
	n	negative	schwach	stark
Adenokarzinom	59	24 (41 %)	8 (14 %)	27 (46 %)
Plattenepithelkarzinom	56	39 (70 %)	9 (16 %)	8 (15 %)

Tabelle 18: Multi-Tumor-Array für Karzinome des Ösophagus

Insgesamt wurden 59 Proben mittels Immunfärbung auf Midkine untersucht. Dabei ließen sich 27 Proben stark und 8 Proben schwach anfärben. 24 Proben zeigten keine Färbung.

Mit diesem Wissen waren weitere Untersuchungen, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt genannt werden, sinnvoll und gerechtfertigt.

4.2 Midkine-Depletion

In den Experimenten zeigte sich eine deutliche temporäre Depletion von Midkine. In Vorversuchen konnten wir beobachten, dass der Knockdown bei Verwendung von 200 pmol siRNA meist effektiver war als bei anderen Mengen wie zum Beispiel 400 pmol. Exemplarisch sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen immer die Kontrolle und die Ergebnisse der Transfektionen und Western Blots bei der Verwendung von 200 und 400 pmol gezeigt. Die Transfektionseffizienz wurde jeweils am Folgetag nach der Transfektion mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Ein Maßstab von 35-40 % GFP-positiver Zellen wurde von uns als gelungenes Experiment angesehen (Tabelle 19).

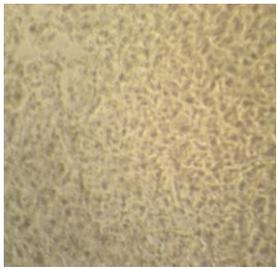
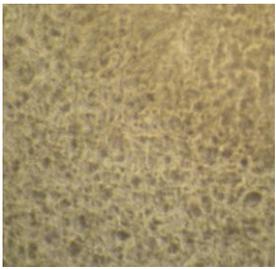
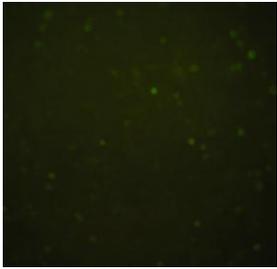
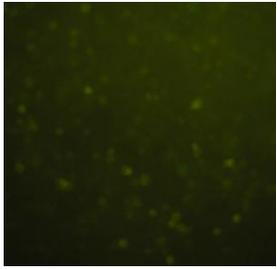
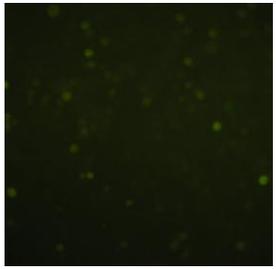
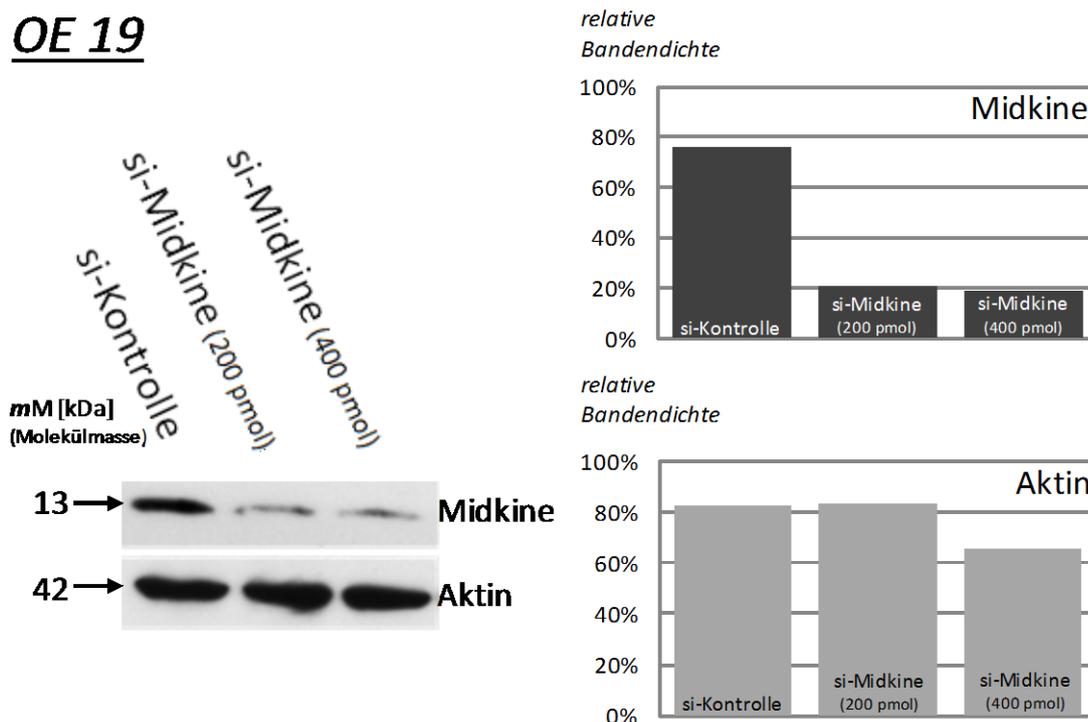
OE 19	Kontroll-siRNA	si-Midkine (200 pmol)	si-Midkine (400 pmol)
<i>nativ</i>			
<i>GFP</i>			

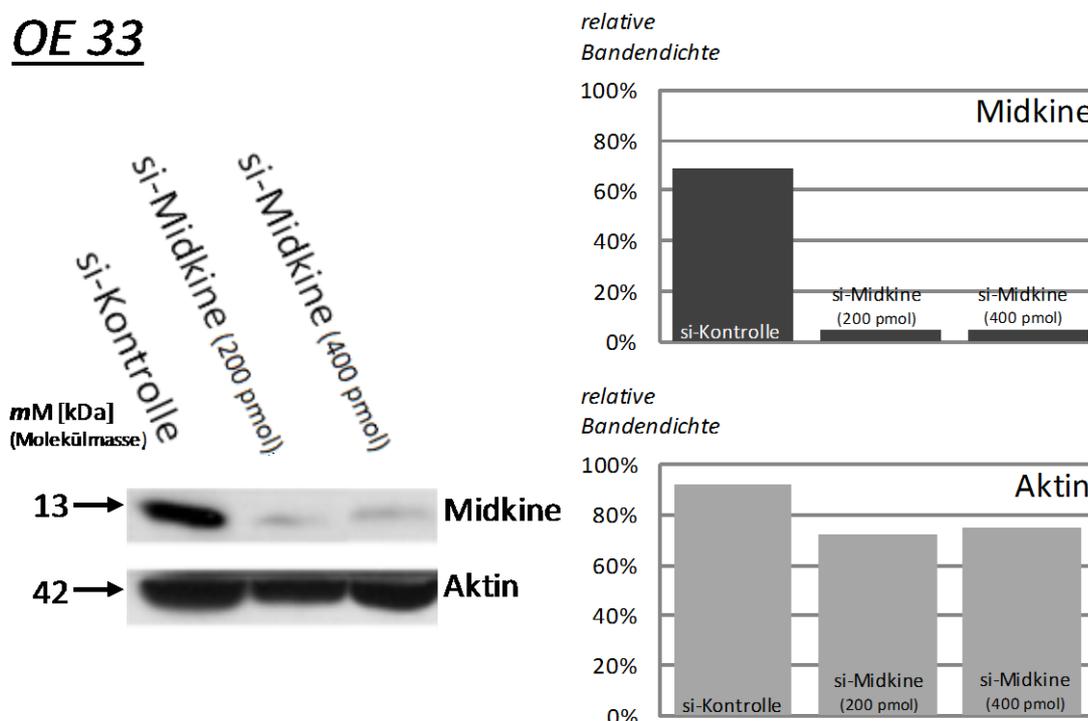
Tabelle 19: OE 19 Zellkultur nach Transfektion unter Durchlicht/fluoreszenzmikroskopisch

Die jeweiligen Ausschnitte zeigen die Zellkultur nach erfolgter Transfektion. Lichtmikroskopisch zeigen sich *nativ* dicht gewachsene vitale Zellen (1. Zeile). In der 2. Zeile ist die GFP-Aufnahme der Zellen gezeigt (fluoreszenzmikroskopisch).

Die erfolgreiche MK-Depletion sollte nun im Western-Blot-Verfahren mittels Verwendung spezifischer MK-Antikörper untersucht werden. In den folgenden Abbildungen ist jeweils die MK- und Aktin-Detektion gezeigt für eine Kontroll-siRNA und die siRNA-MK in zwei verschiedenen Konzentrationen (200 pmol und 400 pmol). Aktin hat etwa eine Größe von 42 kDa und kann in entsprechender Position auf dem Gel detektiert werden. Die Proben, in denen die MK-Expression detektiert wurde, waren Zelllysate von zuvor mit siRNA-MK oder einer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen.

