

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie und Hämatologie  
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Nachweis von löslichem Midkine bei soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Susanne Lucas  
aus Backnang

Gutachter:                   1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze  
                                      2. Prof. Dr. med. J. Cinatl  
                                      3. Prof. Dr. med. F. Czubayko

Datum der Promotion:       18.09.2009

## **Zusammenfassung**

Nephroblastom, Neuroblastom und Rhabdomyosarkom zählen nach den Tumoren des zentralen Nervensystems zu den häufigsten soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Für die Diagnostik und das Monitoring der Therapie liegen für diese Tumoren bisher keine oder nur wenige Tumormarker vor. Midkine (MK), ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor ist ein sezerniertes Protein, das im Serum nachgewiesen werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei Erwachsenen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen die MK-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Normalwert für MK bei Kindern und Jugendlichen festzulegen und zu klären, ob bei pädiatrischen Patienten mit den o.g. soliden Tumoren erhöhte MK-Werte im Serum vorliegen. MK wurde in Serumproben von 215 Kontrollpatienten sowie 29 Patienten mit soliden Tumoren (14 Nephroblastom, 10 Neuroblastom, 5 Rhabdomyosarkom) mittels eines ELISA-Testverfahrens bestimmt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten zusammen, bei denen ein elektiver chirurgischer Eingriff durchgeführt wurde oder die an einer endokrinologischen Erkrankung litten.

Die MK-Serumwerte in der Kontrollgruppe korrelierten weder mit dem Geschlecht, dem Alter, dem Gewicht noch der Körpergröße. Die Werte zeigten keine Normalverteilung, weshalb der Median als Vergleichswert mit der Studiengruppe herangezogen wurde. Bei fast der Hälfte der Patienten konnte kein MK im Serum nachgewiesen werden. Bei Patienten mit Kleinwuchs, Adipositas und Diabetes mellitus wurden jedoch teilweise sehr hohe MK-Werte ( $> 10$  ng/ml) gefunden. Die MK-Werte sind bei den pädiatrischen Kontrollpatienten breit gestreut und nicht normal verteilt. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die MK-Expression von bisher unerkannten Faktoren beeinflusst wird. Die erhöhten Werte bei den Kleinwuchspatienten zeigen eine mögliche Heraufregulierung von MK bei Wachstumsstörungen auf. Die MK-Konzentration war bei den Patienten mit soliden embryonalen Tumoren (Median 0,621 ng/ml,  $N = 29$ ) signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Median 0,077 ng/ml,  $N = 215$ ,  $p < 0,001$ ). Bei einem Schwellenwert von 0,176 ng/ml wurden 86 % der Tumorpatienten positiv getestet. Die MK-Werte korrelierten nicht mit der Tumormasse oder dem Stadium der Erkrankung, sanken jedoch bei der Hälfte der Patienten nach Chemotherapie und operativer Tumorentfernung ab. Die Bestimmung von MK im Serum kann als zusätzlicher Marker bei der Erkennung von soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter dienen, wobei seine Bedeutung in der Verlaufskontrolle noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Schlagwörter: Midkine, ELISA, Tumormarker, solide Tumoren, Normalwert

## **Abstract**

Nephroblastoma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma are the most common solid tumors outside the central nervous system in children and adolescents. Currently, there are only few and for some entities no serum markers that can be used in the diagnosis and monitoring of treatment of these solid tumors. Midkine (MK), a heparin-binding growth factor is a secreted protein and can be detected in patient sera. Serum levels were shown to be significantly elevated in adult cancer patients compared to healthy individuals.

In this study, we wanted to determine normal values in children and adolescents and to test whether serum levels are increased in pediatric tumor patients. MK was studied in sera of 215 non-cancer patients and 29 tumor patients (14 nephroblastoma, 11 neuroblastoma and 5 rhabdomyosarcoma) using an enzyme-linked immunosorbent assay. Non-cancer patients either underwent elective surgical procedures or suffered from endocrinological diseases.

MK serum levels in the non-cancer patient group did neither correlate with sex, age, weight or height nor follow a normal distribution. Therefore we used the median as reference value. On one hand nearly half of the patients in the non-cancer group had no detectable MK in their sera at all and on the other several very high MK values ( $> 10$  ng/ml) were found in patients with short stature, obesity and diabetes mellitus. MK serum values in children are widely spread and not normally distributed. Our findings imply that MK expression is influenced by factors not yet identified. High MK serum levels in patients with short stature indicate that MK may be up-regulated in growth disorders.

MK serum levels were significantly higher in tumor patients (median 0.621 ng/ml,  $N = 29$ ) than in non-cancer patients (median 0.077 ng/ml,  $N = 215$ ,  $p < 0.001$ ). 86 % of tumor patients were identified when using a cut-off value of 0.176 ng/ml. MK values did neither correlate with tumor size nor stage, but decreased in half of the patients after chemotherapy and surgery.

MK may serve as an additional marker for the detection of pediatric solid tumors, but its clinical relevance for the evaluation of response to therapy needs further study.

Keywords: Midkine, ELISA, tumor marker, solid tumor, normal value

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Genetische Grundlagen der Tumorentstehung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Solide Tumoren im Kindes- und Jugendalter</b>	<b>2</b>
1.2.1	Das Nephroblastom	2
1.2.2	Das Neuroblastom	3
1.2.3	Das Rhabdomyosarkom	4
<b>1.3</b>	<b>Midkine</b>	<b>6</b>
1.3.1	Protein- und Genstruktur	6
1.3.2	Rezeptoren und Signaltransduktion	7
1.3.3	Funktion und biologische Eigenschaften	8
1.3.4	Midkine-Expression in Tumoren	9
1.3.5	Midkine als Tumormarker	10
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>13</b>
3.1.1	Studiengruppe	13
3.1.2	Kontrollgruppe	16
<b>3.2</b>	<b>Studienablauf</b>	<b>17</b>
3.2.1	Normalwert für Midkine im Serum	17
3.2.2	Midkine-Serumwerte bei Tumorpatienten	17
3.2.2.1	Nephroblastom	18
3.2.2.2	Neuroblastom	18
3.2.2.3	Rhabdomyosarkom	19
3.2.3	Midkine-Expression in Tumorgewebe	19
<b>3.3</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
3.3.1	Geräte	20
3.3.2	Chemikalien	21
3.3.3	Kunststoffmaterialien	22
<b>3.4</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.4.1	Serumgewinnung aus Blutproben	23
3.4.2	Midkine ELISA	23
3.4.3	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	24
3.4.4	RNA-Isolierung	24
3.4.5	Reverse Transkriptase PCR	25
3.4.6	Real time PCR	26
3.4.7	Gel-Elektrophorese	27
<b>3.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>28</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis von Midkine im Serum</b>	<b>29</b>
4.1.1	Normalwert für Midkine im Serum	29
4.1.2	Erhöhte Midkine-Werte in der Kontrollgruppe	32
4.1.2.1	Kleinwuchs	35
4.1.2.2	Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten	36
4.1.2.3	Adipositas und Diabetes mellitus	36
4.1.3	Vergleich Studiengruppe vs. Kontrollgruppe	37
4.1.4	Festlegung eines Schwellenwertes für die MK-Konzentration im Serum	38
4.1.5	Unterschiede zwischen den Tumorentitäten	40
4.1.6	Korrelation mit der Tumorlast	40
4.1.7	Korrelation mit dem Tumorstadium	42
4.1.8	Einfluss der Tumor-Operation auf die Midkine-Werte	45
4.1.9	Midkine-Werte im zeitlichen Verlauf	45
4.1.9.1	Nephroblastom	46
4.1.9.2	Neuroblastom	49
4.1.9.3	Rhabdomyosarkom	51
<b>4.2</b>	<b>Gesamtproteinkonzentration im Serum</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Expression von Midkine im Gewebe</b>	<b>53</b>
4.3.1	Neuroblastom	55
4.3.2	Nephroblastom	55
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Normalwert für Midkine im Serum</b>	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Erhöhte Midkine-Werte in der Kontrollgruppe</b>	<b>58</b>
5.2.1	Kleinwuchs	59
5.2.2	Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten	59
5.2.3	Adipositas und Diabetes mellitus	59
5.2.4	Midkine, Wachstumshormon und Insulin-like Growth Factor	60
<b>5.3</b>	<b>Erhöhte Midkine-Werte in der Studiengruppe</b>	<b>61</b>
5.3.1	Nephroblastom	61
5.3.2	Neuroblastom	61
5.3.3	Rhabdomyosarkom	61
5.3.4	Schwellenwert	62
<b>5.4</b>	<b>Einflussfaktoren in der Studiengruppe</b>	<b>62</b>
5.4.1	Tumorvolumen	62
5.4.2	Tumorstadium	62
5.4.3	Tumorentfernung	63
<b>5.5</b>	<b>Midkine-Werte im zeitlichen Verlauf</b>	<b>63</b>
5.5.1	Nephroblastom	63
5.5.2	Neuroblastom	64
5.5.3	Rhabdomyosarkom	64
<b>5.6</b>	<b>Gesamtproteinkonzentration im Serum</b>	<b>64</b>

<b>5.7</b>	<b>Expression von Midkine im Gewebe</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>FAZIT UND AUSBLICK</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>74</b>
<b>8.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>8.2</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>75</b>
<b>8.3</b>	<b>Publikationen</b>	<b>76</b>
<b>8.4</b>	<b>Erklärung an Eides Statt</b>	<b>77</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur des humanen Midkine-Gens (RARE = Retinolsäure bindende Region, WT1 = Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1 bindende Region) (Muramatsu 2002).....	6
Abb. 2: Die dreidimensionale Domänen-Struktur von Midkine. Die beiden Heparin-Bindungsstellen in der C-Domäne sind umkreist. (Muramatsu 2002).....	7
Abb. 3: Der Rezeptorkomplex von Midkine und die intrazelluläre Signalkette. (Muramatsu 2002).....	8
Abb. 4: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Nephroblastom-Patienten .....	18
Abb. 5: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Neuroblastom-Patienten .....	18
Abb. 6: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Rhabdomyosarkom-Patienten.....	19
Abb. 7: Verteilung der MK-Werte im Bereich von 0 bis 4,5 ng/ml .....	29
Abb. 8: Unterschied der MK-Werte bei Mädchen und Jungen.....	31
Abb. 9: Korrelation von MK und Alter.....	32
Abb. 10: Vergleich der MK-Werte in den Subgruppen .....	33
Abb. 11: MK-Konzentration bei Kleinwuchs-Patienten .....	35
Abb. 12: MK-Konzentration bei Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte .....	36
Abb. 13: MK-Konzentration bei Patienten mit Adipositas und Diabetes mellitus .....	37
Abb. 14: Vergleich der MK-Werte in Tumor- und Kontrollgruppe ohne Ausreißer.....	38
Abb. 15: ROC-Kurve zur Bestimmung eines Schwellenwertes (N = 152).....	39
Abb. 16: MK-Expression der drei Tumorentitäten (WT = Nephroblastom, NBT = Neuroblastom, RMS = Rhabdomyosarkom).....	40
Abb. 17: Korrelation mit der Tumorlast.....	41
Abb. 18: MK-Werte in unterschiedlichen Stadien .....	42
Abb. 19: MK-Werte beim Nephroblastom.....	43
Abb. 20: MK-Werte beim Neuroblastom.....	44
Abb. 21: MK-Werte in unterschiedlichen Stadien des Rhabdomyosarkoms.....	44
Abb. 22: MK-Werte vor und nach Tumor-OP .....	45
Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 1 .....	46
Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 2a.....	47
Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 2b .....	48
Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 3 .....	49
Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe NBT 1.....	50
Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe NBT 2.....	51



Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei RMS-Patienten.....	52
Abb. 30: Korrelation zwischen MK-Wert und MK-Wert /Proteinkonzentration .....	53
Abb. 31: Standardkurve der PCR.....	54
Abb. 32: Auftrennung der Produkte aus der MK- und GAPD-PCR.....	55
Abb. 33: MK-Expression im Gewebe.....	56

## Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alphafetoprotein
AGS	Androgenitales Syndrom
ALK	Anaplastische Lymphatische Kinase
ASCT	Autologe Stammzell-Transplantation
BMI	Körpermassenindex
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CdK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Karziñoembryonales Antigen
CT	Computertomogramm
CWS	Kooperative Weichteilsarkom Studie
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Ereignisfreies Überleben
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Erk	Extrazelluläre Signalabhängige Kinase
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAPD	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HBGF	Heparin-bindender Wachstumsfaktor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HVA	Homovanillinmandelsäure
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGFBP	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Bindungsprotein
Imb	Imbalance
INSS	Internationales Neuroblastom Staging System
IRS	Intergroup Rhabdomyosarcoma Study
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase

LKG	Lippen-Kiefer-Gaumen
LOH	Verlust der Heterozygotie
LRP	LDL-Rezeptor verwandtes Protein
MDK	Humanes Midkine kodierendes Gen
MIBG	Meta-Jodbenzylguanidin
MK	Midkine
MPNST	Maligne periphere Nervenscheidentumoren
MRT	Magnetresonanztomographie
NBT	Neuroblastom
NF1	Neurofibromatose vom Typ 1
NSE	Neuron-Spezifische Enolase
P	Perzentile
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PTN	Pleiotrophin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	receiver operating characteristic
Rpm	Umdrehung pro Minute
SIOP	Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TPS	Tissue-Polypeptid-specific Antigen
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VMA	Vanillinmandelsäure
WAGR	Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitale Missbildungen, Retardierung
WT	Wilms-Tumor
WT1	Wilms-Tumorsuppressorprotein
ZNS	Zentralnervensystem

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientencharakteristik bei Nephroblastom-Patienten .....	14
Tab. 2: Patientencharakteristik der Neuroblastom-Patienten .....	15
Tab. 3: Patientencharakteristik der Rhabdomyosarkom-Patienten .....	15
Tab. 4: Patientencharakteristik der Kontrollgruppe .....	17
Tab. 5: Geräteverzeichnis .....	20
Tab. 6: Chemikalienverzeichnis .....	21
Tab. 7: Kunststoffmaterialienverzeichnis .....	22
Tab. 8: Primersequenzen .....	27
Tab. 9: Statistische Werte für MK in der Kontrollgruppe .....	30
Tab. 10: Erhöhte MK-Werte in der Kontrollgruppe .....	34
Tab. 11: Sensitivität und Spezifität bei unterschiedlichen Schwellenwerten und Vergleichsgruppen .....	39
Tab. 12: Korrelation zwischen Tumorgröße und MK-Wert (Pearsons r) .....	41
Tab. 13: Vergleich der Tumorstadien .....	43
Tab. 14: MK-Grenzwerte im Vergleich .....	57

# **1 EINLEITUNG**

Eine wichtige Aufgabe der Krebsforschung ist es, die Mechanismen der Tumorentstehung zu untersuchen, eine frühzeitige Diagnose der Erkrankungen zu ermöglichen und nach innovativen Therapieansätzen zu suchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Proteins Midkine (MK) in der Entstehung von soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter untersucht und die Möglichkeit der Verwendung von MK als Tumormarker überprüft.

## **1.1 Genetische Grundlagen der Tumorentstehung**

Jede Körperzelle befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Zelldifferenzierung, natürlicher Zellalterung und Zelltod. Die Fehlregulation eines dieser Prozesse kann zur malignen Entartung führen. Bei einer Krebszelle ist das Verhältnis von Proliferation und Absterben zu Gunsten einer Zunahme der Zellmasse gestört. Eine maligne Zelle ist in der Lage, sich aus dem Zellverband zu lösen, Gefäßwände zu passieren und an einem entfernten Ort Metastasen zu bilden. In der Regel erkennt und eliminiert das körpereigene Abwehrsystem solche entarteten Zellen. HANAHAN und WEINBERG haben sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie von Krebszellen identifiziert, die zu einem erfolgreichen Durchbrechen der Abwehrmechanismen des Körpers führen: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung des programmierten Zelltodes, grenzenloses Teilungsvermögen, anhaltende Gefäßneubildung und die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung (Hanahan et al. 2000).

Man geht heute davon aus, dass die Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Krebszelle eine Folge von multiplen genetischen Veränderungen ist (Kinzler et al. 1996). Häufig sind Defekte in Genen vorhanden, deren Produkte an der interzellulären Kommunikation, an der intrazellulären Signaltransduktion oder an der Genexpression im Zellkern beteiligt sind. Es gibt zwei unterschiedliche Mechanismen wie diese Gene in der Tumorphagenese wirken können. Zum einen kann durch Mutation eines Protoonkogens ein so genanntes Onkogen entstehen, welches die direkte Ausprägung von charakteristischen Tumoreigenschaften zur Folge hat (Fischinger et al. 1984; Look 1995). Zum anderen kann es zum Verlust eines Tumorsuppressorgens kommen, dessen Genprodukt normalerweise hemmend auf das Zellwachstum wirkt (Stanbridge 1976).

## **1.2 Solide Tumoren im Kindes- und Jugendalter**

### **1.2.1 Das Nephroblastom**

Das Nephroblastom ist der häufigste Nierentumor im Kindesalter und macht 5,9 % aller pädiatrischen Tumoren aus. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 1:100.000, wobei ca. 100 Neuerkrankungen pro Jahr auftreten. Die meisten Kinder erkranken zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr. Nur 2 % der Nephroblastome treten im Erwachsenenalter auf.

Beim Nephroblastom handelt es sich um eine hochmaligne embryonale Mischgeschwulst, bei deren Entstehung genetische Faktoren eine wesentliche Rolle spielen. Bei Kindern mit den folgenden Syndromen tritt der Wilms-Tumor gehäuft auf: WAGR-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitale Missbildungen, Retardierung), Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Denys-Drash-Syndrom, Perlman-Syndrom und Neurofibromatose vom Typ 1. Das Nephroblastom weist meist einen euploiden Chromosomensatz auf, und genetische Veränderungen sind als Ursache der Tumorentwicklung sehr wahrscheinlich. Bei 10-30 % der Wilms-Tumoren finden sich Deletionen im Bereich des Genlocus 11p13, wo das sog. Wilms-Tumor-Suppressor-Gen (WT1) identifiziert wurde (Call et al. 1990). Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der urogenitalen Entwicklung spielt und die Expression kritischer Gene für das Zellwachstum steuert. Ein Screening zum Nachweis eines Nephroblastoms ist bei fehlendem Tumormarker zurzeit nicht möglich.

Die Therapie des Nephroblastoms erfolgt im Rahmen von Therapie-Optimierungsstudien (SIOP 2001) und schließt Chemotherapie, Operation und ggf. Bestrahlung je nach Stadium, Histologie und Ansprechen auf die Therapie ein. In den bisherigen Studien der International Society of Pediatric Oncology (SIOP) und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) konnte gezeigt werden, dass eine präoperative Chemotherapie im Gegensatz zu einem primär operativen Vorgehen zu einer Reduktion der intraoperativen Tumorrupturen sowie zu einer Erhöhung der Zahl der Patienten mit einem postoperativen Stadium I führt (Godzinski et al. 1998; Godzinski et al. 1999).

90 % aller Kinder mit Nephroblastom können heute geheilt werden. Die Prognose der Erkrankung ist in erster Linie abhängig vom postoperativen Tumorstadium und Tumorzellen sowie dem histologischen Subtyp. Für Tumoren mit niedriger Malignität und den Stadien I-III liegt das ereignisfreie Überleben (EFS) bei zwei Jahren Beobachtungszeit bei 100 %. Für die große Gruppe der Patienten mit intermediär-maligner Histologie und postoperativem Stadium I waren es 97 % EFS. Bei Stadium II und III verschlechtert sich die

Prognose auf 88 % bzw. 78 % EFS. Bei Patienten mit hochmalignen Tumoren bzw. intermediär-malignen bei einem Tumolvolumen von über 500 ml ist die Prognose im Stadium I 76 %, im Stadium II 72 % und im Stadium III nur noch bei 56 % EFS. Patienten im Stadium IV haben ebenfalls eine ungünstige Prognose (SIOP 2001; Gutjahr 2004).

### **1.2.2 Das Neuroblastom**

Neuroblastome (NBT) sind die häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren des Kindesalters. Sie gehören zur Gruppe der embryonalen Tumoren und leiten sich von unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems ab. NBT machen 8,3 % aller Malignome im Kindes- und Jugendalter aus und haben in Deutschland eine Inzidenz von 1,3:100.000, wobei eine diskrete Knabenwendigkeit besteht (1,2:1). In Deutschland treten derzeit pro Jahr ungefähr 130-160 Neuerkrankungen auf. Die höchste altersspezifische Inzidenz wird bei Kindern unter einem Jahr beobachtet. Das mittlere Alter zum Diagnosezeitpunkt liegt bei zwei Jahren, und 90 % aller NBT werden in den ersten fünf Lebensjahren diagnostiziert (Kinderkrebsregister 2004).

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist weitgehend ungeklärt. In den vergangenen Jahren konnte eine Reihe von tumorspezifischen molekulargenetischen Veränderungen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um den Verlust bzw. Zugewinn von genetischer Information und Veränderungen in der Genexpression. Insbesondere die Amplifikation des Protoonkogens MYCN wird bei einer nicht unerheblichen Zahl von NBT gefunden. Sie korreliert mit einem raschen Fortschreiten der Erkrankung und einer schlechten Prognose (Brodeur et al. 1984; Seeger et al. 1985). Eine zweite häufige Anomalie ist die Deletion von Chromosom 1p (1p36.1-3), auf dem ein Neuroblastom-Suppressorgen vermutet wird. Die 1p-Deletion steht ebenfalls mit einem ungünstigen Verlauf in Verbindung (Caron et al. 1996). Günstige Verlaufsformen haben häufig einen hyperdiploiden Karyotyp, wohingegen NBT mit einem diploiden DNA-Index einen schlechteren Verlauf zeigen (Look et al. 1991). Die Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors Trk A für den Nervenwachstumsfaktor (NGF) wird besonders bei Tumoren mit guter Prognose beobachtet, während die Expression von Trk B hauptsächlich bei aggressiven NBT mit MYCN-Amplifikation zu finden ist (Eggert et al. 2000).

Die Diagnosekriterien für das Vorliegen eines Neuroblastoms sind eine eindeutige histologische lichtmikroskopische Diagnose aus Tumorgewebe oder der eindeutige Nachweis von Tumorzellen im Knochenmarkspirat bzw. in der Knochenstanze und erhöhte Spiegel von Katecholaminen bzw. deren Metaboliten in Urin oder Serum (Brodeur et al. 1993). Folgende Tumormarker im Serum haben neben dem Nachweis von Katecholaminen im Urin Eingang in

Diagnostik und Verlaufskontrolle gefunden: Neuronspezifische Enolase (NSE) (Zeltzer et al. 1983), Laktat-Dehydrogenase (LDH) (Shuster et al. 1992) und Ferritin (Hann et al. 1985). Sie werden jedoch nicht zur Risikostratifizierung heran gezogen.

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS). Im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie NB-2004 der GPOH wird anhand des Stadiums, des Alters und der molekulargenetischen Eigenschaften (MYCN-Amplifikation, 1p-Deletion) des Tumors eine Risikostratifizierung durchgeführt. Die Therapie wird risikoadaptiert durchgeführt, wobei drei unterschiedliche Therapiegruppen existieren: Beobachtungs-, Mittlere Risiko- und Hochrisikogruppe (GPOH 2004). In der Therapie lokalisierter Neuroblastome steht die Operation im Vordergrund, während bei disseminierten NBT eine Remission nur durch eine kombinierte zytostatische Behandlung erzielt werden kann. Die Radiotherapie findet bei Hochrisikopatienten und im Rahmen der Knochenmarktransplantation Anwendung.

Der Verlauf der Erkrankung wird sowohl von Stadium und Alter bestimmt, als auch von der Zuordnung zu einer Risikogruppe. Bei Säuglingen mit dem Stadium 4S besteht die Möglichkeit der spontanen Regression. Patienten der Beobachtungsgruppe haben in der NB-97-Studie ein 5-Jahres-EFS von 86 % und eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 97 %. Für die Mittlere Risikogruppe gelten je nach Stadium und Alter folgende Überlebensraten: Stadium 2 (>1 J.) 3-JÜR 98 % (EFS 87 %), Stadium 3 (<1 J.) 3-JÜR 93 % (EFS 76 %), Stadium 3 (>1 J.) 3-JÜR 92 % (EFS 66 %), Stadium 4 (<1 J.) 3-JÜR 92 % (EFS 79 %), Stadium 4 (>1 J.) 3-JÜR 69 % (EFS 40 %). Die Patienten der Hochrisikogruppe haben eine schlechte Prognose mit einem EFS von unter 45 %. Für die Gesamtheit der Neuroblastome bedeutet dies eine 5-Jahres-Überlebensrate von 75 % (GPOH 2004; Kinderkrebsregister 2004).

### **1.2.3 Das Rhabdomyosarkom**

Rhabdomyosarkome (RMS) gehören zur Gruppe der Weichteilsarkome. Sie stammen von undifferenzierten mesenchymalen Zellen ab und machen 3,7 % der malignen Tumoren im Kindesalter aus. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 0,5:100.000, was ungefähr 70 Neuerkrankungen pro Jahr entspricht. RMS kommen in nahezu allen Körperregionen vor, auch unabhängig vom Vorhandensein von Skelettmuskulatur. Es existieren zwei Untergruppen, die sich hinsichtlich Histologie, Genetik, Klinik und Prognose deutlich unterscheiden: alveoläres und embryonales RMS. Der Altersmedian liegt bei ca. 6 Jahren, variiert aber je nach Lokalisation. Embryonale RMS treten häufiger in den ersten 5 Lebensjahren auf, wohingegen



alveoläre RMS gleichmäßig über alle Altersklassen im Kindesalter verteilt sind. Jungen sind insbesondere bei embryonalen RMS (1,7:1) häufiger betroffen als Mädchen (Gesamt 1,3:1). Die drei Hauptlokalisationen des RMS sind der Kopf-Hals-Bereich, der Urogenitaltrakt und die Extremitäten. Embryonale RMS kommen bevorzugt im Kopf-Hals-Bereich, hier speziell in der Orbita und dem Urogenitaltrakt vor. Alveoläre RMS manifestieren sich eher an den Extremitäten (Gutjahr 2004).

