

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

DISSERTATION

**Modulation der Biologie maligner peripherer
Nervenscheidentumorzellen durch Midkine**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Carsten Friedrich
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
 2. Prof. Dr. med. A. von Deimling
 3. Prof. Dr. T. Pietsch

Datum der Promotion: 07.09.2007

Zusammenfassung

Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) sind aggressive Weichteiltumoren, die sporadisch auftreten können. Häufiger sind sie jedoch mit der Neurofibromatose vom Typ 1 (NF1) assoziiert. Die Prognose von MPNST ist unverändert ungünstig, da die Tumoren zumeist chirurgisch nicht resezierbar sind. Eine adjuvante Therapie mit Chemo- und Radiotherapie kann das Überleben kaum beeinflussen. Für MPNST gibt es zur Zeit kein Xenotransplantatmodell. Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine (MK) scheint wesentlich an der Tumorgenese von Neurofibromen und MPNST beteiligt zu sein. MK wirkt mitogen, anti-apoptotisch, angiogen und fördert die Tumorigenität von Zelllinien neuroektodermalen Ursprungs.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss von MK auf das maligne Verhalten und besonders die Tumorigenität von MPNST zu untersuchen. Hierzu wurden MPNST-Zelllinien stabil transfiziert. Zum Nachweis der Überexpression von MK auf der Ebene der Ribonukleinsäuren (RNS) wurde eine reverse Transkription mit anschließender quantitativer Polymerasenkettenreaktion (quantitative RT-PCR) etabliert. Zur Messung der Proteinkonzentration von MK im konditionierten Medium wurde ein Enzym-Immunoassay (ELISA) verwendet. Die Analyse der Wachstumsraten der verschiedenen Zelllinien erfolgte mit einem Dimethylthiazol-carboxymethoxyphenyl-sulfophenyl-tetrazolium-Assay (MTS-Assay). Die Chemosensitivität der Zelllinien gegenüber Vincristin wurde ebenfalls mit dieser Methode untersucht. Zur Apoptosemessung wurde ein TUNEL- („terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling“-) Assay etabliert, da die Messung durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Annexin und Propidiumjodid keine eindeutigen Interpretationen ermöglichte.

MPNST-Zelllinien sind nicht tumorigen. Auch die stabile Überexpression von MK in S462- sowie in ST88-14-Zellen war nicht ausreichend, um ein Tumorwachstum in Nod/Scid- („non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency“-) Mäusen zu induzieren. Dafür erhöhte die Überexpression von MK in der MPNST Zelllinie S462 die Zellvitalität unter Serumentzug. Auch externe Addition von MK steigerte die Vitalität der MPNST-Zellen. Die Überexpression von MK schützte S462-Zellen vor durch Serumentzug induzierter Apoptose und ist wahrscheinlich als Ursache für die erhöhte Vitalität anzusehen. Eine Stimulation des Wachstums wurde durch MK nicht induziert. Außerdem führte die Transfektion von MK zu einer Abnahme der Chemosensitivität gegenüber Vincristin. Konditioniertes Medium von mit MK transfizierten S462-Zellen war ein potentes Mitogen für humane venöse Endothelzellen

(HUVEC). Auch andere angiogene Faktoren im konditionierten Medium könnten neben MK für die Stimulierung des Wachstums der HUVEC verantwortlich sein. So war die MK-Überexpression in S462-Zellen begleitet von höheren RNS-Konzentrationen des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die stabile Transfektion von MK in S462-Zellen das Überleben steigert und die angiogene Potenz erhöht. Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von MK als Teil eines neuen therapeutischen Ansatzes zur Behandlung von MPNST ist daher möglicherweise vielversprechend.

Schlagwörter: MPNST, NF1, Midkine, Tumorigenität, Apoptose, Angiogenese

Abstract

Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) are aggressive soft tissue tumors arising sporadically, but more frequently in patients with Neurofibromatosis type 1 (NF1). Prognosis of MPNST is dismal because most of the tumors are surgically not resectable. So far adjuvant therapy using chemotherapy and radiation has only little influence on the survival rate of MPNST patients. The heparin-binding growth factor Midkine (MK) is implicated in the tumorigenesis of neurofibromas and MPNST. MK is mitogenic, anti-apoptotic, angiogenic and promotes tumorigenicity in tumor cells of neuroectodermal origin.

So far, there is no xenograft animal model available. Thus, we investigated the role of MK in terms of tumorigenicity and malignant biology in MPNST cells using stable transfection of MK into MPNST cell lines. For the detection of MK overexpression on the ribonucleic acid (RNA) level a reverse transcription with following quantitative polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR) was established. The concentration of MK protein in conditioned medium was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) normally used to determine MK in patient samples. The growth rate of MPNST cells and human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) was analysed using a dimethylthiazol-carboxymethoxyphenyl-sulfophenyl-tetrazolium (MTS) assay. Also, the chemosensitivity to vincristine of MPNST cells was analysed using this method. A terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was established for the detection of apoptosis, as fluorescence tagged annexin and propidium iodide yielded conflicting results.

Current MPNST cell lines are not tumorigenic. Stable overexpression of MK into the cell lines S462 and ST88-14 was insufficient to induce tumor growth in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency (nod/scid) mouse xenotransplant model. But, overexpression of MK in the MPNST cell line S462 increased cell viability when stressed by serum deprivation. Also, the external addition of MK increased the viability of the cells. Stable transfection of MK protected S462 cells of apoptosis induced by serum deprivation and probably caused the increased viability. MK overexpression could not increase the growth rate in transfected cells. Additionally, the chemosensitivity to vincristine was decreased after stable transfection of MK. Conditioned medium of MK overexpressing S462 cells was a potent mitogen for human venous endothelial cells (HUVEC). Furthermore, MK overexpression in S462 cells was accompanied by higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) RNA suggesting that other angiogenic factors induced by MK overexpression participated in the stimulation of HUVEC

growth rate.

These results demonstrate that stable transfection of MK in S462 MPNST cells increases their survival and angiogenic potency. They highlight the importance of developing specific inhibitors for MK as part of new therapeutic concepts against MPNST.

Keywords: MPNST, NF1, Midkine, tumorigenicity, apoptosis, angiogenesis

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	MPNST.....	1
1.1.1	MPNST im Rahmen der Neurofibromatose 1.....	1
1.1.2	MPNST im Kindesalter.....	2
1.1.3	Tumorgenese und Tumorprogression.....	3
1.2	Midkine.....	5
1.2.1	Gen-/Proteinstruktur.....	7
1.2.2	Rezeptoren und Signaltransduktion.....	7
1.2.3	Biologische Aktivität.....	8
1.2.4	Midkineexpression in Tumoren.....	9
2	FRAGESTELLUNG.....	11
3	MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1	Zellkultur.....	12
3.2	Transfektion der MPNST-Zelllinien.....	12
3.2.1	Vektoren.....	12
3.2.2	Transformation kompetenter E.coli.....	13
3.2.3	Plasmidpräparation.....	14
3.2.4	Restriktionsanalyse.....	14
3.2.5	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	15
3.2.6	Stabile Transfektion der MPNST-Zelllinien S520 und S462.....	16
3.3	Bestimmung der Genexpression von Midkine.....	16
3.3.1	RNS-Isolation.....	16
3.3.2	Reverse Transkription.....	17
3.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	17
3.3.3.1	Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17

3.3.3.2	Quantitative Echtzeit RT-PCR mit dem LightCycler	18
3.3.3.3	Standardkurve.....	19
3.3.3.4	Normalisierung.....	19
3.3.3.5	Kalibrierung	19
3.3.3.6	Schmelzkurvenanalyse.....	20
3.3.3.7	Primer	20
3.3.3.8	Reaktionsansatz der PCR	20
3.3.3.9	Reaktionsbedingungen der PCR.....	20
3.4	Bestimmung der Genexpression von VEGF	21
3.5	Bestimmung der Proteinexpression von Midkine mit ELISA	21
3.6	Tumorigenitätsassay in Nod/Scid-Mäusen.....	22
3.7	Untersuchung von Zellwachstum und –vitalität	22
3.7.1	Vitalitätsassay unter Serumentzug	22
3.7.2	Chemosensitivitätsassay	22
3.7.3	HUVEC-Proliferationsassay	23
3.7.4	MTS-Assay.....	23
3.8	Bestimmung der Apoptoserate.....	23
3.8.1	Färbung mit Annexin-FITC und Propidiumjodid	24
3.8.2	TUNEL-Assay.....	24
3.9	Statistische Auswertung.....	24
4	ERGEBNISSE.....	26
4.1	Generierung stabil Midkine überexprimierender MPNST-Zellklone	26
4.1.1	Optimierung der Transfektionseffizienz von MPNST-Zelllinien.....	26
4.1.2	Stabile Transfektion von MPNST-Zelllinien	27
4.2	Selektion MK überexprimierender Klone	27
4.2.1	Etablierung einer quantitativen RT-PCR für MK	27
4.2.2	Genexpression von MK in den MPNST-Zellklonen.....	29

4.2.3	MK-Konzentration im konditionieren Medium der S462-Klone.....	32
4.3	Tumorigenitätsassay in Nod/Scid-Mäusen.....	34
4.4	Einfluss der MK-Überexpression auf Tumorzelleigenschaften.....	34
4.4.1	Zellvitalität und Chemosensitivität	34
4.4.2	Apoptose.....	38
4.4.3	Proliferation von HUVEC.....	42
4.4.4	VEGF-Genexpression	43
5	DISKUSSION	44
5.1	Nachweis von MK in MPNST-Zellen	44
5.1.1	Genexpression von MK.....	44
5.1.2	Proteinkonzentration von MK im Zellkulturmedium.....	45
5.1.3	Vergleich zwischen der Gen- und Proteinexpression von MK.....	45
5.2	Tumorigenitätsverhalten bei MK-Überexpression	46
5.3	Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch MK.....	48
5.3.1	Zellvitalität der MPNST-Zellen nach Serumentzug.....	48
5.3.2	Mitogene Rolle von MK in anderen Zelllinien	48
5.3.3	Chemosensitivität gegenüber Vincristin und Cisplatin.....	49
5.4	Einfluss auf die Apoptose durch MK	50
5.4.1	Anti-apoptotische Eigenschaften in unterschiedlichen Zellkultursystemen	50
5.5	Induktion eines pro-angiogenetischen Phänotyps durch MK.....	51
5.5.1	<i>In vitro</i> Proliferation von Endothelzellen.....	51
5.5.2	Pro-angiogene Eigenschaften von MK in MPNST	52
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	53
6	LITERATURVERZEICHNIS	56
7	ANHANG	68

7.1 Danksagungen.....	68
7.1 Veröffentlichungen.....	69
7.2 Lebenslauf.....	70
7.3 Eidesstattliche Erklärung.....	71

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaar
Br-UTP	Bromierte Desoxynukleotidyltransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdk	Cyclin abhängige Kinase
CDNA	Komplementäre Desoxynukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
Cp	„crossing point“, Schnittpunkt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	„epidermal growth factor“, epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, Enzym-Immunoassay
ERK	Extrazelluläre Signal-abhängige Kinase
FGF	„fibroblast growth factor“, Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBGF	Heparin-bindender Wachstumsfaktoren
HGF	„hepatocyte growth factor“, Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen
LB-Medium	Luria Broth, Bakterienmedium
LOH	„loss of heterozygoty“, Verlust der Heterozygotie
LRP	„low density lipoprotein receptor related protein“, mit dem Rezeptor des Lipoprotein geringer Dichte verwandtes Protein
MDK	Humanes Midkine kodierendes Gen
MK	Midkine
MPNST	Maligne periphere Nervenscheidentumoren

MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF1	Neurofibromatose vom Typ 1
NIH	National Institute of Health
NTC	„no template control“, Kontrolle ohne Matrize
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	„platelet derived growth factor“, von Thrombozyten hergeleiteter Wachstumsfaktor
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RDGF	„retina derived growth factor“, von der Retina hergeleiteter Wachstumsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TGF	„transforming growth factor“, transformierender Wachstumsfaktor
TUNEL	„terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“, vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
WT1	Wilms-Tumorsuppressorprotein

1 EINLEITUNG

1.1 MPNST

Maligne Nervenscheidentumoren (Neurofibrosarkome, MPNST) wachsen als hochmaligne Tumoren entlang peripherer neuronaler Strukturen. Eine große Anzahl an MPNST befindet sich in tieferen Körperregionen im Stammbereich. Seltener treten die Tumoren in den distalen Extremitäten auf, die eine Entfernung *in sano* ermöglichen. Leitsymptome sind Schmerzen, eine wachsende Raumforderung oder Funktionsausfall der betroffenen neuronalen Strukturen (1).

MPNST haben in der allgemeinen Bevölkerung eine Inzidenz von jährlich 0,001%. Der Altersdurchschnitt bei Diagnosestellung eines MPNST liegt bei 34 Jahren. Die lokale Rezidivrate von 38% ist u.a. darin begründet, dass eine lokale Kontrolle von MPNST in der Kopf-/Halsregion oder im Abdominalraum selten möglich ist. In 40% der Fälle erfolgt eine Metastasierung meist in die Lunge, Lymphknoten oder Leber (1). Patienten mit MPNST haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 34-52% eine ungünstige Prognose (1,2).

Die Therapie von MPNST entspricht der multimodalen Therapie maligner Weichteiltumoren. Eine Resektion *in sano* (R0) ist der wichtigste prognostische Faktor. Adjuvante Radiotherapie inklusive Brachytherapie und intraoperativer Elektronenbestrahlung (IOERT) können die Prognose verbessern (2). MPNST haben vermutlich ein intermediäres Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika (3).

1.1.1 MPNST im Rahmen der Neurofibromatose 1

Die Neurofibromatose vom Typ 1 (Morbus von Recklinghausen, NF1) hat eine Inzidenz von 1:3500 unabhängig von ethnischer Herkunft und Geschlecht. Sie wird autosomal-dominant vererbt, tritt aber zur Hälfte durch Neumutation in Keimzellen auf. Das *NF1*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17q11.2. Das Genprodukt Neurofibromin funktioniert als Tumorsuppressor (4,5).

Die Diagnosekriterien von NF1 umfassen Neurofibrome, Pigmentierungsstörungen (Café-au-lait-Flecken, axilläre oder inguinale Lentigines, Lisch-Knötchen der Iris) und Knochendysplasien.

Zu den Tumorerkrankungen zählen vor allem bei Kindern neben Neurofibromen und MPNST Astrozytome, insbesondere der Sehbahn, aber auch an anderen Stellen des zentralen

Nervensystems (ZNS), Rhabdomyosarkome und akute myeloische Leukämien (6,7).

Fast alle NF1-Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens Neurofibrome. Neurofibrome sind gutartige periphere Nervenscheidentumoren, die aus Schwannzellen und Fibroblasten eingebettet in Perineuralzellen, Axonen und Mastzellen in extrazellulärer Matrix bestehen (8). Sie treten meist multipel als kutane Tumoren, spinale Tumoren oder diffus in verschiedenen Körperregionen auf. Seltener entstehen plexiforme Neurofibrome. Ihre Inzidenz liegt bei ungefähr 25-30% unter den NF1-Patienten. Plexiforme Neurofibrome treten im Ausbreitungsgebiet eines peripheren Nervs auf und können sich netzartig auf zahlreiche Faszikel und Nervenäste ausbreiten. Maligne periphere Nervenscheidentumoren wachsen oft auf dem Boden plexiformer Neurofibrome. Da innerhalb der MPNST Neurofibromstrukturen vorhanden sein können und zumindest einige MPNST das schwannzellspezifische Protein S-100 exprimieren (9,10), unterstützt dieser Befund die Genese der MPNST aus Schwannzellen.

Neurofibromatosepatienten haben mit einer Inzidenz von 2-5% im Vergleich zur Normalbevölkerung ein sehr viel höheres Risiko, MPNST zu entwickeln. Neuere Daten sprechen für ein noch größeres Risiko von bis zu 10% bei NF1-Patienten (11). Innerhalb von plexiformen Neurofibromen entstehende MPNST sind in der Regel nicht frühzeitig zu diagnostizieren. Zusätzlich bedingt die höhere Rezidivrate, die häufigere Lage in tiefen Körperregionen und stärkere Metastasierungsneigung eine niedrigere Überlebensrate von NF1-Patienten gegenüber der von Patienten mit sporadischen MPNST (12).