OE 19**Abbildung 8: Midkine-Depletion in OE 19**

Midkine Depletion in Zellen der Reihe OE 19: Bei Proben der Kontrolle (mit Mock-siRNA transfizierte Zellen, linke Spur) ist deutlich mehr MK-Protein zu detektieren als bei den mit siRNA-MK transfizierten Zellen (mittlere und rechte Spur). Die prozentualen Angaben in den Balkendiagrammen auf der rechten Seite beziehen sich auf die relative Bandendichte.

OE 33**Abbildung 9: Midkine-Depletion in OE 33**

Midkine Depletion in Zellen der Reihe OE 33: Bei Proben der Kontrolle (mit Mock-siRNA transfizierte Zellen, linke Spur) ist deutlich mehr MK-Protein zu detektieren als bei den mit siRNA-MK transfizierten Zellen (mittlere und rechte Spur). Die prozentualen Angaben in den Balkendiagrammen auf der rechten Seite beziehen sich auf die relative Bandendichte.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Midkine-Detektion in Überständen statt in Zelllysaten. Die Überstände wurden gewonnen bevor ein Mediumwechsel wachsender Zellen durchgeführt wurde. Anstatt das verbrauchte Medium zu verwerfen wurde es als „Überstand“ sichergestellt und im Western Blot statt der Zelllysate analysiert. Es wurde das absolute MK-Vorkommen in einer definierten Menge des Überstandes untersucht und nicht eine definierte Menge Protein. Eine zusätzliche Detektion von Aktin war also nicht sinnvoll, zumal es sich bei Aktin um ein intrazelluläres Strukturprotein handelt. Eine jeweils definierte Zahl von Zellen wurde mit einer definierten Menge an Nährmedium im Inkubator bebrütet. Dabei wurden sowohl Zellen verwendet, bei denen zuvor MK mittels siRNA herunterreguliert wurde, als auch Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die untersuchten Zelllinien waren PT 1590 und LN 1590. Nach definierten Zeitpunkten wurde eine Probe der Überstände aus der Zellkultur gewonnen und im Western Blot auf den MK-Gehalt hin überprüft. Zu erwarten wäre eine verminderte MK-Expression bei den Überständen der transfizierten Zellen. Genau das ist auch zu beobachten. Dieser Effekt ist nicht nur nach 24 Stunden, sondern auch noch nach 72 Stunden deutlich präsent. Die MK-Sezernierung in den Kontroll-Zellen ist nicht beeinträchtigt, während die Sezernierung in den transfizierten Zellen nicht komplett zum Erliegen gekommen, jedoch deutlich eingeschränkt ist (Abbildung 10 und 11).

PT 1590

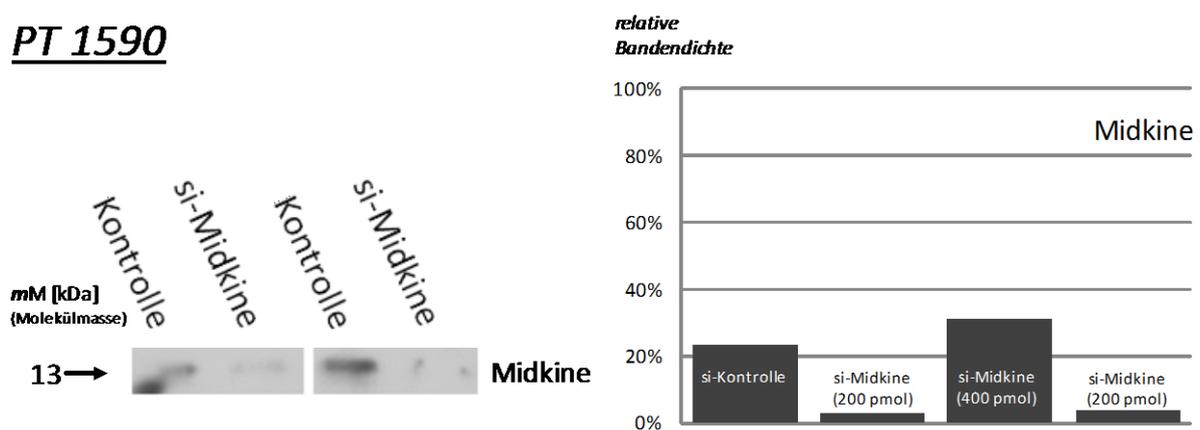
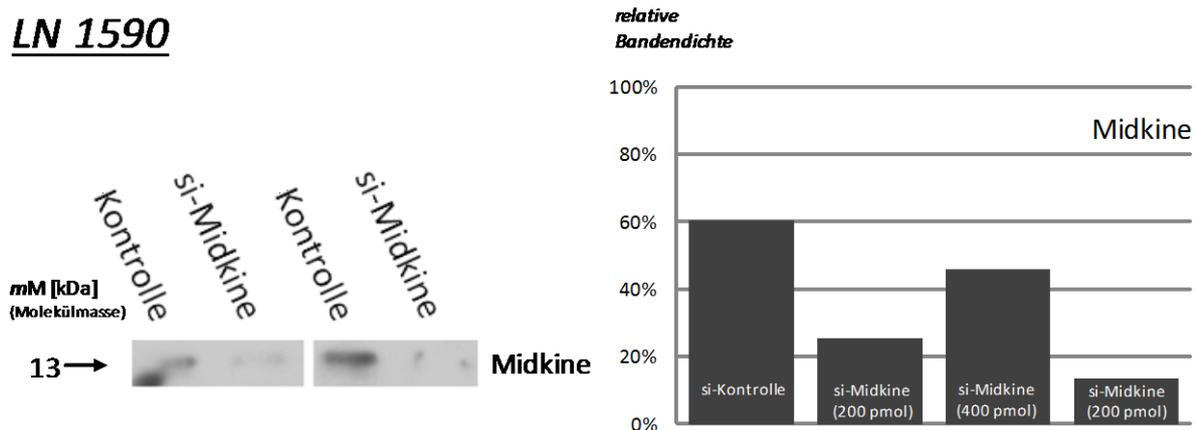


Abbildung 10: Midkine in Überständen nach Depletion in PT 1590

Midkine-Gehalt in Überständen von Zellen der Reihe PT 1590, deren Midkine-Sekretion mittels siRNA reduziert wurde. Die Überstände wurden 24 h und 72 h nach erfolgreicher Transfektion gewonnen. In der jeweils ersten Spur (Kontrolle) ist deutlich mehr MK zu detektieren als in der jeweils zweiten (siRNA-MK). Die prozentualen Angaben in den Balkendiagrammen auf der rechten Seite beziehen sich auf die relative Bandendichte.

LN 1590**Abbildung 11: Midkine in Überständen nach Depletion in LN 1590**

Midkine-Gehalt in Überständen von Zellen der Reihe LN 1590, deren Midkine-Sekretion mittels siRNA reduziert wurde. Die Überstände wurden 24 h und 72 h nach erfolgreicher Transfektion gewonnen. In der jeweils ersten Spur (Kontrolle) ist deutlich mehr MK zu detektieren als in der jeweils zweiten (siRNA-MK). Die prozentualen Angaben in den Balkendiagrammen auf der rechten Seite beziehen sich auf die relative Bandendichte.

In der vergleichenden Gegenüberstellung der Überstände der transfizierten Zellen vom Zeitpunkt 24 h und 72 h ist auffällig, dass der MK-Gehalt nach 72 Stunden etwas größer ist als der MK-Gehalt nach 24 Stunden. Letzteres ist am ehesten dadurch zu erklären, dass die durchgeführte Transfektion nicht stabil ist und nur temporär bestehen bleibt. Die Zellen sind nach einer gewissen Zeit wieder in der Lage, vermehrt MK zu sezernieren. Der Effekt ist bei beiden untersuchten Entitäten zu beobachten. Bei LN 1590 ist die MK-Expression insgesamt allerdings höher.

4.3 Proliferation

Bei der Proliferation der siRNA-MK-transfizierten Zellen der Linie OE 19 beobachteten wir, dass diese Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen über einen betrachteten Zeitraum von 96 Stunden insgesamt langsamer proliferierten (Abbildung 12). Die Signifikanz war dabei nach 24 h am größten ($p < 0,001$). Mit längerer Beobachtungszeit nimmt die Signifikanz dabei ab: nach 72 h ist $p < 0,05$. Nach 96h ist der Unterschied zwischen der Proliferation siRNA-MK-transfizierter Zellen und Zellen der Kontroll-Gruppe nicht mehr signifikant ($p = 0,25$).