Es besteht eine Assoziation zwischen der Entstehung eines RMS mit Neurofibromatosen und dem Li-Fraumeni-Syndrom, wobei die meisten RMS jedoch sporadisch entstehen. Für das alveoläre RMS wurden zwei reziproke Chromosomen-Translokationen identifiziert, die für die Fusionstranskripte PAX3/FKHR [t(2;13)(q35;q14)] und PAX7/FKHR [t(1;13)(p36;q14)] kodieren. Bei Patienten mit primärem Stadium IV ist PAX3/FKHR mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert, wohingegen PAX7/FKHR mit einer günstigeren Prognose einhergeht (Sorensen et al. 2002). Embryonale RMS weisen einen Verlust der Heterozygotie (LOH) auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 auf (11p15.5), als Folge der entstehenden paternalen Disomie kann es zu einer Überexpression des Wachstumsfaktors IGF-2 kommen (Scrabble et al. 1989; El-Badry et al. 1990). Die Stadieneinteilung für das RMS erfolgt durch das auf chirurgisch-pathologischen Kriterien basierende Intergroup-Rhabdomyosarcoma-Study-(IRS)-System. Die Risikostratifizierung berücksichtigt folgende Faktoren: Histologie, IRS-Stadium, Tumorlokalisation, Lymphknotenstatus, Tumorgöße und Patientenalter. Es werden vier Risikogruppen unterschieden: Niedrig-Risiko, Standard-Risiko, Hoch-Risiko und sehr hohes Risiko (CWS 2002).

Die Therapie des RMS erfolgt Risiko-adaptiert im Rahmen der CWS-2002P-Studie. Sie setzt sich aus Chemotherapie und ggf. Lokaltherapie zusammen. Die Lokaltherapie besteht aus Operation und/oder Radiotherapie. Über das weitere chirurgisch-radiotherapeutische Vorgehen, sowie über die Fortführung der Chemotherapie, wird nach Beurteilung des Ansprechens auf die neoadjuvante Therapie entschieden.

Die Prognose von Patienten mit alveolärem RMS ist generell ungünstiger als die von Patienten mit embryonalem RMS. Wichtig für den Verlauf ist die Risikogruppe. In der CWS-96-Studie zeigte die Niedrig-Risiko-Gruppe ein 3-Jahres-Gesamtüberleben von 97 % und ein ereignisfreies Überleben von 88 %. Bei den Standardrisikopatienten waren es noch 95 % 3-JÜR bzw. 77 % EFS. Die Prognose der Hochrisikopatienten ist wesentlich schlechter mit einer 3-JÜR von 78 % und einem EFS von 62 %. In dieser Gruppe konnten zwei Patientengruppen identifiziert werden, die eine unterschiedliche Prognose aufwiesen, weshalb die

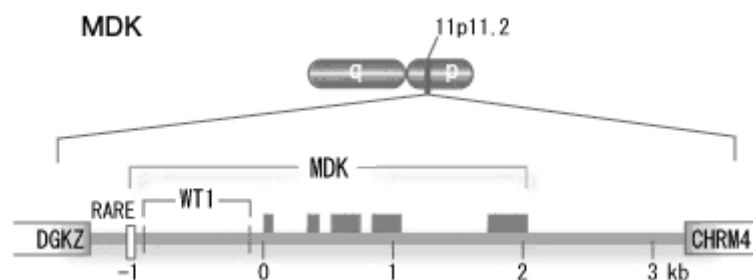
Hochrisikogruppe in der CWS-2002P-Studie neu definiert wurde. Der Verlauf bei Patienten mit primär metastasierter Krankheit oder nach einem Rezidiv ist weiterhin sehr ungünstig (CWS 2002).

### 1.3 Midkine

Midkine (MK) ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der erstmalig als das Produkt eines durch Retinolsäure induzierbaren Gens während der frühen Differenzierungsphase von embryonalen Teratokarzinomzellen beschrieben wurde (Kadomatsu et al. 1988). MK wird während der Embryogenese und bei Reparaturvorgängen vermehrt exprimiert und spielt eine substantielle Rolle bei der Karzinogenese sowie der damit assoziierten Angiogenese.

#### 1.3.1 Protein- und Genstruktur

Das humane Midkine-Gen (MDK) befindet sich auf Chromosom 11p11.2 und ist ungefähr 3,5 kb lang (O'Hara et al. 1995). In der Promotorregion gibt es eine Retinolsäure bindende Region sowie zwei Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1 (WT1) bindende Regionen (Matsubara et al. 1994; Adachi et al. 1996). Die kodierende Sequenz besteht aus vier Exons und befindet sich auf einem 1,5 kb großen DNA-Segment (Abb. 1). Vergleicht man die von der kodierenden Sequenz abgeleitete Proteinstruktur von humanem MK und Maus-MK, so ist sie zwischen den beiden Spezies hoch konserviert. 87 % der Aminosäuren sind homolog (Tsutsui et al. 1991; Uehara et al. 1992).



**Abb. 1: Struktur des humanen Midkine-Gens (RARE = Retinolsäure bindende Region, WT1 = Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1 bindende Region) (Muramatsu 2002)**

Midkine ist ein stark basisches, Cystin-reiches Protein mit einem Molekulargewicht von 13 kDa (Muramatsu 1993). Das MK-Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen, einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne (Abb. 2). Beide Domänen sind aus drei  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen aufgebaut und untereinander durch Disulfidbrücken verbunden. Die meisten biologischen Aktivitäten sind in der C-terminalen Domäne lokalisiert, die zusätzlich

noch eine Haarnadel-Schleife mit zwei Heparin-Bindungsstellen aufweist (Iwasaki et al. 1997). Die MK-Sequenz ist mit der des Wachstumsfaktors Pleiotrophin zu 50 % identisch. Aufgrund der starken Homologie bilden sie eine eigene Familie von sezernierten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die sich strukturell von den anderen Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren unterscheiden (Muramatsu 1993).

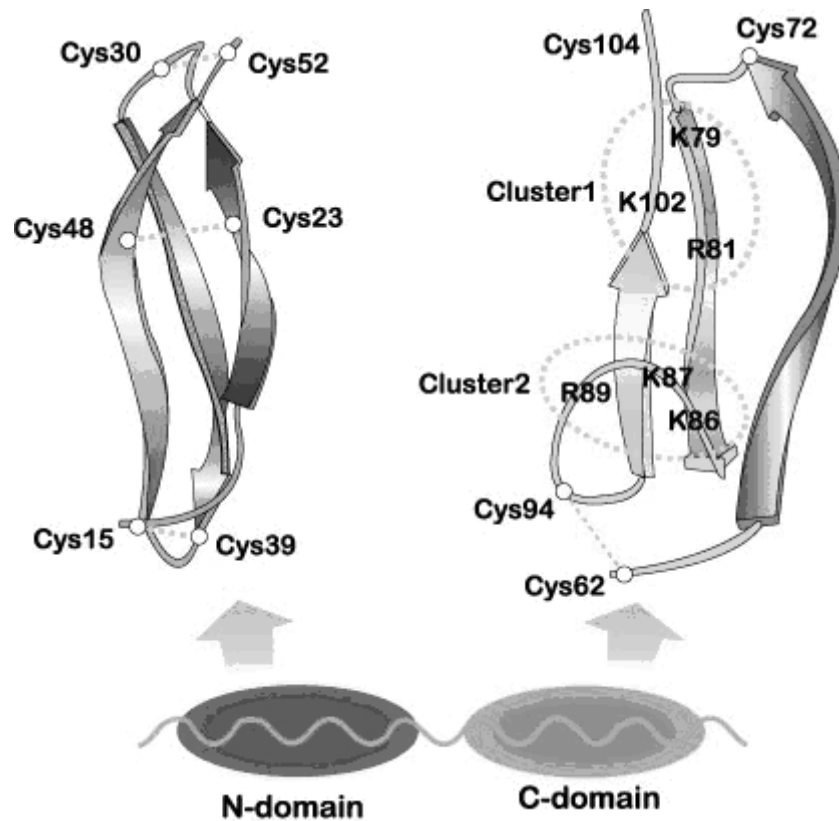


Abb. 2: Die dreidimensionale Domänen-Struktur von Midkine. Die beiden Heparin-Bindungsstellen in der C-Domäne sind umkreist. (Muramatsu 2002)

### 1.3.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

Bisher konnten vier verschiedene Rezeptoren von Midkine identifiziert werden (Abb. 3). Die Heparin-bindende Aktivität von MK führte zu der Annahme, dass Heparin-Sulfat-Proteoglykane am Rezeptorkomplex beteiligt sein könnten. Tatsächlich konnte eine Bindung von MK an N-Syndecan, das aus transmembranen Heparin-Sulfat-Proteoglykanen besteht, nachgewiesen werden (Nakanishi et al. 1997). Des Weiteren bindet MK an die Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\zeta$  (PTP  $\zeta$ ), wobei sich die Bindungsstelle hierfür in der C-terminalen Domäne befindet und der intrazelluläre Signalweg über eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Extrazellulären Signalabhängigen Kinase (Erk) läuft (Maeda et al. 1999). Ein weiterer Rezeptor für MK ist die Anaplastische Lymphatische Kinase (ALK), deren weiterer Signalpfad ebenfalls über PI3-Kinase und Erk erfolgt (Stoica et

al. 2002). Der vierte Rezeptor ist das mit dem LDL-Rezeptor verwandte Protein (LRP), durch den MK in die Zelle aufgenommen wird und anschließend in den Zellkern gelangen kann (Shibata et al. 2002). Inwieweit einzelne Rezeptoren an den spezifischen Wirkungen von MK beteiligt sind, ist zur Zeit noch unklar (Kadomatsu et al. 2004).

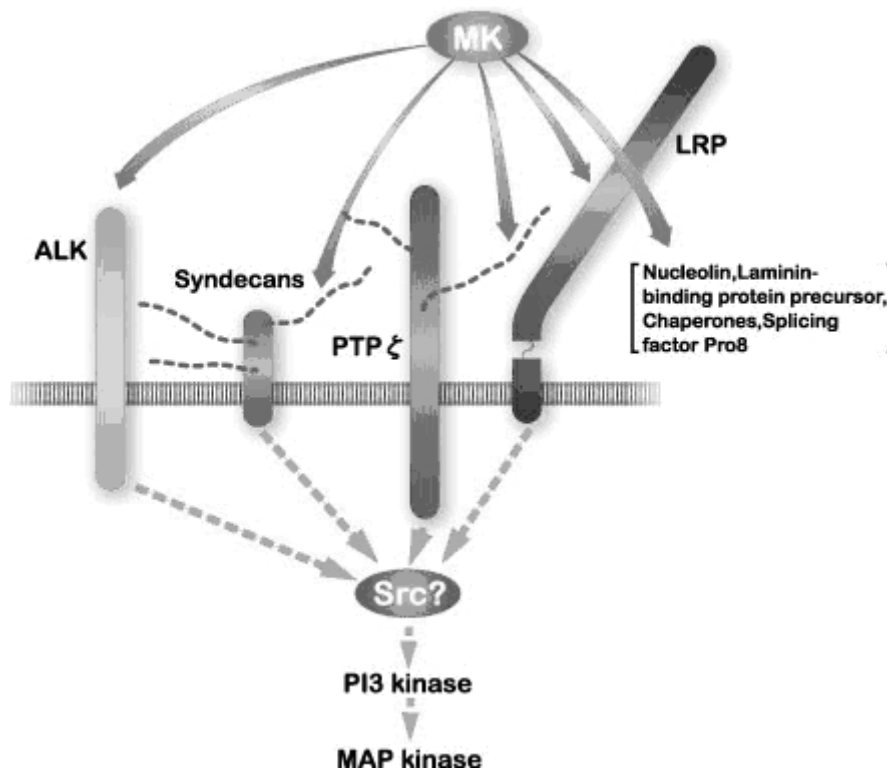


Abb. 3: Der Rezeptorkomplex von Midkine und die intrazelluläre Signalkette. (Muramatsu 2002)

### 1.3.3 Funktion und biologische Eigenschaften

Die biologischen Eigenschaften von Midkine sind vielfältig, wobei sich insbesondere eine Beteiligung an Entwicklung, Angiogenese und Inflammation gezeigt hat. Bei Mäusen wird MK in der mittleren Gestationsperiode der Embryogenese im Gehirn sowie in zahlreichen anderen Organen vermehrt exprimiert. Die MK-Expression nimmt in der weiteren Entwicklung stark ab und beschränkt sich bei erwachsenen Mäusen auf die Nieren (Kadomatsu et al. 1990). Dies war entscheidend für die Namensgebung dieses Wachstumsfaktors (Midkine = midgestation + kidney). Beim Menschen wurden postnatal eine relativ hohe MK-Expression in der Dünndarmschleimhaut, sowie eine mittlere Expression in der Schilddrüse nachgewiesen. In Gewebeproben von Niere, Magen, Dickdarm, Milz und Lunge von gesunden Probanden zeigte sich eine schwache MK-Expression (Tsutsui et al. 1993).

MK spielt als neurotropher Faktor eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems. Bei Mäusen fördert MK die Ausbreitung von Neuriten und die Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen zu Neuronen. Darüber hinaus verlängert MK das Überleben von embryonalen Neuronen in Kultur (Michikawa et al. 1993; Michikawa et al. 1993; Muramatsu et al. 1993). Photorezeptor-Zellen des Auges von Ratten können in vivo durch MK vor Licht-induziertem Schaden bewahrt werden (Unoki et al. 1994).

In der Wundheilung und bei Reparaturvorgängen ist MK ebenfalls von Bedeutung. Es stimuliert die Glykosaminoglykan- und Kollagen-Synthese in menschlichen Hautfibroblasten (Yamada et al. 1997) und erhöht die Plasminogen-Aktivator-Expression in Rinder-Endothelzellen der Aorta (Kojima et al. 1995). MK hat Einfluss auf die Chemotaxis von menschlichen neutrophilen Granulozyten und ist an der Neointima-Bildung nach Gefäßverschlüssen in einem Mausmodell beteiligt (Takada et al. 1997; Horiba et al. 2000). Die MK-Expression ist während der Frakturheilung und in der Heilungsphase von Magengeschwüren vorübergehend erhöht (Maekawa et al. 1999; Ohta et al. 1999).

#### **1.3.4 Midkine-Expression in Tumoren**

In Untersuchungen konnte die Bedeutung von Midkine für die Tumorigenese herausgestellt werden. So wurde gezeigt, dass MK auf bestimmte Zelltypen mitogen wirkt. Die Proliferation von undifferenzierten neuroektodermalen Tumorzellen und 10T1/2 Fibroblasten wurde durch MK gesteigert (Nurcombe et al. 1992). Des Weiteren führt MK zur Transformation von NIH3T3 Zellen (Kadomatsu et al. 1997), zeigt fibrinolytische Aktivität in Endothelzellen (Kojima et al. 1995) und fördert die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen (Takada et al. 1997; Horiba et al. 2000). Außerdem wirkt MK als angiogenetischer Faktor bei der Proliferation von Brustkrebs- und MPNST-Zellen und schützt die MPNST-Zellen zusätzlich vor Apoptose (Choudhuri et al. 1997; Friedrich et al. 2005).

Die MK-Expression ist bei einer Vielzahl von Tumoren erhöht. Dies wurde bereits in Gewebeproben von Karzinomen der Speiseröhre, des Magens, der Bauchspeicheldrüse, des Kolons, der Leber (Tsutsui et al. 1993; Aridome et al. 1995; Kato et al. 2000), der Brust (Garver et al. 1994) und der Lunge (Garver et al. 1993) nachgewiesen. In den ZNS-Tumoren Glioblastom, Medulloblastom, Astrozytom und in primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) wird MK vermehrt exprimiert (Kato et al. 1999). Bei embryonalen Tumoren wurde eine erhöhte MK-mRNA-Expression sowohl in Neuroblastom-Proben (N = 72) und -Zelllinien (N = 11), als auch in sechs Nephroblastom-Gewebeproben gemessen (Tsutsui et al.

1993; Nakagawara et al. 1995). Manche Tumorentitäten zeigen bereits in präkanzerösen Vorstufen eine MK-Überexpression. Die Hälfte der untersuchten kolorektalen Adenome mit mittelgradiger Dysplasie sowie 75 % der Prostataprobe mit intraepithelialer Neoplasie zeigten erhöhte MK-Werte (Konishi et al. 1999; Ye et al. 1999).

Von MK existiert eine alternative Spleißvariante, der ein Fragment von Exon 3 und somit der größte Teil der N-terminalen Domäne fehlt. Diese trunkierte Form von MK wurde bisher nur im Tumorgewebe nachgewiesen, jedoch nicht in normalem Gewebe (Kaname et al. 1996; Miyashiro et al. 1996; Miyashiro et al. 1997; Aridome et al. 1998).

### **1.3.5 Midkine als Tumormarker**

Tumormarker sind Substanzen, deren Auftreten oder erhöhte Konzentration in Körperflüssigkeiten einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein und/oder Verlauf von Tumorerkrankungen aufweist. Hierzu zählen lösliche Antigene wie das karzinoembryonale Antigen (CEA), das  $\alpha$ 1-Fetoprotein (AFP) oder das prostataspezifische Antigen (PSA), ektope Hormone wie ACTH, ADH, Parathormon oder Calcitonin, plazentare Proteine wie  $\beta$ -HCG und Enzyme wie die Neuronspezifische Enolase (NSE) oder die Laktat-Dehydrogenase (LDH). Folgende Eigenschaften definieren einen idealen Tumormarker: Er sollte von Tumorzellen produziert werden und in Körperflüssigkeiten bereits in frühen Krankheitsstadien nachweisbar sein, damit der Nachweis des Markers als Screening-Methode für den jeweiligen Tumor dienen kann. Der Tumormarker sollte idealer Weise tumorspezifisch sein, das heißt bei Gesunden oder benignen Erkrankungen nicht vorkommen. Dabei sollte die Marker-Konzentration mit dem Tumolvolumen korrelieren und das klinische Ansprechen auf die anti-tumorale Therapie reflektieren (Bates et al. 1987).

Es wurden viele Versuche unternommen, zuverlässige Marker für solide Tumoren im Kindesalter zu etablieren. Beim Neuroblastom haben folgende Tumormarker Eingang in die Diagnostik und Verlaufskontrolle gefunden: Die Bestimmung der Katecholamine im Urin (Laug et al. 1978) sowie der Nachweis der Neuronspezifischen Enolase (NSE) (Zeltzer et al. 1983), der Laktat-Dehydrogenase (LDH) (Shuster et al. 1992) und des Ferritins (Hann et al. 1985) im Blut. Für den Wilms-Tumor und das Rhabdomyosarkom stehen bisher keine vergleichbaren Marker zur Verfügung.

Im Folgenden werden einige der bisherigen Ansätze näher betrachtet. Bei Nephroblastom-Patienten konnten verschiedene Tumor-bezogene Proteine nachgewiesen werden. Es wurden erhöhte Erythropoietin-Spiegel ohne einen Anstieg der Erythrozytenzahl beschrieben, sowie

in Einzelfällen eine vermehrte Expression der Neuron-spezifischen Enolase. Außerdem wurden erhöhte Werte für Hyaluronsäure, Hyaluronsäure-stimulierende Aktivität und Hyaluronidase gefunden (Coppes 1993). DELAHUNT et al. präsentierte zwei Fälle eines rhabdomyomatösen Wilms-Tumors, bei denen das Serum-Kreatininkinase-Level den klinischen Verlauf widerspiegelte (Delahunt et al. 2001). Die Expression des mit Polysialinsäure modifizierten neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (PSA-NCAM) ist bei Patienten mit alveolärem Rhabdomyosarkom (N = 1), anaplastischem Wilms-Tumor (N = 3) und undifferenziertem Neuroblastom (N = 3) erhöht (Gluer et al. 1998). Des Weiteren wurde eine erhöhte Serumkonzentration von tissue-polypeptide-specific Antigen (TPS) bei Neuroblastom- (N = 23) und Wilms-Tumorpatienten (N = 9) nachgewiesen (Rebhandl et al. 1998). Bisher konnte jedoch keines der entdeckten Proteine die oben genannten Kriterien für einen Tumormarker erfüllen.

Bei dem Wachstumsfaktor MK handelt es sich um sezerniertes Protein, das mittels eines ELISA-Testverfahrens im Serum nachgewiesen werden kann (Muramatsu et al. 1996). In einer Studie von IKEMATSU et al. wurden bei 87 % der untersuchten Karzinom-Patienten (N = 150) erhöhte MK-Serumspiegel gefunden. Die Werte gingen bei vier von fünf Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom nach der Entfernung des Tumors signifikant zurück (Ikematsu et al. 2000). SHIMADA et al. untersuchte 93 Patienten mit einem primären Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus. Die Serumwerte der Tumorpatienten waren signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpatienten. Außerdem waren hohe Werte über 0,3 ng/ml mit einer schlechten Prognose assoziiert (Shimada et al. 2003). Bei Neuroblastom-Patienten korrelieren die erhöhten MK-Werte mit ungünstigen Prognosefaktoren wie MYCN-Amplifikation, niedriger TrkA-Expression, Diploidie/Tetraploidie und einem Alter von über einem Jahr (Ikematsu et al. 2003).

## 2 Aufgabenstellung

Wie in Kapitel 1 gezeigt, liegen für die Diagnostik und das Monitoring der Therapie bei den soliden Tumoren Neuroblastom, Nephroblastom und Rhabdomyosarkom im Kindesalter keine oder nur wenige Tumormarker vor. Der Wachstumsfaktor Midkine (MK) zeigte bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen im Erwachsenenalter eine Konzentrationserhöhung im Serum. Es wurde daher geprüft, ob bei pädiatrischen Patienten mit soliden embryonalen Tumoren lösliches MK ebenfalls signifikant erhöht im Serum nachgewiesen werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Konzentration von MK während der anti-tumoralen Behandlung ändert und ob dies im Verhältnis zum Ansprechen der Erkrankung auf die Therapie steht. Ziel des Vorhabens war es, einen zusätzlichen diagnostischen Marker für solide Tumorerkrankungen im Kindesalter zu etablieren.

Bevor eine Aussage über die MK-Werte bei Tumorpatienten gemacht werden konnte, musste zunächst ein zuverlässiger Vergleichswert bei Kindern ohne Tumorerkrankung bestimmt werden. Normalwerte für MK im Serum wurden mit einer entsprechend großen Fallzahl bisher nur für Erwachsene ermittelt. Für das Kindes- und Jugendalter wurden in bisherigen Untersuchungen entweder die erwachsenen Werte übernommen oder mit einer kleinen Vergleichsgruppe gearbeitet.

Im Rahmen der Dissertation wurden folgende Fragen untersucht:

1. Wie hoch ist die MK-Konzentration im Serum von Kindern und Jugendlichen ohne Tumorerkrankung?
2. Korreliert die MK-Konzentration mit den Faktoren Geschlecht, Alter, Gewicht oder Größe der Kinder und Jugendlichen?
3. Ist die Serumkonzentration von MK bei Kindern mit soliden embryonalen Tumorerkrankungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöht?
4. Korrelieren diese Werte mit der Tumorlast oder dem Tumorstadium?
5. Erlaubt die Bestimmung von MK eine Verlaufskontrolle zur Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie?
6. Hat die operative Tumorentfernung einen Einfluss auf die MK-Konzentration?
7. Ist die Serumkonzentration von MK für eine Verwendung als Tumormarker geeignet?



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Die Studienteilnehmerinnen und –teilnehmer wurden aus dem Patientengut der Kinderklinik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum rekrutiert. Folgende Kliniken waren an der Studie beteiligt: Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie, mit Schwerpunkt Endokrinologie und Kinderchirurgie. Es wurden 14 Nephroblastom-, 10 Neuroblastom- und 5 Rhabdomyosarkom-Patienten sowie 215 Kontrollpatienten in die Studie eingeschlossen. Der entsprechende Ethikantrag wurde von der Ethikkommission vor Beginn der Studie positiv beschieden.