1.1.2 MPNST im Kindesalter

MPNST gehören zu den häufigeren nicht-rhabdomyosarkomatösen Weichteiltumoren im Kindesalter. Im Kieler Kindertumorregister mit 4272 Präparaten von Weichteilmalignomen haben die MPNST einen Anteil von 8,1% und sind damit an dritter Stelle nach dem Rhabdomyosarkom und den Tumoren der Ewing-Sarkomfamilie (13). Im Rahmen der Therapiestudien der GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) zur Behandlung von Weichteilsarkomen CWS-81-96 wurden 2918 Kinder und Jugendliche registriert. Von ihnen hatten 4% einen MPNST (14). Die häufigste Beschwerde dieser Kinder ist das Auftreten eines schmerzhaften Tumors. Ansonsten ähneln MPNST im Kindesalter klinisch und histologisch denen im Erwachsenenalter. Obwohl MPNST meistens unifokal auftreten, wurde in einigen Fällen über ein multifokales Auftreten bei Kindern mit NF1 berichtet (1,2). MPNST im Kindesalter werden wie Tumoren im Erwachsenenalter multimodal behandelt. Die

Hälfte der Patienten entwickelt innerhalb eines Jahres ein Lokalrezidiv und/oder Metastasen mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von zwei Jahren (15). Wichtige ungünstige Prognosefaktoren für MPNST im Kindesalter sind großes Tumolvolumen, Alter \geq 7-10 Jahre und das Vorhandensein von NF 1 (16,17).

1.1.3 Tumorgenese und Tumorprogression

Ausgangspunkt für die Tumorgenese von MPNST scheinen Mutationen im *NF1*-Gen zu sein, die zu einem Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins Neurofibromin führen (Abb. 1). Patienten mit NF1 weisen eine konstitutionelle Mutation im *NF1*-Gen auf. Abgeleitet vom „two-hit“-Modell für Tumorsuppressorproteine nach Knudson (18) wird angenommen, dass der somatische Verlust der verbleibenden funktionierenden Kopie des *NF1*-Genes in Schwannzellen (LOH, Verlust der Heterozygotie) zur Bildung der Neoplasmen führt. In Übereinstimmung dessen wurde LOH in 0-57% der Neurofibrome und ca. 63% der MPNST gefunden (19-28). Zudem zeigten in einer Studie mit einer kleinen Tumorprobenzahl sowohl alle NF1-assoziierten als auch alle sporadischen MPNST auf beiden Allelen Deletionen im *NF1*-Gen (28). Das Genprodukt Neurofibromin besitzt wahrscheinlich mehrere tumorsupprimierende Wirkungen. Am genauesten wurde bis jetzt die GAP (GTPase aktivierendes Protein) homologe Domäne von Neurofibromin untersucht, durch welche GTP gebundenes aktives p21 („rat sarcoma“) -ras in GDP gebundenes inaktives p21-ras konvertiert werden kann (29). Dementsprechend besitzen MPNST-Zellen stark erhöhte p21-ras-GTP-Spiegel (30-32). Mutationen im *NF1*-Gen von Schwannzellen sind von funktioneller Bedeutung. Lediglich aus Neurofibromen isolierte Schwannzellen mit fehlender Expression von Neurofibromin konnten im Vergleich zu normalen Schwannzellen Kolonien im Softagar-Assay als Zeichen für eine Tumorigenität *in vitro* bilden. Zusätzlich wuchsen sie in immundefizienten Nacktmäusen an, nachdem sie in den N. ischiadicus injiziert wurden (33).

Da auch in Neurofibromen Schwannzellen mit LOH im *NF1*-Gen gefunden wurden, sind für die weitere Tumorgenese von MPNST noch zusätzliche Mutationen verantwortlich. Es wird von einer mehrstufigen Tumorentstehung ausgegangen. In einem Großteil der MPNST scheinen Mutationen, die zum Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 führen, bedeutsam für die Tumorentwicklung zu sein. In mehr als der Hälfte der menschlichen Tumoren ist *TP53* mutiert (34). In normalen Zellen steigt die p53-Konzentration in Folge von DNA-Schäden an. p53 stoppt die Zellzyklusprogression und Proliferation und leitet eine DNA-Reparatur ein. Bei größeren Schäden induziert p53 die Apoptose der Zelle. Von sechs untersuchten MPNST konnte in allen

Tumoren eine homozygote Deletion im *TP53*-Gen nachgewiesen werden (35,36). Mehrfach wurde eine Überexpression von funktionslosem p53 in MPNST gefunden, wobei die Häufigkeit bei kleinen Fallzahlen mit 29-100% stark variierte (37-39). Im Tiermodell konnte die Mutation von p53 als ein wichtiges Ereignis in der Tumorgenese von MPNST bestätigt werden. Das Gen für p53 ist wie das *NF1*-Gen auf Chromosom 17 lokalisiert. Transgene Mäuse, in denen eine Kopie des *NF1*-Gens mutiert war, entwickelten keine Neurofibrome. Mäuse mit homozygoten Mutationen im *NF1*-Gen starben *in utero*. Die heterozygote Mutation des *NF1*-Gens verbunden mit einer heterozygoten Mutation im *TP53*-Gen führte zur Bildung von Tumoren, die den MPNST histologisch sehr ähnlich waren (40).

Auch die pRB-Regulation ist durch unterschiedliche genetische Veränderungen in den MPNST betroffen. Durch die erhöhte Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen kommt es zu einer inaktivierenden Hyperphosphorylierung von pRB. Als Folge findet ein vermehrter Wechsel von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus, im Sinne einer stärkeren Proliferationsrate, statt. Deletionen im Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 2A- (*CDKN2A*-) Gen auf Chromosom 9p21 bewirken einen Ausfall von p16^{INK4A} und p19^{ARF}. In MPNST wurden in 50-75% Deletionen im *CDKN2A*-Gen gefunden (41-43). Die Deletionen bewirken, dass die Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen cdk4 und cdk6 durch p16^{INK4A} entfällt. Als Folge des Funktionsverlusts von p19^{ARF} wird das Überleben der Tumorzellen gestärkt, da es nicht mehr über die Bindung an mdm2 („mouse double minute 2“-Homolog) die Degradierung von p53 hemmen kann. Zusätzlich scheint in MPNST über den verstärkten Abbau von p27^{KIP1} ein weiterer Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen in seiner Funktion geschwächt zu sein (39).

Es wird heute davon ausgegangen, dass Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von MPNST spielen. Wachstumsfaktoren haben oft ähnliche Funktionen. Über einen parakrinen und/oder autokrinen Wirkmechanismus können sie das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen fördern. Häufig stimulieren sie auch die Angiogenese, was für das Tumorstadium über mehrere mm³ hinaus von entscheidender Bedeutung ist (44). Über die beteiligten Rezeptoren und die anschließende intrazelluläre Signaltransduktion im Falle der MPNST-Zellen ist zumeist noch wenig bekannt. Viele Wachstumsfaktoren steigern die intrazelluläre Konzentration an aktivem p21-ras, indem sie GDP-gebundenes ras in GTP-gebundenes ras konvertieren. In MPNST-Zellen werden dadurch vermutlich die ohnehin hohen Spiegel an aktiviertem p21-ras weiter erhöht.

Der Rezeptor für EGF („epidermal growth factor“) wird in normalen Schwannzellen nicht

exprimiert. Schwannzellen im Tumorgewebe von Neurofibromen, Tumorzellen von MPNST und MPNST-Zelllinien exprimierten jedoch den Rezeptor (EGF-R). MPNST-Zelllinien proliferierten in serumfreien Medium unter Zugabe von EGF. Es ist anzunehmen, dass EGF sowohl für die Tumorentstehung von Neurofibromen als auch die von MPNST bedeutend ist (45).

Der Wachstumsfaktor HGF („hepatocyte growth factor“) wird von mesenchymalen Zellen sezerniert und hat pleiotrophe biologische Aktivitäten auf mehrere Zelltypen (46,47). In MPNST konnte in 100% eine starke Expression des Rezeptors von HGF, nämlich MET, nachgewiesen werden. In 57% waren die Tumoren positiv für MET und HGF, was ein Hinweis auf eine autokrine Stimulierung durch HGF in diesen Tumoren ist. In ca. 70% der Neurofibrome war MET schwach positiv, während in keinem der Tumoren HGF immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Obwohl die Fallzahlen sehr gering waren, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von MET eine Rolle in der Tumorgenese von Neurofibromen spielt und Co-Expression von MET und HGF die Entwicklung von plexiformen Neurofibromen zu MPNST begünstigt (48).

In einem direkten Vergleich zwischen benignen und malignen Anteilen von NF1-assoziierten MPNST-Tumoren wurden neben einer erhöhten Expression von HGF auch erhöhte Expressionen von TGF- β 1 („transforming growth factor“ β 1) und einem seiner Rezeptoren (TGF- β „receptor type“ II) gefunden (49). Genexpressionsanalysen ergaben, dass der Rezeptor PDGFRA („platelet derived growth factor receptor“ A) sowohl in Neurofibromen als auch in MPNST exprimiert wurde. Der Anteil der exprimierenden Zellen betrug in Neurofibromen jedoch unter 30%, während in MPNST über 50% der Zellen positiv waren (50). Der Wachstumsfaktor PDGF wirkt mitogen auf verschiedene Zelltypen und ist in die Tumorgenese von verschiedenen Tumoren involviert (51). Bindung von PDGF an PDGFRA führt zu erhöhten ras-Spiegeln in der Zelle und fördert die Angiogenese (52). Somit könnten auch PDGF und TGF- β eine wichtige Bedeutung für die Tumorgenese von MPNST besitzen.

1.2 Midkine

Auch der Wachstumsfaktor Midkine (MK) scheint für die Tumorgenese von Neurofibromen und MPNST bedeutend zu sein (Abb. 1). In embryonalen Schwannzellen der Maus wurde die Expression von MK induziert, als beide Allele für das *NF1*-Gen mutiert waren. Zusätzlich ließ sich eine MK-Expression im Gewebe von Neurofibromen und noch stärker in dem von MPNST nachweisen. Normalem adulten humanen Nervengewebe fehlte dagegen die

MK-Expression (53). MK spielt in der Tumorgenese und Progression von verschiedenen Tumorerkrankungen eine Rolle. Der Wachstumsfaktor besitzt mitogene, anti-apoptotische und pro-angiogene Funktionen. In mehreren Zellsystemen konnte MK ein Tumorwachstum *in vivo* induzieren.

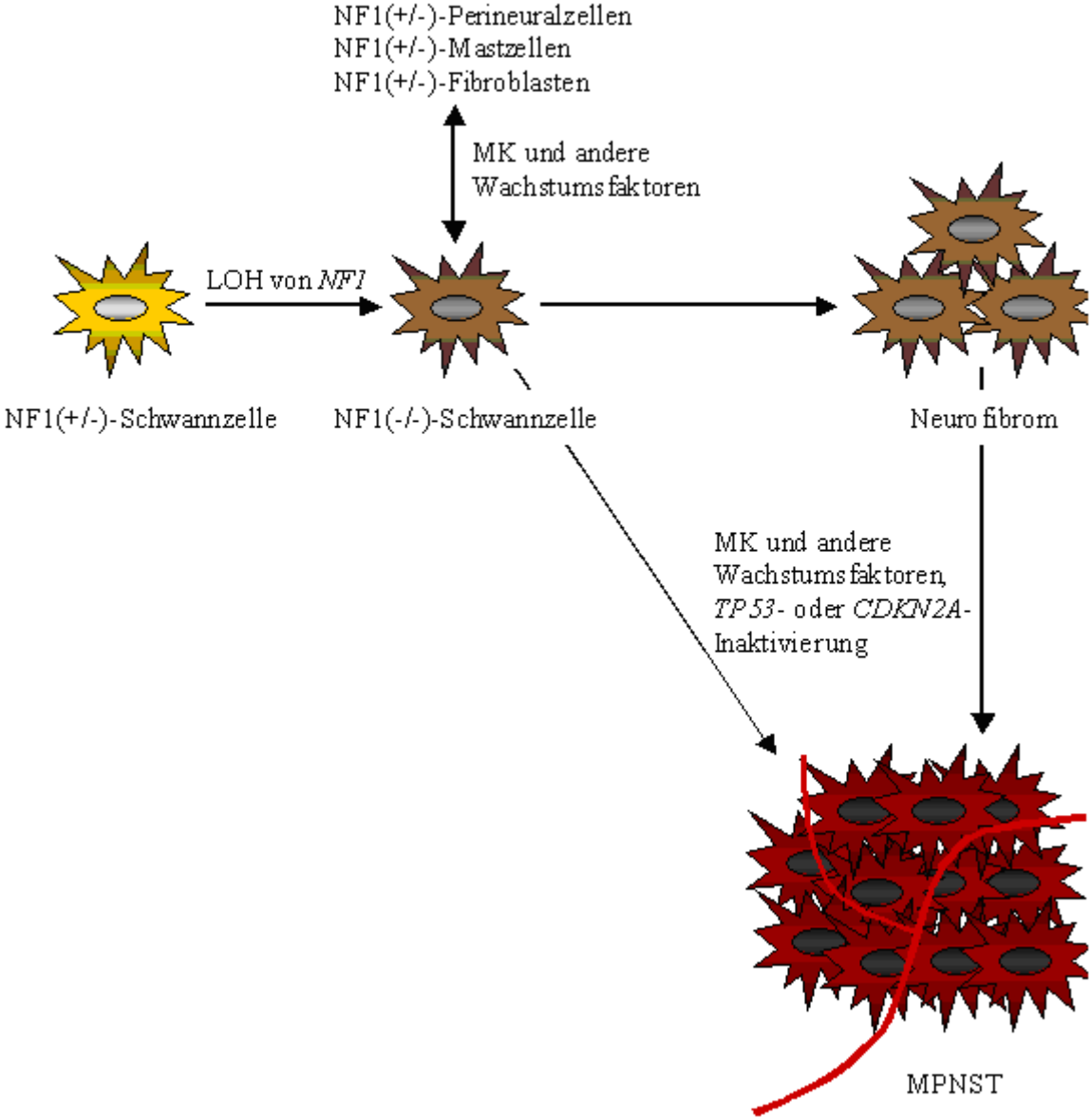


Abb. 1: Tumorgenese von MPNST

1.2.1 Gen-/Proteinstruktur

Das Midkine kodierende Gen (*MDK*) befindet sich beim Menschen auf Chromosom 11p11.2. Das ungefähr 3500 Bp lange Gen umfasst vier Exone. In embryonalen Karzinomzellen und anderen Gewebetypen konnte die Expression von MK durch Retinsäure induziert werden. Ursache dafür ist ein Retinsäure abhängiges Element in der 5'-Regulationssequenz von *MDK* (54,55). In der Regulationssequenz befindet sich außerdem in der Nähe des Transkriptionsstarts ein WT1-abhängiges Element, durch welches das Wilms-Tumorsupressorprotein (WT1) die MK-Expression inhibieren kann (56).

Midkine ist ein an Cystein und basischen Aminosäuren reiches Protein. Es besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Beide Domänen sind aus drei antiparallelen β -Faltblättern zusammengesetzt. Die C-terminale Domäne besitzt zusätzlich eine flexible Schlaufe. Beide Domänen sind über eine flexible Linkerregion miteinander verbunden (57,58). In der C-Domäne befinden sich zwei Heparin-bindende Zonen. Da einzeln nur die C-terminale Domäne die biologischen Funktionen ausübt, nicht aber die N-terminale Domäne, scheinen die Heparin-Bindungsstellen von zentraler Bedeutung zu sein (56,59,60). Midkine zeigt eine 45-prozentige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem Wachstumsfaktor Pleiotrophin. Beide Proteine besitzen homologe Cysteinreste und Heparin-Bindungsstellen. Midkine und Pleiotrophin werden zu einer eigenen Familie zusammengefasst, die sich strukturell, weniger aber funktionell von den Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (HBGF) FGF-1/2 unterscheidet. Beide Wachstumsfaktoren sind zwischen unterschiedlichen Organismen vom Frosch bis zum Menschen stark konserviert (57).