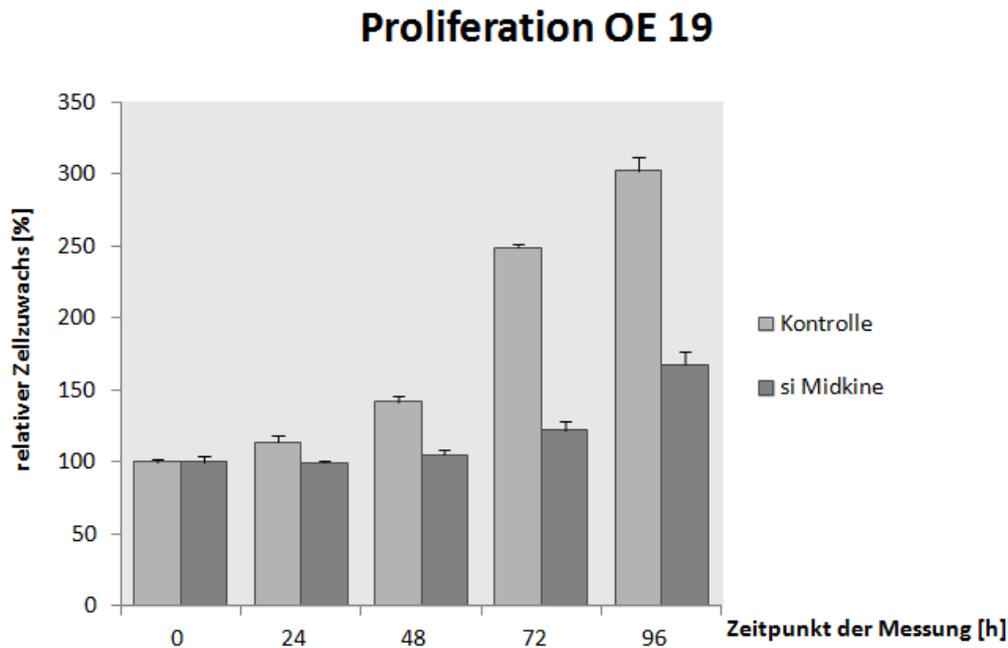


Abbildung 12: Ergebnisse des Proliferationsessays

Gezeigt ist die prozentuale Zunahme der Zahl von Zellen der Linie OE 19, die jeweils unterschiedlich behandelt wurden: Kontrolle (transfiziert mit Kontroll-siRNA ohne Depletion, hellgrau) und si Midkine (transfiziert mit siRNA-MK, mittelgrau). Begonnen wurde mit etwa 3.000 Zellen pro Well.

4.4 Stimulation der Midkine-Expression

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von FCS, TNF- α und EGF auf die MK-Expression von Zellen der Linie OE 19 untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass alle drei Faktoren einen positiven Effekt auf die MK-Sezernierung haben. TNF- α ist dabei der stärkste Stimulator. Es wurde eine Steigerung der MK-Konzentration von 2,18 ng/ml auf 263 ng/ml nach 72 Stunden gemessen ($p < 0,001$). Bei der Stimulation mit EGF konnten wir eine Steigerung von 2,09 ng/ml auf 111,13 ng/ml nach 48 Stunden zeigen ($p < 0,001$). Unter alleiniger Zugabe von FCS-haltigem Nährmedium lässt sich ein Anstieg von 7,24 ng/ml auf 245,29 ng/ml verzeichnen ($p < 0,05$; Abbildung 13).

Es zeigten auch Zellen, die FCS-freies Nährmedium erhielten, eine erhöhte Ausschüttung von Midkine: angefangen mit einer MK-Konzentration von 0,24 ng/ml war nach 72 Stunden eine Steigerung auf 49,47 ng/ml zu verzeichnen ($p < 0,05$).

OE 19: Stimulation (Zeitreihe)

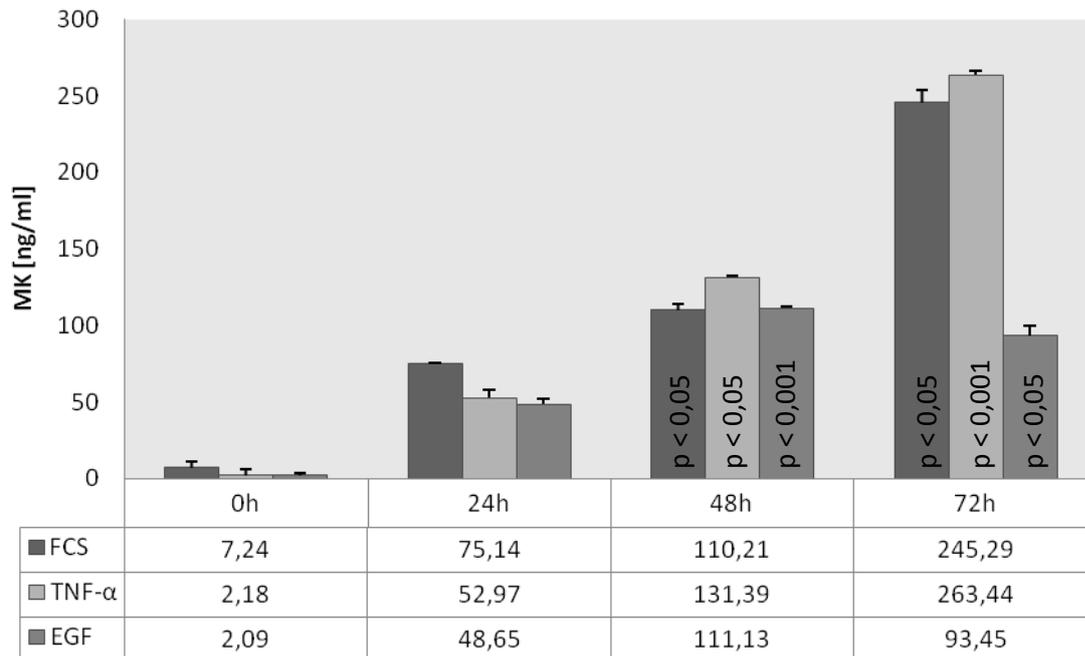


Abbildung 13: Zellwachstum nach Stimulation bei Zellen der Linie OE 19

Die Zellen (OE 19) wurden unterschiedlich behandelt: Zugefügt wurde entweder FCS (dunkelgrau), TNF- α (hellgrau) oder EGF (mittelgrau). Zu Beginn des Experiments, nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die entsprechenden Proben gewonnen und die Midkine-Konzentration im ELISA gemessen und quantifiziert. Die Balken ganz links zeigen die Werte zu Beginn, ganz rechts sind die Werte nach 72 Stunden aufgetragen. Für jeden Messzeitpunkt sind die Werte für die drei unterschiedlich behandelten Probenreihen jeweils nebeneinander zum unmittelbaren Vergleich dargestellt. Die Tabelle unterhalb der Balken gibt die jeweiligen Konzentrationen in Zahlenwerten an. Die Einheit, in der gemessen wurde, ist ng/ml.

5. Diskussion

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Ösophaguskarzinomen betrug im Jahr 2006 in Deutschland nur 11 bis 22 % (Husman *et al.* 2010). Die MK-Konzentration ist bei Patienten mit malignen Ösophagustumoren bekanntermaßen erhöht. Daher lohnen sich genauere Nachforschungen hinsichtlich des Zusammenhangs von der MK-Konzentration zum Wachstumsverhalten und der Beeinflussbarkeit von Ösophaguskarzinomzellen.

5.1 RNA-Interferenz und Midkine-Depletion

Für die detaillierte Beschreibung der RNA-Interferenz mit nachfolgender Gen-Depletion erhielten Andrew Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Sie forschten an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, entschlüsselten sein Genom und beschrieben den Mechanismus der RNA-Interferenz (Fire *et al.* 1998). Normalerweise dient der Mechanismus der RNA-Interferenz in Säugetieren der Abwehr fremder DNA, welche beispielsweise durch Viren eingeschleust wird. Nach dem Einschleusen doppelsträngiger DNA (dsDNA) kommt es zur Spaltung der DNA in doppelsträngige Fragmente mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden. Verantwortlich hierfür ist ein sogenannter „Dicer“. Diese Fragmente werden small interfering RNA (siRNA) genannt und lagern sich mit dem Dicer zum Multienzymkomplex RISC (RNA induced silencing complex) zusammen, welcher die Spaltung in Einzelstränge bewirkt. Nun kann sich der Strang an die homologe Sequenz der Ziel-mRNA (messenger RNA) anlagern. Nach der Anlagerung kommt es zur Spaltung der mRNA und somit zur posttranskriptionalen Stilllegung des Gens (Wacheck und Vornlocher 2003). Nach Einschleusung doppelsträngiger DNA in Zellen von Säugetieren kann es aber auch zur Interferonantwort kommen, welche einen unspezifischen RNA-Abbau mit resultierender Apoptose zur Folge hat. Bei der in der Forschung genutzten Technik der RNA-Interferenz wird dieser Schritt umgangen, indem er übersprungen wird. Generell werden Fragmente mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden eingeschleust.