#### **3.1.1 Studiengruppe**

##### **Einschlusskriterien**

- Ersterkrankung oder Rezidiv eines Neuroblastoms, Nephroblastoms oder Rhabdomyosarkoms
- Patienten im Alter zwischen 0 und 20 Jahren
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern

##### **Patientencharakteristik**

Das postoperative Stadium war bei neun Nephroblastom-Patienten Stadium 1, bei je zwei Patienten Stadium 2 bzw. Stadium 3 und bei einem Patienten Stadium 4. Bei Patient Nr. 7 handelte es sich um ein Lokalrezidiv eines bilateralen Nephroblastoms. Die Größe des Tumors wurde in drei Ebenen zum Zeitpunkt der Diagnose (prä) und nach der präoperativen Chemotherapie vor der Tumoroperation (post) gemessen (Tab. 1). Als bildgebende Verfahren kamen Sonografie, Magnetresonanztomografie oder Computertomografie zum Einsatz. Das Tumolvolumen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen (ml)} = \text{Länge (cm)} \times \text{Tiefe (cm)} \times \text{Breite (cm)} \times 0,5$$

**Tab. 1: Patientencharakteristik bei Nephroblastom-Patienten**

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter in J.	Post-op Stadium	Metastasen/ Rezidiv	Risiko-Einteilung	Histologie	Vol. prä (ml)	Vol. post (ml)	OP
1	w	1	1	nein/nein	Standard	epithelial	230	170	R0
2	m	1	1	nein/nein	Standard	regressiv	270	60	R0
3	w	4	1	nein/nein	Standard	regressiv	144	25	R0
4	m	5	1	nein/nein	Standard	anaplastisch	630	400	R0
5	w	5	2	nein/nein	Standard	regressiv	630	50	R0
6	w	5	1	nein/nein	Standard	regressiv	790	175	R0
7	m	4	3	nein/ja	Standard	zystisch	44	3,5	R2
8	w	8	2	ja/nein	Standard	regressiv	712	500	R0
9	m	3	3	ja/nein	Hoch	regressiv	410	90	R0
10	m	0.5	1	nein/nein	Standard	zystisch	224	144	R0
11	w	0.6	1	nein/nein	Standard	epithelial	186	75	R0
12	m	2	1	nein/nein	Standard	epithelial	36	11	R0
13	w	0.7	4	ja/nein	Hoch	rhabdoid	224	183	R2
14	m	3	1	nein/nein	Standard	gemischt	95	10	R0

Die eine Hälfte der Neuroblastom-Patienten hatte initial ein Stadium 3, die andere ein Stadium 4. Es gab keine Patienten mit einem Stadium 1 oder 2. Die MYCN-Amplifikation war bei zwei von zehn Patienten positiv. Bei Patient Nr. 15 wurde eine 1p36 Imbalance und bei Patient Nr. 17 eine 1p36 Deletion nachgewiesen. Das Tumolvolumen wurde ebenfalls vor Therapiebeginn und wiederum vor der Tumor-Resektion bestimmt. Es wird also ausschließlich das Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie beurteilt (Tab. 2).

**Tab. 2: Patientencharakteristik der Neuroblastom-Patienten**

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter in J.	Stadium	Lokalisation	Metastasen/Rezidiv	Risiko-Einteilung	Mycn/1p36	Vol. prä (ml)	Vol. post (ml)	OP
15	w	3	4	abdominal, KM	ja/nein	Hoch	pos/Imb	533	53	R2
16	m	4	4	Orbita, KM, Lunge	ja/ja	Hoch	pos/neg	n.d	n.d	nein
17	m	4	4	vertebral, KM	ja/nein	Hoch	neg/Del	80	17	nein
18	m	6	3	Leberpforte, LK	ja/ja	Hoch	neg/neg	12	2	R1
19	m	1	3	retro-peritoneal, suprarenal	nein/nein	Beobachtung	neg/neg	144	190	n.d.
20	w	2	4	abdominal, LK, KM, Knochen	ja/nein	Hoch	neg/n.d.	46	n.d	R2
21	w	0.9	4	NN, KM, Knochen	ja/nein	Standard	neg/neg	7,7	1,3	R0
22	w	0.1	3	sakral, intraspinal	nein/nein	Beobachtung	neg/neg	45+14	61+32	nein
23	w	0.3	3	spinal, abdominal	nein/nein	Beobachtung	neg/neg	8,5	5	nein
24	w	1	3	abdominal, vertebral	nein/nein	Beobachtung	neg/neg	10	4	n.d.

Zwei Rhabdomyosarkom-Patienten waren im Stadium 2, einer im Stadium 3 und zwei im Stadium 4 der Erkrankung. Es gab keinen Patienten mit Stadium 1. Zwei der fünf Patienten zeigten in der Histologie ein alveoläres RMS (Tab. 3).

**Tab. 3: Patientencharakteristik der Rhabdomyosarkom-Patienten**

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter in J.	Stadium	Lokalisation	Metastasen/Rezidiv	Risiko-Einteilung	Histologie	Vol. prä (ml)	Vol. post (ml)	OP
25	m	15	4	Hand, KM, Knochen	ja/nein	Hoch	alv.	10	12	R2
26	m	10	2	Wange	nein/nein	Standard	emb.	n.d	n.d	R1
27	w	15	4	Unterarm, Knochen, Lunge, LK	ja/nein	Hoch	alv.	48	3	R2
28	m	8	2	Leberhilus, LK	nein/nein	Hoch	emb.	25+15	22+11	R0
29	m	0.7	3	Prostata, Urethra	nein/nein	Hoch	emb.	88	n.d	R2

### **3.1.2 Kontrollgruppe**

Es wurde Blut von 215 Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 20 Jahren auf Midkine (MK) untersucht, welches im Rahmen von Routineuntersuchungen in der Kinderklinik abgenommen wurde. Wie bereits in Kapitel 1.3.3 dargestellt, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass MK im Rahmen von Reparaturvorgängen vermehrt exprimiert wird. Deshalb wurden nur Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die keine akuten Infektzeichen oder Frakturen aufwiesen. Mit den endokrinologischen und chirurgischen Patienten wurde eine Kontrollgruppe zusammengestellt, für die folgende Voraussetzungen zutrafen:

#### **Einschlusskriterien**

- Patienten ohne Tumorerkrankung
- Patienten im Alter zwischen 0 und 20 Jahren
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern

#### **Ausschlusskriterien**

- Akute Infektionskrankheiten
- Frische Frakturen
- Wundheilungsstörungen
- Schwere Hauterkrankungen

#### **Patientencharakteristik**

Das Patientengut in der Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen zusammen. Tabelle 4 zeigt um welche Erkrankungsgruppen es sich hierbei handelte. Bei den Patienten der chirurgischen Station (Operationen, LKG-Spalte) wurde das Blut während der Narkoseeinleitung präoperativ aus einem venösen Zugang abgenommen. Bei den Patienten mit endokrinologischen Erkrankungen wurde das Blut bei Kontrolluntersuchungen im Rahmen der Grunderkrankung abgenommen.

Bei den Operationen handelte es sich um elektive Eingriffe wie Nabel- und Leistenhernien, Strabismus-OP, Ohr-Anlegen, Zirkumzision, Orchidopexie, Tonsillektomie, Trichterbrust-Korrektur, Hämangiom-Laserung oder den Verschluss des harten Gaumens bei Lippen-Kiefer-Gaumen (LKG)-Spalten. Die Patienten mit Adipositas (BMI > 30) zeigten häufig eine Adipositas per magna (BMI > 40), und der Diabetes Mellitus war meist ein Typ II. Außerdem ist bei einigen Patienten ein metabolisches Syndrom diagnostiziert worden. Unter dem Begriff Kleinwuchs wurden Kinder mit Wachstumshormonmangel oder Konstitutioneller Entwick-

lungsverzögerung zusammengefasst. Bei den Schilddrüsenerkrankungen handelte es sich überwiegend um konnatale Hypothyreose und Autoimmunthyreoiditis sowie vereinzelt einen Morbus Basedow. Für die Auswertung wurden die Patienten mit Ullrich-Turner-Syndrom, Hirsutismus, Rachitis und Androgenitalem Syndrom (AGS) mit den sonstigen Erkrankungen zu einer Gruppe zusammengefasst.

**Tab. 4: Patientencharakteristik der Kontrollgruppe**

Diagnosen	N	Geschlecht		Alter (Jahre)				
		Männlich	Weiblich	< 1	1 – 4	5 – 9	10 -14	> 14
Operationen	74	43	31	6	30	23	12	3
LKG-Spalte	13	7	6	7	5	1	0	0
Adipositas	21	8	14	0	0	7	6	8
Diabetes	8	1	6	0	0	1	5	2
Kleinwuchs	21	14	7	0	0	3	7	11
Schilddrüsenerkrankung	50	18	32	1	10	8	12	19
Pubertas praecox	9	0	9	1	0	4	4	0
Ullrich-Turner-Syndrom	3	0	3	0	0	1	2	0
Hirsutismus	5	0	5	0	0	0	3	2
Rachitis	3	0	3	0	0	0	1	2
AGS	2	2	0	0	0	0	2	0
Sonstige Erkrankungen	6	5	1	0	0	0	2	4
Gesamt	215	98	117	15	45	48	56	51

## 3.2 Studienablauf

### 3.2.1 Normalwert für Midkine im Serum

Zum einen wurde Serum von Kindern ohne Tumorerkrankung (Kontrollgruppe) untersucht. Die Probandenseren wurden durch Blutproben erlangt, die im Rahmen der jeweiligen Diagnostik der Grunderkrankung abgenommen wurden.

### 3.2.2 Midkine-Serumwerte bei Tumorpatienten

Zum anderen wurden im Rahmen der klinikinternen Diagnostik Blutproben von Kindern mit Tumorerkrankungen (Studiengruppe) entnommen.

### 3.2.2.1 Nephroblastom

Die Midkine-Serumkonzentration wurde bei Diagnosestellung vor Beginn der Chemotherapie bestimmt. Dieser Wert wurde mit der Kontrollgruppe verglichen. Für die Verlaufsbestimmung der MK-Konzentration wurden weitere Serumproben untersucht: während der präoperativen Chemotherapie jeweils zu Blockbeginn, vor der Operation und postoperativ nach zirka zwei, vier, acht und zwölf Wochen jeweils wieder zu Beginn eines Chemotherapie-Blocks (Abb. 4).

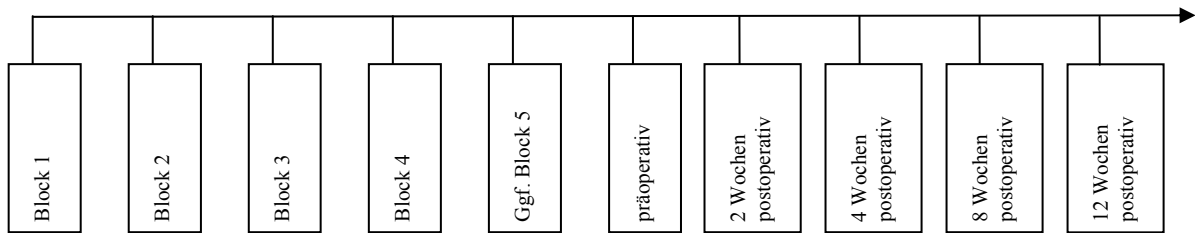


Abb. 4: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Nephroblastom-Patienten

### 3.2.2.2 Neuroblastom

Die MK-Serumwerte wurden bei Diagnosestellung vor Beginn der Chemotherapie gemessen. Folgemessungen erfolgten jeweils zu Beginn der Blöcke N5 und N6 bzw. N4, vor einer operativen Entfernung des Tumors und zirka vier, acht und zwölf Wochen postoperativ wiederum zu Blockbeginn (Abb. 5).

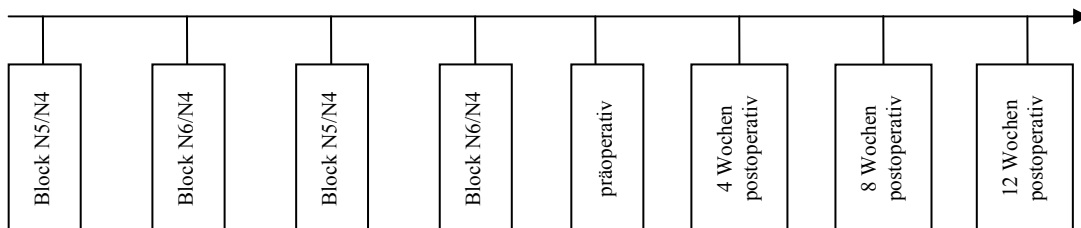
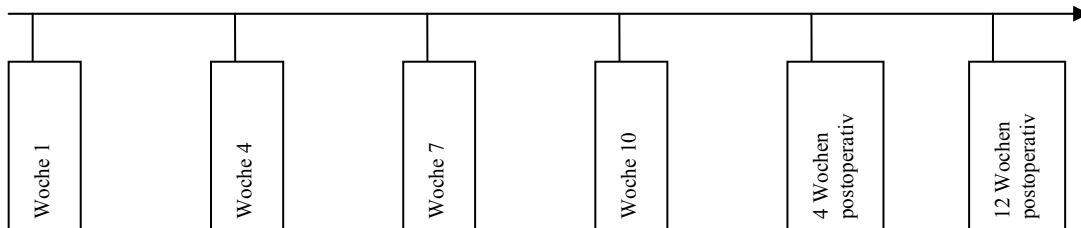


Abb. 5: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Neuroblastom-Patienten

### 3.2.2.3 Rhabdomyosarkom

Die MK-Konzentration im Serum wurde bei Diagnosestellung vor Beginn der Chemotherapie bestimmt. Weitere Messungen erfolgten präoperativ jeweils zu Beginn von Block VA, I2VA bzw. I2VAd in den Wochen 1, 4 und 7, vor der Lokalthherapie in Woche 10 sowie vier und zwölf Wochen postoperativ, je zu Beginn eines Chemotherapie-Blocks (Abb. 6).



**Abb. 6: Zeitpunkte der Blutentnahmen bei Rhabdomyosarkom-Patienten**

### 3.2.3 Midkine-Expression in Tumorgewebe

Stand von den Kindern der Studiengruppe Tumormaterial zur Verfügung, das zur Diagnostik oder Therapie entnommen worden war, so ist von diesen Gewebeproben RNA extrahiert und mittels PCR die MK-Expression untersucht worden.

### 3.3 Material

#### 3.3.1 Geräte

Tab. 5: Geräteverzeichnis

Gerätetyp	Produkt	Hersteller
Elektrophoresekammer	Agagel Midi-Wide	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Multiskan Ascent	Thermo labsystems, Egelsbach
Mikrowelle	Microwave 800	Severin, Sundern
PCR-Werkbank	Captair bio	Erlab D.F.S., Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Thermocycler	Mastercycler epgradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler	Lightcycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vortexer	Reax top	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge	Rotanta/R	Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf GmbH, Hamburg



### 3.3.2 Chemikalien

Tab. 6: Chemikalienverzeichnis

Methoden	Produkt	Hersteller
MK-ELISA	MK-Antikörper beschichtete Platten	Bioclone, Australia
	MK-Antikörper-Reagenz	Bioclone, Australia
	Amplifikations-Reagenz: Streptavidin-Peroxidase	Bioclone, Australia
	Waschpuffer-Konzentrat	Bioclone, Australia
	Substrat-Lösung TMB H: Tetramethylbenzidin + Wasserstoffperoxidase	Bioclone, Australia
	Stopreagenz: 2M HCl	Bioclone, Australia
	Probenverdünnungslösung: Humanes Serum	Bioclone, Australia
	Kalibratoren: In 1 %igem humanem Serum	Bioclone, Australia
Bradford-Test	Biorad Protein Assay, Dye reagent concentrate	Biorad Laboratories, München
	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RNA-Isolierung	Trizol	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	Chloroform	Fluka Chemica AG, Neu-Ulm
	Isopropanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
	Ethanol 70 %ig	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
	Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RT-PCR	Reverse Transkriptase (Superscript II, 200U/l)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	5x Reaktionspuffer	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	1x Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	Dithiothrietol = DTT (0,1M)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	dNTP (20mM)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe

Real time PCR	Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	10 x Reaktionspuffer (50mM)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	dNTPs (2 mM)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	SYBR Green (1: 5000)	Applied Biosystems, Darmstadt
	Oligonukleotid-Primer	TIB-MOLBIOL, Berlin
	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Molecular Biology Grade Water	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophorese	DNA-Längenstandard (100 bp ladder)	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
	1x Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Agarose	Biozym Diagnostics GmbH, Hessisch Oldendorf
	Ethidiumbromid	Serva, Feinbiochemika GmbH, Heidelberg
	Probenauftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % Saccharose)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
	Fotopapier	Polaroid Co., Cambridge, Mass, USA

### 3.3.3 Kunststoffmaterialien

**Tab. 7: Kunststoffmaterialienverzeichnis**

0,5/1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
10/25 ml Sterile Einmal-Pipetten	Falcon-Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich
12 ml Zellkulturröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
3,5 ml Transfer-Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Konisches Röhrchen	Falcon-Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Microtest 96 Zellkulturplatte	Falcon-Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht

## **3.4 Methoden**

### **3.4.1 Serumgewinnung aus Blutproben**

#### **Prinzip**

Auftrennung des Vollblutes in Zellbestandteile und Serum durch Zentrifugation.

#### **Durchführung**

Das Vollblut wurde innerhalb von zwei Stunden nach der Blutentnahme abgesert. Hierzu wurden die Röhrchen zehn Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die obere Serumschicht wurde mit einer Transferpipette in ein 12 ml Zellkulturröhrchen überführt und durchmischt. Anschließend wurde das Serum auf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und umgehend bei - 20°C oder niedriger eingefroren.

### **3.4.2 Midkine ELISA**

#### **Prinzip**

Der Midkine ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung des MK-Proteins im Serum. Das zu bestimmende Antigen in der Probe (MK) bindet an einen spezifischen Antikörper, der an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebunden ist. Anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper gleicher Spezifität hinzu gegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet. Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe von Substrat gestartet und das entstehende Reaktionsprodukt photometrisch gemessen. Die Nachweisgrenzen der Methode liegen zwischen 0 und 3,5 ng/ml. Bei jeder Messung wird eine Standardkurve erstellt, und es erfolgt eine Doppelbestimmung der einzelnen Proben.

#### **Durchführung**

Die Serumproben wurden langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden je 20 µl der Probe (Standard, Patientenprobe) in zwei Probenlöcher als Doppelbestimmung pipettiert. Danach wurden je 100 µl des blauen Antikörper-Reagenz in die Probenlöcher gegeben. Die Platten wurden abgedeckt und vier Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten viermal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und der Überstand anschließend dekantiert. Es wurde je 100 µl violette Amplifikations-Reagenz in die Probenlöcher pipettiert. Die Platten wurden abgedeckt und zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Waschschrift wiederholt. Es wurden je 100 µl Substrat-Lösung in alle Probenlöcher pipettiert. Die Inkubationszeit begann mit der Zugabe der Substrat-Lösung zum

ersten Probenloch. Die Platten wurden abgedeckt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl Stopreagenz in die Probenlöcher pipettiert, in der gleichen Reihenfolge wie die Substrat-Lösung zugegeben wurde. Danach wurden die Platten in einem Multiplattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **3.4.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford**

#### **Prinzip**

Der Bradford-Test dient der Gesamtproteinbestimmung in den Serumproben. Bei der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Bindung des Farbstoffes an das Protein erfolgt innerhalb von zwei Minuten.

#### **Durchführung**

Die Färbelösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt. Die konzentrierte Färbelösung wurde mit autoklaviertem Wasser in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt. Die Serumproben wurden auf Eis aufgetaut, durchmischt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum mit Wasser 1:20 verdünnt. Bei jeder Messung wurde eine Rinderserumalbumin(BSA)-Standardreihe mit fünf Verdünnungen mitbestimmt. Je 250 µl der verdünnten Färbelösung wurde in die benötigten Probenlöcher einer 96-Lochplatte gegeben. Dann wurde jeweils 1 µl der verdünnten Serumprobe in die Löcher hinzugeben und mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Messung wurden die Platten auf einem Schüttler für zehn Sekunden gemischt. Die Platten wurden in einem Multiplattenlaser bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

### **3.4.4 RNA-Isolierung**

#### **Prinzip**

Die Zellen wurden lysiert, die RNAsen inaktiviert, und die Gesamt-RNA wurde isoliert. Ein Anteil von 2 % mRNA ist für die Durchführung einer RT-PCR ausreichend.

#### **Durchführung**

Zunächst erfolgte ein Homogenisierungsschritt. Das Gewebe wurde mit 1 ml Trizol-Reagenz pro 50 - 100 mg versetzt, wobei das Probenvolumen nicht mehr als 10 % des Volumens des Trizol-Reagenzes überschreiten darf. Nach einer fünfminütigen Inkubation der Proben bei

15 – 30 °C schloss sich eine Separationsphase an. Es wurden jeweils 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol-Reagenz den Proben hinzugefügt. Die Proben wurden dann ca. 15 Sekunden sanft geschwenkt und bei 15 - 30 °C für zwei bis drei Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie bei nicht mehr als 12000 x g 15 Minuten bei 2 – 8 °C zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation teilt sich die Flüssigkeit in eine rote Phenol-Chloroform-Phase (unten), eine Interphase und eine farblose wässrige Phase (oben). Die RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Phase. Für die RNA-Präzipitation wurde die wässrige Phase in ein frisches Gefäß pipettiert und die organische Phase verworfen. Zur Präzipitation wurde die Probe mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei 15 – 30 °C wurde die Probe bei nicht mehr als 12000 x g zehn Minuten bei 2 – 8 °C zentrifugiert. Es bildete sich ein gel-artiges Pellet aus RNA am seitlichen Boden des Gefäßes. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte ein Waschschrift. Das RNA-Zentrifugat wurde einmal mit 75 %-igen Ethanol gewaschen. Pro 1 ml Trizol-Reagenz wurde die Probe mit 1 ml Ethanol versetzt. Die Probe wurde dann durchmischt und bei nicht mehr als 7500 x g fünf Minuten bei 2 – 8 °C zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Lösung der RNA. Zunächst musste das RNA-Zentrifugat an der Luft ca. fünf bis zehn Minuten getrocknet werden. Die RNA wurde in RNase freiem DEPC-Wasser gelöst und zehn Minuten bei 55 – 60 °C inkubiert. Die RNA-Konzentration wurde in einem Photometer gemessen.

### **3.4.5 Reverse Transkriptase PCR**

#### **Prinzip**

Die RNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase in die stabilere, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die RNA dient hierbei als Matrize. In einem zweiten Schritt wird eine PCR durchgeführt, bei der die zuvor gebildete cDNA amplifiziert wird.

#### **Durchführung**

1 µg RNA wurde zu einem Volumen von 10 µl mit RNase freiem Wasser versetzt und für zehn Minuten bei 70 °C denaturiert. Zu dem 10 µl-Ansatz wurden 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl 1x Hexamere, 2 µl DTT (0,1M), 1 µl dNTP (20mM) und 1 µl Superscript II gegeben. Der 20 µl-Ansatz wurde zehn Minuten bei 25 °C, anschließend 45 Minuten bei 42 °C und zuletzt drei Minuten bei 99 °C inkubiert. Im Anschluss an die Umschreibung kann die cDNA direkt für eine Amplifikation mittels PCR eingesetzt werden oder zur späteren Nutzung bei - 80 °C aufbewahrt werden.

### **3.4.6 Real time PCR**

#### **Prinzip**

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer Gensequenzen, wobei der Reaktionsablauf der natürlichen Replikation ähnelt. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Die DNA wird bei etwa 90 – 94 °C in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Danach erfolgt bei ca. 50 °C der Annealing-Schritt mit der Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize. Als Primer werden synthetische Oligonukleotide verwendet, die gegenläufig orientiert sind, sodass gezielt der DNA-Abschnitt zwischen dem Primerpaar vervielfältigt wird. Im Extensions-Schritt wird die Zielsequenz ausgehend von den Primern durch eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) bei 72 °C neu synthetisiert. Für die Extension benötigt die Polymerase die vier Desoxyribonukleotide und den Cofaktor Magnesium. Die drei Schritte werden in einem Thermozykler vielfach wiederholt und es entstehen  $2^n$  Kopien der Zielsequenz.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA und sendet in gebundener Form Fluoreszenzsignale aus, die vom Gerät gemessen werden können. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Zyklus gemessen, wobei die steigende Intensität der Signale der Zunahme des PCR-Produktes während der Reaktion entspricht. Die LightCycler-Software führt automatisch eine Quantifizierung durch, indem sie aus der Fluoreszenzzunahme die Menge des PCR-Produktes berechnet.

Da es sich bei der Messung im LightCycler um eine relative Quantifizierung handelt, wird bei jedem Lauf eine Verdünnungsreihe mit gemessen, aus der eine Standardkurve erstellt wird. Hierfür wurde cDNA von der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-AS in vier Schritten logarithmisch verdünnt.

#### **Normalisierung durch Referenzgene**

Um Unterschiede in Qualität und Quantität zwischen der cDNA der einzelnen Proben auszugleichen, wurde neben dem Zielgen Midkine ein Referenzgen amplifiziert. Die Expression des Referenzgenes sollte in allen Gewebeproben möglichst ähnlich sein. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPD) zeigt eine stabile Expression in unterschiedlichen Geweben, insbesondere auch in Neuroblastomzellen (Vandesompele et al. 2002). Für die Normalisierung wurde die MK-Expression durch die GAPD-Expression geteilt. Die Primer-Sequenz für das Referenzgen GAPD wurde von VANDESOMPELE et al. übernommen (Tab. 8).

## Durchführung

Der 25 µl-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten: 0,25 µl Platinum Taq-Polymerase, 2,5 µl 10 x Puffer (50 mM), 2,5 µl dNTPs (2 mM), 1,25 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl SYBR Green (1:5000), 0,75 µl Primer-forward, 0,75 µl Primer-reverse, 0,3 µl BSA, 11,7 µl Aqua dest, 4 µl cDNA. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR am LightCycler waren wie folgt: Vor dem ersten Zyklus wurde eine längere Denaturierung von 300 Sekunden bei 94°C durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Matrizenmoleküle einzelsträngig vorlagen. Anschließend wurden 45 Zyklen mit einem je acht Sekunden langen Denaturierungsschritt bei 94°C und einem 16 Sekunden langen gemeinsamen Annealing- und Extensionsschritt bei 60°C durchgeführt.

**Tab. 8: Primersequenzen**

Primer	Sequenz
MK-Forward	5' ggT gCC CTg CAA CTg gAA 3'
MK-Reverse	5' CAC gCA CCC CAg TTC TCA A 3'
GAPD-Forward	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
GAPD-Reverse	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

## 3.4.7 Gel-Elektrophorese

### Prinzip

Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Agarose-Gelsysteme verwendet. Die DNA-Moleküle werden im elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Anschließend werden die Banden durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter der UV-Lampe sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente müssen DNA-Längenstandards mit aufgetrennt werden.