1.2.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

Über Heparin-Bindungsstellen kann MK an das Heparansulfat der extrazellulären Matrix binden. Diese Bindung schützt Heparin-bindende Wachstumsfaktoren vor Proteolyse und konzentriert die Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche, wodurch die Bindung zu Rezeptoren erleichtert wird. Heparansulfate können sehr dicht mit Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren beladen sein. Eine solche Oligomerisierung unterstützt die Aktivierung der Rezeptoren. Heparansulfate sind teilweise auch direkt Bestandteil der Signaltransduktion. So konnte MK an N-Syndecan, bestehend aus transmembranen Heparansulfatproteoglykanen, binden (61-64). Der genaue Weg der Signaltransduktion, über die MK seine Wirkung vermittelt, ist noch ungeklärt. Die Bindung von Midkine an die Protein-Tyrosin-Phosphatase ζ (PTP ζ) konnte die neuronale

Migration stimulieren (60). Weitere Signaltransduktionswege über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) oder die extrazelluläre Signal-abhängige Kinase (ERK) wurden im Zusammenhang mit der Osteoblastenmigration und dem neuronalem Überleben nachgewiesen (65-67). Auch die Bindung von MK an die anaplastische Lymphom-Kinase (ALK) war mit einer Signaltransduktion über die PI3-Kinase/ERK und der Induktion von Tumorigenität in der Adenokarzinom-Zelllinie SW13 assoziiert (68). Über das mit dem LDL-Rezeptor verwandte Protein (LRP) konnte Midkine per Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und von dort aus in den Nukleus gelangen (69,70). Es ist zur Zeit noch unklar, ob nur einzelne Rezeptoren an den spezifischen biologischen Funktionen von MK beteiligt sind (71) oder ob MK über eine Vielzahl von Rezeptoren seine Wirkung entfaltet.

1.2.3 Biologische Aktivität

MK scheint für wichtige biologische Prozesse in der Entwicklung, Angiogenese und Inflammation verantwortlich zu sein. Während der Embryogenese der Maus ist die Genexpression von MK zeitlich und örtlich streng reguliert (72-75).

Die starke Expression im Gehirn und in zahlreichen anderen Organen während der Mitte der Embryonalzeit war für diesen Wachstumsfaktor namensgebend. In ausgewachsenen Mäusen und Menschen ist die MK-Expression sehr stark eingeschränkt und findet sich im Gewebe von Nieren, Hoden, Magen und Dünndarm (72,73,76,77).

Während der Entwicklung der Maus wurde die stärkste MK-Expression in den Umbauzonen von Neuroektoderm und im Bereich des Überganges zwischen Mesoderm und Ektoderm (57) gefunden. Am genauesten wurden bisher die biologischen Aktivitäten von MK im Rahmen der Entwicklung des Nervensystems erforscht. Die Überlebensrate von embryonalen Neuronen wurde durch MK erhöht. Zusätzlich stimulierte MK das Aussprossen von Neuriten und die neuronale Differenzierung von embryonalen aus Mäusen und Ratten isolierten Neuronen (73,78,79). Im cerebralen Kortex von 17 Tage alten Rattenembryos war MK an radialen glialen Prozessen lokalisiert. Entlang dieser Prozesse wandern neuronale Stammzellen von der Ventrikulärzone nach außen in kortikale Schichten, um an ihrem Zielort zu differenzieren (75). Es ist sehr wahrscheinlich, dass MK die Migration dieser Nervenzellen stimulierte. Interessanterweise wurden aber keine signifikanten Defekte in der Entwicklung von Mäusen beobachtet, in denen beide Allele für MK mutiert waren, bis auf eine Verzögerung in der postnatalen Entwicklung des Hippocampus (80,81). Wenn für das MK-Gen heterozygote Mäuse

miteinander gepaart werden, ist jedoch die Zahl der homozygot mutierten neugeborenen Mäuse signifikant geringer als die homozygoter Wildtypiere (82).

In bestimmten Situationen war MK auch im Gewebe von adulten Lebewesen biologisch aktiv. Nach dem Auslösen eines experimentellen Gehirnfarktes in der Ratte konnte eine Expression von MK einen Tag später in Astrozyten nachgewiesen werden (83-86). MK schützte *in vivo* Photorezeptoren im Auge von Ratten vor Licht-induziertem Schaden (87). Midkine scheint in Reparatur- und Regenerationsvorgänge des Nervensystems involviert zu sein. Im humanen Endometrium wurde MK durch Estradiol hochreguliert und die erhöhte Expression korrelierte mit einer gesteigerten angiogenen Aktivität in diesem Gewebe (88). Des Weiteren erhöhte MK die Plasminogenaktivator-Spiegel und die Plasmin-Aktivität in bovinen aortalen Endothelzellen (89), weshalb von einer Rolle in der Gewebereparatur und Angiogenese auszugehen ist. MK wurde in der Synovia, den Synoviozyten und Endothelzellen von neugebildeten Blutgefäßen bei chronischer Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis gefunden (90). Die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (90) und Makrophagen (91) konnte durch MK stimuliert werden. MK besitzt somit vermutlich eine wichtige Funktion innerhalb des inflammatorischen Regelkreises.

1.2.4 Midkineexpression in Tumoren

Die biologischen Funktionen von MK und die strenge Regulierung der MK-Expression während der Embryogenese legen eine Beteiligung des Wachstumsfaktors in der Tumorgenese nahe. Die MK-Expression war in zahlreichen Tumoren im Vergleich zum benachbarten nicht tumorösen Gewebe erhöht. Das Ausmaß der Überexpression innerhalb mehrerer Tumorgewebeproben war abhängig vom Tumortyp. In neuroektodermalen Tumoren wurde MK außer in Neurofibromen und MPNST in Neuroblastomen, Astrozytomen, Schwannomen, Meningiomen und anderen ZNS-Tumoren überexprimiert (53,92-94). MK wurde auch in Tumorgewebe anderer Herkunft wie dem hepatozellulären Karzinom, Magen-Karzinom, kolorektalen Karzinom, Prostata-Karzinom oder Harnblasenkarzinom überexprimiert (95-104). In den Tumorentitäten, in denen eine MK-Überexpression bereits in den gutartigen Vorstufen gefunden wurde, spielt Midkine möglicherweise eine besonders wichtige Rolle in der Tumorentstehung als auch der Progression. Ähnlich der Überexpression von MK in Neurofibromen, konnten erhöhte MK-Spiegel in ungefähr der Hälfte der kolorektalen Adenome mit mittelgradiger Dysplasie gefunden werden (105). Interessanterweise ist nach dem Modell von Fearon und Vogelstein der Übergang von einer leichtgradigen zur mittelgradigen Dysplasie

mit einer aktivierenden Mutation eines K-ras-Allels begleitet (106). In ungefähr einem Drittel aller kolorektalen Karzinome wurde diese Mutation gefunden. Embryonale Schwannzellen, in denen das *NFI*-Gen ausgeschaltet wurde, wiesen ebenfalls erhöhte ras-Spiegel zusammen mit einer Induktion der MK-Expression auf (53). Ob erhöhte K-ras-Spiegel in Zellen aus kolorektalen Adenomen ebenso die MK-Expression induzieren, muss noch untersucht werden. In Neuroblastomen, Astrozytomen und Harnblasen-Karzinomen konnte eine positive Korrelation der MK-Konzentration mit dem Stadium und invers mit der Prognose festgestellt werden (92,93,102). Für MPNST gibt es in Hinblick auf die Prognose noch keine vergleichbaren Studien. In Genarrayanalysen von aus MPNST isolierter RNA konnte eine Subgruppe von Tumoren identifiziert werden, in der neben anderen Wachstumsfaktoren MK herunterreguliert war. In dieser Subgruppe fand sich aber keine Korrelation zu einem erhöhten Überleben (107).

2 FRAGESTELLUNG

Der Ausgangspunkt der Tumorentstehung von MPNST im Rahmen von NF1 scheint der Funktionsverlust des Tumorsuppressors Neurofibromin zu sein. Es folgen eine Vielzahl weiterer genetischer oder epigenetischer Defekte, die für die Tumorgenese notwendig sind. Unter diesen Veränderungen scheint die Überexpression des Wachstumsfaktors MK eine wichtige Rolle zu spielen. Neurofibrome und MPNST weisen eine erhöhte Expression von MK im Vergleich zu normalem Nervengewebe auf.

Die Überexpression von MK konnte bereits in einigen Zelllinien das Tumorwachstum *in vivo* induzieren. In Ermangelung eines Xenotransplantatmodells für MPNST war ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Überexpression von MK in MPNST-Zelllinien eine Tumorigenität induzieren kann. Es ergaben sich daher zunächst folgende Fragestellungen:

- Sind die MPNST-Zelllinien S520 und S462 stabil transfizierbar?
- Wird MK in den isolierten MPNST-Zellklonen überexprimiert?
- Sind die Zellklone der MPNST-Zelllinie S462 und ST88-14 in Nod/Scid-Mäusen tumorigen?

MK ist für seine mitogenen, anti-apoptotischen und pro-angiogenen Eigenschaften in verschiedenen Zelllinien bekannt. Ein weiteres Ziel war es zu untersuchen, ob die stabile Transfektion der MPNST-Zelllinie S462 mit MK *in vitro* ebenfalls zu Veränderungen einzelner Tumorzelleigenschaften führt. Es wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Beeinflusst die Überexpression von MK das Verhalten der S462-Klone in Bezug auf Zellvitalität/Proliferation und Apoptose unter Serumentzug?
- Wird die Chemosensitivität dieser Zellen gegenüber Vincristin oder Cisplatin verändert?
- Stimuliert konditioniertes Medium der S462-Klone das Wachstum von HUVEC?
- Wird VEGF-RNA als angiogener Wachstumsfaktor in den S462-Klonen durch MK hochreguliert?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

Die MPNST-Zelllinien S462 und S520 wurden freundlicherweise von Dr. Victor F. Mautner (Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sie entstammen MPNST von Patienten, die nach NIH- (National Institute of Health-) Kriterien für NF1 diagnostiziert wurden. Die Primärkulturen wurden durch molekularbiologische Methoden als neoplastische MPNST-Abkömmlinge verifiziert (108). Die MPNST-Zelllinie ST88-14 erhielten wir von Dr. Jack DeClue (NIH, Bethesda, USA). Der Klon ST88-14-MK4, die Adenokarzinom-Zelllinie SW13 und ihr mit MK stabil transfizierter Klon SWMK1 (53) wurde uns von Dr. Andreas Kurtz (Robert Koch Institut, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle genannten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose, stabilem Glutamin und Na-Pyruvat unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG Seromed[®], Berlin, Deutschland) kultiviert.

Die HUVEC haben wir von Dr. Cornelia Eckert erhalten. Sie wurden in unserem Labor nach der üblichen Methode aus humanen Nabelschnüren isoliert (109). Die HUVEC wurden ausschließlich in der zweiten Passage für die Versuche verwendet. Die Zellen wurden in Medium 199 Earle (Biochrom AG Seromed[®]) unter Zusatz von Glutamin, 20% fetalem Kälberserum (FKS), 1% RDGF („retina derived growth factor“), 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin gezüchtet. Die Zellkulturgefäße wurden vorher durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 10 µg/ml Kollagen S (Biochrom AG Seromed[®]) in 12 mM HCL beschichtet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Cytoperm 2, Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland) bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂.

3.2 Transfektion der MPNST-Zelllinien

3.2.1 Vektoren

Die Vektoren p-GreenLantern und pRc/CMV-MK mit zugehörigem Leervektor (Invitrogen[™] life technologies, Karlsruhe, Deutschland) haben wir von Dr. Andreas Kurtz zur Verfügung gestellt bekommen (Abb. 2).

Im Vektor pGreenlantern-1 ist die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins unter Kontrolle eines Zytomegalievirus- (CMV-) Promotors enthalten. Es wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und kommt in humanen Zellen nicht vor. Ein solches Reportergen eignet sich daher gut zur Evaluierung der Transfektionseffizienz.

Der Vektor pRc/CMV (Invitrogen™ life technologies) beinhaltet die cDNA von Midkine unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Midkine-cDNA besteht aus dem kompletten offenen Leseraster (ORF) und einem Teil (70 Nukleotide) der 5'-untranslatierten Region des Midkine-Transkriptes. Ein Großteil der 143 Nukleotide des 3'-Endes des untranslatierten Bereichs inklusive des Poly(A)-Schwanzes wurde während der Klonierung deletiert. Die MK-cDNA kodiert für eine RNA von ungefähr 900 bp Länge (68). Die Expression des *neo_r*-Gens von pRc/CMV verursacht eine Aminoglykosidresistenz in transfizierten MPNST-Zellen.

Beide Vektoren besitzen das *ap_r*-Gen, welches nach Expression Ampicillin-Resistenz vermittelt.

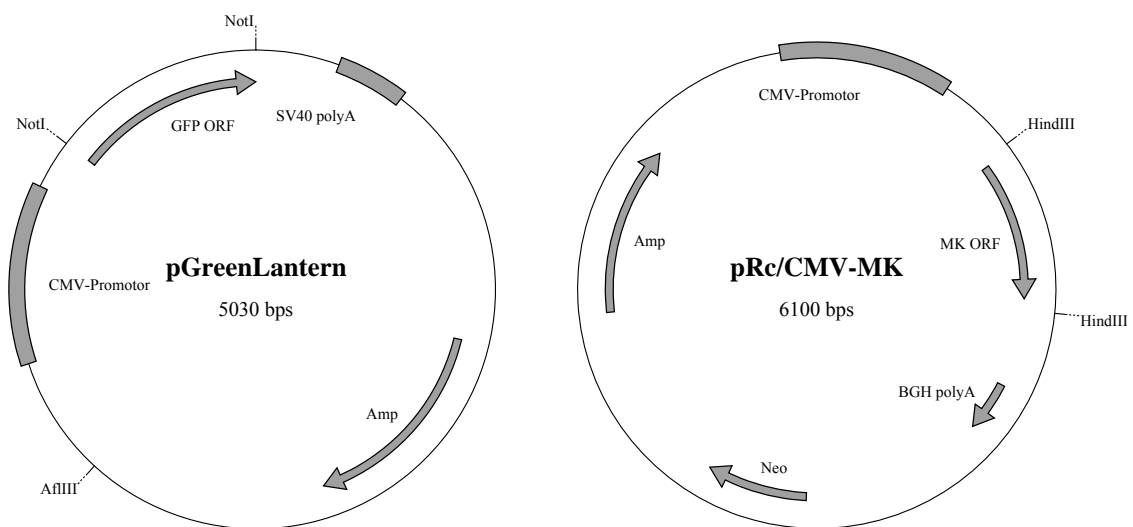


Abb. 2: **Karten der verwendeten Vektoren**

3.2.2 Transformation kompetenter E.coli

Um ausreichend Plasmid-DNS zu bekommen, wurden kompetente Zellen des E. coli-Stammes TOP10F^c (One Shot, Invitrogen™ life technologies) mit der vorhandenen Plasmid-DNS transformiert.

Dabei wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 2 µl β-Mercaptoethanol und 1-2 µl der in Wasser gelösten Plasmide gemischt. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die

Zellen für 30 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann für 60 min in 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose) bei 37 °C und 225 UpM auf einem Rotationsschüttler (Certomat[®] H, B. Braun International, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl und 250 µl des Ansatzes auf Luria-Agar-Platten (Luria Agar, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit 100 µl/ml Ampicillin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die über das Plasmid vermittelte Ampicillin-Resistenz konnten sich nur diejenigen Bakterien vermehren, die auch Plasmide aufgenommen hatten.

3.2.3 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparationen wurde eine Kolonie einer Übernachtskultur von der Platte gepickt und in 2 ml Luria Broth- (LB-) Medium (Millers LB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Diese so genannte Starterkultur wurde bei 37 °C mit 300 UpM im Rotationsschüttler für 8 h inkubiert. Von der Starterkultur wurden anschließend 200 µl in 100 ml Ampicillin-LB-Medium überführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 16 h erfolgte die Plasmidisolation mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers. Die Isolation funktioniert nach dem Prinzip, dass Bakterien alkalisch lysiert werden und anschließend die DNS über Säulen mit einer DNS-bindenden Silica-Matrix aufgereinigt werden.

3.2.4 Restriktionsanalyse

Zum Nachweis des replizierten Plasmids und zum Ausschluss einer Verunreinigung durch fremde Plasmid-DNS wurde eine Restriktionsanalyse im Agarosegel durchgeführt.

Durch die einfache Restriktion des Plasmids pRc/CMV-MK mit dem Enzym HindIII (Roche Diagnostics GmbH) entsteht ein kleineres Fragment von ungefähr 650 bp Länge, welches die zum MK-Gen komplementäre DNS beinhaltet, und ein größeres Fragment mit einer Länge von ungefähr 5450 bp. Bei Restriktion des Kontrollvektors mit Hind III wird ausschließlich die Ringstruktur aufgelöst und es entsteht eine einzelne scharfe Bande bei ca. 6100 bp.