Die Stilllegung/Depletion von Midkine in Ösophaguskarzinomzellen der Linien OE 19 und OE 33 konnte in unserer Arbeitsgruppe problemlos erfolgen. Desweiteren konnten wir zeigen, dass in den Überständen von Zellen, die mit siRNA-MK behandelt wurden, weniger Midkine detektiert werden konnte, als in den Überständen unbehandelter Zellen der gleichen Linie.

Dieser Effekt war bei Zellen der Linie PT 1590 24 Stunden nach Transfektion deutlich erkennbar. Nach längerer Wartezeit war der Effekt zwar auch noch vorhanden, jedoch schwächer ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass die Transfektion instabil ist und die Zellen daher nach einer gewissen Zeit wieder in der Lage sind MK in größerer Menge zu produzieren. Bei Zellen der Linie LN 1590 hingegen war der Effekt insgesamt schwächer und nach 72 Stunden noch deutlicher erkennbar als nach 24 Stunden. Es muss also noch weitere Einflussfaktoren geben. Offenbar unterscheiden sich die Zellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase in Bezug auf die MK-Sekretion.

5.2 Proliferation nach Midkine-Depletion

Die große Bedeutung von Midkine für die Genese maligner Ösophagustumoren ist begründet in der Funktion dieses Wachstumsfaktors (gesteigerte Zellproliferation, Förderung von Migration, Mitogenese und Angiogenese (Dai et al. 2007)). Daher ist anzunehmen, dass im Falle einer gelungenen Ausschaltung des MK-Gens und damit unterdrückter oder zumindest reduzierter Sezernierung des Proteins ein negativer Einfluss auf die Proliferation und das Wachstum maligner Zellen vorliegt. Für Pankreaskarzinomzellen konnte bereits beobachtet werden, dass die MK-Überexpression für die gesteigerte Proliferation der Pankreaskarzinomzellen verantwortlich zu sein scheint (Güngör et al. 2010 und 2011).

Dass dieses Phänomen auch bei Ösophaguskarzinomzellen zutrifft, konnten wir in unseren MTT-Tests zeigen. Die Signifikanz war dabei nach 24 h am größten ($p < 0,001$). Mit längerer Beobachtungszeit nahm die Signifikanz dabei ab: nach 72 h ist $p < 0,05$. Nach 96 h ist der Unterschied zwischen der Proliferation siRNA-MK-transfizierter Zellen und Zellen der Kontroll-Gruppe nicht mehr signifikant ($p = 0,25$). Als Ursache ist hier unter anderem die Tatsache zu nennen, dass es sich bei unserer Depletion aufgrund der Instabilität der siRNA um eine temporäre Herunterregulation handelt und die Zellen offenbar in der Lage sind, sich relativ rasch zu regenerieren und MK wieder vermehrt herstellen und sezernieren zu können.

5.3 Midkine als Tumor- und Prognosemarker

Von großem Nutzen wäre es, wenn der Serum-MK-Spiegel in Zukunft als Tumormarker und Verlaufsmarker Verwendung finden würde, da somit ein Werkzeug zur Verfügung stehen

würde, mit dessen Hilfe die Erstdiagnose sowie die Diagnose eines Rezidivs rascher gestellt werden könnte, als es bisher der Fall ist.

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus ist die Serum-MK-Konzentration sogar höher als die des schon bekannten Tumormarkers CEA (Jono et al. 2010). Auch über die Prognose bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus lässt sich mit Hilfe von MK eine Aussage treffen: Je höher die MK-Konzentration, desto schlechter ist die Überlebensrate (Shimada et al. 2003).

Für Mammakarzinome stellen Ibusuki *et al.* (2009) die mögliche Verwendung von MK im Serum von Patientinnen als Tumormarker in Aussicht. Sie betrachteten die Serum-MK-Konzentration in sowohl gesunden als auch an Brustkrebs erkrankten Probandinnen. Im Ergebnis wiesen die an Brustkrebs erkrankten Patientinnen im Vergleich zu den Gesunden einen deutlich höheren Wert der Serum-MK-Konzentration auf. So konnte die erhöhte Konzentration beispielsweise bei 32,4 % aller Probandinnen mit bisher nicht metastasiertem Brustkrebs und bei 64 % aller Probandinnen mit metastasierendem Mammakarzinom festgestellt werden. Die Autoren der Studie sehen MK daher als möglichen neuartigen Tumormarker an. Natürlich sind vorher weitere Studien mit großer Probandenzahl nötig, bevor die Nutzung von MK als Tumormarker zuverlässig erfolgen kann (Ibusuki et al. 2009).

Auch bei Weichteiltumoren an den Aponeurosen von Muskeln, den sogenannten Desmoidtumoren, wird der Einsatz von MK als Prognosefaktor diskutiert (Colombo et al. 2011): Die Forscher beschreiben in der Studie, dass eine erhöhte MK-Konzentration mit dem vermehrten Auftreten von Rezidiven korreliert.

Umfangreiche Untersuchungen zu MK und Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) machten Hung *et al.* (2011). Dabei fanden sie heraus, dass das MK-Serum-Level sich als Tumormarker für HCC einsetzen lässt. Allerdings ist letzteres nur eingeschränkt zur Erstdiagnose im Sinne eines Screeningfaktors möglich, da neue HCC bei Patienten in kompletter Remission oder ohne HCC in der Vorgeschichte mit einer Messung des Serum-MK-Spiegels nicht sicher detektiert werden konnten. Sie halten MK jedoch zur Überwachung der Progression eines HCC und eines möglichen Ansprechens auf eine Therapie mit transarterieller Chemoembolisation, Radiofrequenzablation oder perkutaner Alkohol-Injektionstherapie für gut geeignet. In der Studie wurde gezeigt, dass ein relativer MK-Anstieg umgekehrt proportional zur verbleibenden Überlebenszeit des Patienten ist. Ein

starker Anstieg des Serum-MK-Spiegels signalisiert bei Patienten mit HCC ein schlechtes Outcome (Hung et al. 2011).

Auch für die bereits erwähnten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die mit einer erhöhten MK-Expression im Gewebe einhergehen (Kaifi et al. 2007), scheint die Gewebe-MK-Konzentration ein geeigneter Marker für die Einschätzung von Fortschreiten des Tumorleidens und Prognose zu sein. Ein besonderer Zusammenhang besteht hier vor allem bei Patienten, die mit Imatinib, einem Tyrosinkinase-Hemmstoff, therapiert werden: Bei Patienten mit hohen Serum-MK-Spiegeln zeigte sich unter Imatinib-Therapie eine kürzere rezidivfreie Überlebensrate als bei Patienten mit gleichem Therapieregime und niedrigeren Serum-MK-Spiegeln. Die Serum-MK-Spiegel helfen also bei der Vorhersage des Ansprechens auf eine Imatinib-Therapie bei Patienten mit GIST (Rawnaq et al. 2011).

Für Neuroblastome wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die MK-Serum-Konzentration bei betroffenen Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht ist (Nakagawara et al. 1995, Fiegel et al. 2008). Ikematsu *et al.* (2008) sehen in MK ebenfalls einen zuverlässigen Prognosefaktor bei Neuroblastomen, allerdings nur in Kombination mit den Konzentrationen von Lactatdehydrogenase, Ferritin, neuronenspezifischer Enolase und den Disialogangliosiden GD2 und NM23H1 (Ikematsu et al. 2008).

Bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist eine besonders hohe MK-Konzentration im Patientenserum mit einer schlechten Prognose verknüpft, außerdem eignet sich MK hier sowohl als Prognosemarker als auch als Tumormarker in der Erstdiagnose dieser Karzinome, da der MK-Serumspiegel vor allem im Frühstadium besonders erhöht ist (Ota et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MK Bestandteil vieler Forschungsprojekte der letzten Jahre ist und dass die Serum-MK-Konzentration in vielerlei Karzinompatienten im Vergleich zu gesunden Vergleichsprobanden deutlich erhöht ist. Ein Einsatz als Verlaufsp parameter zur Beurteilung eines Ansprechens auf die Therapie, Tumorprogression oder zur Abschätzung der Prognose erscheint in der Zukunft als vielversprechend. Als Tumormarker wäre der Einsatz bei unsicherem Karzinomverdacht als Zusatzuntersuchung denkbar und bei dringendem Karzinomverdacht als Zusatzuntersuchung für die Bestätigung der Diagnose gut geeignet.