### Durchführung

Gel gießen: 3 g Agarose wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml 1x TAE-Puffer suspendiert. Die Agarose-Suspension wurde in einem Mikrowellengerät vorsichtig mehrfach aufgeköcht und zwischendurch wiederholt geschwenkt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur auf 50 - 60°C abgekühlt und dann wurden 5 µl Ethidiumbromid dazu gegeben. Die Taschenschablonen wurden in die Gelkammer eingesetzt und die Agarose-Lösung wurde luftblasenfrei bis zu einer Schichtdicke von ca. 5 Millimeter in die Kammer gegossen. Die

Agarose erstarrte in 30 - 40 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Taschen-schablonen entfernt. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet.

Gel beladen: Die DNA-Probe wurde mit Auftragspuffer versetzt und in die Probentasche eingebracht. Der DNA-Größenstandard wurde ebenfalls mit Auftragspuffer versetzt und auf das Gel auftragen. Das Gel lief bei 120 V und wurde anschließend unter der UV-Lampe fotografiert.

### **3.5 Statistik**

Die Datenauswertung wurde mit dem Programm SPSS für Windows (Version 11.5) durchgeführt.

Folgende statistischen Testverfahren kamen zur Anwendung:

- Zur Signifikanzbestimmung zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe wurde der nicht-parametrische Rangsummentest nach Mann-Whitney für unverbundene Stichproben durchgeführt.
- Die Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten wurden mit dem Kruskal-Wallis-H-Test für unverbundene Stichproben analysiert.
- Die Korrelationen wurden nach Pearson berechnet.
- Der Schwellenwert wurde mittels einer ROC (receiver operating characteristic)-Kurve bestimmt.

Den Signifikanzanalysen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 % zugrunde gelegt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von Midkine im Serum

Für die Bestimmung der Midkine-Expression auf Proteinebene wurde Serum mit Hilfe eines MK-spezifischen ELISA Tests untersucht. Wir haben die MK-Konzentration bei 215 Kindern ohne Tumorerkrankung und bei 29 Patienten mit einem soliden embryonalen Tumor gemessen.

#### 4.1.1 Normalwert für Midkine im Serum

Die Messung der MK-Serumkonzentrationen der Kontrollgruppe diente der Festlegung eines Normalwertes in der pädiatrischen Population. In Abbildung 7 ist die Verteilung der MK-Werte im Bereich von 0 bis 4,5 ng/ml dargestellt.

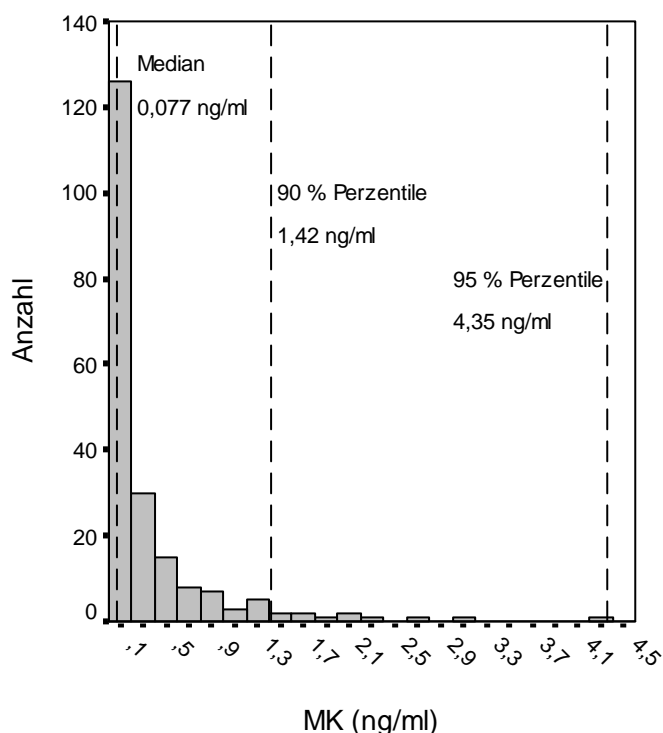


Abb. 7: Verteilung der MK-Werte im Bereich von 0 bis 4,5 ng/ml

Die Verteilung der Werte ist für die Abgrenzung des normalen Spektrums von entscheidender Bedeutung. Viele Parameter folgen einer Normalverteilung, bei der man den Mittelwert plus/minus der zweifachen Standardabweichung als Normbereich angibt. Im Gegensatz hierzu zeigten die MK-Werte eine L-förmige Verteilungskurve, da bei 106 der 215 untersuchten Proben (49,3 %) MK nicht nachweisbar war. Umgekehrt gab es einige Patienten mit sehr hohen Werten, weshalb der Mittelwert als nicht aussagekräftig anzusehen ist. Es wurde stattdessen der Median mit der 25 %- und der 75 %-Perzentile als Normbereich angegeben:

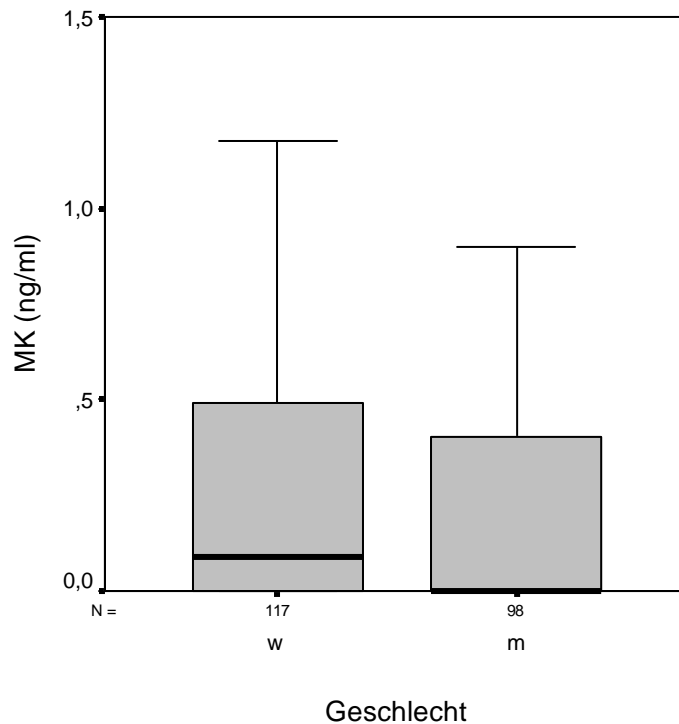
0,077 ng/ml (0 – 0,44 ng/ml). 90 % der MK-Werte lagen in dem Bereich von 0 bis 1,42 ng/ml und die 95 %-Perzentile war bei 4,35 ng/ml (Tab. 9).

**Tab. 9: Statistische Werte für MK in der Kontrollgruppe**

<b>Statistischer Wert</b>	<b>MK-Konzentration der gesamten Kontrollgruppe (ng/ml)</b>	<b>MK-Konzentration der Kontrollgruppe ohne Ausreißer (ng/ml)</b>
N	215	152
Mittelwert	1,86	0,26
Median	0,077	0,00
25 %-Perzentile	0,00	0,00
75 %-Perzentile	0,44	0,31
90 %-Perzentile	1,42	0,66
95 %-Perzentile	4,35	1,15
Minimum	0,00	0,00
Maximum	101,5	5,58

Wurden die Subgruppen, in denen gehäuft erhöhte MK-Werte auftraten, von der Kontrollgruppe ausgeschlossen (N = 152), galten für Median und Mittelwert die folgenden Werte: 0 ng/ml bzw. 0,26 ng/ml. Die Streubreite lag zwischen 0 und 5,58 ng/ml. Bei 89 von 152 Patienten (58,6 %) lag der MK-Wert bei 0 ng/ml (Kap. 4.2.1).

Neben der Darstellung der Verteilung ist es wichtig, mögliche Einflussfaktoren auf die MK-Konzentration im Serum zu identifizieren. Für die folgenden Faktoren wurden die Zusammenhänge mit MK untersucht: Geschlecht, Alter, Gewicht und Größe der Kinder und Jugendlichen. Mögliche Unterschiede in der MK-Expression zwischen den Geschlechtern wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes bestimmt (Abb.8). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,55$ ) zwischen den Werten der Mädchen (N = 117) und denen der Jungen (N = 98).

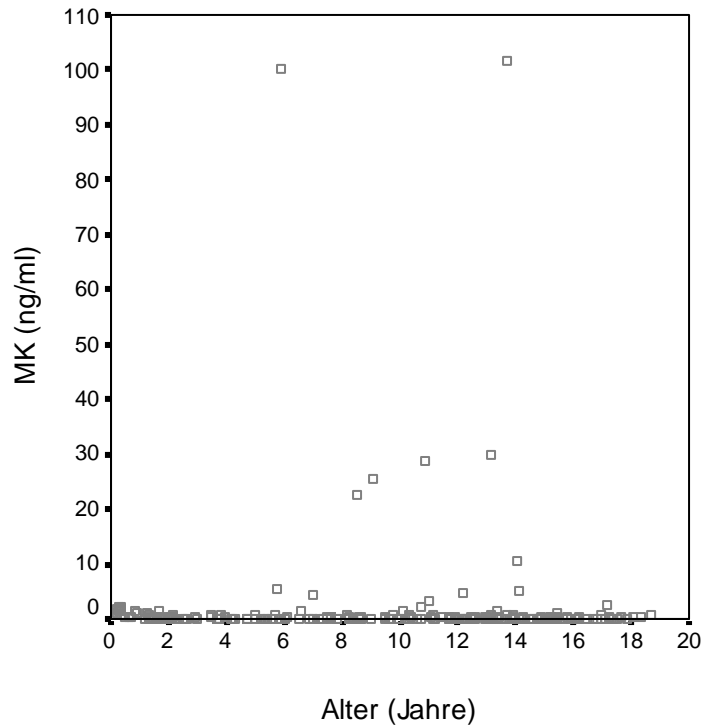


**Abb. 8: Unterschied der MK-Werte bei Mädchen und Jungen**

Die statistische Analyse für Alter, Gewicht und Größe erfolgte durch die Berechnung des Maßkorrelationskoeffizienten nach Pearson.

Sollte das Alter die MK-Expression beeinflussen, müssten Kinder und Jugendliche in entsprechende Altersgruppen eingeteilt werden, und für jede Gruppe müsste ein zugehöriger Normwert angegeben werden. Die zweiseitige Signifikanz der Pearson-Korrelation ( $r = 0,015$ ) lag jedoch bei 0,83. Das Alter der Kinder und Jugendlichen hat also keinen signifikanten Einfluss auf die MK-Konzentration, weshalb auf die Einteilung in Altersgruppen verzichtet werden kann. In Abbildung 9 ist außerdem zu erkennen, dass Ausreißer ausschließlich in der Altersgruppe von ca. 6 bis 14 Jahren vorkommen.

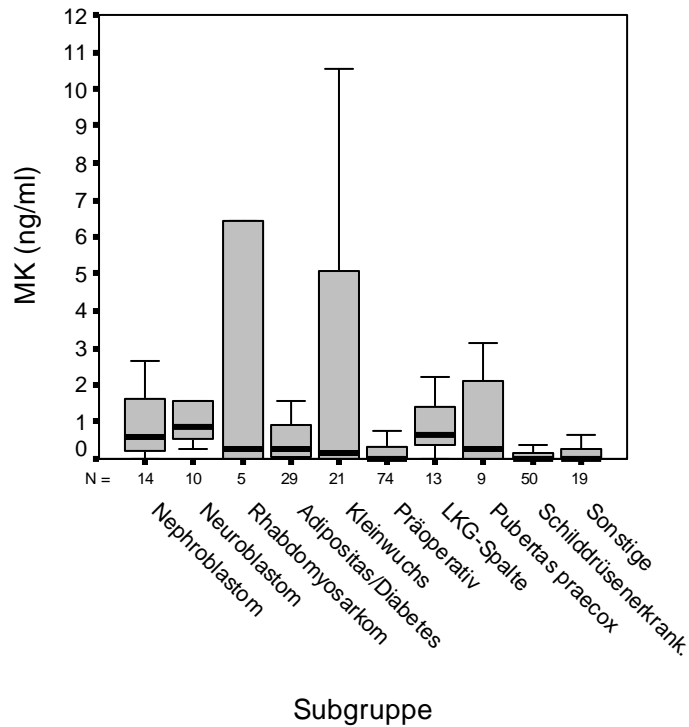
Für die meisten Patienten lagen Daten zu Gewicht ( $N = 210$ ) und Größe ( $N = 181$ ) zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor. Die Berechnung der zweiseitigen Signifikanz für die Korrelation nach Pearson erbrachte mit Werten von 0,16 ( $r = -0,098$ ) für Gewicht und 0,27 ( $r = -0,082$ ) für Größe kein signifikantes Ergebnis. Die MK-Werte korrelierten also weder mit dem Gewicht noch mit der Größe. Auf eine Darstellung im Streudiagramm wurde verzichtet.



**Abb. 9: Korrelation von MK und Alter**

#### **4.1.2 Erhöhte Midkine-Werte in der Kontrollgruppe**

Wie in Kapitel 3.1.2.1 dargestellt, setzt sich die Kontrollgruppe aus einem heterogenen Patientengut zusammen. Die unterschiedlichen Erkrankungen der Probanden lassen sich in die folgenden sieben Untergruppen einteilen: Adipositas und Diabetes Mellitus, Kleinwuchs, Chirurgische Patienten vor kleinen operativen Eingriffen bzw. vor Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten-Korrektur, Pubertas praecox, Schilddrüsenerkrankungen und sonstige endokrinologische Erkrankungen. Es sollte untersucht werden, ob die Erkrankung der Kontrollpatienten einen Einfluss auf die MK-Expression haben. Der folgende Boxplot zeigt die sieben Kontroll-Untergruppen und die drei Tumorgruppen im Vergleich (Abb. 10).



**Abb. 10: Vergleich der MK-Werte in den Subgruppen**

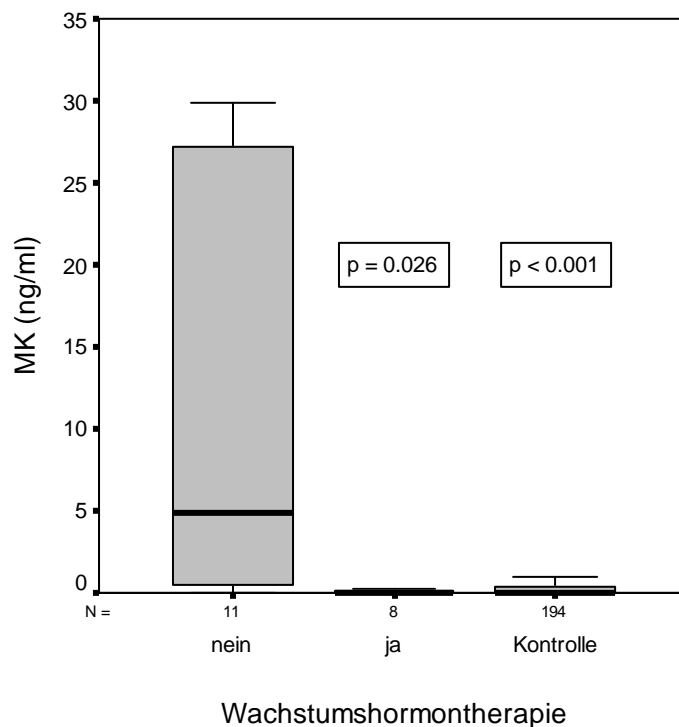
Die wenigen sehr hohen MK-Serumwerte ( $> 10$  ng/ml) wurden ausschließlich bei Patienten mit Adipositas (N = 1), Diabetes mellitus (N = 1) und Kleinwuchs (N = 5) gefunden. Des Weiteren wurden einige mäßig erhöhte Werte ( $> 1$  ng/ml) bei Patienten nachgewiesen, die aufgrund einer Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte (N = 6) oder einer Hernie (N = 3) operiert wurden oder die an Adipositas (N = 4), Diabetes mellitus (N = 1), Kleinwuchs (N = 3), Pubertas praecox (N = 3) oder anderen Erkrankungen (N = 2) litten. In der folgenden Tabelle werden alle Patienten mit MK-Werten über 1 ng/ml aufgeführt.

**Tab. 10: Erhöhte MK-Werte in der Kontrollgruppe**

Diagnose	MK (ng/ml)	Geschlecht	Alter	Gewicht in kg (P.)	Größe in cm (P.)	BMI in kg/m <sup>2</sup> (P.)	Fall-Nr.
Kleinwuchs	101,46	W	13	23,9 (0)	128,2 (0)	14,5 (0)	228
STH-Mangel	29,82	M	13	29,6 (0)	127 (0)	18,4 (40)	11
Kleinwuchs	28,76	W	10	27,5 (4)	139,2 (28)	14,2 (3)	144
Kleinwuchs	25,60	M	9	21,2 (1)	118,6 (0)	15,1 (22)	137
Kleinwuchs	10,54	M	14	34,7 (1)	149,2 (3)	15,6 (2)	44
STH-Mangel	5,09	M	14	36,5 (2)	148,8 (2)	16,5 (10)	107
Kleinwuchs	4,85	M	12	28,6 (1)	130,5 (0)	16,8 (26)	91
Kleinwuchs	1,17	W	15	58,2 (69)	147,5 (1)	26,8 (96)	203
Diabetes mellitus 1	100,27	W	5	13 (0)	100,1 (0)	13 (4)	159
Diabetes mellitus 2	1,45	W	10	103,4 (99)	154 (100)	43,6 (100)	99
Adipositas	22,72	W	8	46,5 (99)	140,8 (93)	23,5 (98)	182
Adipositas	4,22	W	6	43,1 (100)	128,3 (88)	26,3 (100)	105
Adipositas	2,60	W	17	92,7 (98)	168 (78)	32,6 (100)	181
Adipositas	1,58	M	6	40,6 (100)	130,6 (98)	23,7 (100)	204
Adipositas	1,33	M	13	57,2 (82)	151,2 (18)	25,0 (94)	10
Pubertas praecox	5,58	W	5	23,7 (83)	121,7 (93)	15,7 (57)	164
Pubertas praecox	3,11	W	11	48,9 (87)	139,2 (23)	24,8 (98)	89
Pubertas praecox, Meningomyelozele	2,12	W	10	32,1 (27)	133 (10)	18,1 (64)	13
LKG-Spalte	2,24	M	0.3	5,7 (38)	60 (41)	15,8 (46)	221
LKG-Spalte	2,15	M	0.3	6,8 (84)	65 (95)	16,1 (53)	217
LKG-Spalte	1,60	W	0.3	5,7 (63)	61 (78)	15,3 (47)	205
LKG-Spalte	1,39	W	0.8	7,8 (28)	n.d.	n.d.	222
LKG-Spalte	1,34	M	0.3	6,4 (38)	n.d.	n.d.	250
LKG-Spalte	1,31	M	0.3	6,2 (30)	n.d.	n.d.	251
Ureterabgangs- stenose	1,91	W	0.2	5,2 (75)	58 (74)	15,5 (66)	218
Nabelhernie	1,66	W	0.3	5,1 (11)	56 (2)	16,3 (65)	262
Leistenhernie	1,30	W	1	11,8 (65)	n.d.	n.d.	225
Katarakt bds.	1,20	M	0.2	5,8 (82)	66 (>99)	13,3 (5)	246
Leistenhernie	1,13	W	1	7,9 (4)	74 (12)	14,4 (6)	243

#### 4.1.2.1 Kleinwuchs

In der Gruppe der Kleinwuchs-Patienten wurden einige erhöhte MK-Werte gefunden. Um eine Erklärung für die hohen Werte zu finden, wurde nach Unterschieden innerhalb der Gruppe gesucht. Ein Teil der Kleinwuchs-Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Wachstumshormontherapie (N = 8), andere hingegen wurden nicht behandelt (N = 11), entweder weil sie keinen Wachstumshormonmangel hatten (N = 8) oder weil die Therapie noch nicht begonnen hatte (N = 3). Beim Vergleich der Werte dieser beiden Patientengruppen zeigt sich, dass die höheren MK-Werte den Patienten zugeordnet werden konnten, die kein Wachstumshormon erhalten hatten. Die Patienten, die bereits mit Wachstumshormon behandelt wurden, wiesen dagegen niedrige Werte auf. In Abbildung 11 sind die beiden Gruppen der Kleinwuchs-Patienten den anderen Kontrollpatienten einander gegenüber gestellt.



**Abb. 11: MK-Konzentration bei Kleinwuchs-Patienten**

Beim statistischen Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter ( $p = 0,026$ ) Unterschied zwischen den Kleinwuchs-Patienten ohne Therapie (N = 11, Median 4,85 ng/ml) und denen mit Therapie (N = 8, Median 0,0 ng/ml). Beim Vergleich mit den anderen Kontrollen (N = 194) war der Unterschied noch größer ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test).

#### 4.1.2.2 Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten

Die Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten hatten ebenfalls signifikant höhere MK-Werte (Median 0,66 ng/ml, N = 13) als die anderen Kontrollpatienten (Median 0 ng/ml, N = 202,  $p = 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 12).

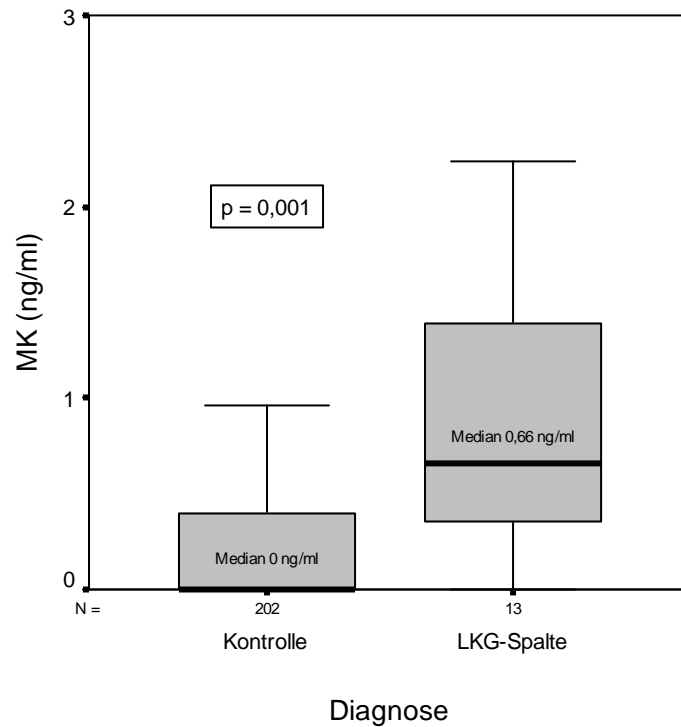
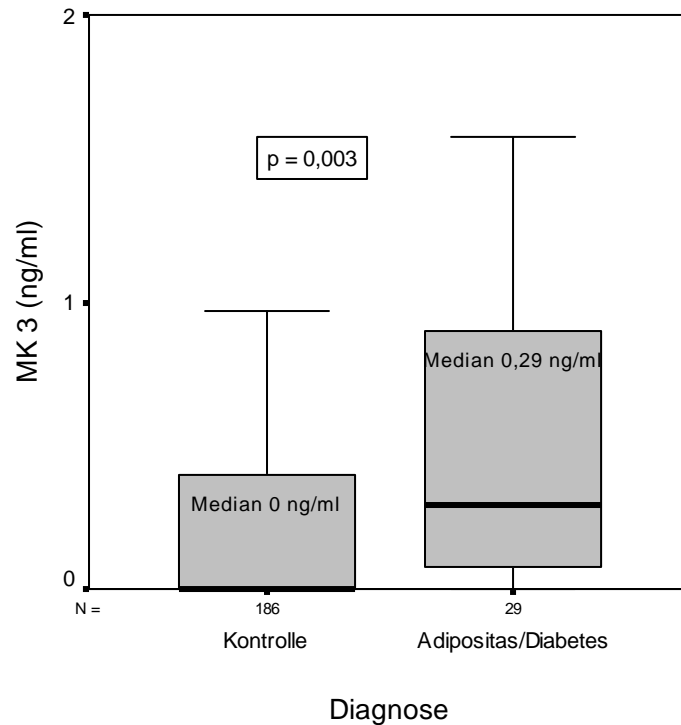


Abb. 12: MK-Konzentration bei Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte

#### 4.1.2.3 Adipositas und Diabetes mellitus

In der Gruppe der Patienten mit Adipositas oder Diabetes mellitus (Median 0,29 ng/ml, N = 29) wurden ebenfalls erhöhte MK-Werte im Vergleich zu den anderen Kontrollpatienten (Median 0 ng/ml, N = 186,  $p = 0,003$ , Mann-Whitney-U-Test) gefunden. Der Extremwert von 101,5 ng/ml wurde bei einem Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 gemessen (Abb. 13).