Nach doppelter Restriktion des Plasmids pGreenLantern-1 mit den Enzymen NotI und AflIII (Roche Diagnostics GmbH) entsteht ein kleineres ca. 1190 bp langes und ein größeres ca. 3840 bp langes Fragment.

Der 25 µl Ansatz für die Restriktion enthielt: 2,5 µl 10x SuRE/Cut Buffer B (Hind III, Roche Diagnostics GmbH) oder 10x SuRE/Cut Buffer H (NotI, AflIII, Roche Diagnostics GmbH), 1 U des jeweiligen Enzyms, 1 µg Plasmid-DNA und H₂O ad 25 µl.

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. 2 µl einer jeder Restriktion wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in mit Ethidiumbromid (200 µg/l, Serva, Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefärbtem 2%igen Agarose-Gel (2 g SeaKem[®] LE Agarose, FMC BioProducts, Rockland, USA, in 100 ml 1x TAE) analysiert.

3.2.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Optimierung der Transfektionsbedingungen wirkt sich vor allem auf die transiente Expression von Genen aus, kann aber darüber hinaus auch die Effizienz einer stabilen Transfektion verbessern. Es wurden die Transfektionssubstanzen Superfect und Effectene (Transfektions Selector Kit, Qiagen) getestet, die beide einem unterschiedlichen Wirkungsmechanismus unterliegen.

Superfect hat die Form eines Dendrimers. Von einem Kern gehen verzweigte Polyamidoamine (PAMAM) ab. Die Polyamidoamine bestehen aus tertiären Aminosäuren im Inneren und positiv geladenen primären Aminosäuren außen. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA bilden mit der positiven Ladung der Dendrimere einen stabilen Komplex. Die Interaktion des Komplexes mit der negativ geladenen Zellmembran bewirkt eine Aufnahme in die Zelle durch Endozytose (110). Effectene besteht aus Mizellen geformten Lipiden. Die Lipide haben einen kationischen hydrophilen Teil und einem hydrophoben Rest. Bei Interaktion der positiven Ladungen der Lipide mit der Plasmid-DNA bilden sich Liposome. Dieses liposomale Vehikel interagiert mit der Zellmembran in ähnlicher Weise wie Superfect. Ein Teil der Transfektionskomplexe schafft es, den Endosomen zu entweichen und durch die Kernmembran in den Nukleus zu gelangen.

Zur Evaluierung der Transfektionseffizienz wurde die Zelllinie S520 24 h vor dem Transfektionsbeginn in 4-Loch-Permanox[™] Lab-Tek[™] Chamber Slides (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) mit einer Zellzahl von 4×10^4 pro Lochkammer eingesät. Die Wachstumsfläche pro Lochkammer entsprach ungefähr der einer herkömmlichen 24-Lochplatte. PGreenlantern-1 wurde als Reporterplasmid verwendet. Die Mengen an Plasmid-DNA und der Transfektionssubstanzen Superfect und Effectene wurden nach Angaben des Herstellers variiert. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48 h in frischem Medium inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (4 g in 100 ml H₂O) fixiert und 30 s mit Methanol/Ethanol (1:1) dehydriert. Die Analyse der GFP-Expression erfolgte anschließend unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem Fluorescein-isothiocyanate- (FITC-) Filtersatz (Exzitations-Bandpassfilter: 485-585 nm, Emissions-Bandpassfilter: 515-540 nm). Die Bilder wurden mit Hilfe einer Spot RT Camera v3.5 und der Spot RT Software v3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) festgehalten und gespeichert.

3.2.6 Stabile Transfektion der MPNST-Zelllinien S520 und S462

Nach der transienten Transfektion kommt es zur Genexpression von der Plasmid-DNS im Nukleus der Zelle. Die Genexpressionsrate sinkt nach ca. 48-72 h wieder, da die Plasmid-DNS durch DNS-Nukleasen abgebaut wird. In ungefähr 10% der transfizierten Zellen wird die Plasmid-DNS stabil in das Genom der Zellen eingebaut oder bleibt als ein extrachromosomales (episomales) Element erhalten. Das *neo_r*-Gen kodiert für die Aminoglykosid-Phosphotransferase. Wird dem Medium das Aminoglykosid Geneticin hinzugefügt, haben die Zellen einen Selektionsvorteil, die dieses Zweitgen exprimieren.

Es wurden die MPNST-Zelllinien S520 und S462 mit dem Plasmid pRc/CMV-MK und dem Leervektor pRc/CMV stabil transfiziert. Die Plasmide enthalten das *neo_r*-Gen als Zweitgen. Die Zellen wurden in einer Zellzahl von 9×10^5 pro 60 mm-Platte eingesät und am darauffolgenden Tag mit Superfect unter den optimierten Bedingungen nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 h wurde den Zellen 1000 ng/ml Geneticin (Sigma-Aldrich GmbH) hinzugefügt. Die hohe Konzentration an Geneticin selektierte Zellen, die eine hohe Plasmid-Kopienzahl in ihr Genom aufgenommen hatten. Die Zellen galten als stabil transfiziert, wenn in der Kontrolle aus nicht transfizierten Zellen mit Geneticin im Medium alle Zellen apoptotisch wurden und sich vom Boden des Kulturgefäßes lösten. Es wurde für mindestens 14 d selektiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen 1:4 passagiert. Nachdem die Zellklone eine Zahl von 10-100 Zellen erreicht hatten, wurden die Klone unter einem inversen Lichtmikroskop (Televa, Zeiss) markiert und durch Lösen und Absaugen mit der Pipette isoliert.

3.3 Bestimmung der Genexpression von Midkine

3.3.1 RNS-Isolation

Die Zellen wurden in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen mit einer

Wachstumsfläche von 25 cm² eingesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem RNeasy Kit (Qiagen) lysiert und die Gesamt-RNS mit integriertem DNS-Verdau nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNS wird bei diesem Verfahren aus Zelllysaten über eine Silicagel-Membran isoliert und aufgereinigt.

3.3.2 Reverse Transkription

RNS eignet sich nicht zur Genamplifikation mittels PCR. Daher wird zunächst die RNS in der reversen Transkription in die stabilere komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben. 1 µg RNS ad 10 µl H₂O wurde als Prämix für 10 min bei 70 °C im Thermozykler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Biozym Diagnostics GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) denaturiert. Der 20 µl RT-Mix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 10 µl Prämix, 4 µl 5 x RT-Buffer (Invitrogen™ life technologies), 1 µl 20 mM dNTP-Mix (Invitrogen™ life technologies), 2 µl 50 mM Hexanukleotide (Roche Diagnostics), 2 µl 100 mM DTT (Invitrogen™ life technologies) und 1 µl Superscript II H⁻ Reverse Transkriptase (10 U/µl, Invitrogen™ life technologies).

Der RT-Mix wurde zur Hybridisierung der Hexanukleotide für 10 min bei 25 °C, zur reversen Transkription für 45 min bei 42 °C und zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 3 min bei 99 °C im Thermozykler inkubiert.

3.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

3.3.3.1 Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik zur zyklischen Amplifikation bestimmter DNS-Bereiche. Nach Denaturierung der DNS und damit Trennung der gebildeten Doppelstränge lagert sich bei geeigneten Temperaturen ein Paar spezifischer Oligodesoxynukleotide (Primer), das die nachzuweisenden DNS-Region flankiert, der DNS an („annealing“) und initiiert die Synthese des jeweils komplementären DNS-Stranges durch eine thermostabile DNS-Polymerase (Elongation). Weitere Zyklen mit den jeweiligen Schritten Denaturierung, „primer annealing“ und Elongation schließen sich an. Da sich idealer Weise die synthetisierten DNS-Fragmente mit jedem Zyklus verdoppeln, resultiert eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel stellen sich die PCR-Fragmente nach Färbung mit Ethidiumbromid als Bande dar. Die RT-PCR untersucht Expressionsunterschiede von zuvor in cDNA umgeschriebener RNS.

3.3.3.2 Quantitative Echtzeit RT-PCR mit dem LightCycler

Der LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) besteht aus einer zylindrischen Kammer, in der durch einen Fön ein zirkulierender Luftwirbel erzeugt wird. Durch die geringere Masse der Luft können sehr schnell Temperaturwechsel innerhalb der Kammer erzeugt werden. Als Reaktionsgefäße werden Quarzglas Kapillaren mit einem Volumen von 25 µl verwendet. Das niedrige Volumen des Reaktionsgemisches und die große Oberfläche der Kapillaren im Verhältnis zum aufgenommenen Volumen bewirken, dass das Reaktionsgemisch schnell die Umgebungstemperatur annimmt. Mit dem LightCycler steht somit ein sehr schneller Thermozykler zur Verfügung (111).

Der LightCycler benutzt eine blaues Licht emittierende Diode für die Exzitation. Die von der Kapillarenspitze ausgehende Lichtemission wird von Photodioden registriert.

Das Prinzip der Echtzeit RT-PCR beruht auf der Mitführung von Fluoreszenzfarbstoffen in der zyklischen Amplifikation der DNA-Bereiche. Die Zunahme des PCR-Produktes kann über die Fluoreszenzintensität zu jedem Zeitpunkt während der Reaktion („real-time“, Echtzeit) gemessen werden. In dieser Arbeit wurde SYBRGreen verwendet, das direkt mit doppelsträngiger DNS wie Ethidiumbromid interkaliert. Der ungebundene Farbstoff sendet nur schwache Fluoreszenzsignale. Während der Elongation binden Fluoreszenzfarbstoffe an die neuentstandene doppelsträngige DNS. Es folgt ein Anstieg in der Intensität der Fluoreszenzsignale. In der Denaturierungsphase fällt die Fluoreszenzintensität jedes Mal wieder rapide ab. Die Fluoreszenz wurde am Ende jeder Elongation gemessen, da sie hier folglich am stärksten ist.

Der Schnittpunkt des gemessenen Signals mit einer Basislinie oberhalb des unspezifischen Hintergrundsignals wird als „crossing point“ (Cp) bezeichnet. Der Cp wird in der Anzahl der PCR-Zyklen angegeben. Mit der LightCycler-Software (Roche Diagnostics GmbH) wurde über den „second derivate maximum“ (SDM) Analysemodus eine vollständig automatisierte Quantifizierung durchgeführt. Hierbei ist der Cp definiert als die Anzahl von PCR-Zyklen, bei der die Fluoreszenzzunahme aus dem linearen in den exponentiellen Bereich wechselt. Mathematisch entspricht dieser Wendepunkt dem Maximum der zweiten Ableitung der Kurve entstehend aus der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl.

3.3.3.3 Standardkurve

Die Standardkurve wurde aus einer Verdünnungsreihe entstanden durch logarithmische Verdünnung von einem cDNA-Pool aus den MPNST-Zelllinien ST88-14 und S462 hergestellt. Da die genaue Konzentration des Gens im cDNA-Pool unbekannt war, wurde sie als RNS-Äquivalent angegeben. Hierbei wird die in der Verdünnung eingesetzte cDNA als Konzentration an RNS angegeben, aus der sie hervorgegangen ist. Die Verdünnung erfolgte ausgehend von 2 ng/µl RNS-Äquivalent in vier logarithmischen Schritten. Der Cp-Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge an DNS (112). Durch die Auftragung der gemessenen Cp-Werte gegen die logarithmisch verdünnten RNS-Äquivalente lässt sich eine Gerade ziehen. Aus der Steigung (slope) dieser Standardkurve wird die Effizienz berechnet: $E=10^{-1/\text{slope}}$. Die Standardkurve selber ergibt die Gleichung:

$$Cp = -\left[\frac{1}{\log E}\right] \times \log T_0 + \left[\frac{\log T}{\log E}\right]$$

T_0 bezeichnet die Ausgangskonzentration des Gens und T die Konzentration des PCR-Produktes am Cp. Mit Hilfe dieser Gleichung wurde die Ausgangskonzentration T_0 eines Gens als RNS-Äquivalent von unbekanntem Proben durch die LightCycler-Software automatisch berechnet.

3.3.3.4 Normalisierung

Um Variationen z.B. in der Menge des Ausgangsmaterials zwischen den einzelnen Proben auszugleichen, wurden die Daten mit dem Referenzgen GAPDH (Glyceraldehydphosphatdehydrogenase) normalisiert.

3.3.3.5 Kalibrierung

In dieser Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung. Bei dieser Methode ist die absolute Ausgangskonzentration des Zielgens unbekannt. Die normalisierten RNS-Äquivalente der Proben werden im Verhältnis zu einem Kalibrator gesetzt. Der Kalibrator soll das Zielgen stabil in gleicher Höhe exprimieren. Mit ihm sind auch Vergleiche zwischen einzelnen LightCycler-Läufen möglich. In dieser Arbeit diente die jeweilige parentale MPNST-Zelllinie S462 als Kalibrator.

3.3.3.6 Schmelzkurvenanalyse

Mit der Schmelzkurvenanalyse können Produkte voneinander abgegrenzt werden, die sich weniger als 2 °C in der Schmelztemperatur unterscheiden (113). Sie wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion durch den LightCycler durchgeführt. Für die Schmelzkurvenanalyse erfolgte erst eine Denaturierung bei 95 °C. Nach Abkühlen der Temperatur auf 55 °C wurde die Temperatur um 0,2 °C/s bis zu einer Temperatur von 95 °C gesteigert.

3.3.3.7 Primer

Primer	Sequenzen
MK ex3vor	5'-GGT GCC CTG CAA CTG GAA-3'
MK ex4rück	5'-CAC GCA CCC CAG TTC TCA A-3'
GAPDH vor*	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
GAPDH rück*	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

Tab. 1: **Sequenzen der verwendeten Primer, Abkürzungen:** ex=Exon, vor=vorwärts, rück=rückwärts; *Sequenz aus der Literatur entnommen (114)

Die Primer für MK wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 (Applied Biosciences, Foster City, Kalifornien, USA) generiert und mit Hilfe der Gen-Datenbank Blast (NIH, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gov>) auf ihre Spezifität untersucht.

3.3.3.8 Reaktionsansatz der PCR

Die quantitative PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl pro Kapillare durchgeführt. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verhindert unspezifisches Binden der Reaktionskomponenten an die LightCycler-Kapillaren. Das 25 µl Reaktionsgemisch enthielt: 2,5 U temperature-release Taq DNS Polymerase (Platinum-Polymerase, Invitrogen™ life technologies), 2,5 µl des dazugehörigen 10x PCR Puffers (Invitrogen™ life technologies), 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen™ life technologies), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen™ life technologies), 3 µg BSA, 0,3 µM von jedem Primer (TIB-MOLBIOL, Berlin, Deutschland), 1:50000 SYBRGreen (Invitrogen™ life technologies), 25 ng cDNA und H₂O ad 20 µl.

3.3.3.9 Reaktionsbedingungen der PCR

Die optimalen Reaktionsbedingungen für den spezifischen Nachweis von MK am

LightCycler waren wie folgt: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 300 s, gefolgt von 45 Zyklen bestehend aus: Denaturierung bei 95 °C für 8 s, „annealing“ und Elongation bei 55 °C für 35 s.

3.4 Bestimmung der Genexpression von VEGF

Es wurden 1×10^6 Zellen der S462-MK-Klone und des Kontrollklons pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen 24 oder 96 h mit Medium ohne Serum inkubiert. Von diesen Zellen wurde RNS isoliert und durch reverse Transkription in cDNA überführt.

Die nachfolgende Analyse der VEGF-Genexpression wurde zusammen mit Dr. Sven Wellmann in unserem Labor mit dem LightCycler durchgeführt, wie es bereits beschrieben wurde (115). Auch hier wurde SYBRGreen (Invitrogen™ life technologies) als fluoreszierender Farbstoff verwendet. Serielle Verdünnungen von Plasmid-DNS bekannter Konzentration mit einklonierter VEGF-cDNA dienten zur Standardisierung.

3.5 Bestimmung der Proteinexpression von Midkine mit ELISA

Für die Bestimmung der MK-Konzentration im Medium wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 6-Lochplatten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit 1 ml frischem Medium ohne Serum. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde das Medium den Lochplatten entnommen und sofort bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C eingefroren.