5.4 Induktion von Midkine durch Wachstumsfaktoren (TNF- α , EGF)

Wir untersuchten auch, ob und welchen Effekt verschiedene Wachstumsfaktoren und Zusätze auf die Midkine-Sezernierung haben. Dabei konnten wir zeigen, dass sich die MK-Sezernierung durch alleinige Zugabe von FCS oder durch die Zugabe von TNF- α oder EGF stimulieren lässt. TNF- α zeigte dabei den größten Einfluss: nach 72 h stieg die MK-Konzentration von ursprünglich 2,18 ng/ml auf 263,44 ng/ml an ($p < 0,001$). Bei der Zugabe von EGF zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der MK-Konzentration. Nach 72 h stieg sie von 2,09 ng/ml auf 93,45 ng/ml ($p < 0,05$). Bei EGF fällt außerdem auf, dass der höchste Anstieg der MK-Konzentration mit 11,13 ng/ml ($p < 0,001$) bereits nach 48 h erreicht war und anschließend wieder abfiel. Als Grund hierfür kommt eine kürzere Halbwertszeit von EGF im Vergleich zu TNF- α in Frage.

Zellen, die nicht stimuliert wurden, denen aber FCS entzogen wurde (Daten nicht gezeigt), zeigten einen paradoxen Effekt mit deutlich gesteigerten Werten für MK mit einem Konzentrationsanstieg von 0,24 ng/ml auf 49,47 ng/ml nach 72 h ($p < 0,05$). Offenbar ist der Serumentzug ein starker Induktor für die MK-Expression. Unter Serumentzug fehlen den Zellen wertvolle Wachstumsfaktoren und daher geraten die Zellen unter enormen Stress. Dieser Stress scheint eine ausgeprägte MK-Expression und -Sezernierung zur Folge zu haben. Möglicherweise ist die gesteigerte MK-Expression als Versuch anzusehen durch eine forcierte Stimulation von Wachstum und Proliferation der Apoptose entgegen zu wirken.

Friedrich beschreibt in seiner Dissertation (2007) ein ähnliches Phänomen. Er führte verschiedene Experimente mit MPNST-Zellen (maligne periphere Nervenscheidentumoren) durch. Bei diesen Tumoren liegt aufgrund mangelnder Therapieoption bislang eine schlechte Prognose vor und es ist erstrebenswert eine weitere Möglichkeit zur Therapie zu entwickeln. Friedrich beobachtete bei MPNST-Zellen der Linie S462 eine Überexpression von MK unter Serumentzug und mutmaßt, dass diese Überexpression durch den Stress der unterversorgten Zellen hervorgerufen wurde und für die gesteigerte Vitalität der Zellen verantwortlich ist (Friedrich 2007). Diese Beobachtung und Vermutung deckt sich mit den von uns gemessenen Ergebnissen.

In der Zukunft könnte man die Effekte von Wachstumsfaktoren auf die MK-Expression genauer untersuchen und beispielsweise betrachten, welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen der Wachstumsfaktoren TNF- α und EGF jeweils auf das Wachstum der Karzinomzellen haben. Eine derartige Titration erfolgte bei unseren Experimenten nicht.

Außerdem wurden die Stimulationsversuche mit einer Auswahl an Wachstumsfaktoren durchgeführt (TNF- α und EGF), da diese in einem von uns durchgeführten Vorversuch die besten Effekte zeigten. Hier ist der Effekt anderer Wachstumsfaktoren weiterhin von Interesse. Für VEGF-C (vascular endothelial growth factor C) beispielsweise wurde beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus bereits zuvor ein Zusammenhang beschrieben. Ebenso wie die MK-Konzentration war auch die VEGF-C-Konzentration im Serum von Patienten mit einem Ösophaguskarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Krzystek-Korpacka et al. 2007). Hier lohnen sich weitere Experimente. Friedrich (2007) beschrieb neben der Überexpression von MK unter Serumentzug auch erhöhte Konzentrationen von VEGF auf RNA-Ebene als mögliche Erklärung für ein gesteigertes Angiogenesepotential. Inwiefern die Regulation der VEGF-Expression direkt oder indirekt mit der MK-Expression verantwortlich ist, bleibt offen.

5.5 Midkine als therapeutisches Target

Neben der Verwendung als Tumormarker ist die Verwendung von MK in der Gentherapie, bei der das MK-Gen mittels Adenoviren als therapeutisches molekulares Target genutzt werden kann, von sehr großem Nutzen. Ansätze hierzu zeigten Yu *et al.* (2004) in der Zellkultur. Über rekombinante Adenoviren mit einem eingeschleusten Genfragment von MK konnte der Zelltod von Tumorzellen (HCC) ausgelöst werden. Auch Banno *et al.* können sich MK als molekulares Target vorstellen. Die Forscher beschäftigten sich nicht mit Karzinomen, sondern mit Gefäßtransplantaten. Durch siRNA-MK konnte im Kaninchenmodell nach vorgenommener Venentransplantation weniger Entzündungsreaktion und weniger Zellrekrutierung beobachtet werden als in der Kontrollgruppe (Banno et al. 2006). Weitere Karzinomferne Experimente machte Yamamoto (2006). Arthritis-Mäuse, welche mit siRNA-MK behandelt wurden, zeigten nach der Operation weniger Adhäsionen und weniger durch Antikörper ausgelöste Arthritis-Erscheinungen als unbehandelte Mäuse der Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen passen zu den proinflammatorischen Eigenschaften von Midkine. Allerdings waren für die beobachteten Effekte *in vivo* sehr große Mengen siRNA nötig (Yamamoto 2006). Es muss also auch an eine Zytotoxizität im Rahmen der Versuche bei sehr hohem Gebrauch von siRNA im Sinne einer potentiell toxischen Transfektion bei hohen Dosierungen der Transfektionsreagenzien gedacht werden.

Midkine bietet also nicht nur in der Krebstherapie neue Einsatzmöglichkeiten. Ein Beispiel für den gelungenen Einsatz von siRNA-MK im Tierversuch liefern dabei Takei *et al.* (2006). Im Mausmodell mit Tieren mit Prostatakarzinom erfolgte die kombinierte Therapie mit siRNA-MK und Paclitaxel, einem gängigen Zytostatikum. Die Kombinationstherapie zeigte bessere Ergebnisse als die alleinige Therapie mit Paclitaxel. Außerdem kam in der Zellkultur von Zellen des Prostatakarzinoms die MK-Sezernierung nach MK-RNA-Interferenz fast vollständig zum Erliegen. Dies äußerte sich in einer deutlich eingeschränkten Proliferation der Zellen (Takei *et al.* 2006). Auch Magenkarzinome wurden in der Zellkultur bereits mit siRNA-MK behandelt und beobachtet. Diese Behandlung führte zu gemindertem Wachstum und vermehrter Apoptose der Karzinomzellen im Vergleich zu Karzinomzellen der Kontrollgruppe (Wang *et al.* 2007). Zusätzlich sehen Fiegel *et al.* (2008) im MK-Gen ein vielversprechendes molekulares Target in der Neuroblastom-Therapie. In ihrer Studie untersuchten sie Proben von 56 Neuroblastomen und fanden dabei heraus, dass viele dieser Tumoren MK-mRNA exprimieren und somit ein attraktives therapeutisches Target bieten (Fiegel *et al.* 2008).

Eine weitere Tumorentität, in der MK eine wichtige Rolle spielt, stellt das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (OSCC) dar. Ota *et al.* zeigten bereits 2010, dass ein Zusammenhang zwischen der MK-Konzentration und einem mutierten p53-Gen besteht. Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor und greift unter anderem in die Regulation des Zellzyklus ein (Zhang *et al.* 2010). So scheint MK vor allem für Patienten, die unter einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle leiden und bei denen ein mutiertes p53-Gen vorliegt, ein attraktives molekulares Target in der Therapie zu sein (Ota *et al.* 2010).

Auch bei Ösophaguskarzinomen konnten wir zeigen, dass Midkine nach Ausschaltung des Midkine-Gens weniger sezerniert wird und somit ein geringeres Wachstum der Tumorzellen zur Folge hat. Parallel wurde das gleiche Phänomen bei Pankreaskarzinomzellen von unserer Forschungsgruppe beobachtet. Für beide Entitäten ist die Midkine Depletion ein aussichtsreicher Therapieansatz, welcher für betroffene Patienten eine hoffnungsvolle Alternative darstellt.