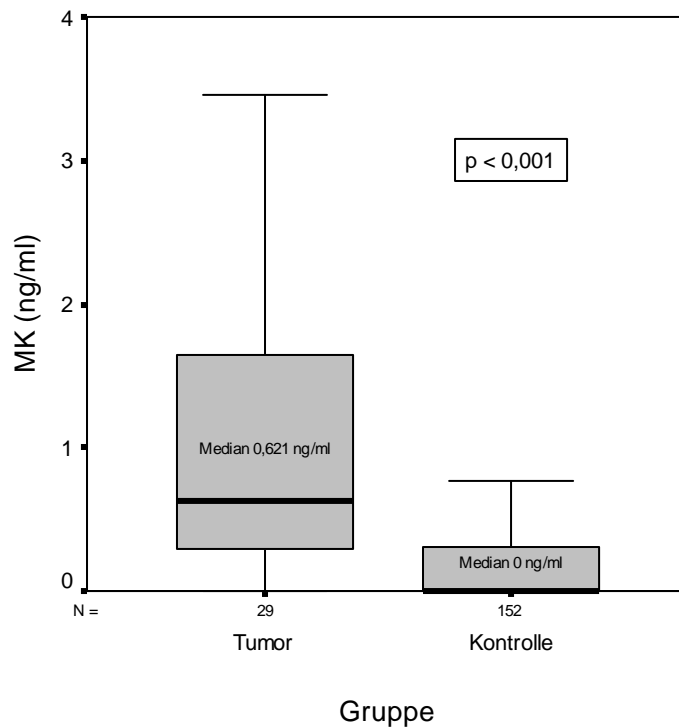




**Abb. 13: MK-Konzentration bei Patienten mit Adipositas und Diabetes mellitus**

### 4.1.3 Vergleich Studiengruppe vs. Kontrollgruppe

Auf der Basis des Normalwertes für MK im Serum konnte der Vergleich zwischen Kontroll- und Studiengruppe geführt werden. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die MK-Serumwerte der Tumorpatienten (Median 0,62 ng/ml) sind signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Median 0,077 ng/ml). Führt man den Mann-Whitney-U-Test mit der Kontrollgruppe ohne die o.g. Subgruppen mit den Ausreißern durch (Median 0 ng/ml,  $N = 152$ ), ist das Ergebnis ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,001$ ), wobei der Unterschied zwischen den Medianen hier noch prägnanter als beim Vergleich mit der gesamten Kontrollgruppe ist (Abb.14).

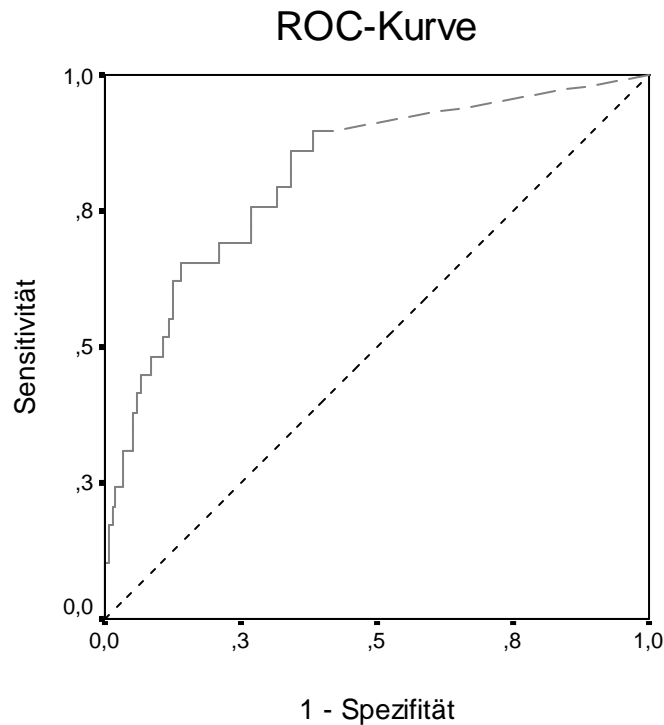


**Abb. 14: Vergleich der MK-Werte in Tumor- und Kontrollgruppe ohne Ausreißer**

Beim einzelnen Vergleich der drei Tumorentitäten mit der Kontrollgruppe ohne Ausreißer (N = 152) ergaben sich folgende Resultate: Die Werte von Nephroblastom- (Median 0,59 ng/ml) und Neuroblastom-Patienten (Median 0,84 ng/ml) waren signifikant erhöht bei  $p < 0,001$ . Für die kleine Gruppe der RMS-Patienten (Median 0,29 ng/ml) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p = 0,17$ ), obwohl bei einem Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose des Rezidives eines alveolären RMS ein sehr hoher MK-Wert mit 52 ng/ml gefunden wurde. Ein zweiter Patient mit embryonalem RMS hatte eine MK-Konzentration von 6,45 ng/ml, die restlichen drei Patienten wiesen jedoch keine erhöhten Werte auf.

#### **4.1.4 Festlegung eines Schwellenwertes für die MK-Konzentration im Serum**

Der diagnostische Wert eines Tumormarkers lässt sich durch die Angabe von Sensitivität und Spezifität beschreiben. Bei einem diagnostischen Test ist der Grenzwert entscheidend, ab dem ein positives Ergebnis angezeigt werden soll. Für einen Screening-Test wird eine hohe Sensitivität gefordert, das heißt es sollen möglichst alle kranken Personen auch als solche erkannt werden. Bei einem Bestätigungs-Test ist wiederum die Spezifität von großer Bedeutung, da hier möglichst keine Gesunden als krank eingestuft werden sollen. Der Grenzwert für die MK-Konzentration im Serum wurde durch eine ROC (receiver operating characteristic)-Kurve festgelegt (Abb.15).



**Abb. 15: ROC-Kurve zur Bestimmung eines Schwellenwertes (N = 152)**

Die Berechnung erfolgte sowohl für die gesamte Kontrollgruppe (N = 215), als auch getrennt für die Kontrollgruppe ohne Ausreißer (N = 152). Das beste Ergebnis wurde in beiden Gruppen bei einem Schwellenwert von 0,176 ng/ml erreicht. Die Sensitivität war in diesem Fall mit über 86 % positiv getesteten Tumorkranken hoch. Die Spezifität war deutlich geringer, da über ein Drittel der Kontrollpatienten ebenfalls über diesem Schwellenwert lag (Tab. 11).

**Tab. 11: Sensitivität und Spezifität bei unterschiedlichen Schwellenwerten und Vergleichsgruppen**

	Gesamte Kontrollgruppe		Kontrollgruppe ohne Ausreißer	
Fallzahl	215		152	
Schwellenwert (ng/ml)	0,176	0,5	0,176	0,5
Sensitivität (%)	86,2	66	86,2	65,5
Spezifität (%)	57,7	77	65,8	86,2

Legte man den Grenzwert auf 0,5 ng/ml wie bei IKEMATSU et al. vorgeschlagen, sank die Sensitivität und es wurden nur 2/3 der Krebskranken positiv getestet. Die Spezifität stieg

hingegen auf 77 % bzw. 86,2 %. Aufgrund dieser geringen Sensitivität wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Schwellenwert von 0,176 ng/ml weitergearbeitet.

#### 4.1.5 Unterschiede zwischen den Tumorentitäten

Es wurden Kinder und Jugendliche mit Nephroblastom, Neuroblastom oder Rhabdomyosarkom untersucht. Mit dem Kruskal-Wallis-Test kann gezeigt werden, ob es zwischen den drei Tumorentitäten signifikante Unterschiede in der MK-Expression gibt. Die asymptotische Signifikanz lag bei 0,71, wonach sich die Subgruppen somit nicht signifikant unterscheiden (Abb. 16).

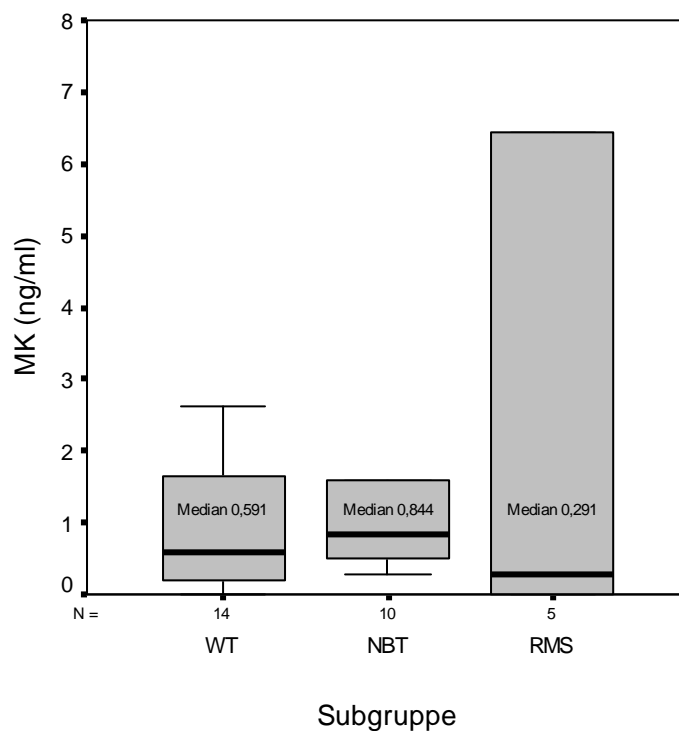
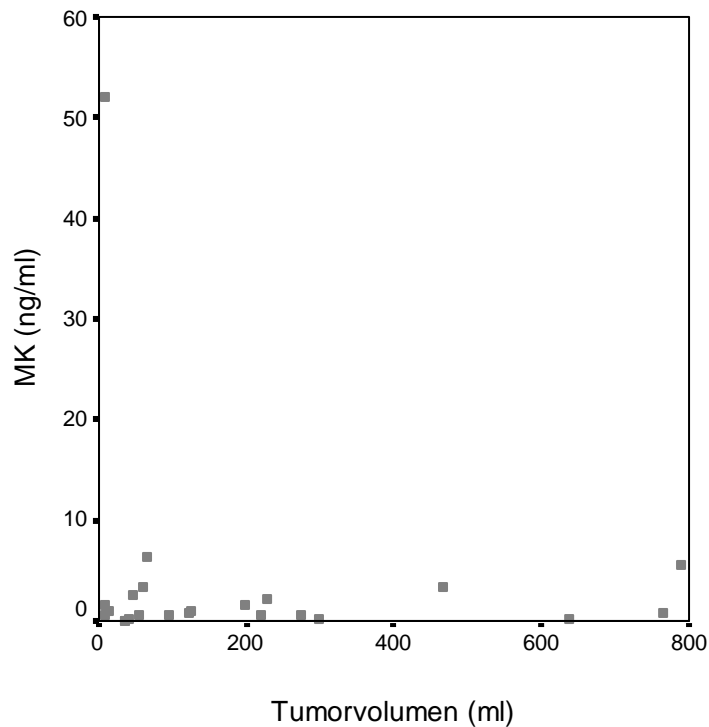


Abb. 16: MK-Expression der drei Tumorentitäten (WT = Nephroblastom, NBT = Neuroblastom, RMS = Rhabdomyosarkom)

#### 4.1.6 Korrelation mit der Tumorlast

Für die Etablierung eines Tumormarkers ist es von Bedeutung, ob die MK-Konzentration im Serum mit der Tumorlast korreliert. Die Tumorgröße wurde durch bildgebende Verfahren wie Sonographie, MRT und CT bestimmt.



**Abb. 17: Korrelation mit der Tumorlast**

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnte keine Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem MK-Wert im Serum nachgewiesen werden (Abb. 17). Dies gilt sowohl für eine Berechnung für alle Tumorentitäten gemeinsam sowie für eine getrennte Darstellung (Tab. 12). Im Rahmen der Beurteilung des Tumoransprechens wurde sowohl die Tumorgröße als auch die MK-Konzentration erneut bestimmt. Es ergab sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang.

**Tab. 12: Korrelation zwischen Tumorgröße und MK-Wert (Pearsons r)**

	Bei Diagnose		Im Verlauf	
	Korrelation nach Pearson	Signifikanz	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
Alle Tumorentitäten	- 0,13	0,54	0,01	0,98
Wilmstumor	0,38	0,22	- 0,07	0,82
Neuroblastom	0,57	0,14	-0,23	0,77
Rhabdomyosarkom	- 0,68	0,32	n.d.	n.d.

#### 4.1.7 Korrelation mit dem Tumorstadium

Eine weitere statistische Prüfung erfolgte hinsichtlich einer Korrelation von Tumorstadium und MK-Expression. Zunächst wurde der Vergleich der MK-Werte in den unterschiedlichen Stadien für alle drei Tumorentitäten gemeinsam dargestellt. Die lokalisierten Nephroblastome wurden mit Stadium 1 bezeichnet, da präoperativ nur zwischen lokalisiertem und disseminiertem Stadium unterschieden wurde.

Statistisch wurden die Unterschiede zwischen den Stadien mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,18$ ) zwischen den Gruppen, obwohl eine leicht steigende Tendenz der MK-Werte mit dem Stadium zu erkennen war (Abb. 18).

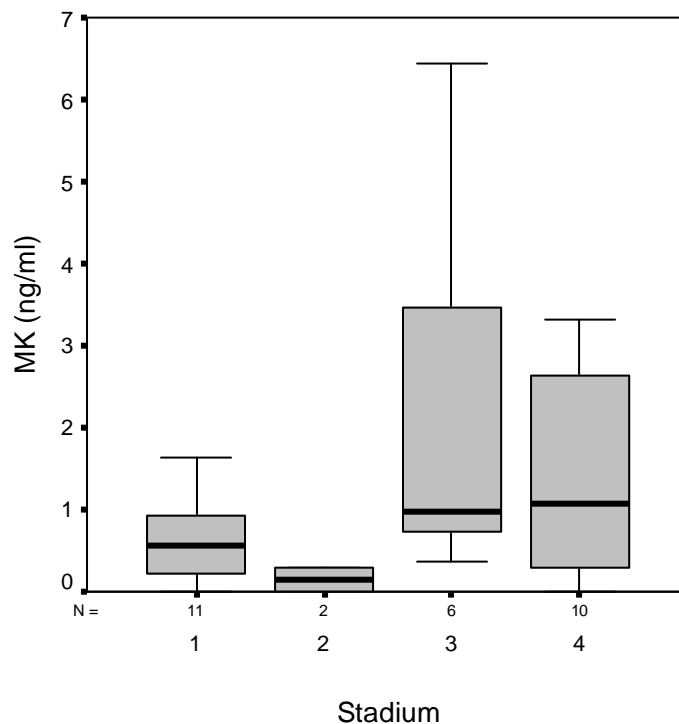


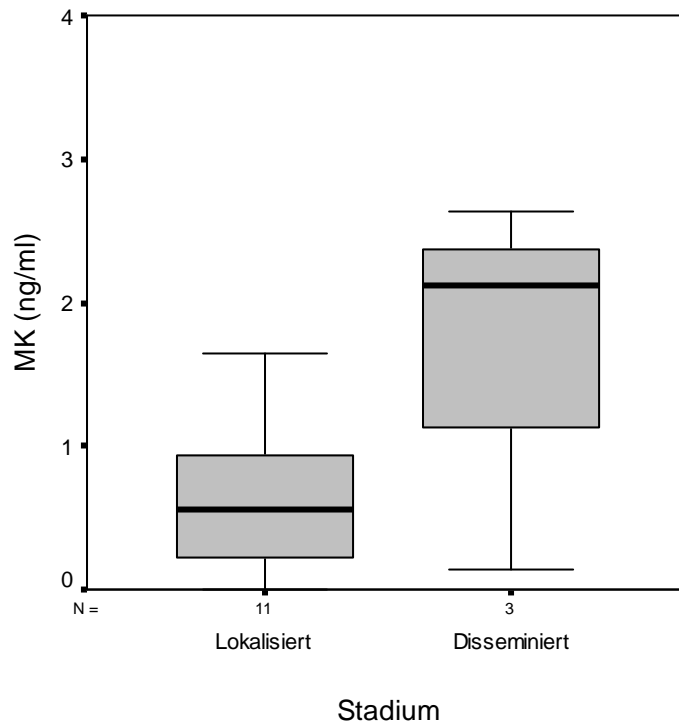
Abb. 18: MK-Werte in unterschiedlichen Stadien

Beim Vergleich der einzelnen Stadien untereinander mit dem Mann-Whitney-U-Test konnte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden (Tab. 13). Wurde Stadium 1 und 2 sowie Stadium 3 und 4 zusammengefasst, deutete sich zwar ein Unterschied an, der jedoch mit 0,095 nicht signifikant war.

**Tab. 13: Vergleich der Tumorstadien**

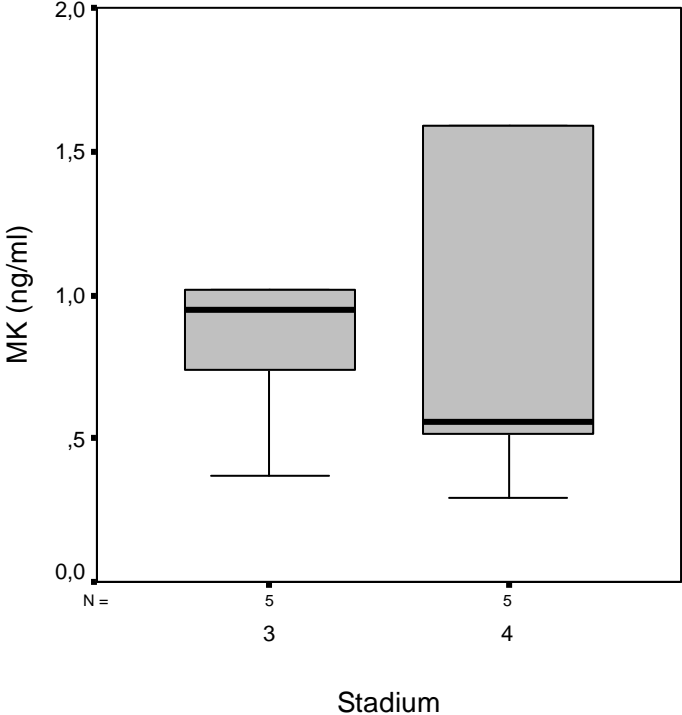
Stadium	Statistische Signifikanz
Stadium 1 vs. 2	p = 0,231
Stadium 1 vs. 3	p = 0,122
Stadium 1 vs. 4	p = 0,512
Stadium 2 vs. 3	p = 0,071
Stadium 2 vs. 4	p = 0,182
Stadium 3 vs. 4	p = 0,562
Stadium 1 + 2 vs. 3 + 4	p = 0,095

Im Folgenden wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorstadien für die drei Tumorentitäten getrennt untersucht. Abbildung 19 zeigt die MK-Konzentration bei lokalisierten (N = 11) und disseminierten Nephroblastomen (N = 3). Auch hier erkennt man eine Tendenz zu höheren MK-Werten bei den disseminierten Tumoren, die allerdings statistisch nicht signifikant ist (p = 0,56).

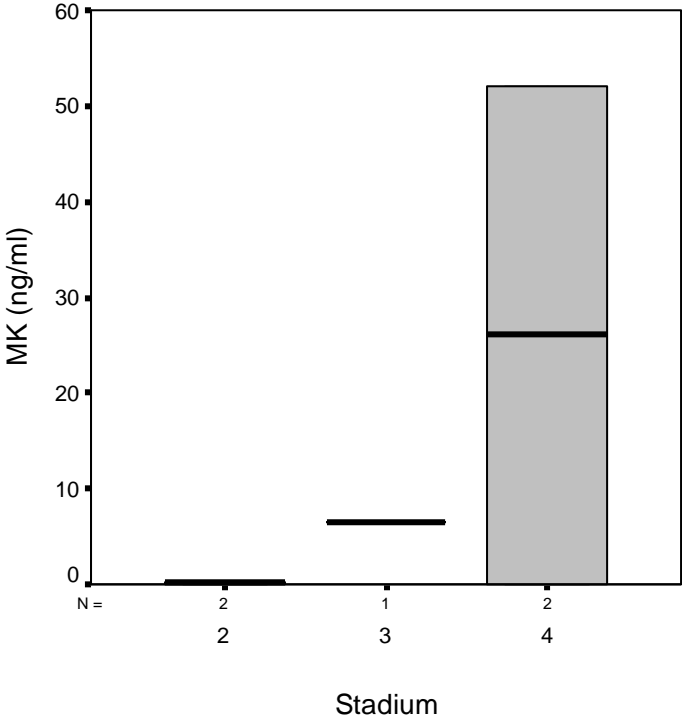


**Abb. 19: MK-Werte beim Nephroblastom**

Die Neuroblastom-Patienten verteilten sich gleichmäßig auf die Stadien 3 und 4, die Stadien 1 und 2 waren in der Gruppe nicht vertreten. Abbildung 20 zeigt, dass die MK-Expression im Stadium 4 (N = 5) geringer war als im Stadium 3 (N = 5). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,69$ ).



**Abb. 20: MK-Werte beim Neuroblastom**



**Abb. 21: MK-Werte in unterschiedlichen Stadien des Rhabdomyosarkoms**



Die Rhabdomyosarkom-Patienten verteilten sich auf die Stadien 2, 3 und 4. Abbildung 21 zeigt einen Anstieg der MK-Expression über diese Stadien hinweg, jedoch war dieser nicht statistisch signifikant ( $p = 0,62$ ).

#### 4.1.8 Einfluss der Tumor-Operation auf die Midkine-Werte

Bei neun Wilmstumor-Patienten lagen MK-Werte vor und nach der Operation vor. Dem Wert zum Zeitpunkt der Diagnose wurde der 4-Wochen-post-OP-Wert gegenübergestellt. In fünf Fällen fiel die MK-Konzentration ab, bei einem Patienten blieb sie etwa gleich und bei drei Patienten stieg sie nach der Operation an. Bei Patient 6 war die MK-Konzentration vor der Operation sehr hoch und fiel danach stark ab. Im Gegensatz hierzu zeigte Patient 10 vorher eine relativ geringe Konzentration, die nach Tumorentfernung auf ein Vielfaches anstieg. Hieraus lässt sich somit keine eindeutige Aussage zum Einfluss der Operation auf die MK-Werte treffen (Abb. 22).

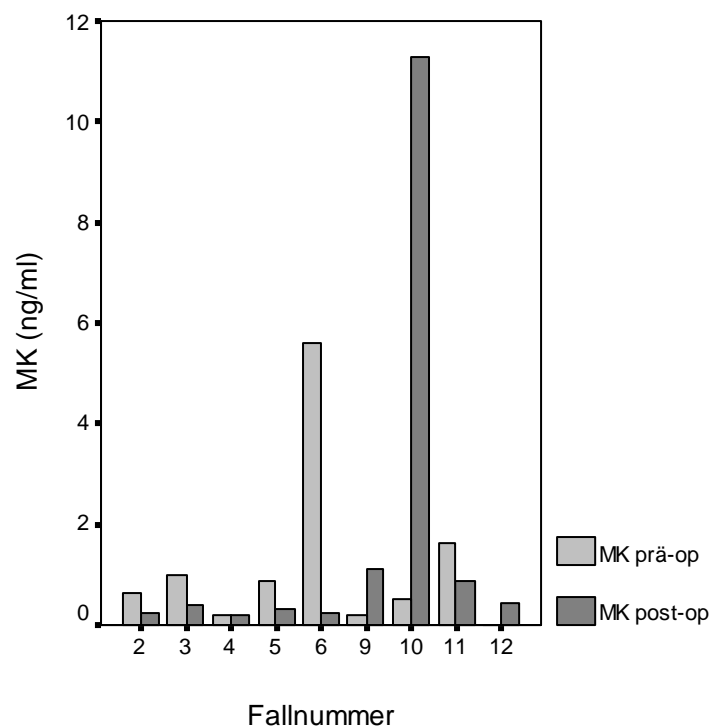


Abb. 22: MK-Werte vor und nach Tumor-OP

#### 4.1.9 Midkine-Werte im zeitlichen Verlauf

Die MK-Serumwerte der Tumorpatienten wurden zu mehreren Zeitpunkten während der Therapie bestimmt. Es wurde untersucht, ob sich die MK-Konzentration im Laufe der Therapie änderte und ob dies im Verhältnis zum Ansprechen auf die Therapie stand.

#### 4.1.9.1 Nephroblastom

Bei den Nephroblastom-Patienten waren die Zeitpunkte wie folgt definiert (Abb. 4, Kapitel 3.2.2.1): 1 = Therapiebeginn/Chemotherapie-Block 1, 2 = Block 2, 3 = Block 3, 4 = Block 4, 5 = ggf. Block 5, 6 = präoperativ, 7 = 2 Wochen postoperativ, 8 = 4 Wochen postoperativ, 9 = 8 Wochen postoperativ, 10 = 12 Wochen postoperativ. Bei der zeitlichen Analyse der MK-Konzentrationen zeigten sich unterschiedliche Verlaufskurven. Um die Mustererkennung grafisch zu verdeutlichen, wurden die Patienten mit ähnlichen Verlaufskurven jeweils in einer Gruppe (WT 1, WT 2a, WT 2b, WT 3) zusammengefasst. In der folgenden Darstellung werden die Charakteristika der einzelnen Gruppen näher erläutert.

#### Gruppe WT 1

Bei den Patienten 6, 7 und 14 waren die MK-Konzentrationen zu Beginn der Therapie erhöht und fielen im Laufe der Therapie zum Teil deutlich ab. Alle drei Patienten zeigten eine deutliche Regression des Tumorumfanges und ein postoperatives Stadium I bzw. II (Abb. 23).

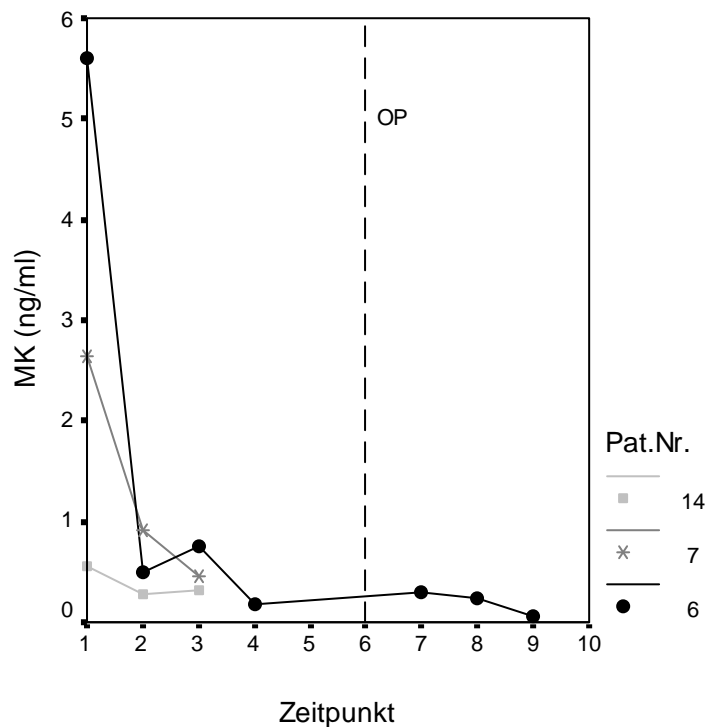


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 1

## Gruppe WT 2

Bei den Patienten 2, 3, 4, 5, 12 und 13 kam es nach Therapiebeginn zu einer vorübergehenden Zunahme der MK-Werte, die im weiteren Verlauf jedoch auf ein niedrigeres Niveau zurückkehrten.