Die Midkine ELISA-Kits wurden uns von Dr. Sadatoshi Sakuma (Cell Signals Inc., Kanagawa, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zusammengefasst wurden 10 µl des Überstandes in 100 µl Peroxidase-konjugierter MK-Antikörperlösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden 50 µl in eine Vertiefung einer mit MK-Antikörper-beschichteten 96-Lochplatte gegeben und für 60 min inkubiert. Nach einem fünffachen Waschschrift mit 1% Tween in PBS wurden 100 µl pro Loch einer Substratlösung (0,5 mg/ml Tetramethylbenzidin in Dako S1600) addiert. Die Platten wurden für 2 h inkubiert und anschließend die Farbreaktion mit 2 N Schwefelsäure gestoppt. Als Standard wurde eine synthetische Präparation des gesamten MK-Proteins (Peptide Institute, Osaka, Japan) in Konzentrationen von 0, 0,5, 1, 2, 3 und 4 ng/ml verwandt. Die Auswertung erfolgte mit einem Spektralphotometer mit einer Exzitationswellenlänge von 450 nm. Die Nachweisgrenze für MK liegt bei 5 pg (0,5 ng/ml).

3.6 Tumorigenitätsassay in Nod/Scid-Mäusen

Die Tumorigenität der MPNST-Zellen wurde *in vivo* an Nod/Scid-Mäusen untersucht. Die Mäuse weisen ein gestörtes Immunsystem auf und akzeptieren leichter xenogene Zelltransplantate. Durch Bestrahlung verbleibende Restaktivität von natürlichen Killerzellen und Makrophagen kann durch Bestrahlung zusätzlich geschädigt werden. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Iduna Fichtner (epo GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden mit γ -Strahlen in einer Dosis von 200 cGy bestrahlt. Innerhalb von 3-5 h nach der Bestrahlung wurden die Mäuse mit den S462-, ST88-14-Zellen und ihre MK-Klone inokuliert. Es wurden bis zu 5×10^7 Zellen in 0,3 ml Matrigel (BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland) gelöst den Mäusen subkutan oder intramuskulär injiziert. Täglich erfolgte eine Bestimmung des Tumolvolumens und Körpergewichts der Mäuse.

3.7 Untersuchung von Zellwachstum und –vitalität

Mit dem MTS-Assay (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA) wurde in der vorliegenden Arbeit das Wachstum und die Vitalität der Zellen untersucht.

3.7.1 Vitalitätsassay unter Serumentzug

Vor den Vitalitätsversuchen wurde untersucht, ob die Zellzahl von S462-pRc- und S462-MK9-Zellen proportional zu den am Ende des MTS-Assays gemessenen Absorptionen ist. Die Ausgangszahl war 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe mit 1×10^4 , $0,5 \times 10^4$, $0,25 \times 10^4$ und $0,125 \times 10^4$ Zellen erstellt, indem die Zellsuspensionen jeweils 1:1 mit Medium verdünnt wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt und der MTS-Assay durchgeführt.

Für den Vitalitätsassay wurden 1×10^4 S462-pRc- und S462-MK9-Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte in 100 μ l Medium eingesät. Am nächsten Tag wurde den Zellen serumfreies Medium mit oder ohne 10 ng/ml Midkine (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) gegeben. Nach 24, 48 oder 72 h erfolgten MTS-Assays mit anschließender Auswertung mit dem Spektrophotometer.

3.7.2 Chemosensitivitätsassay

Die Vincristin-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH) und Cisplatin-Lösung (ASTA Media AG,

Frankfurt, Deutschland) wurden nach Angaben des Herstellers präpariert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die S462-Klone und parentalen Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^4 in die Vertiefungen von 96-Lochplatten mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Medium eingesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Vincristin und Cisplatin in frischem Medium für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurde der MTS-Assay durchgeführt und mit dem Spektrophotometer ausgewertet.

3.7.3 HUVEC-Proliferationsassay

Konditioniertes Medium wurde gewonnen, indem 1×10^6 Zellen der S462-Klone und parentalen Zellen in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte eingesät wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 1 ml serumfreies Medium ersetzt. Nach 72 h im Inkubator wurde das konditionierte Medium von den Zellen entfernt und durch Zentrifugation vom Detritus befreit.

Es wurden 1×10^3 HUVEC pro Vertiefung in 96-Lochplatten (beschichtet mit Kollagen S und mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Medium gefüllt) eingesät. Am nächsten Tag wurde das Medium zur Hälfte durch konditioniertes Medium und zur anderen Hälfte durch Medium 199 Earle inklusive 2% FKS ersetzt. Als Kontrolle wurde Medium 199 Earle mit 1% FKS verwendet. Die Zellen wurden für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der MTS-Assay durchgeführt und mit dem Spektralphotometer ausgewertet.

3.7.4 MTS-Assay

Der MTS-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ MTS zu dem Zellkulturmedium addiert. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurde die Absorption bei 490 nm mit einem Spektralphotometer (Multiscan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland) bestimmt. Von der gemessenen Absorption wurde die unspezifische Hintergrundabsorption (bestimmt bei einer Wellenlänge von 650 nm) abgezogen.

3.8 Bestimmung der Apoptoserate

Es wurden 8×10^5 Zellen der S462-MK-Klone und des Kontrollklons in Kulturgefäße mit 25 cm^2 Wachstumsfläche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel auf serumfreies Medium. Nach 72 h wurde die Apoptose in den Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen zuerst trypsiniert und zusammen mit dem Mediumüberstand bei 1200 rpm für 5 min in eine Zentrifuge (Rotanta IR, Hettich, Tübingen, Deutschland) überführt. Anschließend wurde eine der beiden nachfolgend beschriebenen Methoden durchgeführt.

3.8.1 Färbung mit Annexin-FITC und Propidiumjodid

Diese Methode ist in unserem Labor etabliert und wurde mit dem Phosphatidyl Serin Detection Kit IQP-116F (IQ-Products, Groningen, Niederlande) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer (FACScan™ Flowzytometer, BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland).

3.8.2 TUNEL-Assay

Es wurde ein TUNEL-Assay zur Apoptosemessung etabliert. Während der späten Abschnitte der Apoptose wird die DNS durch die Aktivierung von Endonukleasen fragmentiert. Das Nachweisverfahren funktioniert nach dem Prinzip, dass exogene TdT (terminale Deoxynucleotidyltransferase) die Bindung von Br-dUTP (bromierte Desoxyuridinetriphosphate) an 3'-Hydroxylgruppen von doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA katalysiert. Nach Permeabilisierung der Zellmembran ist es möglich, durch Zugabe von FITC-gebundenen monoklonalen anti-BrdU-Immunglobulinen die Anzahl der Fragmente mit Durchflusszytometrie zu bestimmen. Propidiumjodid bindet unspezifisch an die DNA von permeabilisierten Zellen. Durch Färbung mit Propidiumjodid kann zwischen Zellfragmenten oder Apoptosekörperchen und in der äußerlichen Struktur erhaltenen Zellen unterschieden werden. Der TUNEL-Assay wurde mit dem APO-BRDU™ (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und im Durchflusszytometer ausgewertet.

Bei jeder Messung wurde die Apoptoserate in der Positiv- und Negativkontrolle mitbestimmt. Die Positivkontrolle stellten S462-Rc-Zellen dar, die zuvor über 24 h mit 10 nM Staurosporin (Sigma-Aldrich GmbH) in Medium ohne FKS inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden die gleichen Zellen für 24 h in Medium mit 10% FKS inkubiert.

3.9 Statistische Auswertung

Mittelwerte und Mittelwertabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Excel 2000 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) berechnet und graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem U-Test von Mann-Whitney überprüft. Hierbei wurde das Programm SPSS 12.0.1 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) verwendet. Als Signifikanzschwelle wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) gewählt. Dieser nichtparametrische Test ist besonders geeignet für Versuche mit sehr kleinen Stichproben, bei denen nicht sicher ist, ob die Werte normalverteilt sind. Diese Situation ist in

Zellkulturexperimenten üblich.

4 ERGEBNISSE

4.1 Generierung stabil Midkine überexprimierender MPNST-Zellklone

4.1.1 Optimierung der Transfektionseffizienz von MPNST-Zelllinien

Um die Tumorigenität von MPNST-Zelllinien in Abhängigkeit von der MK-Expression zu untersuchen, war die Generierung stabil MK-überexprimierender MPNST-Zellklone notwendig. Für die hier verwendeten MPNST-Zelllinien lagen noch keine Transfektionsprotokolle vor. Durch eine höhere transiente Transfektionsrate vergrößert sich auch die Anzahl an Zellen mit stabil integrierter Plasmid-DNS. Die Transfektionseffizienz wurde an der Zelllinie S520 mit den Transfektionssubstanzen Superfect und Effectene getestet. Das verwendete Reporterplasmid pGreenlantern kodiert für GFP („green fluorescent protein“) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Um die optimalen Transfektionsbedingungen zu erzielen, wurde jeweils die Menge an Transfektionssubstanz und Plasmid-DNS sowie das Verhältnis zwischen Transfektionssubstanz und Plasmid-DNS variiert. Die höchste Transfektionseffizienz wurde bei einer Zellzahl von 4×10^4 Zellen pro Loch in 4-kammerigen Chamberslides und einer Inkubationsdauer von 3 h mit 5 μ l Superfect und 1 μ g Plasmid-DNS erzielt (Abb. 3).

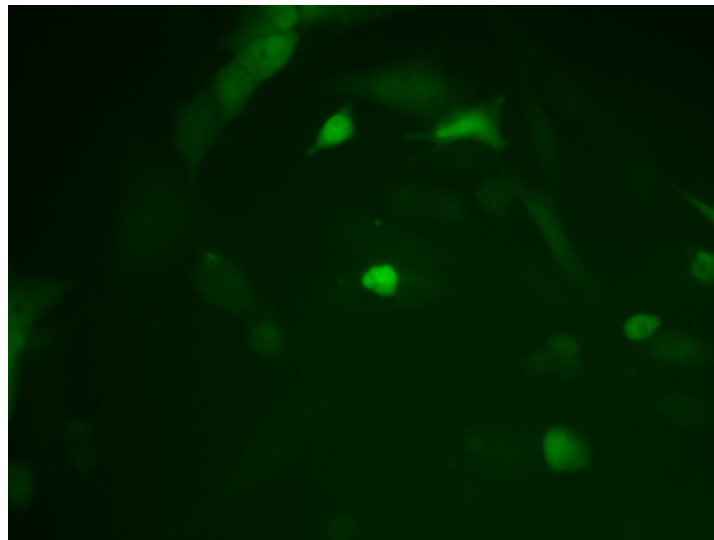


Abb. 3: **GFP-Expression nach Transfektion von S520:**

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in die Kammern der Chamberslides eingesät. Über eine Dauer von 3 h erfolgte die Transfektion mit 5 μ l Superfect und 1 μ g Plasmid-DNS in Medium mit FKS. 48 h nach Transfektionsbeginn wurde die GFP-Expression unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

4.1.2 Stabile Transfektion von MPNST-Zelllinien

Die stabile Transfektion fand unter den optimierten Bedingungen umgerechnet auf 30 mm-Zellkulturplatten statt. Zwei Tage nach der Transfektion mit Superfect und dem Vektor pRc/CMV-MK bzw. dem Leervektor pRc/CMV wurde dem Medium Geneticin hinzugefügt. Zellen, die das *neo*-Resistenzgen der Plasmide exprimieren, haben eine Resistenz gegenüber Geneticin. Durch die hohe Konzentration von Geneticin im Medium (1 mg/ml) erhielten vor allem die Klone einen Wachstumsvorteil, die multiple Kopien an Plasmid-DNS in ihr Genom integriert hatten. Nach der Selektion wurden die Zellklone durch Lösen und Absaugen vom Kulturplattenboden in 96-Lochplatten übertragen. Es konnten erfolgreich Klone der MPNST-Zelllinien S462 isoliert und weiter passagiert werden. Von der MPNST-Zelllinie S520 konnten Klone isoliert werden, die jedoch beim Versuch, die Zellzahl zu expandieren, apoptotisch wurden und sich vom Boden der Lochplatten lösten.

4.2 Selektion MK überexprimierender Klone

4.2.1 Etablierung einer quantitativen RT-PCR für MK

Für die quantitative Analyse von MK wurde ein Primerpaar (ex3for-ex4rev) mit der Software Primerexpress 2.0 generiert. Das resultierende Amplikon umfasst 69 Basenpaare. Es wurde eine quantitative PCR mit SYBRGreen als fluoreszierendem Farbstoff etabliert. SYBRGreen emittiert nach Bindung in die kleine Grube („minor groove“) doppelsträngiger DNA verstärkte Fluoreszenz, so dass mit Hilfe von SYBRGreen sequenzunabhängig die Menge an doppelsträngiger DNS gemessen werden kann. Grundlage für die MK-RNS-Konzentrationsbestimmung und Berechnung der Effizienz war die Standardreihe aus logarithmisch verdünnter cDNA der MPNST-Zelllinien S462 und ST88-14 in einem Messbereich von 50-0,05 ng RNS-Äquivalent (Abb. 4). Das RNS-Äquivalent ist die Menge an cDNA, die aus der reversen Transkription einer bestimmten RNS-Menge hervorgegangen ist. Über den gesamten Messbereich der Standardreihe zeigte sich eine hohe Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von -1 . Die Standardreihe umfasste die erwarteten Werte der in dieser Arbeit gemessenen Proben. Ihre Steigung („slope“) betrug durchschnittlich 3,85. Daraus berechnet sich eine PCR-Effizienz von 1,82. Eine Effizienz von 2,0 ist optimal, angestrebt werden sollten Effizienzen von $>1,8$. In der Kontrolle ohne cDNA („no template control“, NTC) wurde kein Anstieg der Fluoreszenz über den unspezifischen Hintergrund oder weit hinter dem Messbereich nach mehr als 41 Zyklen gemessen.

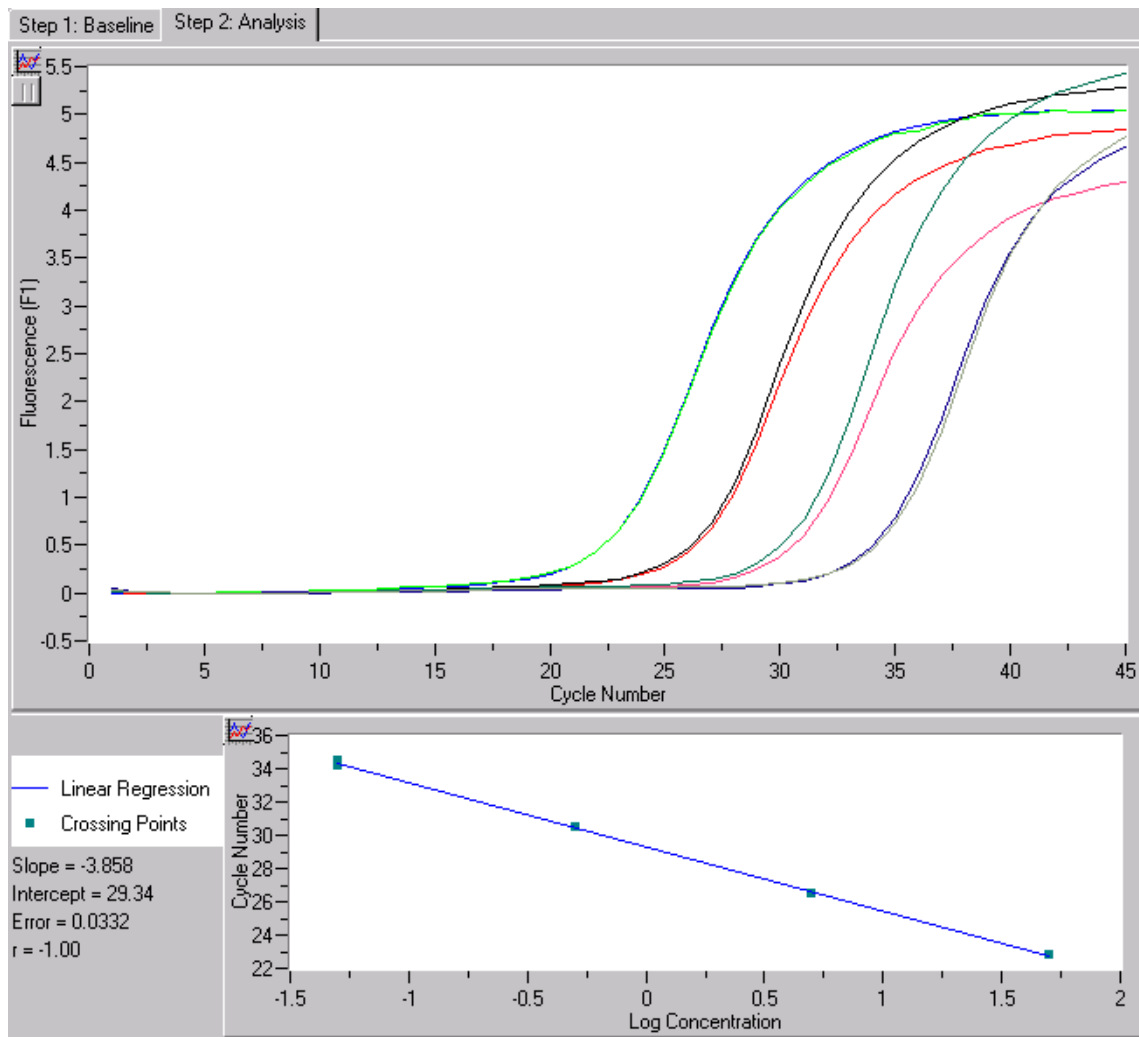


Abb. 4: **Standardreihe für die RT-PCR von MK:**

Eine Standardreihe wurde bei jeder RT-PCR durch Verdünnung von cDNA der MPNST-Zelllinien S462 und ST88-14 mitbestimmt. Die Standardreihe wurde generiert durch logarithmische Verdünnung von cDNA in einem Bereich von 50-0,05 ng RNS-Äquivalenten cDNA. Jede Verdünnungsstufe wurde doppelt bestimmt.