Die bisher schon zahlreich durchgeführten Experimente *in vivo* und *in vitro* stellen eine vielversprechende Basis für weitere Experimente dar. Schließlich ist es auch denkbar, dass in nicht allzu ferner Zukunft die ersten Karzinompatienten eine alternative Therapiemöglichkeit präsentiert bekommen, die im Vergleich zur konventionellen Chemo- und Strahlentherapie wesentlich schonender für den gesamten Organismus sein könnte, da über MK gezielt die

Karzinomzellen angegriffen und abgetötet werden und die gesunden Zellen des Organismus von der Therapie unbeeinträchtigt überleben könnten. Denkbar ist auch eine Kombination dieser Therapie mit konventionellen Ansätzen in dosisreduzierter Form. Es konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise beim Prostatakarzinom (PC-3 Zellen) durch die gleichzeitige Behandlung mit siRNA gegen MK die Dosis des parallel verabreichten Chemotherapeutikums Paclitaxel deutlich reduziert werden konnte. Die gleichen therapeutischen Effekte wurden *in vitro* und *in vivo* (Mäuse) erzielt und durch die Einsparung des Chemotherapeutikums konnten weniger zytotoxische Nebenwirkungen wie Leukozytopenie oder Leberschäden mit Transaminasenerhöhung beobachtet werden (Takei et al. 2006).

Bei Pankreaskarzinomen wurde der Zusammenhang von Midkine und der Chemoresistenz von Karzinomzellen in Bezug auf Gemcitabine bereits näher beleuchtet und es konnte gezeigt werden, dass Midkine für eine gesteigerte Chemoresistenz der Karzinomzellen verantwortlich ist und eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) über die Interaktion mit Notch-Rezeptoren induzieren kann (Güngör et al. 2011). Für das Ösophaguskarzinom wurde dieses Phänomen noch nicht beschrieben, es wäre jedoch ein interessantes Thema zukünftiger Arbeiten, denn der Nachweis dieses Phänomens wäre von großem Interesse für das Verständnis dieses malignen Erkrankungsbildes und seines Verlaufs.

Es sind bereits mehrere Chemotherapeutika im Einsatz, die gezielt einzelne Zytokine ausschalten. Ein beliebtes Ziel hierbei ist TNF- α : Etanercept (Enbrel®), Infliximab (Remicade®), Adalimumab (Humira®), Golimumab (Simponi®) und Certolizumab (Cimzia®) sind zum Teil bereits etablierte und erfolgreich eingesetzte Chemotherapeutika.

Auch eine siRNA ist als Therapeutikum in der Erprobung. Der Wirkstoff Bevasiranib war nach erfolgreicher Unterbindung einer Neovaskularisierung der Retina im Tiermodell (Reich et al. 2003) bereits Bestandteil einer Phase-III-Studie zur Therapie der Makuladegeneration. Diese siRNA bewirkt eine Stilllegung des Gens für VEGF. Die Phase-III-Studie *COBALT (Combining-Bevasiranib-And-Lucentis-Therapy-Studie)* musste leider abgebrochen werden, da sich abzeichnete, dass das Studienziel nicht erreicht werden konnte. Bevasiranib ist aber weiterhin im Mittelpunkt der Forschung der gezielten Therapie.

Zurzeit ist die gezielte Ausschaltung von MK beim Menschen noch nicht möglich, doch es ist immer wahrscheinlicher dass in den nächsten Jahrzehnten durch MK ein vielfältiger therapeutischer Nutzen generiert werden kann. Patienten, für die aktuell trotz der Therapie schlechte Prognosen bestehen, würden von einem neuen, in diesem Fall spezifischen, Therapieansatz profitieren. Auch Patienten, die aufgrund von zu starken Nebenwirkungen eine Chemotherapie abbrechen müssen und Patienten, denen aufgrund von Nebenerkrankungen oder Nebenwirkungen gar nicht erst eine konventionelle Chemotherapie angeboten werden kann, hätten Vorteile durch neue und gezielte Therapiemöglichkeiten mit einem resultierenden Gewinn an Lebenszeit und -qualität.

Dieser Therapieansatz klingt zunächst hoffnungsvoll, allerdings muss bedacht werden, dass die von uns durchgeführten Experimente und gemachten Beobachtungen in der Zellkultur stattfanden. Der nächste Schritt wäre die Etablierung einer stabilen Ausschaltung des Midkine-Gens in der Zellkultur mit einer anschließenden Übertragung der Technik ins Tiermodell (z.B. Mausmodell). Ein Mausmodell für Ösophaguskarzinome wurde bereits im Forschungslabor des UKE etabliert (Gros 2010 und Gros et al. 2011). Eine permanente Ausschaltung des Midkine-Gens könnte beispielsweise über shRNAs erfolgen. Nach weiteren Schritten ist eine Übertragung auf den menschlichen Organismus möglich. Sollte sich hierbei ein therapeutischer Nutzen abzeichnen, kann oder muss ein Therapieversuch mit MK-Depletion auf Genebene am Menschen etabliert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eine gute Basis für weitere Experimente im Bereich dieser Thematik.

6. Zusammenfassung

Das sekretorische Protein Midkine wurde in zahlreichen Tumorentitäten vermehrt exprimiert. Seine vermehrte Expression ist auch in Ösophaguskarzinomzellen bekannt und wir konnten mit unseren Experimenten bestätigen, dass es eine zunehmende Rolle in der Zellproliferation von Ösophaguskarzinomen spielt. Es sind Depletionen von MK in der kommerziellen Ösophaguskarzinomzelllinie OE 19 und in einer in unserem Labor generierten Primärtumorzelllinie des Ösophagus (PT 1590) sowie mit Zellen einer Lymphknotenmetastase dieses Karzinoms (LN 1590) durchgeführt worden. Mittels siRNA-Lipofektion konnten wir die Midkine-Expression temporär in den Zellen herunter regulieren und daraufhin eine verringerte Proliferation der MK-depletierten Zellen nachweisen. Diese Beobachtung wurde parallel in unserer Arbeitsgruppe auch bei der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen gemacht.

In einem weiteren Experiment wurden die Tumorkarzinomzellen mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren/Zytokinen stimuliert. Hierbei zeigt sich TNF- α als starker Induktor für MK. Auch die Zugabe von EGF oder von FCS-haltigem Serum führt zu einer gesteigerten MK-Konzentration in der Zellkultur.

Bisherige Anstrengungen bezüglich der Bekämpfung maligner Tumoren durch Antikörper mit gezielten Angriffen auf Zytokine sind vielversprechend. Beispiele sind Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab, welche sich allesamt gegen TNF- α richten.

Bevasiranib ist eine siRNA, die sich gegen das VEGF-Gen richtet und bereits klinisch getestet wurde. Auch wenn eine Phase-III-Studie (COBALT-Studie) mangels Erfolg abgebrochen werden musste, lohnen sich hier weitere Optimierungsversuche.

Wir sind der angestrebten Nutzung von Midkine als therapeutisches Target in der Karzinomtherapie einen Schritt näher gekommen. Weitere Forschungsgruppen sollten nun im nächsten Schritt eine stabile Transfektion der siRNA erreichen und unsere Versuche auf das Tiermodell übertragen, sodass in nicht allzu ferner Zukunft die ersten Studien an Probanden durchgeführt werden können und erkrankte Patienten mit einem Gewinn an Lebenszeit und Lebensqualität von dieser neuen Therapie profitieren können.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADELSTEIN D. J. ET AL.** (2009) *Mature Results from a Phase II Trial of Postoperative Concurrent Chemoradiotherapy for Poor Prognosis Cancer of the Esophagus and Gastroesophageal Junction.* J Thorac Oncol 4(10):1264-1269.
- ALEXANDROU A. ET AL.** (2002) *Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences.* Dis Esophagus 15(4):290-295.
- ARIDOME K. ET AL.** (1995) *Increased Midkine Gene Expression in Human Gastrointestinal Cancers.* Jpn J Cancer Res 86(7):655-661.
- ASAI T. ET AL.** (1997) *Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion.* Biochem Biophys Res Commun 236(1):66-70.
- BANNO H. ET AL.** (2006) *Controlled release of small interfering RNA targeting midkine attenuates intimal hyperplasia in vein grafts.* J Vasc Surg 44(3):633-641.
- BÉDARD E. L. ET AL.** (2001) *The role of surgery and postoperative chemoradiation therapy in patients with lymph node positive esophageal carcinoma.* Cancer 91(12):2423-2430.
- BLOT W. J.** (1994) *Esophageal cancer trends and risk factors.* Semin Oncol 21(4):403-410.
- BLOT W. J. UND McLAUGHLIN J. K.** (1999) *The changing epidemiology of esophageal cancer.* Semin Oncol 26(5):2-8.
- BOLLSCHWEILER E. ET AL.** (2001) *Demographic Variations in the Rising Incidence of Esophageal Adenocarcinoma in White Males.* Cancer 92(3):549-555.
- BOLLSCHWEILER E. ET AL.** (2001) *Carcinoma of the esophagus – actual epidemiology in Germany.* Onkologie 24(2):180-184.
- BOLLSCHWEILER E. UND ELL C.** (2004) *Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom des Ösophagus Unterschiede in Epidemiologie, Tumorbilogie, Diagnostik und Prävention.* Onkologie 10:1168-1178.
- BOLÓS V. ET AL.** (2007) *Notch signaling in development and cancer.* Endocr Rev 28(3):339-363.