## Gruppe WT 2a

In Abbildung 24 werden zunächst die Patienten 4, 5 und 12 gezeigt, deren MK-Werte die Konzentration von 3 ng/ml nicht überstiegen. Patient 4 zeigte im Laufe der Therapie nur eine leichte Tumorregression (37 %), postoperativ erreichte er ein Stadium I jedoch mit hoher Malignität. Trotz der niedrigen postoperativen MK-Werte erlitt der Patient drei Monate nach der letzten MK-Bestimmung ein Lokalrezidiv. Bei Patient 5 zeigte der initial sehr große Tumor (765 ml) ein gutes Ansprechen auf die Therapie (94 %), postoperativ wurde ein Stadium 2 erreicht. Patient 12 sprach ebenfalls gut auf die Chemotherapie an (68 %) mit einem postoperativen Stadium I.

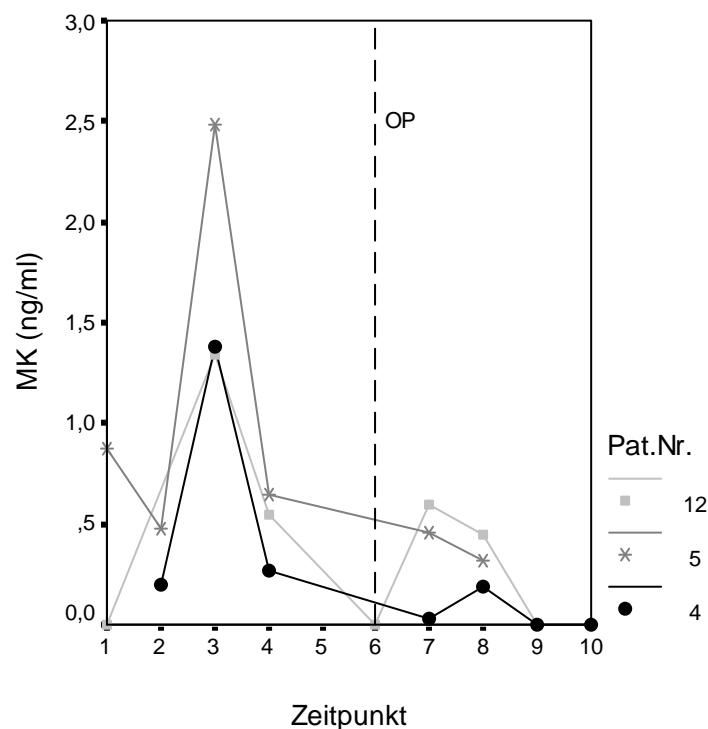


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 2a

## Gruppe WT 2b

Bei den Patienten 2, 3 und 13 kam es zu einem deutlichen Anstieg der MK-Konzentration nach Therapiebeginn, allerdings wurden Werte von über 10 ng/ml beobachtet (Abb. 25). Patient 2 hatte einen sehr hohen MK-Wert vor dem dritten Therapieblock, wobei der Tumor gut auf die Therapie ansprach (81 % Regression) und das postoperative Stadium I war. Ein ähnlicher Verlauf war bei Patient 3 zu beobachten mit einem erhöhten MK-Wert vor Block 2 bei einer Regression von 83 % und einem postoperativen Stadium I. Bei Patient 13 wurden initial Metastasen in beiden Lungen festgestellt, und das Ansprechen auf die Therapie war gering (38 %). Vor dem vierten Chemotherapieblock wurde ein extrem hoher MK-Wert (237,68 ng/ml) gemessen. Postoperativ bestand ein Stadium IV und der Patient verstarb einen Monat nach der Tumorentfernung.

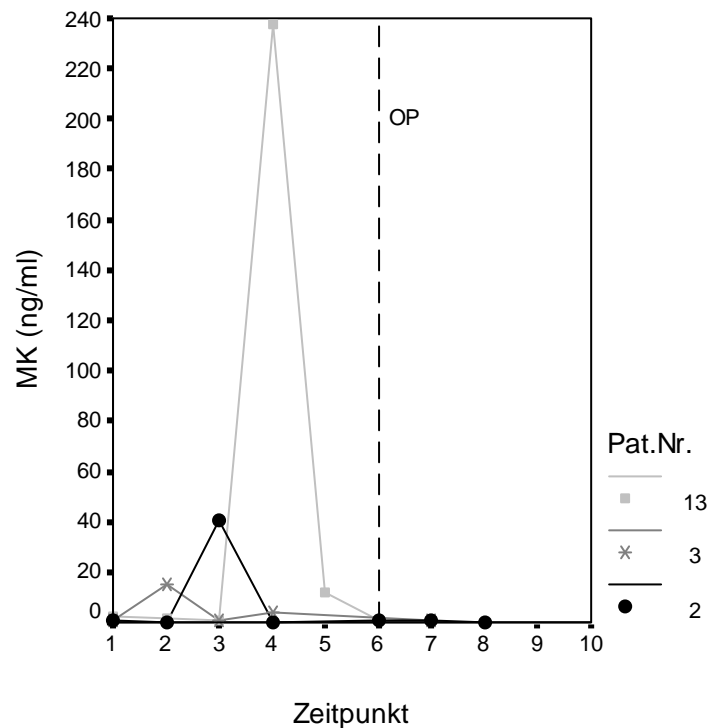


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 2b

## Gruppe WT 3

Die Patienten 8, 9, 10 und 11 zeigten im Laufe der Therapie einen Anstieg ihrer MK-Werte insbesondere auch nach der operativen Entfernung des Tumors. Bei den Patienten 8 und 9 fiel die Konzentration schließlich jedoch wieder auf ein niedriges Niveau ab (Abb. 26). Bei Patient 8 wurde präoperativ ein Stadium IV mit Lungenmetastasen festgestellt und der Tumor sprach schlecht auf die Therapie an (22 % Regression). Tumor und Metastasen wurden

operativ entfernt und es wurde ein Stadium II erreicht. Trotzdem stieg der MK-Wert 8 Wochen postoperativ wieder an. Der Tumor von Patient 9 sprach gut auf die Chemotherapie an (70 %), aber aufgrund von Lymphknoten-Metastasen war postoperativ ein Stadium III festzulegen. Zusätzlich zur postoperativen Chemotherapie wurde eine Bestrahlung der Lymphknoten und des Tumorbettes durchgeführt. Patient 10 zeigte eine geringe Tumorregression (34 %), der Tumor konnte jedoch komplett entfernt werden. Trotzdem trat auch 4 Wochen postoperativ noch ein hoher MK-Wert auf. Das Tumorumfugen von Patient 11 war bei Diagnose klein und ging unter Therapie um 36 % zurück. Postoperativ kam es zu einem geringfügigen Anstieg trotz eines Stadiums I.

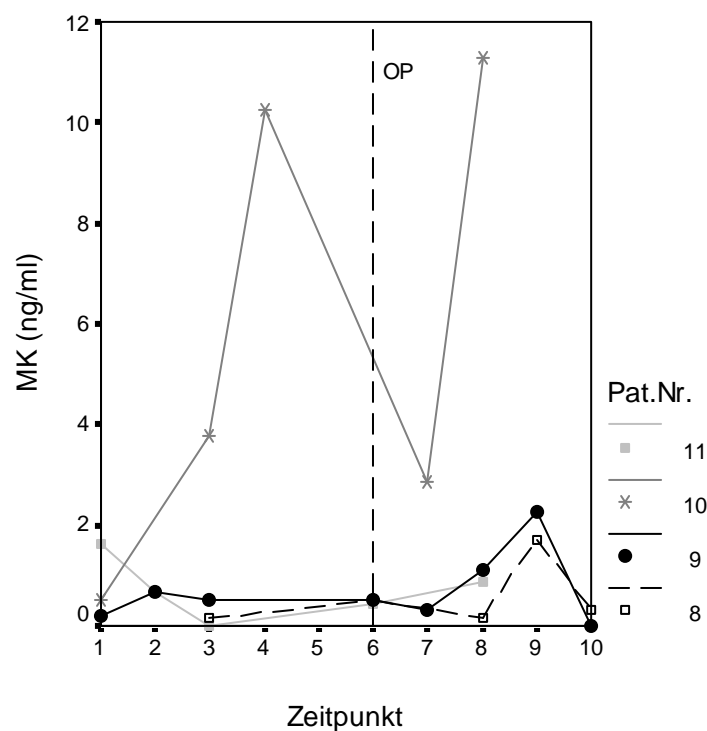


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe WT 3

#### 4.1.9.2 Neuroblastom

Bei den Neuroblastom-Patienten wurde Midkine zu den folgenden Zeitpunkten bestimmt (Abb. 5, Kapitel 3.2.2.2): 1 = erster N5-Block, 2 = erster N6-Block, 3 = zweiter N5-Block, 4 = zweiter N6-Block, 5 = präoperativ, 6 = 4 Wochen postoperativ, 7 = 8 Wochen postoperativ, 8 = 12 Wochen postoperativ. Für die Darstellung wurden die NBT-Patienten in zwei Gruppen unterteilt: NBT 1 mit MK-Werten < 5 ng/ml und NBT 2 mit MK-Werten > 5 ng/ml.

## Gruppe NBT 1

Bei Patient 15 fiel die MK-Konzentration nach Therapiebeginn auf niedrigere Werte zurück, dies ging mit einem sehr guten Tumoransprechen (93 % Regression) einher. Die Knochenmarkbeteiligung blieb jedoch bestehen und der Patient verstarb im Laufe der Therapie. Bei Patient 16 handelte es sich um eine Rezidivkrankung, sodass der Patient nur noch palliativ behandelt werden konnte. Die MK-Werte waren trotz einem vorübergehenden Anstieg auf einem niedrigen Level. Der Patient verstarb im Laufe der Therapie (Abb. 27).

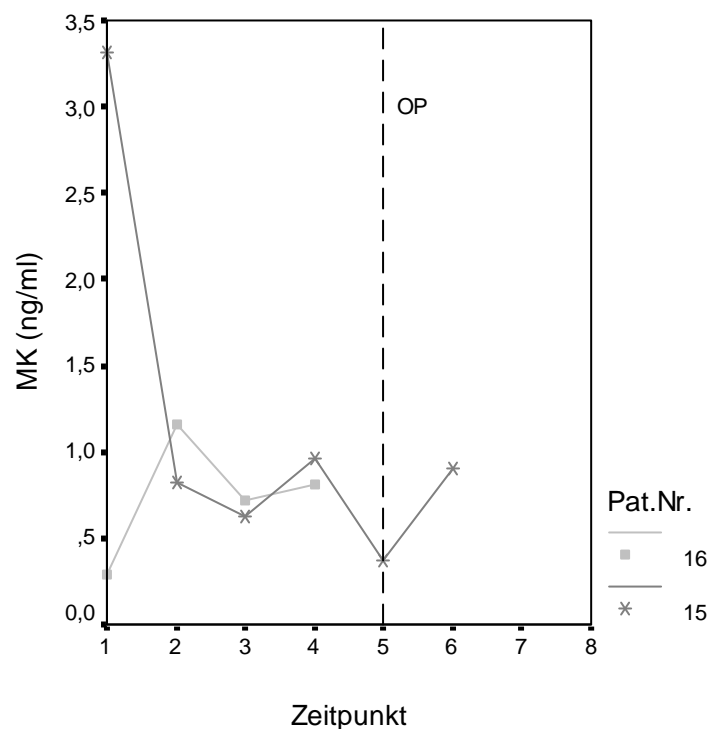


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe NBT 1

## Gruppe NBT 2

Patient 17 zeigte einen sehr hohen präoperativen Midkine-Wert, obwohl der Tumor gut auf die Therapie angesprochen hatte (75 % Regression). Eine operative Entfernung des Tumors war bei diesem Patienten nicht möglich. Die Konzentration fiel während der weiteren Therapie jedoch stark ab. Bei Patient 18 wurde ein Lokalrezidiv festgestellt, das gut auf die Therapie ansprach (83 %). Die Werte fielen zunächst unter die Nachweisgrenze ab, stiegen dann aber postoperativ wieder an. Auch bei Patient 21 stiegen die MK-Werte trotz eines guten Ansprechens auf die Chemotherapie (87 % Regression) und einer kompletten Tumorentfernung während der Therapie an (Abb. 28).

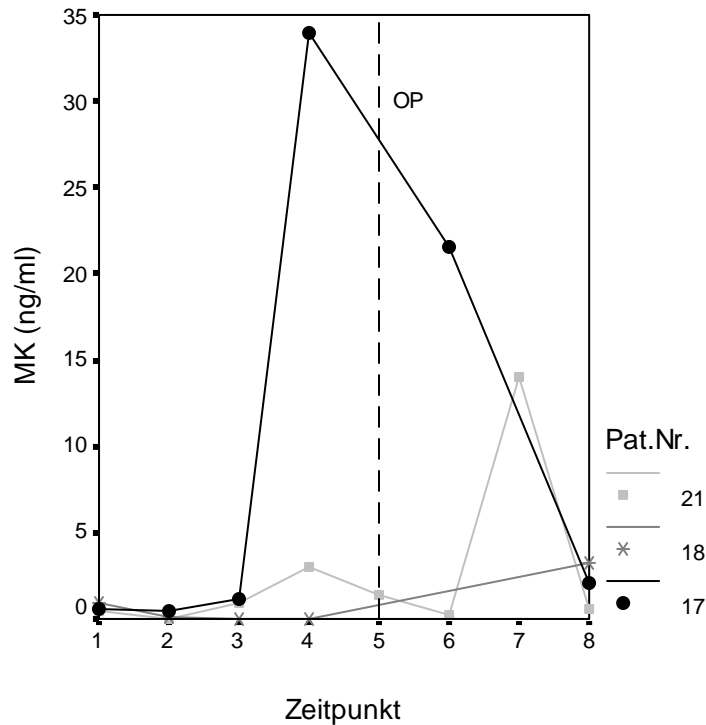


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei Gruppe NBT 2

#### 4.1.9.3 Rhabdomyosarkom

Bei den Rhabdomyosarkom-Patienten entsprachen die Messzeitpunkte folgenden Therapieabschnitten (Abb. 6, Kapitel 3.2.2.3): 1 = Therapie-Woche 1, 2 = Woche 4, 3 = Woche 7, 4 = Woche 10, 5 = 4 Wochen postoperativ, 6 = 12 Wochen postoperativ. Bei Patient 26 wurde der Tumor primär operativ entfernt und die MK-Werte blieben während der Therapie auf einem niedrigen Niveau. Patient 27 zeigte bei Therapiebeginn einen MK-Wert von 0 ng/ml und im Verlauf einen vorübergehenden geringen Anstieg der MK-Konzentration. Das Ansprechen auf die Therapie war sehr gut (92 % Regression). Der Tumor von Patient 28 verkleinerte sich unter Therapie nur um 18 % und die MK-Werte blieben auf einem niedrigen Niveau stabil. Bei Patient 29 wurde der Tumor auch primär entfernt, und die Werte fielen während der Therapie ab (Abb. 29).

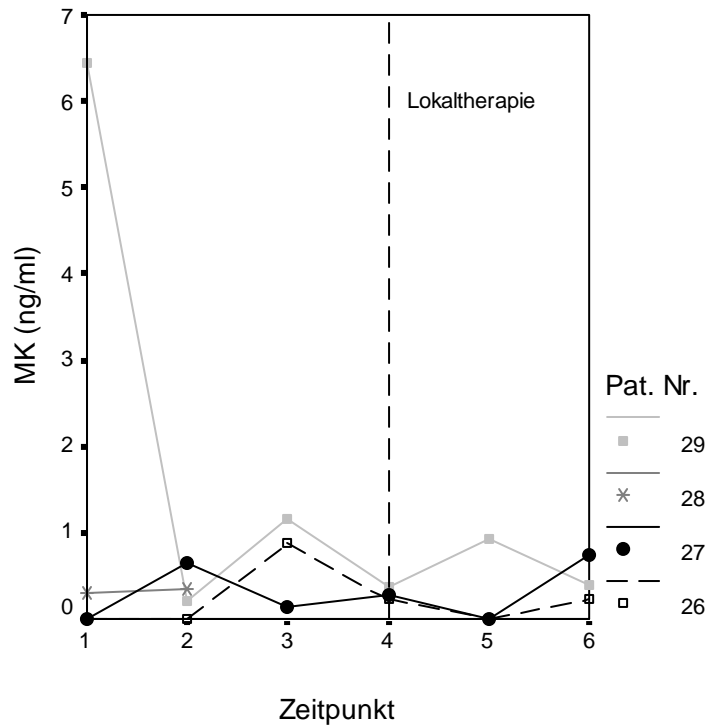
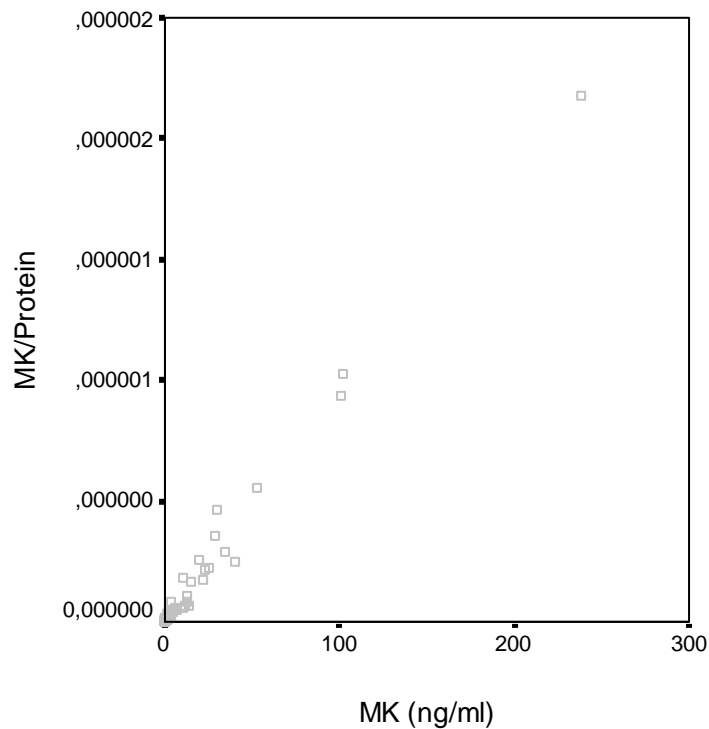


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der MK-Werte bei RMS-Patienten

## 4.2 Gesamtproteinkonzentration im Serum

Um zu kontrollieren, ob Extremwerte in den oben berichteten Daten durch die absolut vorhandene Menge an Proteinen im Serum beeinflusst wird, wurde in allen Serumproben (N = 367) der Gesamtproteingehalt mit dem Bradford-Test bestimmt. Der MK-Wert im Serum wurde auf die Proteinkonzentration bezogen, um eventuell vorhandene Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben auszugleichen. Um zu testen, ob ein großer MK-Wert mit einem entsprechend großen relativen Wert (MK/Protein) einherging, wurde die Korrelation nach Pearson bestimmt. Bei einem zweiseitigen Test bestand eine deutliche, positive Korrelation mit einem Wert von 0,99 und einer Signifikanz von 0,01 (Abb. 30).





**Abb. 30: Korrelation zwischen MK-Wert und MK-Wert /Proteinkonzentration**

Die Ergebnisse der in Kapitel 4.1 dargestellten Analysen ändern sich bei der Berechnung mit den relativen, auf das Gesamtprotein bezogenen MK-Werten nicht. Deshalb wird hier auf eine wiederholte Darstellung verzichtet und auch im Weiteren ausschließlich mit den absoluten MK-Werten gerechnet.

### 4.3 Expression von Midkine im Gewebe

Bei sechs Nephroblastom-Patienten und zwei Neuroblastom-Patienten stand Tumorgewebe zur Extraktion von RNA zur Verfügung. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Die Höhe der MK-Expression wurde mit einer Real time PCR im LightCycler untersucht (siehe Kapitel 3.4.4.-3.4.6.).

Bei jeder PCR wurde eine Standardreihe mitbestimmt, die durch logarithmische Verdünnung von cDNA der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS hergestellt wurde. Der Messbereich lag zwischen 25 und 0,0025 ng RNA-Äquivalent. Alle gemessenen Proben befanden sich in diesem Bereich. Als Referenzgen wurde Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPD) verwendet, da es eine ähnliche Effizienz wie MK zeigt und in unterschiedlichen Geweben relativ stabil exprimiert wird. Die Effizienz wird aus der Steigung der Standardkurve berechnet.

In Abbildung 31 wird exemplarisch eine der Standardkurven dargestellt.

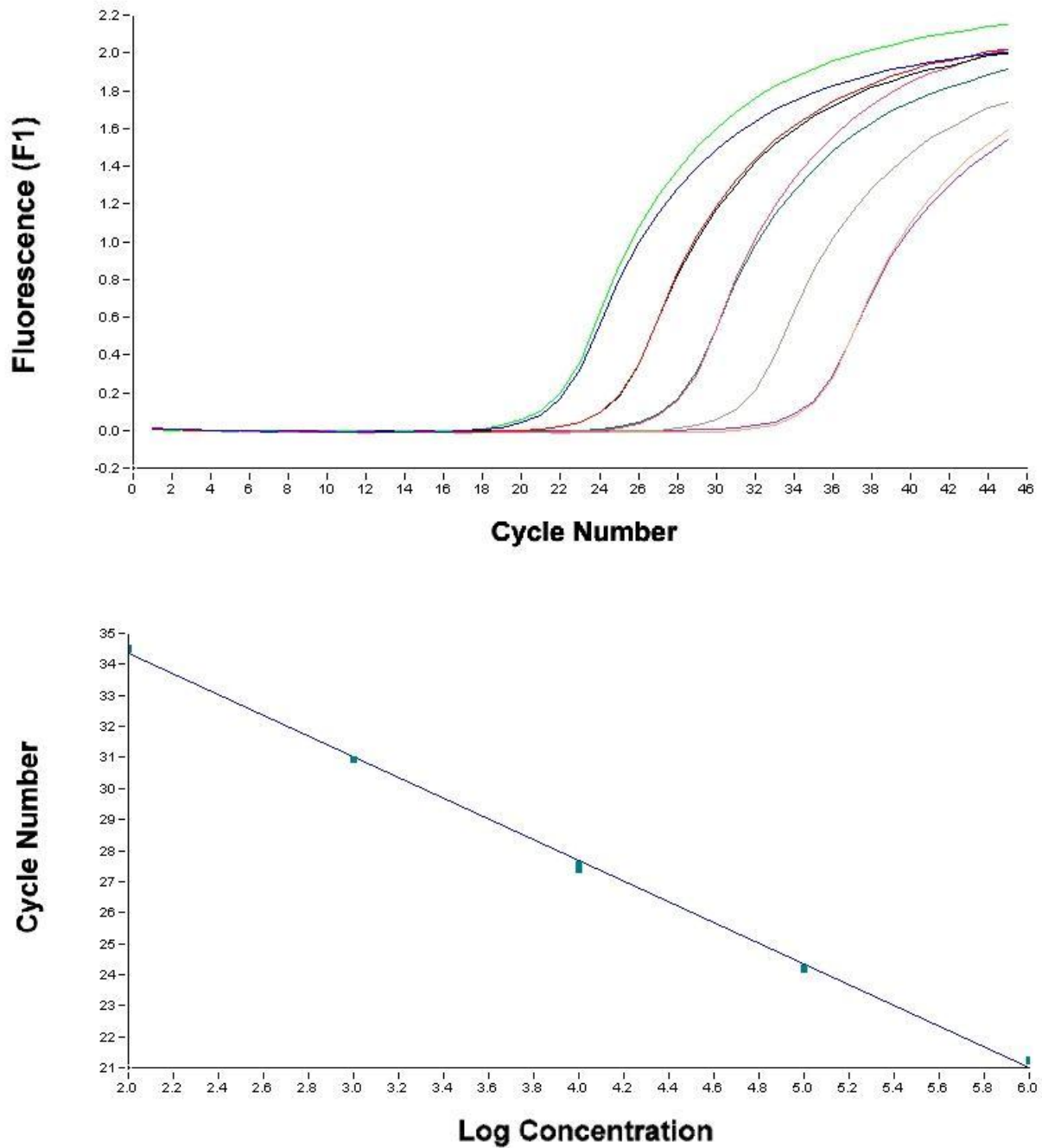
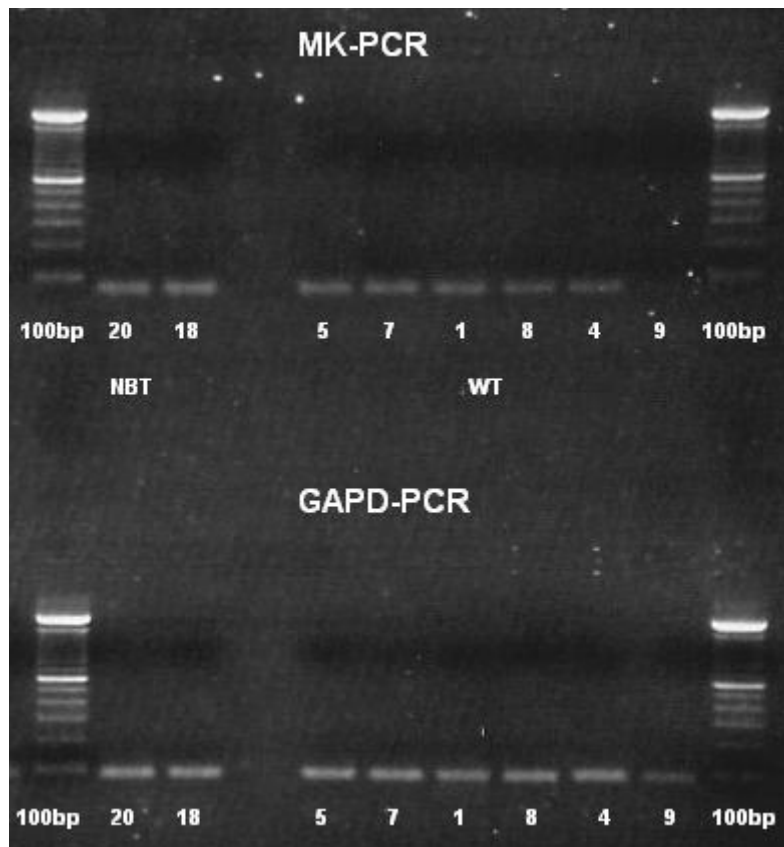


Abb. 31: Standardkurve der PCR

Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt durch eine Gel-Elektrophorese aufgetrennt und unter einer UV-Lampe mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das MK-Amplikon hatte eine Größe von 69 bp. Abbildung 32 zeigt das Foto des Gels.