Da SYBRGreen unspezifisch an jede doppelsträngige DNS also auch an Primer-Dimere und andere unerwünschte Produkte bindet, erfolgte nach der Quantifizierung eine Analyse des Schmelzverhaltens der Amplikone (Abb. 5). Das Schmelzverhalten von doppelsträngiger DNS ist abhängig von der Menge an Guanin- und Cytosin-Basen, Länge und Sequenz der Produkte. Das Amplikon des MK-Gens zeigte einen Schmelzpunkt bei 85 °C. Der NTC fehlte ein Schmelzpunkt in diesem Bereich und Primer-Dimere waren kaum erkennbar. Die Analyse der Spezifität mit der Schmelzpunktanalyse entsprach den Ergebnissen der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung der PCR-Produkte (Daten nicht gezeigt).

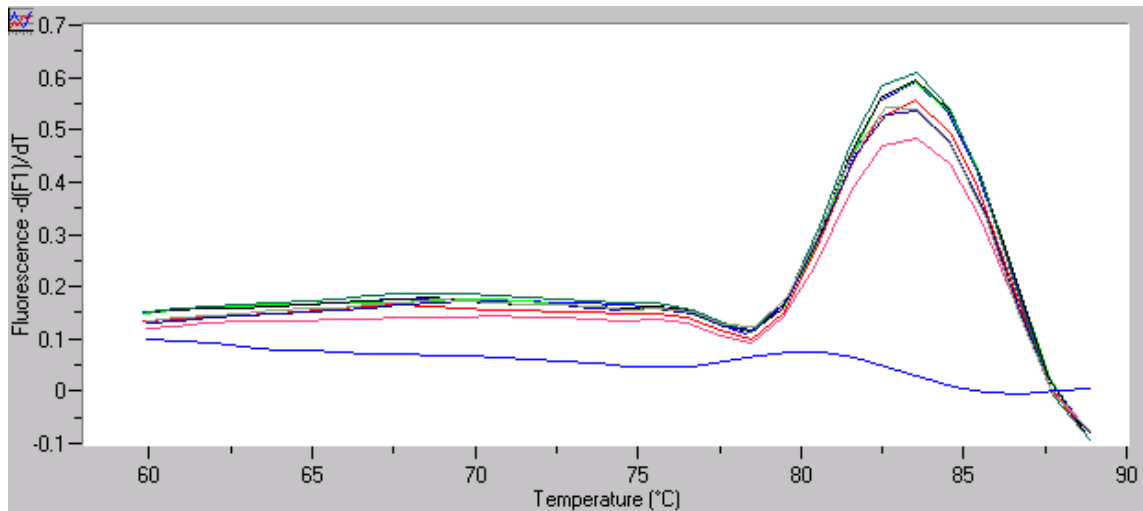


Abb. 5: Analyse der Spezifität der MK-RT-PCR:

Die Abbildung zeigt den spezifischen Schmelzpunkt des Amplikons bei ungefähr 85 °C. Es wurden die Proben der Standardreihe analysiert. Die NTC (lila) zeigt kaum Primer-Dimer-Formationen und keine Spitze bei 85 °C. ($dF1/dT$, negative erste Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit)

Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt, da es sehr stabil in neuroektodermalen Gewebe exprimiert wird. Die Amplifikation von GAPDH wies eine ähnliche Effizienz wie die von MK auf. Die Primer wurden aus der Literatur entnommen (114).

4.2.2 Genexpression von MK in den MPNST-Zellklonen

Von der Zelllinie S462 wurden 45 Klone isoliert, die mit dem MK kodierenden Vektor transfiziert wurden (MK1-MK45) und ein Kontrollklon, der mit dem Leervektor transfiziert wurde (pRc). Die Klone wurden auf ihre MK-RNS-Expression mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 6). Die meisten Klone zeigten initial Expressionslevel, die sich unter dem Doppelten der Kontrolle befanden. Ursache war sehr wahrscheinlich die hohe MK-Expression der parentalen S462-Zellen. Bei den Klonen, die eine ähnliche MK-Expression wie die parentale Zelllinie aufwiesen, kam es möglicherweise zum Verlust oder unvollständigen Einbau der MK-Expressionseinheit in die genomische DNA.

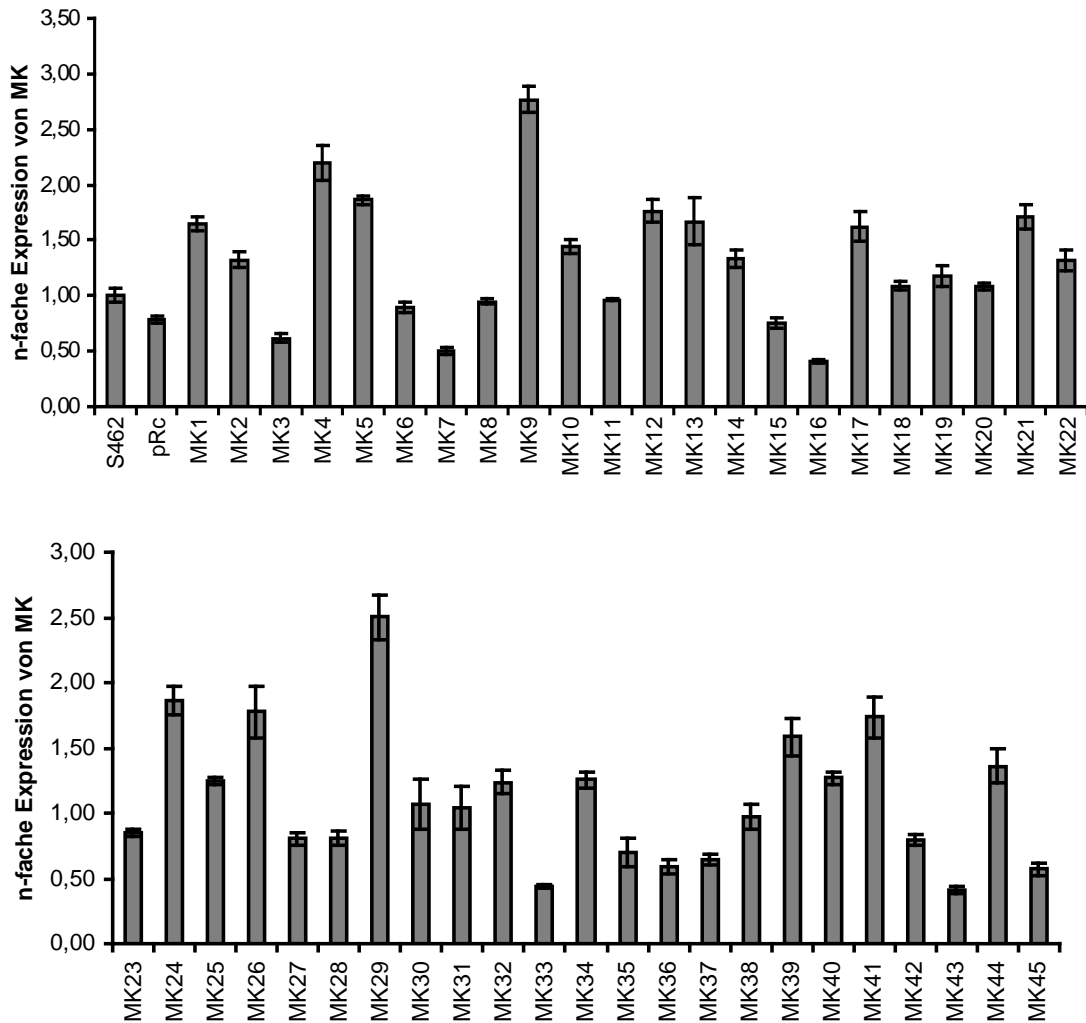


Abb. 6: MK-Genexpression aller isolierter S462-Klone:

Die MK-Expression von 45 S462-MK-Klonen und der Kontrolle (pRc) ist als das Vielfache der parentalen Zelllinie S462 dargestellt.

Die Klone S462-MK 4 und S462-MK 9 wiesen nach der Selektion durch Geneticin und ihrer anschließenden Isolation zwei- bis dreifach höhere MK-Expressionslevel als die parentalen Zelllinie S462 auf. Sie wurden für die weiteren Versuche verwendet. Mit steigender Passagenzahl unterschied sich die MK-Expression der beiden S462-MK-Klone zunehmend von dem Ausgangswert, wodurch sich die im Vergleich zu den anderen Klonen größere Standardabweichung ergab (Abb. 7). Um für die weiteren Versuche konstante MK-Expressionen zu erreichen, wurden die stabil MK überexprimierenden Zellen vorher mit 1000 µg/ml Geneticin erneut ausselektiert. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die S462-MK-Klone unabhängig von einer Vorbehandlung durch Geneticin MK höher exprimieren als die parentale Zelllinie S462 und der Kontrollklon S462-Rc ($p < 0,05$). In der parentalen Zelllinie S462 und dem Klon S462-

pRc wurde MK unabhängig von der Passagenzahl annähernd konstant exprimiert. Die Menge an MK-RNS im mit MK transfizierten Klon ST88-14-MK4 war fünffach höher im Vergleich zum Kontrollklon ST88-14-pRc ($p < 0,05$). Die MK-Expression des ST88-14-MK-Klons war der der S462-MK-Klone sehr ähnlich. Allerdings unterschied sich die basale MK-Expression zwischen den ST88-14-Zellen und den S462-Zellen. So exprimiert der Kontrollklon ST88-14-pRc halb so viel MK-RNS wie der Kontrollklon S462-pRc ($p < 0,05$).

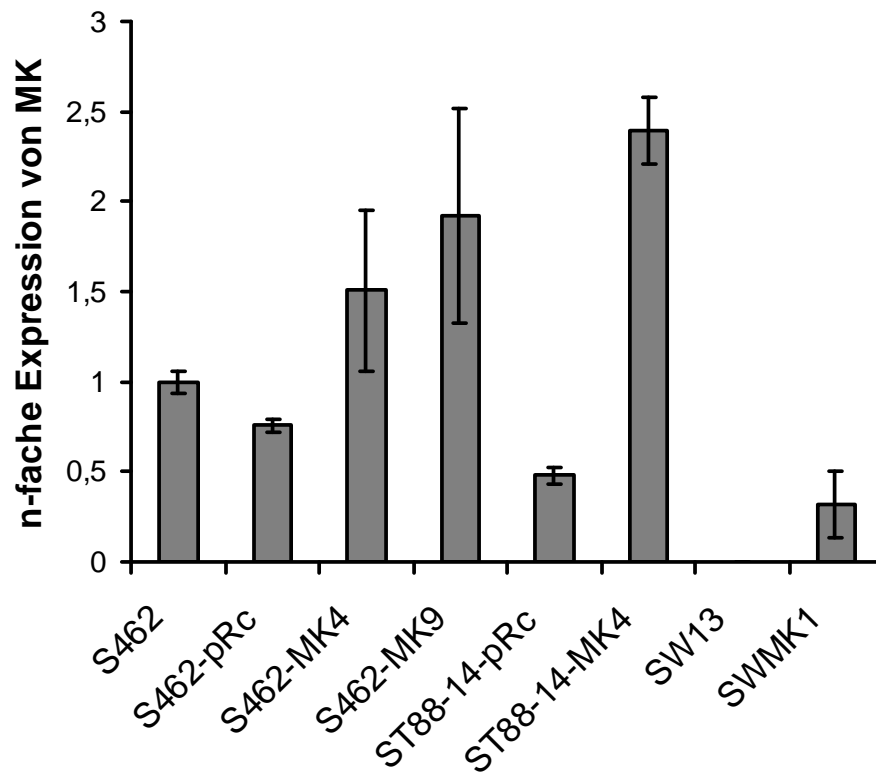


Abb. 7: Vergleich der MK-Genexpression verschiedener MK-Klone:

Dargestellt ist die MK-Expression der Klone der MPNST-Zelllinie S462 und ST88-14 in Relation zu den parentalen S462-Zellen. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Zwischen den Versuchen mit den S462-Zellen bestand ein längerer Passagezeitraum. Als Negativkontrolle wurde die MK-Expression der Zelllinie SW13 und als Positivkontrolle die des Klons SWMK1 untersucht.

Als Negativkontrolle wurde die Adrenokarzinomzelllinie SW13 verwendet, in der bisher keine MK-Expression gemessen werden konnte (68). Mit der in dieser Arbeit etablierten sensitiven quantitativen RT-PCR wurde eine MK-Expression in den SW13-Zellen nachgewiesen, die über 700-fach niedriger war als die in den parentalen S462-Zellen ($p < 0,05$). Stabile Transfektion von SW13-Zellen mit dem gleichen auch für die MPNST-Zellen benutzten Vektor (116) induzierte eine MK-Genexpression, die um das Dreifache niedriger als die der parentalen S462-Zellen war ($p < 0,05$).

4.2.3 MK-Konzentration im konditionieren Medium der S462-Klone

Das Medium wurde bis zu 96 h auf den S462-MK-Klonen, dem Kontrollklon S462-pRc und den parentalen S462-Zellen konditioniert. Damit ausschließlich von den MPNST-Zellen in das Medium abgegebenes MK gemessen wurde, enthielt das Medium kein Serum. Die Bestimmung der MK-Konzentration im Medium erfolgte mit einem für MK sehr spezifischen ELISA mit synthetischen MK-Protein als Standard (117). Mit Zunahme der Inkubationszeit stieg die MK-Konzentration im konditionierten Medium der MPNST-Zellen an (Abb. 8). Die Medien von Kontrollklon (pRc) und parentalen S462-Zellen unterschieden sich kaum in ihrer MK-Konzentration. Die Menge an löslichem MK im konditionierten Medium der mit MK transfizierten S462-Zellen (MK4, MK9, durchgezogene Linie) war zeitabhängig ungefähr zwei- bis vierfach höher als im konditionierten Medium der parentalen Zelllinie S462 bzw. des Kontrollklons.

Es bestand ein Unterschied zwischen der gemessenen MK-Überexpression der transfizierten S462-Zellen auf RNA-Ebene (Faktor: 1,5-2) und Proteinebene (Faktor: 2-4). Auch bei der Bestimmung der MK-Konzentration im Medium der S462-Klone diente die Zelllinie SW13 als Negativkontrolle und ihr Klon SWMK1 als Positivkontrolle. Obwohl die MK-RNS-Konzentration in den SW-MK1-Zellen geringer als in den S462-Zellen waren, wurden sehr viel höhere MK-Proteinkonzentrationen im Medium des SWMK1-Klons als im Medium der S462-MK-Klone gemessen.