BOMMAS-EBERT U. ET AL. (2011) *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*, 3. Auflage, Thieme-Verlag.

BOONSTRA J. ET AL. (1995) *The epidermal growth factor*. Cell Biol Int 19(5):413-430.

CHOUDHURI R. ET AL. (1997) *An Angiogenic Role for the Neurokines Midkine and Pleiotrophin in Tumorigenesis*. Cancer Res 57(9):1814-1819.

COHEN S. (1962) *Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal*. J Biol Chem 237(5):1555-1562.

COHEN S. (1965) *The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF)*. Dev Biol 12(3):394-407.

COLOMBO C. ET AL. (2011) *Increased midkine expression correlates with desmoid tumour recurrence: a potential biomarker and therapeutic target*. J Pathol 225(4):574-582.

CORLEY D. A. UND BUFFLER P. A. (2001) *Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database*. Int J Epidemiol 30(6): 1415-1425.

DAI L.-C. ET AL. (2007) *Antisense oligonucleotide targeting midkine suppresses in vivo angiogenesis*. World J Gastroenterol 13(8):1208-1213.

DEVESA S. ET AL. (1998) *Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States*. Cancer 83(10):2049-2053.

ENGEL L. S. ET AL. (2003) *Population attributable risks of esophageal and gastric cancers*. J Natl Cancer Inst 95(18):1404-13.

FABRI L. ET AL. (1993) *Structural characterization of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK*. J Chromatogr A 646(1):213-225.

FIEGEL H. C. ET AL. (2008) *Midkine is highly expressed in neuroblastoma tissues*. Pediatr Surg Int 24(12):1355-1359.

FIRE A. ET AL. (1998) *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669):806-811.

- FRIEDRICH C.** (2007) *Modulation der Biologie maligner peripherer Nervenscheidentumorzellen durch Midkine* [Dissertation]. Berlin: Charité-Universitätsmedizin.
- FUKAZAWA N. ET AL.** (2008) *Receptor type protein tyrosine phosphatase zeta-pleiotrophin signaling controls endocytic trafficking of DNER that regulates neuritogenesis.* Mol Cell Biol 28(14):4494-4506.
- GHADIRIAN P.** (1987) *Food habits of the people of the Caspian Littoral of Iran in relation to esophageal cancer.* Nutr Cancer 9(2-3):147-157.
- GHOLOPOUR C. ET AL.** (2008) *A histopathological study of esophageal cancer on the western side of the Caspian littoral from 1994 to 2003.* Dis Esophagus 21(4):322-327.
- GROS S. J. ET AL.** (2010) *Orthotopic fluorescent peritoneal carcinomatosis model of esophageal cancer.* Anticancer Res 30(10):3933-3938.
- GROS S. J.** (2011) *Orthotopic models of esophageal carcinoma and their use in drug discovery.* Curr Protoc Pharmacol Chapter 14 Unit 14.20.
- GÜNGÖR C. ET AL.** (2010) *Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine ist häufig überexprimiert und fördert Zellproliferation im Pankreaskarzinom - Midkine is frequently overexpressed and promotes pancreatic cancer cell proliferation.* Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie 39(4):57-58.
- GÜNGÖR C. ET AL.** (2011) *Notch Signaling Activated by Replication Stress-Induced Expression of Midkine Drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer.* Cancer Res 71(14):5009-5019.
- HEROLD G.** (2010) *Innere Medizin 2010*, Herold-Verlag.
- HOLMES R. S. UND VAUGHAN T. L.** (2007) *Epidemiology and Pathogenesis of Esophageal Cancer.* Semin Radiat Oncol 17(1):2-9.
- HOSCH S. ET AL.** (2000) *Malignant Potential and Cytogenetic Characteristics of Occult Disseminated Tumor Cells in Esophageal Cancer.* Cancer Res 60(24):6836-6840.
- HUANG Y. ET AL.** (2008) *Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes.* Cell Cycle 7(11):1613-1622.

HUNG Y. J. ET AL. (2011) *Serum midkine as a prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma.* Am J Clin Pathol 136(4):594-603.

HUSMANN G. ET AL. (2010) *Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends.* Hrsg. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 7. Ausgabe.

IBUSUKI M. ET AL. (2009) *Midkine in plasma as a novel breast cancer marker.* Cancer Sci 100(9):1735-1739.

IKEMATSU S. ET AL. (2000) *Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas.* Br J Cancer 83(6):701-706.

IKEMATSU S. ET AL. (2008) *Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma.* Cancer Sci 99(10):2070-2074.

INAUEN R. UND RUHSTALLER T. (2009) *Magen- und gastroösophageales Übergangskarzinom. Diagnostik und Therapieoptionen des frühen bis metastasierten Tumorstadiums.* Schweizer Zeitschrift für Onkologie 7(1):8-13.

IWASAKI W. ET AL. (1997) *Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor.* EMBO J 16(23):6936-6946.

JONO H. ET AL. (2010) *Midkine: A Novel Prognostic Biomarker for Cancer.* Cancers 2(2):624-641.

JØRGENSEN P. E. ET AL. (1998) *Pig EGF precursor contains segments that are highly conserved among species.* Scand J Clin Lab Invest 58(4):287-298.

KADOMATSU K. ET AL. (1988) *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(3):1312-1318.

KADOMATSU K. ET AL. (1990) *A Retinoic Acid Responsive Gene MK Found in the Teratocarcinoma System Is Expressed in Spatially and Temporally Controlled Manner during Mouse Embryogenesis.* J Cell Biol 110(3):607-616.

KADOMATSU K. ET AL. (2013) *The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors.* J Biochem 153(6):511-521.

KAIFI J. T. ET AL. (2007) *Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal tumors.* J Cancer Res Clin Oncol 133(7):431-435.

KATO M. ET AL. (2000) *Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma.* Arch Pathol Laboratory Med 124(6):848-852.

KE L. (2002) *Mortality and incidence trends from esophagus cancer in selected geographic areas of China circa 1970-90.* Int J Cancer 102(3):271-274.

KOIDE N. ET AL. (1999) *Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas.* Hepatogastroenterology 46(30):3189-3196.

KOJIMA S. ET AL. (1995) *Midkine is a heat and acid stable polypeptide capable of enhancing plasminogen activator activity and neurite outgrowth extension.* Biochem Biophys Res Commun 216(2):574-581.

KONTUREK S. J. ET AL. (1988) *Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats.* Gastroenterology 94(6):1300-1307.

KRZYSZEK-KORPACKA M. ET AL. (2007) *Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma.* Biomarkers 12(4):403-413.

KUBO A. UND CORLEY D. A. (2006) *Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15(5):872-878.

KUO A. ET AL. (2007) *Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase.* Oncogene 26(6):859-869.

LAGERGREN J. ET AL. (1999) *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma.* N Engl J Med 340(11):825-831.

MAEDA N. ET AL. (1994) *Multiple receptor-like protein tyrosine phosphatases in the form of chondroitin sulfate proteoglycan.* FEBS Lett 354(1):67-70.

MAEDA S. ET AL. (2007) *Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma.* Br J Cancer 97(3):405-411.

MARIETTE C. ET AL. (2005) *Esophageal carcinoma: prognostic differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.* World J Surg 29(1):39-45.

MATSUBARA S. ET AL. (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(16):9441-9443.

MINSKY B. D. (1999) *Carcinoma of the esophagus. Part 2: Adjuvant therapy.* Oncology (Williston Park) 13(10):1415-1427.

MISHIMA K. ET AL. (1997) *Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas.* Neurosci Lett 233(1):29-32.

MIYAUCHI M. ET AL. (1999) *Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy.* Jpn J Cancer Res 90(4):469-475.