**Abb. 32: Auftrennung der Produkte aus der MK- und GAPD-PCR**

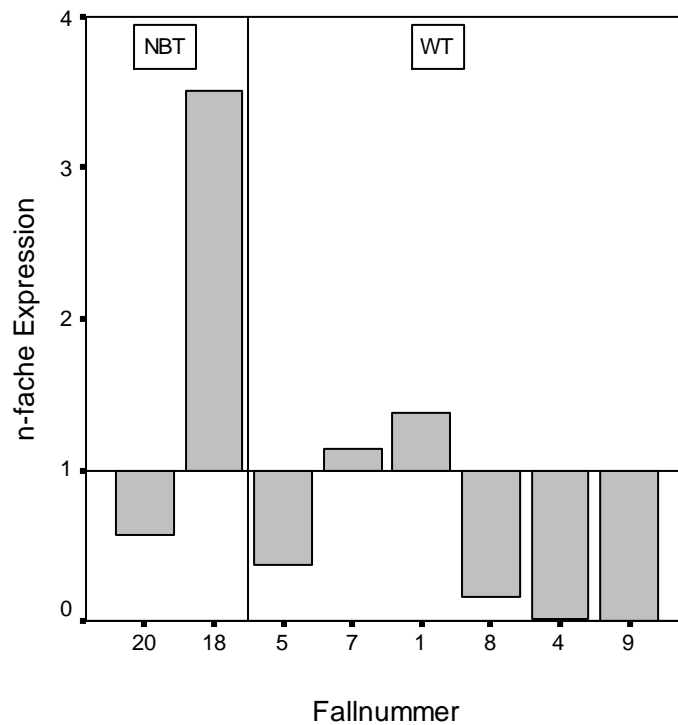
### 4.3.1 Neuroblastom

Im Tumor von Patient 18 war die Midkine-Expression auf das 3,5-fache erhöht. Der Tumor hatte gut auf die Therapie angesprochen und die präoperativen MK-Werte im Serum lagen unter der Nachweisgrenze, stiegen postoperativ jedoch wieder an. Das Tumorgewebe von Patient 20 zeigte eine auf 56 % erniedrigte MK-Expression, wobei die Serumkonzentration zum Zeitpunkt der OP leicht erhöht war. Der Tumor war ein Stadium IV und hatte präoperativ gut auf die Therapie angesprochen. Die Operation konnte jedoch nur eine R2-Resektion erreichen und der Patient verstarb im Laufe der Therapie.

### 4.3.2 Nephroblastom

Der Tumor von Patient 1 hatte mit 1,37 eine erhöhte MK-Expression. Der Tumor zeigte während der Therapie eine leichte Regression und konnte R0-reseziert werden. Der initiale MK-Serumwert war leicht erhöht, weitere Werte im Verlauf standen nicht zur Verfügung. Im Tumorgewebe von Patient 7 zeigte sich ebenfalls ein leicht erhöhtes Expressionsniveau mit 1,14. Es handelte sich um ein Lokalrezidiv eines bilateralen Nephroblastoms, das sehr gut auf die präoperative Chemotherapie ansprach und deutlich regredierende MK-Serumwerte zeigte. Bei den anderen Patienten konnte eine Reduktion unterschiedlichen Ausmaßes gezeigt

werden. Die Expression von Patient 5 war auf 37 % erniedrigt. Der Tumor hatte sehr gut auf die Chemotherapie angesprochen und die Serumkonzentration war nach einem vorübergehenden Anstieg deutlich abgefallen. Bei Patient 8 betrug die Expression nur 14 %. Der Tumor im Stadium 4 hatte nur gering auf die Therapie angesprochen und der Patient zeigte postoperativ einen erneuten Anstieg seiner MK-Serumwerte. Patient 4 exprimierte kein Midkine im Tumorgewebe. Der Tumor hatte nur geringfügig auf die Therapie angesprochen und die MK-Serumwerte fielen im Verlauf nach zwischenzeitlichem Anstieg wieder deutlich ab. Obwohl der Tumor R0 reseziert werden konnte, erlitt der Patient ein Rezidiv. Bei Patient 9 konnte in der PCR kein MK nachgewiesen werden. Der Tumor zeigte eine deutliche Regression während der präoperativen Therapie, die Serumwerte waren auf einem niedrigen Niveau und stiegen trotz R0-Resektion postoperativ wieder an (Abb. 33).



**Abb. 33: MK-Expression im Gewebe**

## 5 Diskussion

Der Wachstumsfaktor Midkine (MK) weist viele biologische Eigenschaften auf, die für die Tumorentstehung wichtig sind. So konnte bei einer Vielzahl von Tumoren bereits eine erhöhte Expression im Gewebe nachgewiesen werden (Garver et al. 1993; Tsutsui et al. 1993; Garver et al. 1994; Aridome et al. 1995; Kato et al. 2000). Die Bestimmung von MK im Serum ist mit Hilfe eines ELISA-Tests möglich (Muramatsu et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MK auf Proteinebene bei Patienten mit soliden embryonalen Tumoren sowie bei gesunden Kindern und Jugendlichen untersucht. MK wurde in einigen Fällen exemplarisch auch auf RNA-Ebene mittels PCR nachgewiesen.

### 5.1 Normalwert für Midkine im Serum

Auf der Basis von 215 Serumproben der Kontrollgruppe wurde ein Normalwert für Midkine in der pädiatrischen Population festgelegt. Die Werte zeigten hierbei eine L-förmige Verteilung, weshalb der Median mit der 25 %- und der 75 %-Perzentile als Normbereich (0,077 ng/ml, 0 – 0,44 ng/ml) angegeben wurde. Bei 49 % der Probanden lag der MK-Wert mit 0 ng/ml unterhalb der Nachweisgrenze. Der in der vorliegenden Untersuchung bestimmte Normalwert war im Vergleich zu den meisten Kontrollgruppen in anderen Untersuchungen deutlich niedriger (Ikematsu et al. 2000; Ikematsu et al. 2003; Shimizu et al. 2003; Mashour et al. 2004; Soulie et al. 2004; Obata et al. 2005). Nur bei SOULIE et al. wurde in einer Kontrollgruppe von 30 Erwachsenen ein kleinerer Medianwert gemessen (Tab. 14).

**Tab. 14: MK-Grenzwerte im Vergleich**

Forschergruppe	MK-Grenzwerte (ng/ml)	Fallzahl
IKEMATSU et al. 2000	Mittelwert $0,154 \pm 0,076$	N = 135 Erwachsene
IKEMATSU et al. 2003	Median 0,205	N = 17 Kleinkinder/Säuglinge
SHIMIZU et al. 2003	Mittelwert $0,40 \pm 0,12$	N = 38 Erwachsene
MASHOUR et al. 2004	Mittelwert 0,78	N = 35 Kinder/Erwachsene
SOULIE et al. 2004	Median 0,01	N = 30 Erwachsene
OBATA et al. 2005	Median 0,17	N = 275 Erwachsene
Diese Untersuchung	Median 0,077	N = 215 Kinder

Für die Abweichungen zwischen den einzelnen Studien werden folgende Faktoren verantwortlich gemacht: der Einsatz von unterschiedlichen ELISA-Kits, die in vorangegangenen Studien sehr kleine pädiatrische Vergleichsgruppe und die Normalwertbestimmung bei erwachsenen Probanden. Die hier vorgestellte Studie ist die erste, die im Bereich der Pädiatrie über eine hinreichend große Datenbasis verfügt. Dass ein deutlich niedrigerer MK-Normalwert für Kinder ermittelt wurde, sollte Ausgangspunkt für weitere Studien sein.

In der hier untersuchten Kontrollgruppe war zu klären, ob die Faktoren Geschlecht, Größe, Gewicht und Alter einen Einfluss auf die MK-Konzentration im Serum der Kinder und Jugendlichen haben. Bisher konnte in verschiedenen Studien kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen MK und dem Geschlecht nachgewiesen werden (Ikematsu et al. 2000; Mashour et al. 2001; Soulie et al. 2004; Ren et al. 2006; Ruan et al. 2007). Da auch in der vorliegenden Stichprobe keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen bestanden, kann man davon ausgehen, dass das Geschlecht den MK-Wert nicht beeinflusst. Entgegen der Erwartung, dass ein Wachstumsfaktor wie Midkine abhängig von Körpergröße und Gewicht sein würde, war dies hier nicht der Fall. Dieser Zusammenhang wurde bisher nicht in anderen Studien untersucht. Aufgrund der höheren Normalwerte bei erwachsenen Probanden (Tab. 14) war zu erwarten, dass sich der MK-Wert mit dem Alter ändern würde. Es konnte keine Korrelation gefunden werden, was mit den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen übereinstimmt, die sich jedoch überwiegend auf das Erwachsenenalter beziehen (Ikematsu et al. 2000; Mashour et al. 2001; Shimada et al. 2003; Ren et al. 2006; Ruan et al. 2007).

## **5.2 Erhöhte Midkine-Werte in der Kontrollgruppe**

Bei einzelnen Kindern innerhalb der Kontrollgruppe wurden sehr hohe Midkine-Konzentrationen im Serum nachgewiesen. Es musste deshalb davon ausgegangen werden, dass entweder die Grunderkrankungen dieser Kontrollpatienten oder andere Faktoren das MK-Level im Serum beeinflussen. Da bereits bekannt war, dass die MK-Expression in der Reparaturphase von Knochenbrüchen, während des Heilungsprozesses von Magengeschwüren sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht ist (Maekawa et al. 1999; Ohta et al. 1999; Yuki et al. 2006) und dass MK an der Migration von Entzündungszellen beteiligt ist (Takada et al. 1997; Sato et al. 2001), wurde dies bei der Auswahl der Kontrollpatienten berücksichtigt. Obwohl alle Kontrollpatienten vor der Blutentnahme klinisch hinsichtlich einer akuten Infektion untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Patienten an einer subklinischen Entzündung litten, die in der Lage war, die MK-Expression zu triggern. Die hohen MK-Werte fanden sich insbesondere bei den im

Folgenden aufgeführten Untergruppen der Kontrollpatienten. Um eine Verzerrung der Daten durch diese Ausreißer zu verhindern, wurden alle statistischen Berechnungen nochmals nach Ausschluss der drei Subgruppen durchgeführt.

### **5.2.1 Kleinwuchs**

In der Gruppe der Kleinwuchs-Patienten fielen mehrere erhöhte Midkine-Werte auf. Ein Teil dieser Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Behandlung mit Wachstumshormon, sodass ein Zusammenhang mit der erhöhten MK-Expression vermutet wurde. Dieser Aspekt ist insbesondere im Kontext mit dem immer noch kontrovers diskutierten eventuell erhöhten Krebs-Risiko einer Wachstumshormontherapie interessant (Sheppard 2006; Swerdlow 2006). Bei genauerer Betrachtung stellte sich allerdings heraus, dass die Patienten, die bisher noch keine Wachstumshormontherapie erhalten hatten, höhere MK-Werte im Serum zeigten. Diese Daten erlauben die Annahme, dass die MK-Expression bei Wachstumsstörungen erhöht ist und nach Behandlung auf einen niedrigeren Spiegel zurückgeht.

### **5.2.2 Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten**

Bei Patienten mit einer Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte lagen die MK-Werte signifikant oberhalb des Durchschnittes der Kontrollpatienten. Die erhöhte MK-Expression bei dieser Fehlbildung könnte in Zusammenhang mit einem Mittelliniendefekt stehen. Hierbei ist auch an einen möglicherweise zusätzlich bestehenden Wachstumshormonmangel zu denken. Eine Überschneidung mit den Signalwegen von anderen an der Entstehung von Gesichtsspalten beteiligten Wachstums- und Signaltransduktionsfaktoren wie Sonic Hedgehog oder Bone Morphogenetic Protein (BMP) wurde bisher nicht beschrieben (Hu et al. 1999; Ashique et al. 2002).

### **5.2.3 Adipositas und Diabetes mellitus**

Bei 7 von 29 Patienten mit Adipositas bzw. Diabetes mellitus konnten hohe bis stark erhöhte MK-Werte nachgewiesen werden. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MK an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie beteiligt ist, ohne dabei den Blutglukosespiegel zu beeinflussen (Kosugi et al. 2006). Interessanterweise führt Adipositas ebenfalls zu einer verminderten Wachstumshormonsekretion (Veldhuis et al. 1996).

#### **5.2.4 Midkine, Wachstumshormon und Insulin-like Growth Factor**

Der erniedrigte Wachstumshormonspiegel wird also als eine mögliche Verbindung in der Pathogenese der o.g. Erkrankungen angesehen. Das Wachstumshormon steuert die Synthese und Freisetzung von Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) sowie die Anzahl der IGF-I-Rezeptoren. Beim Wachstumshormonmangel kommt es zu einer verminderten Konzentration von IGF-I. Hohe Spiegel von IGF-I führen in einem Regelkreis zu einer Hemmung der Wachstumshormon-Sekretion. IGF-I wird im Plasma an IGF-Bindungsproteine (IGFBP) gebunden transportiert und diese regulieren die Bindung von IGF-I an den IGF-Rezeptor.

Bei den folgenden Tumoren wurden Veränderungen in der IGF-Achse beschrieben: Die Konzentration des Insulin-like Growth Factor (IGF)-II mit hohem Molekulargewicht (9 - 15 kD) war im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten (N = 13) bei Wilms-Tumorpatienten (N = 16,  $p < 0.0001$ , t-Test nach Student) signifikant verringert, wohingegen die Spiegel des IGF-Binding-Protein-2 im Serum (N = 13,  $p < 0.0001$ ) wesentlich erhöht waren (Zumkeller et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die IGF-Binding-Protein-3-Protease-Aktivität im Serum von Rhabdomyosarkom- (N = 4,  $p < 0.05$ ) und Neuroblastom-Patienten (N = 5,  $p < 0.001$ , t-Test) im Vergleich zu Kontrollpatienten (N = 10) erhöht ist (Muller et al. 1994).

Die Ausreißer wurden alle in der Altersgruppe von ca. 6 bis 14 Jahren gefunden. Möglicherweise hängt dies ebenfalls mit der Ausschüttung von Wachstumshormon im Rahmen des pubertären Längenwachstumsschubes zusammen.

Inwieweit MK, Wachstumshormon und IGF im Rahmen dieser Erkrankungen interagieren, müssen weitere Studien zeigen, da dieser Zusammenhang bisher noch nicht untersucht wurde.



### **5.3 Erhöhte Midkine-Werte in der Studiengruppe**

Beim Vergleich der Studiengruppe mit der Kontrollgruppe ergaben sich für die Patienten mit soliden embryonalen Tumoren signifikant erhöhte MK-Werte (Median 0,62 ng/ml vs. 0,077 ng/ml bzw. 0 ng/ml).

#### **5.3.1 Nephroblastom**

Es konnte gezeigt werden, dass trunkiertes MK in Nephroblastom-Gewebeproben überexprimiert wird (Paul et al. 2001). Da es sich bei MK um ein sezerniertes Protein handelt, lag es nahe, dass auch die Serum-Konzentration erhöht sein würde, wenn das Tumorgewebe eine hohe MK-Expression zeigt. Tatsächlich konnten bei den Nephroblastom-Patienten signifikant erhöhte MK-Werte (Median 0,59 ng/ml) im Serum nachgewiesen werden.

#### **5.3.2 Neuroblastom**

Der Median der MK-Konzentration wurde für die gesamte Gruppe der zehn Neuroblastom-Patienten auf 0,84 ng/ml bestimmt, für Stadium III ist er 0,95 ng/ml und für Stadium IV liegt er bei 0,56 ng/ml. Die Ergebnisse einer vorherigen Untersuchung zeigten, dass die MK-Spiegel bei fortschreitendem Erkrankungsstadium anstiegen. Für Stadium I lagen sie bei 0,445 ng/ml, für Stadium II bei 0,589 ng/ml, Stadium III bei 0,864 ng/ml, Stadium IV bei 1,445 ng/ml und Stadium IVS bei 2,439 ng/ml. Interessanterweise war die MK-Konzentration bei der Gruppe im Stadium IVS in dieser Studie am höchsten, obwohl dieses Stadium einen deutlich günstigeren Verlauf zeigt (Ikematsu et al. 2003). In der vorliegenden Studie konnte die These, dass MK kontinuierlich stärker exprimiert wird, je weiter fortgeschritten das Tumorstadium ist, nicht bestätigt werden. Neben einer zu geringen Patientenanzahl ist die Tatsache, dass unsere Patienten ausschließlich auf die Stadien III und IV verteilt waren, als Ursache hierfür zu sehen.

#### **5.3.3 Rhabdomyosarkom**

Rhabdomyosarkome wurden bisher noch nicht auf eine Midkine-Expression untersucht. Es wurde die MK-Konzentration bei fünf RMS-Patienten gemessen, wobei in zwei Fällen stark erhöhte Werte nachgewiesen werden konnten. Der Unterschied der gesamten RMS-Gruppe zur Kontrollgruppe war jedoch nicht signifikant, woraus der Bedarf an weiteren Studien mit größerer Fallzahl zur Beteiligung von MK an der RMS-Entstehung abgeleitet wird.

### **5.3.4 Schwellenwert**

Mit einem Schwellenwert bei 0,176 ng/ml erreichte der verwendete ELISA-Test eine Sensitivität von über 86 %. Die Spezifität erreichte einen Wert von 58 %. Der Test kann bei dieser geringen Spezifität also nur für eine Screening-Untersuchung und nicht für einen Bestätigungs-Test verwendet werden, da man zu viele falsch positive Ergebnisse erwarten muss. Bei IKEMATSU et al. zeigten 87 % der 150 Karzinom-Patienten Werte über 0,5 ng/ml (Ikematsu et al. 2000). Wird der Schwellenwert in unserer Studie auf 0,5 ng/ml gelegt, sinkt die Sensitivität auf 66 % mit einer Spezifität bei 77 %. Beim Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus lag die Sensitivität bei 61 % mit einem Grenzwert von 0,3 ng/ml sowie einer Spezifität von 96,3 % (Shimada et al. 2003). Deshalb wird es für sinnvoll erachtet, dass für jeden unterschiedlichen ELISA-Test ein dazu gehöriger Grenzwert angegeben wird, da die Ergebnisse offensichtlich nicht von einem auf den anderen Test übertragbar sind.

## **5.4 Einflussfaktoren in der Studiengruppe**

### **5.4.1 Tumorvolumen**

Geht man davon aus, dass der Tumor den Wachstumsfaktor Midkine sezerniert, müsste der Serumwert mit dem Tumorvolumen ansteigen und nach Entfernung des Tumors zurückgehen. Beim Ösophagus-Karzinom waren die MK-Werte bei großen Tumoren (> 50 mm) höher ( $p = 0,049$ ) als bei kleineren (Shimada et al. 2003). Eine Studie über die MK-Expression bei oralen Plattenepithel-Karzinomen konnte ebenfalls eine Korrelation mit der Tumorgröße und dem Tumorstadium zeigen (Ruan et al. 2007). IKEMATSU et al. konnte allerdings bei verschiedenen Karzinomen keine Korrelation der MK-Werte mit dem Tumorvolumen nachweisen (Ikematsu et al. 2000). Auch für die gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) wurde kein Zusammenhang zwischen MK-Expression und Tumorgröße gefunden (Kaifi et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnte für die soliden embryonalen Tumoren ebenfalls keine Korrelation mit der Tumorgröße nachgewiesen werden.

### **5.4.2 Tumorstadium**

Trotz einer klaren Tendenz zu höheren MK-Konzentrationen bei fortschreitendem Tumorstadium, kann aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistisch gesicherte Aussage gemacht werden. Für das Neuroblastom konnte eine solche Korrelation bereits statistisch gesichert werden (Ikematsu et al. 2003). In einer anderen Studie konnten bei metastasierten Karzinomen tendenziell höhere Werte im Vergleich zu lokalisierten Stadien nachgewiesen werden, jedoch ohne statistische Signifikanz (Soulie et al. 2004). Für das Ösophagus-

Karzinom wurde kein Zusammenhang zwischen MK und der Tumorprogression bzw. dem klinischem Stadium gefunden (Shimada et al. 2003; Ren et al. 2006). Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass MK zwar eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese spielt, jedoch nicht bei der Tumorprogression.

### **5.4.3 Tumorentfernung**

Für das Hepatozelluläre Karzinom konnte in vier von fünf Fällen sieben Tage nach der Tumorentfernung ein starker Abfall der Midkine-Konzentration gezeigt werden (Ikematsu et al. 2000). Bei 19 Patienten mit einem Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus, die vor der Operation positiv für MK getestet wurden, konnte vier Wochen postoperativ gezeigt werden, dass die MK-Werte nach der Entfernung des Tumors absinken (Shimada et al. 2003). Es wurde der Einfluss der Tumor-Operation bei neun Patienten mit embryonalem Tumor untersucht. Bei fünf Patienten fällt die MK-Konzentration nach der Operation ab. Bei den Nephroblastom-Patienten, bei denen MK auf dem gleichen Niveau bleibt oder sogar ansteigt, könnten Tumor-assoziierte Faktoren wie Chemotherapie oder Operationstrauma der Grund für eine fortgesetzte MK-Sekretion sein.

## **5.5 Midkine-Werte im zeitlichen Verlauf**

### **5.5.1 Nephroblastom**

Bei drei der Nephroblastom-Patienten fällt die zunächst erhöhte Midkine-Serumkonzentration im Therapieverlauf deutlich ab. Die Abnahme der MK-Werte spiegelt wahrscheinlich das Ansprechen auf die Therapie wider, da bei allen drei Patienten durch die Therapie eine deutliche Volumenabnahme des Tumors erreicht werden konnte.

Ein vorübergehendes Ansteigen der MK-Werte nach Therapiebeginn bei sechs weiteren Patienten lässt sich durch die Gewebe schädigende Wirkung der Chemotherapeutika und eine darauf folgende erhöhte MK-Expression zurückführen. Gerade bei initial sehr großen Tumoren kann durch den Zerfall der Tumorzellen vermehrt MK ins Serum gelangen. Hierdurch kann es trotz gutem Ansprechen auf die Therapie zu erhöhten MK-Werten kommen. Der extrem hohe MK-Wert von 237,68 ng/ml nach vier Wochen Therapie zeigt bei einem Patienten (Patient 13) mit Lungenmetastasen möglicherweise bereits ein Fortschreiten der Erkrankung an. Das Ansprechen auf die Chemotherapie war gering und der Tumor konnte nur unvollständig entfernt werden (R2). Außerdem zeigte die Histologie einen malignen Rhabdoidtumor. Der Patient verstarb kurz nach der Tumorentfernung.

Für die trotz Tumorentfernung weiterhin hohe MK-Expression bei vier Patienten ist Folgendes anzunehmen. Die postoperativ durchgeführte Strahlentherapie (Patient 9) kann eine Entzündungsreaktion hervorgerufen haben, die wiederum die MK-Ausschüttung getriggert hat. Zum anderen wird ein nicht vollständig entfernter Tumor (Patient 8) weiterhin eine Sekretion des Wachstumsfaktors bewirken. Des Weiteren kann eine Restentzündung im Rahmen einer mit der Chemotherapie assoziierten Granulozytopenie nicht ausgeschlossen werden.

### **5.5.2 Neuroblastom**

Bei den Patienten 15 und 16 geht der Abfall der MK-Werte nicht mit einem verbesserten klinischen Zustand einher. Bei beiden handelte es sich um ein fortgeschrittenes Stadium und sie verstarben im Laufe der Therapie. Der MK-Verlauf bei Patient 17 entspricht ebenso nicht dem eines Tumormarkers: Trotz eines guten Ansprechens auf die Therapie steigt der Wert präoperativ an und fällt nach der OP wieder ab, obwohl der Tumor nicht entfernt werden konnte. Bei den Patienten 18 und 21 kommt es postoperativ zu einem Anstieg der Konzentration, obwohl die Tumoren gut auf die Chemotherapie angesprochen haben und operativ angegangen werden konnten. In der vorliegenden Studie war MK für das Neuroblastom kein geeigneter Parameter, um den Therapieverlauf zu beurteilen.