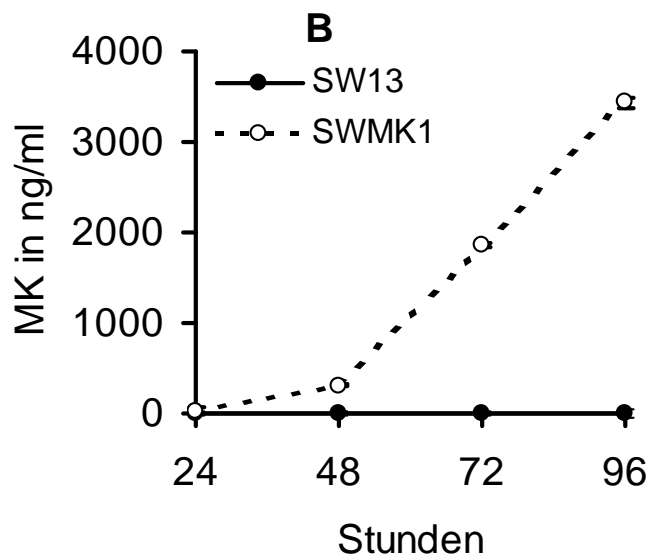
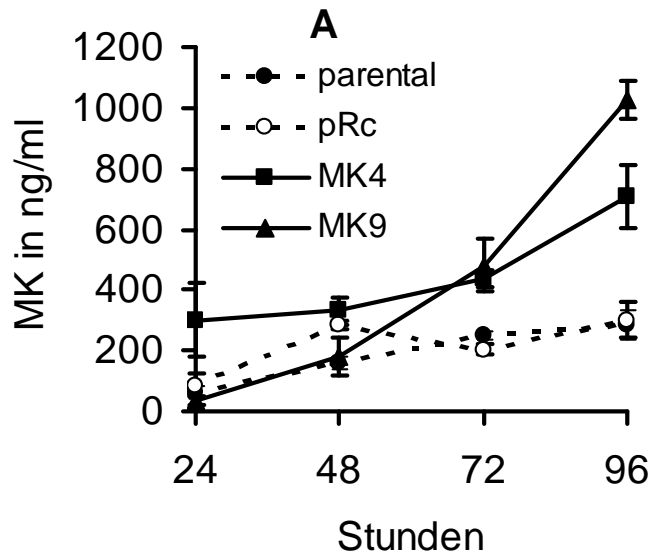


Abb. 8: MK-Konzentration im Zellkulturüberstand:

Serumfreies Medium wurde über eine unterschiedlich lange Zeitperiode (24-96 h) konditioniert. Die Bestimmung der MK-Konzentration erfolgte durch einen ELISA mit synthetischem MK-Protein als Standard. MK-Konzentrationen im konditionierten Medium der S462-MK-Klone (MK4, MK9; durchgezogene Linie), des Kontrollklons (pRc) und der parentalen Zelllinie S462 (A). MK-Konzentration im konditionierten Medium der Zelllinie SW13 (Negativkontrolle) und dem Subklon SW13MK1 (Positivkontrolle) (B).

4.3 Tumorigenitätsassay in Nod/Scid-Mäusen

Nod/Scid-Mäuse eignen sich für *in vivo* Tumorigenitätsversuche, weil sie ein defektes Immunsystem aufweisen. In Kombination mit einer Bestrahlung mit γ -Strahlen in einer Dosis von 200 cGy kommt es nur selten zu Abstoßungsreaktionen gegen Xenotransplantate. Nach Implantation von Tumorzellen in Nod/Scid-Mäusen ist das Anwachsen von ihrem Proliferations-, Apoptose-, Invasionsverhalten und ihrer angiogenetischen Potenz abhängig. MPNST-Zelllinien sind nicht tumorigen. Tumorigene MPNST-Zelllinien sind für die Etablierung eines Tiermodells zur präklinischen Testung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung. Ob die stabile Überexpression von MK in MPNST-Zellen die Tumorigenität induzieren kann, wurde sowohl an den MK-Klonen der MPNST-Zelllinie S462 und ST88-14 getestet. Es wurden die Klone mit der höchsten MK-Überexpression verwendet. Es konnte kein Tumorwachstum nach submuskulärer und subkutaner Injektion von $2\text{-}5 \times 10^7$ Zellen der Klone S462-MK4, S462-MK9 und ST88-14-MK4 in Nod/Scid-Mäusen beobachtet werden. Auch die Kontrollklone und parentalen Zellen wuchsen nicht in den Mäusen an.

4.4 Einfluss der MK-Überexpression auf Tumorzelleigenschaften

Überexpression von MK konnte die Tumorigenität von MPNST-Zellen in unserem Tiermodell nicht induzieren. Dennoch können *in vitro* Unterschiede in den Tumoreigenschaften zwischen der parentalen MPNST-Zelllinie und ihren Klonen bestehen. Diese Unterschiede können Aufschluss über die biologische Funktion von MK in MPNST-Zellen liefern und einen Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien darstellen. Die Überexpression von MK in der MPNST-Zelllinie S462 veränderte die Zellvitalität, Apoptose und angiogene Potenz.

4.4.1 Zellvitalität und Chemosensitivität

MK wirkt mitogen auf verschiedene Zelllinien. Mit dem MTS-Nachweisverfahren kann die Anzahl vitaler Zellen bestimmt werden. Das Spalten eines in der MTS-Substanz enthaltenen Tetrazoliumringes durch mitochondriale Dehydrogenasen verursacht eine Farbreaktion, die die Zellaktivität wiedergibt. Die Zellaktivität ist in den meisten Zelllinien proportional zur Zellzahl. Für MPNST-Zellen war ein solcher Zusammenhang bisher noch nicht untersucht worden. Die MTS-Substanz wurde mit aus Verdünnungsreihen erhaltenen unterschiedlichen Zellzahlen des Kontrollklons S462-pRc und des Klons S462-MK9 inkubiert (Abb. 9). Dabei zeigte sich, dass die gemessenen Farbreaktionen und Zellzahlen im Bereich von $1,25 \times 10^3$ - 10×10^3 Zellen zueinander linear korrelieren (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,997$ für S462-pRc und $0,995$ für S462-

MK9).

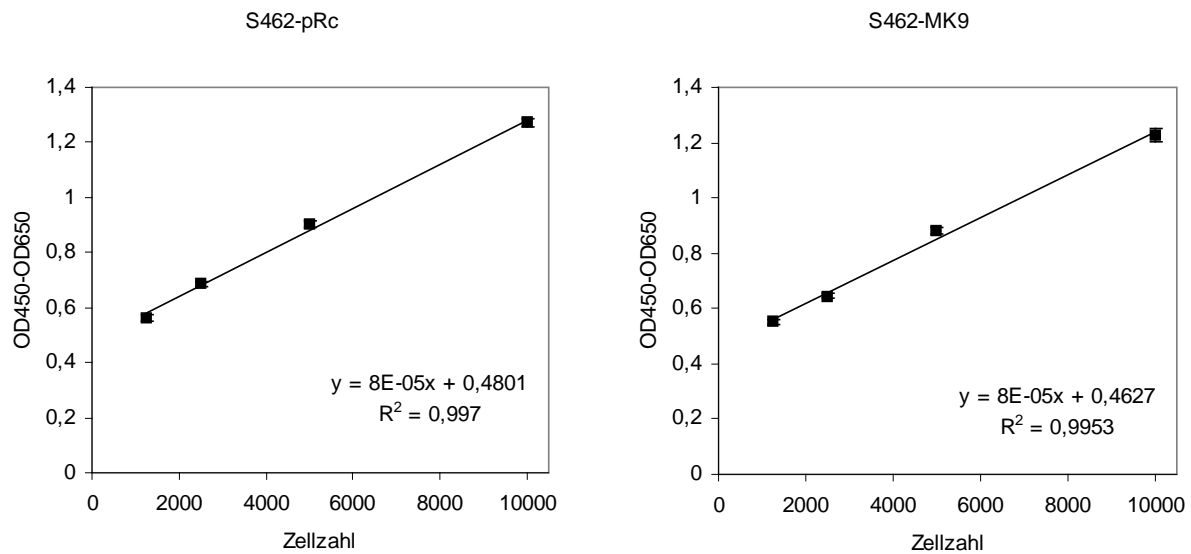


Abb. 9: **Korrelation der Zellzahl mit der Farbreaktion des MTS-Tests:**

Der Kontrollklon S462-pRc und der Klon S462-MK9 wurden mit verschiedenen Zellzahlen in 96-Lochplatten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium und die Zellen wurden für 4 h mit der MTS-Substanz inkubiert. Die Farbreaktion wurde bei 450 nm Wellenlänge mit einem Spektrophotometer abgelesen. Von ihr wurde die unspezifische Hintergrundfärbung bei einer Wellenlänge von 650 nm abgezogen.

Eine Messung der Zellzahl mit dem MTS-Nachweisverfahren zu unterschiedlichen Zeitpunkten liefert Auskunft über die Wachstumsrate oder die Vitalität von Zellen (Abb. 10).

Nach einem Serumentzug fehlen den Zellen alle exogen addierten Wachstumsfaktoren. Das Zellwachstum und Überleben ist nur noch von der autokrinen oder parakrinen Wirkung der eigenständig synthetisierten Wachstumsfaktoren abhängig. Zur Untersuchung der Zellvitalität wurde der am höchsten MK exprimierende MPNST-Zellklon S462-MK9 verwendet. Nach 48 h Serumentzug stieg die Zellzahl des Kontrollklons S462-pRc nicht signifikant an ($p=0,055$). Obwohl der mit MK transfizierte Klon S462-MK9 und der Kontrollklon, dessen Medium 10 ng/ml MK enthielt, statistisch signifikant ($p<0,05$) in ihrer Zellzahl wuchsen, handelte es sich um einen zu geringen Unterschied, als dass er biologisch von Bedeutung wäre. Nach 72 h im serumfreien Medium war die Zellzahl des S462-MK9-Klones deutlich höher als die des Kontrollklons ($p<0,05$). Externe Addition von 10 ng/ml MK in das Medium des Kontrollklons erhöhte die Vitalität der Zellen signifikant ($p<0,05$). Dagegen konnte die externe Addition von MK in das Medium von S462-MK9 die Zellvitalität deutlich geringer beeinflussen. Das Wachstumsverhalten im Medium mit Serum unterschied sich nicht zwischen den MK-Klonen

und dem Kontrollklon oder der parentalen Zelllinie (Daten nicht gezeigt).

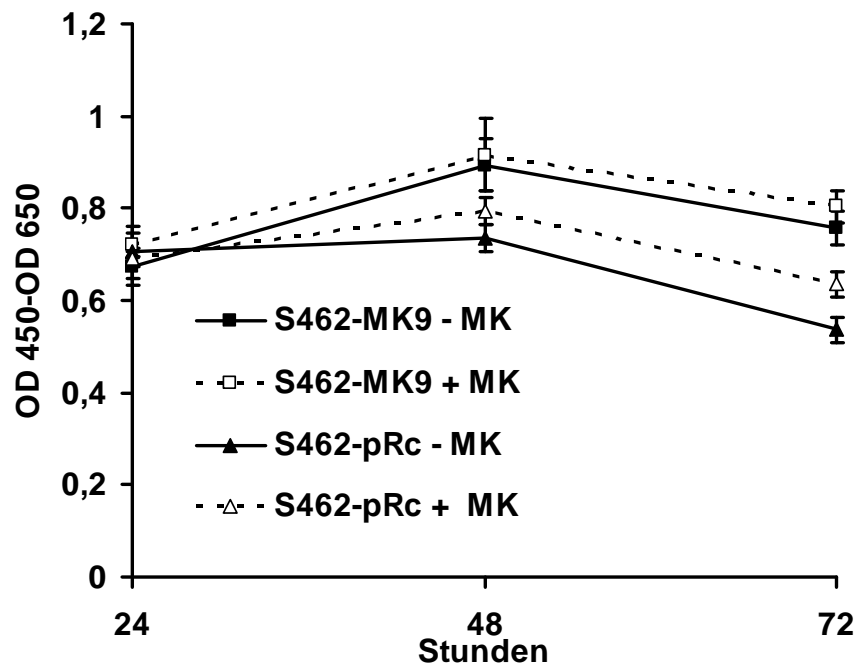


Abb. 10: Zellvitalität unter Serumentzug:

Der MK-Klon (S462-MK9) und der Kontrollklon (S462-pRc) wurden in serumfreiem Medium kultiviert und die Vitalität zu unterschiedlichen Zeitabschnitten (24-72 h) mit dem MTS-Test gemessen. Zum Medium wurden 10 ng/ml MK (+MK) oder kein MK (-MK) hinzugefügt. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Zusätzlich wurde die Vitalität der S462-MK-Klone mit den parentalen Zellen nach Behandlung mit Vincristin und Cisplatin verglichen (Abb. 11). Die Konzentration, die zur Inhibition von 50% aller Zellen durch Vincristin führte (IC50), war im Vergleich zu den parentalen Zellen für den Klon S462-MK4 1,6-fach höher und für den Klon S462-MK9 3,5-fach höher. Dagegen hatte die Überexpression von MK in S462-Zellen keinen Effekt auf die IC50 von Cisplatin.

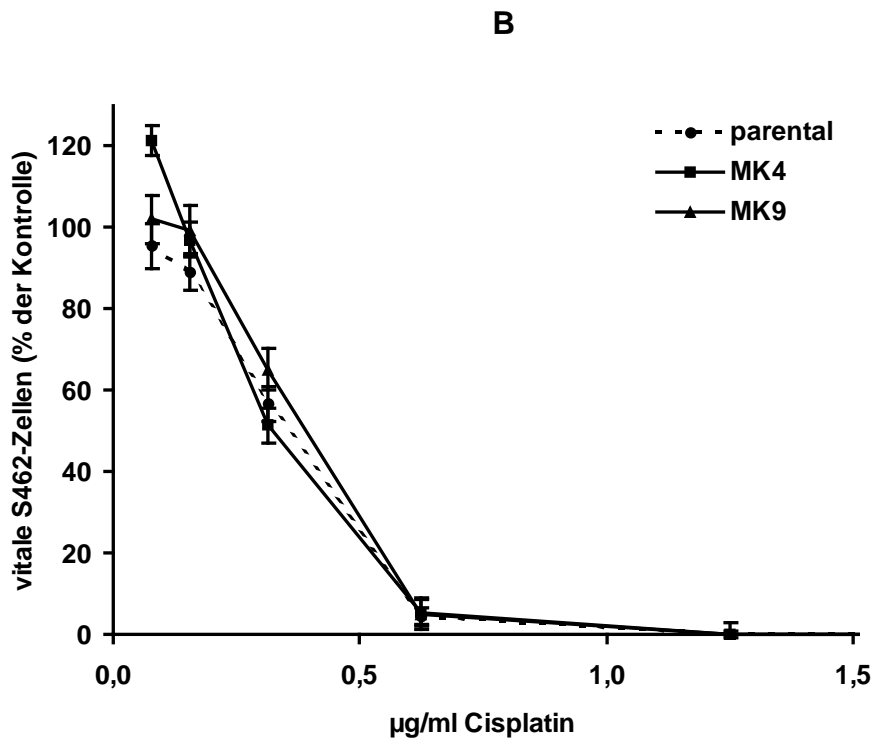
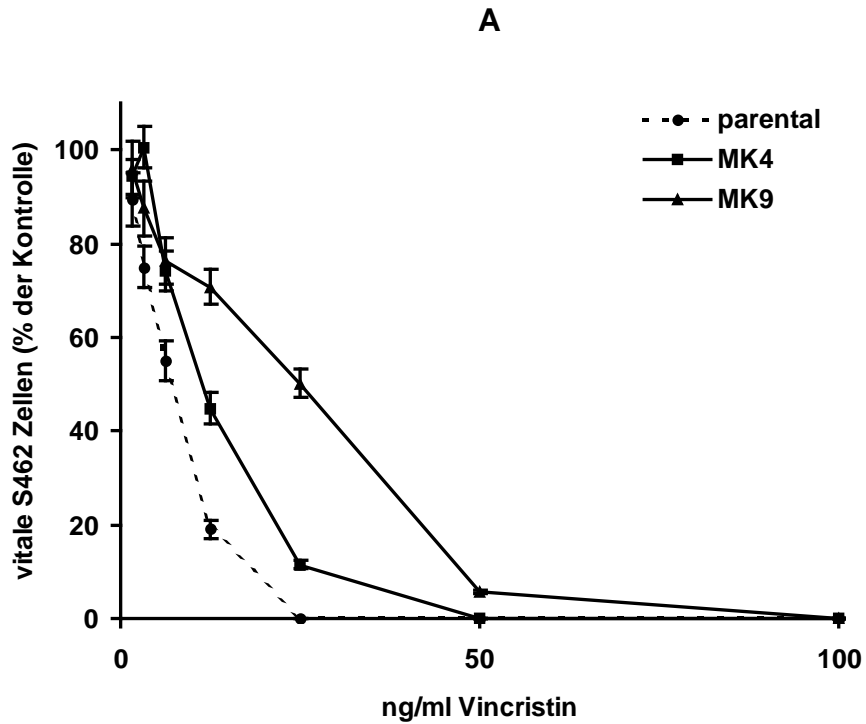


Abb. 11: Chemosensitivität gegenüber Vincristin und Cisplatin:

Die S462-MK-Klone (MK4 (Quadrat), MK9 (Dreieck), durchgezogene Linie) und die parentale Zelllinie (Kreis, gestrichelte Linie) wurden für vier Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von Vincristin (A) und Cisplatin (B) inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität mit dem MTS-Test festgestellt.