MURAMATSU H. UND MURAMATSU T. (1991) *Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors.* Biochem Biophys Res Commun 177(2):652-658.

MURAMATSU H. ET AL. (2004) *$\alpha_4\beta_1$ - and $\alpha_6\beta_1$ -integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor.* J Cell Sci 117(22):5405-5415.

MURAMATSU T. (2002) *Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis.* J Biochem 132(3):359-371.

NAKAGAWARA A. ET AL. (1995) *Differential Expression of Pleiotrophin and Midkine in Advanced Neuroblastomas.* Cancer Res 55(8):1792-1797.

NAKANISHI T. ET AL. (1997) *Expression of midkine and pleiotropin in ovarian tumors.* Obstet Gynecol 90(2): 285-290.

NAKAMOTO M. ET AL. (1992) *A new family of heparin binding growth/differentiation factors: differential expression of the midkine (MK) and HB-GAM genes during mouse development.* J Biochem 112(3):346-349.

O'BRIEN T. ET AL. (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(11):2515-2518.

OHHASHI S. ET AL. (2008) *Midkine mRNA Is Overexpressed in Pancreatic Cancer*. Dig Dis Sci 54(4):811-815.

OLSEN P. S. ET AL. (1984) *Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection*. Gastroenterology 87(1):103-8.

OTA K. ET AL. (2010) *Midkine expression is correlated with an adverse prognosis and is down-regulated by p53 in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol 37(4):797-804.

OTA K. ET AL. (2011) *Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma*. Br J Cancer 99(4):655-662.

PENNICA D. ET AL. (1984) *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. Nature 312(5996):724-729.

QI M. ET AL. (2000) *Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine*. J Biochem 127(2):269-277.

QI M. ET AL. (2001) *Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta, Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem 276(19):15868-15875.

QIN LI L. ET AL. (2011) *Expression of midkine and endoglin in breast carcinomas with different immunohistochemical profiles*. APMIS 119(2):103-110.

RATOVITSKI E. A. ET AL. (1998) *Midkine Induces Tumor Cell Proliferation and Binds to a High Affinity Signaling Receptor Associated with JAK Tyrosine Kinases*. J Biol Chem 273(6):3654-3660.

RAWNAQ T. ET AL. (2011) *Serum midkine correlates with tumor progression and imatinib response in gastrointestinal stromal tumors*. Ann Surg Oncol 18(2):559-565.

ROCKETT J. C. ET AL. (1997) *Five newly established oesophageal carcinoma cell lines: phenotypic and immunological characterization*. Br J Cancer 75(2):258-263.

ROHLEDER N. (2013) *Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha)*. Encyclopedia of Behavioural Medicine pp2009-2011, Department of Psychology, Brandeis University, Waltham, MA, USA.

SAVAGE C. R. ET AL. (1972) *The primary structure of epidermal growth factor.* Biol Chem 247(23): 7612-7621.

SHIBATA Y. ET AL. (2002) *Nuclear targeting by the growth factor midkine.* Mol Cell Biol 22(19):6788-6796.

SHIMADA H ET AL. (2003) *Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for oesophageal squamous cell carcinoma.* Cancer Sci 94(7):628-632.

SHIMOMURA O. ET AL. (1962) *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.* J Cell Comp Physiol 59:223-239.

SHIMOMURA O. (1979) *Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein.* FEBS Lett 104(2):220-222.

SHIRAI T. ET AL. (1985) *Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor.* Nature 313(6005): 803-806.

SIEWERT J. R. ET AL. (2005) *Biologic and clinical variations of adenocarcinoma at the esophago-gastric junction: relevance of a topographic-anatomic subclassification.* J Surg Oncol 90(3):139-146.

SIEWERT J. R. (2006) *Chirurgie, 8. Auflage, Springer-Verlag.*

SIEWERT J. R. UND OTT K. (2007) *Are squamous and adenocarcinomas of the esophagus the same disease?* Semin Radiat Oncol 17:38-44.

SIEWERT J. R. (2007) *Ösophaguskarzinom.* Der Chirurg 78(5):475-486.

SIMON-CHAZOTTES D. ET AL. (1992) *Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: Midkine (MK) and basigin (Bsg).* Mamm Genome 2(4):269-271.

STAHL M. ET AL. (2009) *Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction.* J Clin Oncol 27(6):851-856.

STOICA G. E. ET AL. (2002) *Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types.* J Biol Chem 277(39):35990-35998.

SUMIDA A. ET AL. (2010) *Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodeling and ameliorates cardiac dysfunction.* Cardiovasc Res 86(1):113-121.

SUZUKI N. ET AL. (2004) *Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine.* J Biol Chem 279(17):17785-17791.

TAKEI Y. ET AL. (2006) *Combinational Antitumor Effect of siRNA Against Midkine and Paclitaxel on Growth of Human Prostate Cancer Xenografts.* Cancer 107(4):864-873.

THURNHER D. ET AL. (2011) *HNO-Heilkunde – Ein symptomorientiertes Lehrbuch.* 1. Auflage, Springer-Verlag KG, Kapitel I, Part 2: S. 312.

TOMOMURA M. ET AL. (1990) *A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted Protein with heparin binding activity.* Biochem Biophys Res Commun 171(2):603-609.

TSUTSUI J. ET AL. (1993) *A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas.* Cancer Res 53(6):1281-1285.

UEHARA K. ET AL. (1991) *Genomic Structure of Human Midkine (MK), a Retinoic Acid-Responsive Growth/Differentiation Factor.* J Biochem 111(5):563-567.

WACHECK V. UND VORNLOCHER H.-P. (2003) *siRNA als Plattform für die Entwicklung innovativer Therapeutika in der Onkologie.* Der Onkologe 9(10):1121-1129.

WANG Q. ET AL. (2007) *siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization.* J Biomed Sci 14(6):783-795.

WITTEKIND C. UND OBERSCHMID B. (2010) *Pathologie und neue UICC-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms.* Der Onkologe 16(5):453-461.

XU Y. ET AL. (2009) *Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells.* Cancer Lett 279(2):137-144.

YAMAMOTO H. (2006) *Midkine as a molecular target: Comparison of effects of chondroitin sulfate E and siRNA.* Biochem Biophys Res Commun 351(4):915-919.

YATES R. A. ET AL. (1991) *Epidermal growth factor and related growth factors.* Int J Dermatol 30(10): 687-694.

YE C. ET AL. (1999) *Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer.* Br J Cancer 79(1):179-184.

YOU Z. ET AL. (2008) *Midkine is a NF- κ B-inducible gene that supports prostate cancer cell survival.* BMC Med Genomics 1(1):1-11.

YU L. ET AL. (2004) *Midkine promoter-driven suicide gene expression and -mediated adenovirus replication produced cytotoxic effects to immortalised and tumour cells.* Eur J Cancer 40(11):1787-1794.

YUKIO S. ET AL. (2002) *Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model.* J Cell Sci 115(13):2659-2667.

ZHANG X. D. ET AL. (2010) *The role of p53 in cell metabolism.* Acta Pharmacol Sin 31(9):1208-1212.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde nur durch das Zusammenwirken vieler Personen ermöglicht. Dazu gehört das gesamte Team des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Führung von Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki, durch den die Durchführung der Versuche nicht nur finanziell ermöglicht wurde. Ich danke allen Mitarbeitern: Cenap Güngör, Tamina Rawnaq, Hilke Zander, Tania Kalinina, Nina Kurschat, Antje Heinecke, Magdalena Trochimiuk, Petra Merkert, Ute Eicke-Kohlmorgen, Petra Schröder. Die hervorragende Betreuung und die Geduld sowie die stets vorhandene Bereitschaft zur Beratung und Demonstration diverser Techniken von Cenap Güngör hat mir sehr viel bedeutet und die Arbeit bereichert und vorangetrieben. Dafür bedanke ich mich ganz herzlich. Spezieller Dank gilt auch Tamina Rawnaq, die die Betreuung übernommen hat und so ermöglicht hat, dass diese Arbeit zu Ende geführt werden konnte.

Außerdem danke ich meiner Freundin und Kollegin Luisa Dietrich. Während der Durchführung der gemeinsamen Versuche haben wir uns gut ergänzt und eine schöne und interessante Zeit geteilt und auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit hat sie mich mit konstruktiver Kritik und Anregungen unterstützt.

Zum Schluss danke ich meiner Familie. Danke für die emotionale und finanzielle Unterstützung und beratende Tätigkeit während der gesamten Zeit. Ich danke meinem Ehemann Henning, meinen Eltern Angela und Michael. Danke auch an meine Geschwister Sarah, Felix und Lisa und an meine Großeltern.

EIDESSTÄTLICHE 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Lauenburg, den 19.03.2014