### **5.5.3 Rhabdomyosarkom**

Bei zwei der Rhabdomyosarkom-Patienten (Patient 26 und 29) wurde der Tumor primär entfernt, wodurch sich der schnelle Abfall bzw. die von vornherein niedrigen MK-Werte erklären lassen könnten. Die MK-Werte bleiben mit geringen Schwankungen auf einem niedrigen Niveau während des Therapieverlaufes. Ob die erhöhten MK-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Tumorerkrankung stehen oder durch Therapie bezogene Maßnahmen ausgelöst werden, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Es müssen weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen folgen, um die Rolle von MK beim Rhabdomyosarkom zu definieren.

## **5.6 Gesamtproteinkonzentration im Serum**

Bisher wurden die MK-Konzentrationen ausschließlich als absolute Werte angegeben. Es wäre jedoch möglich, dass die Ergebnisse aufgrund von Schwankungen in der Gesamtproteinmenge in einer Serumprobe verfälscht werden. Deshalb wurde die Gesamtproteinkonzentration in allen Proben bestimmt und die absoluten Werte auf diese Konzentration bezogen. Die Korrelation von absoluten zu relativen Werten ergab einen Wert von 0,99. Man

kann also davon ausgehen, dass es durch Verwendung der absoluten MK-Werte zu keiner signifikanten Veränderung der statistischen Ergebnisse kommt.

## **5.7 Expression von Midkine im Gewebe**

Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass MK in der Wilmstumor-Zelllinie G401 sowie in sechs Tumorgewebeproben sehr stark exprimiert wird (Tsutsui et al. 1993). PAUL et al. gelang der immunhistochemische Nachweis von trunkiertem MK mittels anti-MK-Antikörper in G401-Zellen sowie drei Wilmstumor-Gewebeproben (Paul et al. 2001). BARTHLEN et al. konnte in der Tumorzelllinie G401 ausschließlich eine MK mRNA-Expression der trunkierten Form nachweisen. In den Gewebeproben der Wilmstumor-Patienten konnte jedoch weder die trunkierte noch die Wildform gefunden werden (Barthlen et al. 2003). Bei zwei (1,7) der sechs untersuchten Gewebeproben konnte eine leicht erhöhte MK-Expression gefunden werden. Diese geht mit einer gering erhöhten präoperativen Serum-MK-Konzentration einher. Es ist davon auszugehen, dass die Tumorzellen durch die präoperative Chemotherapie zum Teil bereits nekrotisch waren und somit keine MK-mRNA mehr produziert haben. Eine unterschiedliche Beschaffenheit der Gewebeproben in den Studien könnte die gegensätzlichen Ergebnisse erklären. Aufgrund der präoperativen Chemotherapie ist eine Bestimmung von MK im Gewebe beim Nephroblastom zum Zeitpunkt der Operation als nicht sinnvoll anzusehen.

1995 wurde MK-mRNA erstmals in Gewebeproben von 72 primären Neuroblastomen sowie 11 Neuroblastom-Zelllinien nachgewiesen (Nakagawara et al. 1995). Andererseits gibt es eine Studie, bei der der Nachweis von MK nur in den Zelllinien nicht aber im Tumorgewebe gelang (Barthlen et al. 2003). Die MK-Expression ist in der vorliegenden Studie bei einer der beiden Neuroblastom-Proben auf das 3,5-fache erhöht. Bei diesem Patienten (18) konnte zwar vor der Operation kein MK im Serum nachgewiesen werden, dafür stieg der Wert postoperativ wieder an. Wird das zu untersuchende Gewebe im Rahmen der initial durchgeführten Biopsie und vor Beginn der Chemotherapie gewonnen, sind besser vergleichbare Ergebnisse zu erwarten.

## 6 Fazit und Ausblick

Es wurde ein Normalwert für Midkine bei Kindern und Jugendlichen festgelegt und es konnte gezeigt werden, dass die MK-Konzentration nicht von den Faktoren Geschlecht, Alter, Gewicht oder Größe abhängt. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Kontrollgruppe, konnten zum einen Erkrankungen identifiziert werden, die mit einer erhöhten MK-Konzentration einhergehen, zum anderen ist die Bewertung der Ergebnisse hierdurch erschwert worden. Bei einer Kontrollgruppe mit gesunden Kindern ist von stabileren MK-Werten mit weniger Ausreißern auszugehen.

Die MK-Serumwerte sind bei Kindern mit soliden embryonalen Tumorerkrankungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung statistisch signifikant erhöht. Die MK-Werte korrelieren jedoch nicht mit der Tumormasse oder dem Tumorstadium. Die Bestimmung von MK erlaubt keine zuverlässige Verlaufskontrolle zur Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie. Bei fünf von neun Patienten fällt die MK-Konzentration nach der operativen Tumorentfernung ab.

Bisher ist somit noch nicht genug über weitere Einflussfaktoren auf die MK-Serumkonzentration bekannt, um diese als verlässlichen Tumormarker verwenden zu können. Die vorliegende Studie kann jedoch ein Ausgangspunkt für weitere Forschung sein, insbesondere hinsichtlich der Rolle von MK bei Patienten mit Kleinwuchs, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten, Adipositas und Diabetes mellitus.

MK bietet dennoch die Möglichkeit für eine Reihe von neuen Therapieansätzen. Es konnte gezeigt werden, dass antisense Oligonukleotide gegen MK sowohl bei HepG2-Zellen eine Apoptose induzieren und die Chemosensibilität heraufsetzen als auch in einem Mausmodell des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) das Tumorstadium eindämmen können (Dai et al. 2006; Dai et al. 2007). Ein weiterer Ansatz der HCC-Therapie könnte der an Doxorubicin gebundene Anti-MK monoklonale Antikörper sein, da dieser das Wachstum der HepG2-Zellen *in vitro* signifikant verhindern konnte (Inoh et al. 2006).

Synthetische siRNA gegen MK konnte insbesondere in Kombination mit Paclitaxel die MK-Sekretion von Zellen der Prostata-Zelllinie PC-3 fast vollständig hemmen und in Folge dessen auch die Proliferation der transfizierten Zellen verhindern. Das Wachstum eines subkutan eingepflanzten PC-3-Tumors wurde ebenfalls effektiv unterdrückt (Takei et al. 2006).

Die Möglichkeit, MK als Promoter für eine Suizid-Gentherapie zu benutzen, wurde in verschiedenen Studien bereits untersucht. In einem Wilmstumor-Mausmodell mit einge-

pflanzten G-401-Zellen wurde nachgewiesen, dass eine Adenovirus-Suizid-Gentherapie mit MK-Promotor das Tumorwachstum signifikant verlangsamen konnte, ohne dabei einen tödlichen Leberschaden hervorzurufen (Adachi et al. 2002). Humane HCC-Zellen, die ebenfalls mit einem Adenovirus-Vektor mit MK-Promotor (AdMK) infiziert wurden, bildeten keine Tumoren, nachdem sie in immundefiziente Mäuse injiziert wurden. Des Weiteren führte das Einbringen von AdMK in Hepatozelluläre Karzinome bei Mäusen zu einem verringerten Tumorwachstum (Yu et al. 2004).

Es ist bekannt, dass das Tumorwachstum immer auch von der Interaktion der Tumorzellen mit der umgebenden extrazellulären Matrix abhängt. Eine wichtige Aufgabe wird es deshalb sein, den Einfluss von MK innerhalb dieser Tumorwachstumsmatrix zu erforschen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., S. Matsubara, T. Muramatsu, D. T. Curiel and P. N. Reynolds (2002). "Midkine promoter-based adenoviral suicide gene therapy to midkine-positive pediatric tumor." J Pediatr Surg **37**(4): 588-92.
- Adachi, Y., S. Matsubara, C. Pedraza, et al. (1996). "Midkine as a novel target gene for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1)." Oncogene **13**(10): 2197-203.
- Aridome, K., S. Takao, T. Kaname, et al. (1998). "Truncated midkine as a marker of diagnosis and detection of nodal metastases in gastrointestinal carcinomas." Br J Cancer **78**(4): 472-7.
- Aridome, K., J. Tsutsui, S. Takao, et al. (1995). "Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers." Jpn J Cancer Res **86**(7): 655-61.
- Ashique, A. M., K. Fu and J. M. Richman (2002). "Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion." Development **129**(19): 4647-60.
- Barthlen, W., D. Flaadt, R. Giergert, et al. (2003). "Significance of heparin-binding growth factor expression on cells of solid pediatric tumors." J Pediatr Surg **38**(9): 1296-304.
- Bates, S. E. and D. L. Longo (1987). "Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management." Semin Oncol **14**(2): 102-38.
- Brodeur, G. M., J. Pritchard, F. Berthold, et al. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." J Clin Oncol **11**(8): 1466-77.
- Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." Science **224**(4653): 1121-4.
- Call, K. M., T. Glaser, C. Y. Ito, et al. (1990). "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus." Cell **60**(3): 509-20.
- Caron, H., P. van Sluis, J. de Kraker, et al. (1996). "Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med **334**(4): 225-30.
- Choudhuri, R., H. T. Zhang, S. Donnini, M. Ziche and R. Bicknell (1997). "An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis." Cancer Res **57**(9): 1814-9.
- Coppes, M. J. (1993). "Serum biological markers and paraneoplastic syndromes in Wilms tumor." Med Pediatr Oncol **21**(3): 213-21.
- CWS (2002). "Studienprotokoll der CWS 2002-Studie."
- Dai, L. C., X. Wang, X. Yao, et al. (2006). "Antisense oligonucleotides targeting midkine induced apoptosis and increased chemosensitivity in hepatocellular carcinoma cells." Acta Pharmacol Sin **27**(12): 1630-6.
- Dai, L. C., X. Wang, X. Yao, et al. (2007). "Antisense oligonucleotides targeting midkine inhibit tumor growth in an in situ human hepatocellular carcinoma model." Acta Pharmacol Sin **28**(3): 453-8.
- Delahunt, B., M. E. Lewis, K. C. Pringle, E. J. Wiltshire and M. J. Crooke (2001). "Serum creatine kinase levels parallel the clinical course for rhabdomyomatous Wilms tumor." Am J Clin Pathol **116**(3): 354-9.
- Eggert, A., N. Ikegaki, X. G. Liu and G. M. Brodeur (2000). "Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma." Klin Padiatr **212**(4): 200-5.



- El-Badry, O. M., C. Minniti, E. C. Kohn, et al. (1990). "Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors." Cell Growth Differ **1**(7): 325-31.
- Fischinger, P. J. and V. T. DeVita, Jr. (1984). "Governance of science at the National Cancer Institute: perceptions and opportunities in oncogene research." Cancer Res **44**(10): 4693-6.
- Friedrich, C., N. Holtkamp, J. Cinatl, Jr., et al. (2005). "Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency." Int J Oncol **27**(5): 1433-40.
- Garver, R. I., Jr., C. S. Chan and P. G. Milner (1993). "Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues." Am J Respir Cell Mol Biol **9**(5): 463-6.
- Garver, R. I., Jr., D. M. Radford, H. Donis-Keller, M. R. Wick and P. G. Milner (1994). "Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue." Cancer **74**(5): 1584-90.
- Gluer, S., C. Schelp, R. Gerardy-Schahn and D. von Schweinitz (1998). "Polysialylated neural cell adhesion molecule as a marker for differential diagnosis in pediatric tumors." J Pediatr Surg **33**(10): 1516-20.
- Godzinski, J., M. F. Tournade, J. De Kraker, et al. (1999). "The role of preoperative chemotherapy in the treatment of neuroblastoma: the SIOP experience. Societe Internationale d'Oncologie Pediatrique." Semin Urol Oncol **17**(1): 28-32.
- Godzinski, J., M. F. Tournade, J. deKraker, et al. (1998). "Rarity of surgical complications after postchemotherapy nephrectomy for neuroblastoma. Experience of the International Society of Paediatric Oncology-Trial and Study "SIOP-9". International Society of Paediatric Oncology Neuroblastoma Trial and Study Committee." Eur J Pediatr Surg **8**(2): 83-6.
- GPOH (2004). Studienprotokoll der NB 2004-Studie.
- Gutjahr, P. (2004). Krebs bei Kindern und Jugendlichen, Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hann, H. W., M. W. Stahlhut and A. E. Evans (1985). "Serum ferritin as a prognostic indicator in neuroblastoma: biological effects of isoferritins." Prog Clin Biol Res **175**: 331-45.
- Horiba, M., K. Kadomatsu, E. Nakamura, et al. (2000). "Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice." J Clin Invest **105**(4): 489-95.
- Hu, D. and J. A. Helms (1999). "The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis." Development **126**(21): 4873-84.
- Ikematsu, S., A. Nakagawara, Y. Nakamura, et al. (2003). "Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas." Br J Cancer **88**(10): 1522-6.
- Ikematsu, S., A. Yano, K. Aridome, et al. (2000). "Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas." Br J Cancer **83**(6): 701-6.
- Inoh, K., H. Muramatsu, S. Torii, et al. (2006). "Doxorubicin-conjugated anti-midkine monoclonal antibody as a potential anti-tumor drug." Jpn J Clin Oncol **36**(4): 207-11.
- Iwasaki, W., K. Nagata, H. Hatanaka, et al. (1997). "Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor." Embo J **16**(23): 6936-46.
- Kadomatsu, K., M. Hagihara, S. Akhter, et al. (1997). "Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells." Br J Cancer **75**(3): 354-9.
- Kadomatsu, K., R. P. Huang, T. Suganuma, F. Murata and T. Muramatsu (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): 607-16.
- Kadomatsu, K. and T. Muramatsu (2004). "Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer." Cancer Lett **204**(2): 127-43.
- Kadomatsu, K., M. Tomomura and T. Muramatsu (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): 1312-8.
- Kaifi, J. T., H. C. Fiegel, S. L. Rafnsdottir, et al. (2007). "Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors." J Cancer Res Clin Oncol.
- Kaname, T., K. Kadomatsu, K. Aridome, et al. (1996). "The expression of truncated MK in human tumors." Biochem Biophys Res Commun **219**(1): 256-60.
- Kato, M., T. Shinozawa, S. Kato, A. Awaya and T. Terada (2000). "Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma." Arch Pathol Lab Med **124**(6): 848-52.
- Kato, S., K. Ishihara, T. Shinozawa, et al. (1999). "Monoclonal antibody to human midkine reveals increased midkine expression in human brain tumors." J Neuropathol Exp Neurol **58**(5): 430-41.
- Kinderkrebsregister, D. (2004). Jahresbericht 2004.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Kojima, S., T. Inui, H. Muramatsu, 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): 574-81.
- Kojima, S., H. Muramatsu, H. Amanuma and T. Muramatsu (1995). "Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells." J Biol Chem **270**(16): 9590-6.
- Konishi, N., M. Nakamura, S. Nakaoka, et al. (1999). "Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma." Oncology **57**(3): 253-7.
- Kosugi, T., Y. Yuzawa, W. Sato, et al. (2006). "Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy." Am J Pathol **168**(1): 9-19.
- Laug, W. E., S. E. Siegel, K. N. Shaw, et al. (1978). "Initial urinary catecholamine metabolite concentrations and prognosis in neuroblastoma." Pediatrics **62**(1): 77-83.
- Look, A. T. (1995). "Oncogenic role of "master" transcription factors in human leukemias and sarcomas: a developmental model." Adv Cancer Res **67**: 25-57.
- Look, A. T., F. A. Hayes, J. J. Shuster, et al. (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol **9**(4): 581-91.
- Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, T. Kimura, et al. (1999). "A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta." J Biol Chem **274**(18): 12474-9.
- Maekawa, T., S. Waki, A. Okada, et al. (1999). "Midkine gene expression in the healing process of gastric ulcer." J Lab Clin Med **133**(4): 349-52.
- Mashour, G. A., P. H. Driever, M. Hartmann, et al. (2004). "Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1." Clin Cancer Res **10**(17): 5677-83.
- Mashour, G. A., N. Ratner, G. A. Khan, et al. (2001). "The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells." Oncogene **20**(1): 97-105.
- Matsubara, S., M. Take, C. Pedraza and T. Muramatsu (1994). "Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding

- growth/differentiation factor with neurotrophic activity." J Biochem (Tokyo) **115**(6): 1088-96.
- Michikawa, M., S. Kikuchi, H. Muramatsu, T. Muramatsu and S. U. Kim (1993). "Retinoic acid responsive gene product, midkine, has neurotrophic functions for mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in culture." J Neurosci Res **35**(5): 530-9.
- Michikawa, M., R. Y. Xu, H. Muramatsu, T. Muramatsu and S. U. Kim (1993). "Midkine is a mediator of retinoic acid induced neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells." Biochem Biophys Res Commun **192**(3): 1312-8.
- Miyashiro, I., T. Kaname, T. Nakayama, et al. (1996). "Expression of truncated midkine in human colorectal cancers." Cancer Lett **106**(2): 287-91.
- Miyashiro, I., T. Kaname, E. Shin, et al. (1997). "Midkine expression in human breast cancers: expression of truncated form." Breast Cancer Res Treat **43**(1): 1-6.
- Muller, H. L., Y. Oh, S. E. Gargosky, et al. (1994). "Insulin-like growth factor binding protein-3 concentrations and insulin-like growth factor binding protein-3 protease activity in sera of patients with malignant solid tumors or leukemia." Pediatr Res **35**(6): 720-4.
- Muramatsu, H., H. Shirahama, S. Yonezawa, H. Maruta and T. Muramatsu (1993). "Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution." Dev Biol **159**(2): 392-402.
- Muramatsu, H., X. J. Song, N. Koide, et al. (1996). "Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas." J Biochem (Tokyo) **119**(6): 1171-5.
- Muramatsu, T. (1993). "Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation." Int J Dev Biol **37**(1): 183-8.
- Muramatsu, T. (2002). "Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis." J Biochem (Tokyo) **132**(3): 359-71.
- Nakagawara, A., J. Milbrandt, T. Muramatsu, et al. (1995). "Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas." Cancer Res **55**(8): 1792-7.
- Nakanishi, T., K. Kadomatsu, T. Okamoto, et al. (1997). "Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine." J Biochem (Tokyo) **121**(2): 197-205.
- Nurcombe, V., N. Fraser, E. Herlaar and J. K. Heath (1992). "MK: a pluripotential embryonic stem-cell-derived neuroregulatory factor." Development **116**(4): 1175-83.
- Obata, Y., S. Kikuchi, Y. Lin, et al. (2005). "Serum midkine concentrations and gastric cancer." Cancer Sci **96**(1): 54-6.
- O'Hara, B., N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, et al. (1995). "Chromosomal assignment of the heparin-binding cytokine genes MDK and PTN in mouse and man." Cytogenet Cell Genet **69**(1-2): 40-3.
- Ohta, S., H. Muramatsu, T. Senda, et al. (1999). "Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis." J Bone Miner Res **14**(7): 1132-44.
- Paul, S., T. Mitsumoto, Y. Asano, et al. (2001). "Detection of truncated midkine in Wilms' tumor by a monoclonal antibody against human recombinant truncated midkine." Cancer Lett **163**(2): 245-51.
- Rebhandl, W., B. Rami, J. Turnbull, et al. (1998). "Diagnostic value of tissue polypeptide-specific antigen (TPS) in neuroblastoma and Wilms' tumour." Br J Cancer **78**(11): 1503-6.
- Ren, Y. J. and Q. Y. Zhang (2006). "Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma." World J Gastroenterol **12**(13): 2006-10.

- Ruan, M., T. Ji, Z. Wu, J. Zhou and C. Zhang (2007). "Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis." Int J Oral Maxillofac Surg **36**(2): 159-64.
- Sato, W., K. Kadomatsu, Y. Yuzawa, et al. (2001). "Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury." J Immunol **167**(6): 3463-9.
- Scrabble, H., W. Cavenee, F. Ghavimi, et al. (1989). "A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7480-4.
- Seeger, R. C., G. M. Brodeur, H. Sather, et al. (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." N Engl J Med **313**(18): 1111-6.
- Sheppard, M. C. (2006). "Growth hormone therapy does not induce cancer." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **2**(10): 532-3.
- Shibata, Y., T. Muramatsu, M. Hirai, et al. (2002). "Nuclear targeting by the growth factor midkine." Mol Cell Biol **22**(19): 6788-96.
- Shimada, H., Y. Nabeya, M. Tagawa, et al. (2003). "Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Sci **94**(7): 628-32.
- Shimizu, E., K. Hashimoto, R. H. Salama, et al. (2003). "Two clusters of serum midkine levels in drug-naive patients with schizophrenia." Neurosci Lett **344**(2): 95-8.
- Shuster, J. J., N. B. McWilliams, R. Castleberry, et al. (1992). "Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study." Am J Clin Oncol **15**(4): 295-303.
- SIOP (2001). Studienprotokoll der SIOP 2001-Studie.
- Sorensen, P. H., J. C. Lynch, S. J. Qualman, et al. (2002). "PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group." J Clin Oncol **20**(11): 2672-9.
- Soulie, P., M. Heroult, I. Bernard-Pierrot, et al. (2004). "Correlation of elevated plasma levels of two structurally related growth factors, heparin affin regulatory peptide and midkine, in advanced solid tumor patients." Cancer Detect Prev **28**(5): 319-24.
- Stanbridge, E. J. (1976). "Suppression of malignancy in human cells." Nature **260**(5546): 17-20.
- Stoica, G. E., A. Kuo, C. Powers, 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): 35990-8.
- Swerdlow, A. J. (2006). "Does growth hormone therapy increase the risk of cancer?" Nat Clin Pract Endocrinol Metab **2**(10): 530-1.
- Takada, T., K. Toriyama, H. Muramatsu, et al. (1997). "Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis." J Biochem (Tokyo) **122**(2): 453-8.
- Takei, Y., K. Kadomatsu, T. Goto and T. Muramatsu (2006). "Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts." Cancer **107**(4): 864-73.
- Tsutsui, J., K. Kadomatsu, S. Matsubara, 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): 1281-5.
- Tsutsui, J., K. Uehara, K. Kadomatsu, S. Matsubara and T. Muramatsu (1991). "A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse." Biochem Biophys Res Commun **176**(2): 792-7.

- Uehara, K., S. Matsubara, K. Kadomatsu, J. Tsutsui and T. Muramatsu (1992). "Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor." *J Biochem (Tokyo)* **111**(5): 563-7.
- Unoki, K., N. Ohba, H. Arimura, H. Muramatsu and T. Muramatsu (1994). "Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by midkine, a retinoic acid-responsive gene product." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(12): 4063-8.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.
- Veldhuis, J. D. and A. Iranmanesh (1996). "Physiological regulation of the human growth hormone (GH)-insulin-like growth factor type I (IGF-I) axis: predominant impact of age, obesity, gonadal function, and sleep." *Sleep* **19**(10 Suppl): S221-4.
- Yamada, H., T. Inazumi, S. Tajima, H. Muramatsu and T. Muramatsu (1997). "Stimulation of collagen expression and glycosaminoglycan synthesis by midkine in human skin fibroblasts." *Arch Dermatol Res* **289**(7): 429-33.
- Ye, C., M. Qi, Q. W. Fan, et al. (1999). "Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer." *Br J Cancer* **79**(1): 179-84.
- Yu, L., K. Hamada, M. Namba, 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): 1787-94.
- Yuki, T., S. Ishihara, M. A. Rumi, et al. (2006). "Increased expression of midkine in the rat colon during healing of experimental colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(4): G735-43.
- Zeltzer, P. M., P. J. Marangos, A. M. Parma, et al. (1983). "Raised neuron-specific enolase in serum of children with metastatic neuroblastoma. A report from the Children's Cancer Study Group." *Lancet* **2**(8346): 361-3.
- Zumkeller, W., J. Schwander, C. D. Mitchell, et al. (1993). "Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in the plasma of children with Wilms' tumour." *Eur J Cancer* **29A**(14): 1973-7.

## **8 Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Die vorliegende Dissertation entstand an der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité –Universitätsmedizin Berlin. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Henze für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Dr. Pablo Hernáiz Driever für die wertvollen Hinweise und Ratschläge, die mir bei der Organisation und Durchführung der Arbeit eine große Hilfe waren.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Barthlen und Herrn Dr. Schnabel für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung von Studienteilnehmern auf der kinderchirurgischen Station und in der endokrinologischen Sprechstunde.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Dr. Sakuma, Cell Signals, Japan für die freundliche Bereitstellung der Midkine ELISA Kits.

Für die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Arbeit möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Eva Göncz, Herrn Dr. Carsten Friedrich, Herrn Dr. Andreas Kurtz, Frau Dr. Cornelia Eckert, Frau Shabnam Shalapour, Herrn Dr. Javier Prada, Frau Evelyn Strauss und Frau Andrea Zelmer. Ein Dankeschön auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei Matthias Wanske, Merja Mahrt und meinen Eltern für die Durchsicht des Skriptes bedanken.

## **8.2 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **8.3 Publikationen**

### **Kongressbeitrag SIOP 2006**

Lucas S, Kurtz A, Henze G, Schnabel D, Barthlen W, Reindl T, Sakuma S, Hernáiz Driever P: Increased midkine serum levels in pediatric embryonal tumor patients compared to normal children and adolescents, *Ped Blood Cancer*, 47:408 (2006).

### **Originalarbeiten**

Lucas S, Henze G, Schnabel D, Barthlen W, Sakuma S, Hernáiz Driever P. Serum levels of Midkine in children and adolescents without malignant disease, *Pediatrics International*, Vol.52, No.5, Oktober, 2010.

Lucas S, Reindl T, Henze G, Kurtz A, Sakuma S, Hernáiz Driever P. Increased midkine serum levels in pediatric embryonal tumor patients, *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, angenommen im Juli, 2009.



#### **8.4 Erklärung an Eides Statt**

„Ich, Susanne Lucas, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Nachweis von löslichem Midkine bei soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“