4.4.2 Apoptose

Die MK-Überexpression könnte niedrigere Apoptoseraten unter serumfreien Kulturbedingungen bedingen, die für die höhere Zellvitalität von MPNST-Zellen verantwortlich sind. Die Anzahl apoptotischer Zellen wird zumeist mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. In unserem Labor ist die durchflusszytometrische Messung mit Annexin-FITC und Propidiumjodid etabliert (Abb. 12). In lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin ausschließlich in der inneren Schicht der Doppellipidmembran. Während der frühen Phase der Apoptose gelangt Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Zellmembran und kann dann durch die Bindung von Annexin-FITC nachgewiesen werden. Da die Zellmembran vor der Färbung nicht permeabilisiert wird, gelangt Propidiumjodid nur in spät-apoptotische oder nekrotische Zellen. Bei den positiv für Annexin-FITC und negativ für Propidiumjodid gefärbten Zellen handelt es sich um früh-apoptotische Zellen. Die Analyse der Annexin-FITC-positiven Zellen ergab unerwartet, dass der Anteil an apoptotischen Zellen der MK-Klone nach 72 h Serumentzug sich völlig unspezifisch gegenüber dem des Kontrollklons verhielt. Eine Recherche über mögliche methodische Fehler ergab, dass durch das Trypsinieren vor der Färbung mit Annexin-FITC Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Doppellipidmembran gelangt sein könnte und dadurch die Daten verfälscht wurden (118).

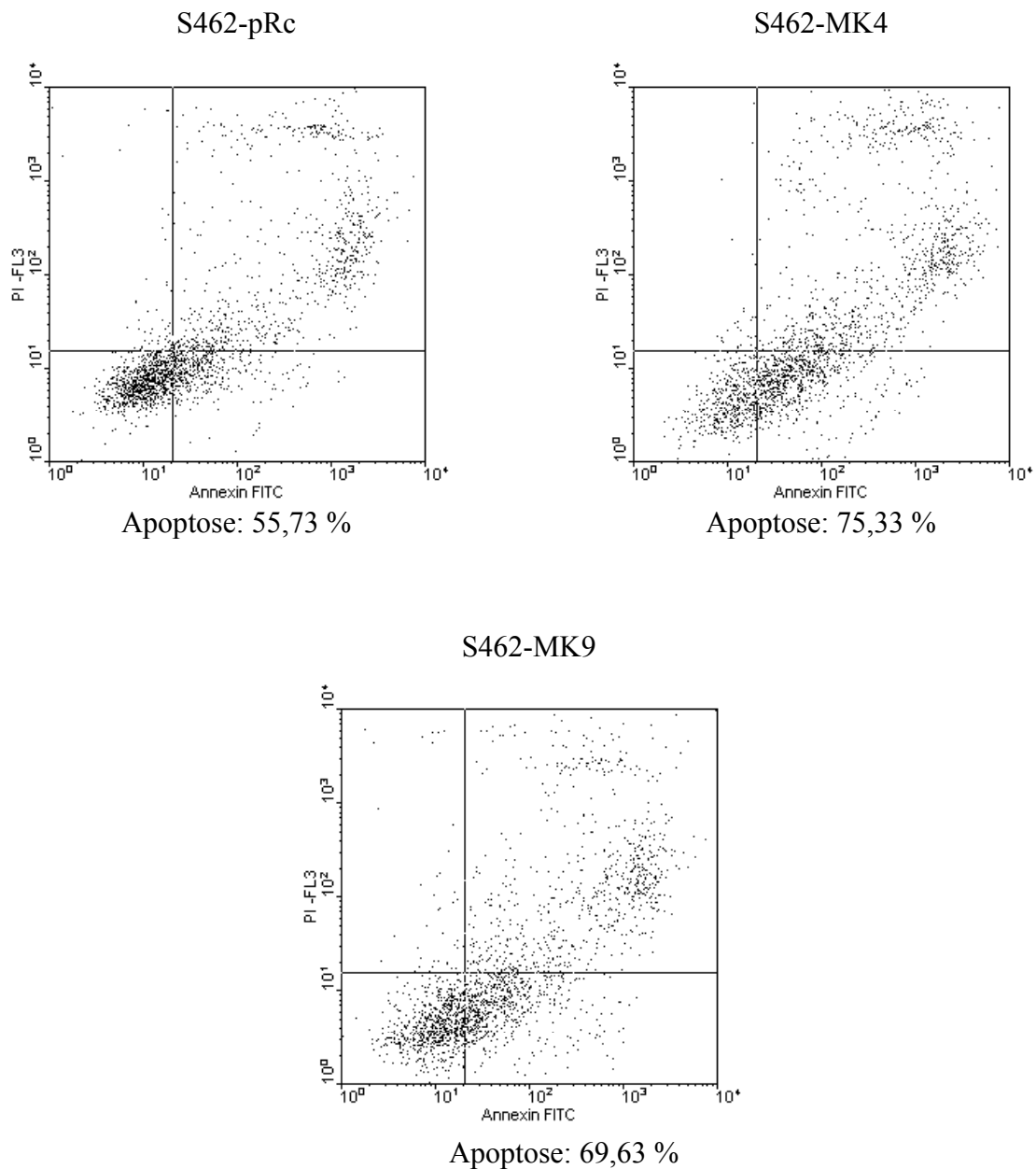


Abb. 12: Färbung der MPNST-Zellen mit Annexin-FITC und Propidiumjodid:

Die S462-MK-Klone und der Kontrollklon S462-pRc wurden nach 72-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium trypsiniert und mit Annexin-FITC und Propidiumjodid angefärbt. Es folgte eine durchflusszytometrische Auswertung, wobei die Zellen als apoptotisch gewertet wurden, die positiv für Annexin-FITC (rechter unterer und oberer Quadrant im Dot Plot) waren.

Ausgehend von dieser Information wurde der TUNEL-Assay etabliert (Abb. 13). Beim TUNEL-Assay werden nach dem Einbau von dUTPs an 3'-Hydroxylgruppen an den freien Enden von doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNS Strangbrüche mit FITC-gebundenen anti-BrdU-Antikörpern nachgewiesen. Doppelstrangbrüche sind sehr spezifisch für die späte Phase der Apoptose. Durch die Fixierung wurden die Zellen für Propidiumjodid permeabel.

Geringfügig mit Propidiumjodid angefärbte Zellen stellten nukleäre Fragmente in apoptotischen Zellen oder Apoptosekörperchen dar, die nicht zu den apoptotischen Zellen gerechnet wurden. Als Positivkontrolle wurde der Kontrollklon 24 h mit 10 nM Staurosporin in serumfreiem Medium behandelt. Inkubation des Kontrollklons für 24 h mit serumhaltigen Medium diente als Negativkontrolle.

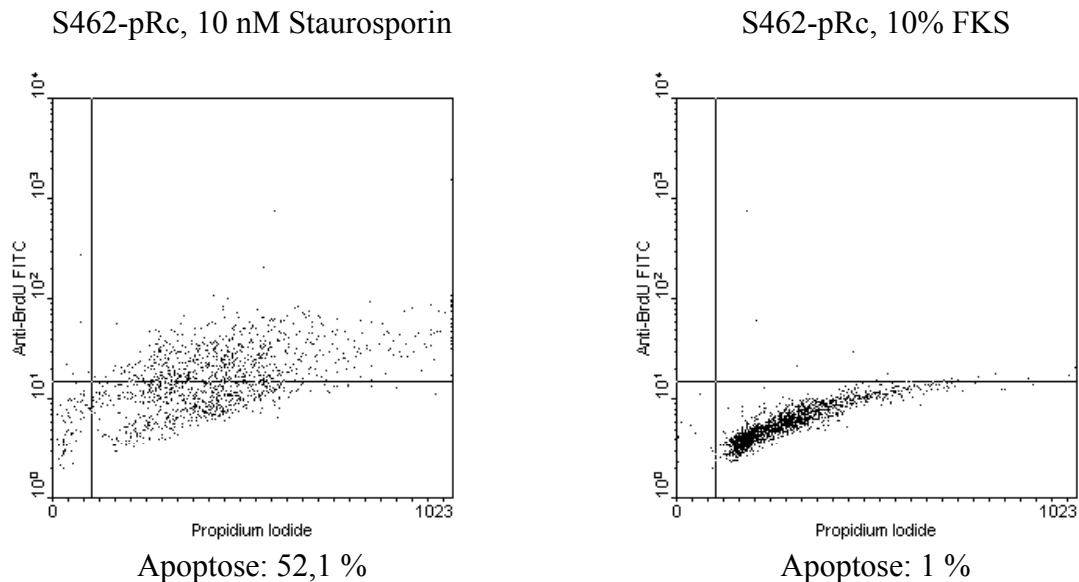


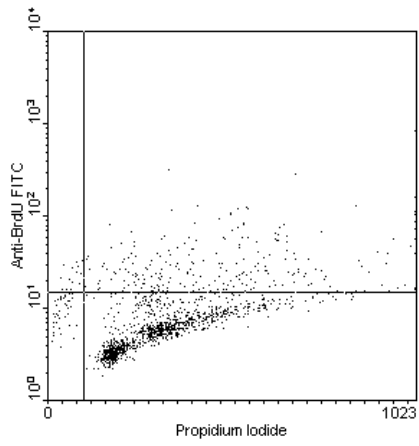
Abb. 13: Etablierung einer Apoptosemessung mit dem TUNEL-Assay:

Der Kontrollklon S462-pRc wurde für 24 h in Medium mit 10 nM Staurosporin ohne FKS (Positivkontrolle) oder in Medium mit 10% FKS (Negativkontrolle) inkubiert. Die trypsinisierten Zellen wurden zusammen mit den Zellen aus dem Überstand nach Anfärben mit Anti-BrdU-FITC zum Nachweis von DNS-Doppelstrangbrüchen durchflusszytometrisch untersucht. Die apoptotischen Zellen sind im rechten oberen Quadranten des Dot Plots zu sehen und unter dem Dot Plot in Prozent von der gesamten Population angegeben.

Mit diesem Messverfahren zeigte sich, dass die Anzahl an apoptotischen Zellen nach 72 h Serumentzug in den MK-Klonen um das 2-6-fache niedriger war als im Kontrollklon ($p < 0,05$, Abb. 14). Überexpression von MK in MPNST-Zellen schützte diese demnach vor durch Serumentzug induzierte Apoptose. Die niedrigere Apoptoserate der MK-Klone korrelierte mit den Ergebnissen aus den Vitalitätsassays unter serumfreien Bedingungen.

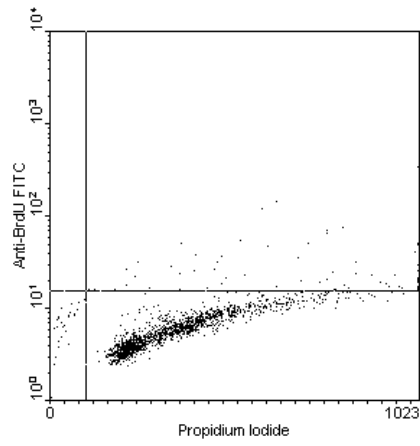
A

S462CMV



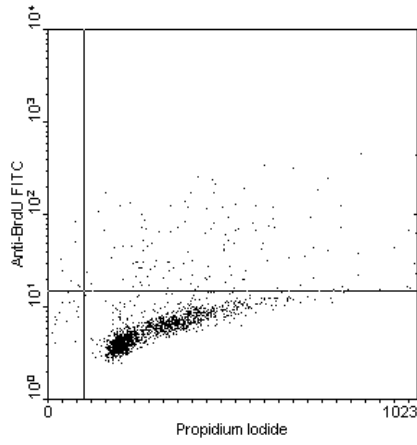
Apoptose: 18,06 %

S462MK4



Apoptose: 4,40 %

S462MK9



Apoptose: 9,15 %

B

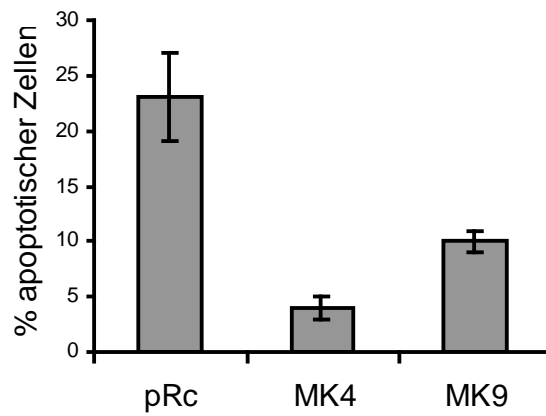


Abb. 14: Apoptoseverhalten nach 72 h Serumentzug:

Nach 72-stündiger Inkubation wurde die Apoptoserate der S462-MK-Klone (MK4, MK9) und des Kontrollklons (pRc) mit dem TUNEL-Assay gemessen. (A) Beispielhaft ist jeweils ein repräsentativer Dot Plot für jeden MPNST-Zellklon dargestellt. Die apoptotischen Zellen befinden sich im rechten oberen Quadranten und ihr Anteil an der gesamten Zellpopulation ist unter den Dot Plots angegeben. (B) Darstellung der Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen.

4.4.3 Proliferation von HUVEC

Die Angiogenese ist für das Tumorwachstum von großer Bedeutung. Partial aufgereinigtes MK wirkt direkt angiogen auf humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC). Um herauszufinden, ob konditioniertes Medium der MK überexprimierenden S462-Klone *in vitro* zu einer Erhöhung der Angiogenese führt, wurde ein HUVEC-Assay etabliert (Abb. 15). Serumfreies Medium wurde für 96 h auf den S462-Klonen konditioniert und auf die HUVEC gegeben. Zur Kontrolle wurde das Wachstum der HUVEC mit unkonditioniertem Medium untersucht. Nach 72 h proliferierten die Endothelzellen mit konditioniertem Medium des Kontrollklons (pRc) stärker als die Kontrolle ($p < 0,05$). HUVEC mit konditioniertem Medium der MK-Klone (MK4, MK9) wiesen nach 72 h ein um den Faktor 1,4-1,6 erhöhtes Wachstum im Vergleich zu den HUVEC mit konditioniertem Medium des Kontrollklons auf ($p < 0,05$).

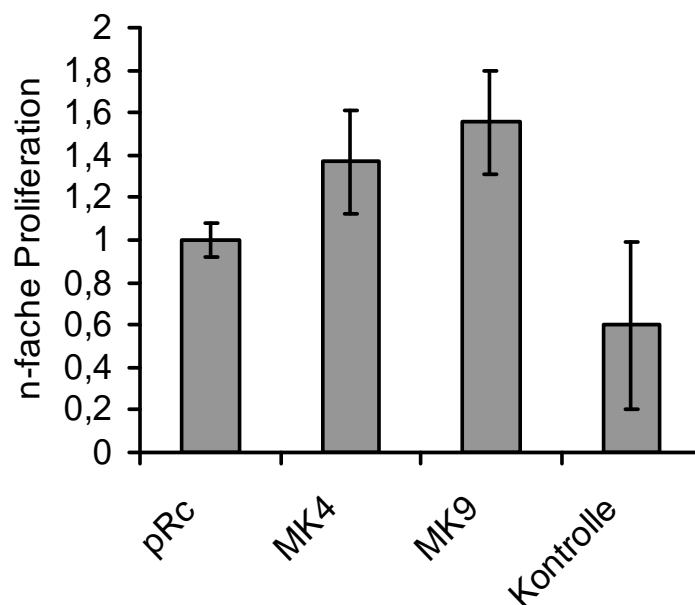


Abb. 15: Proliferationsverhalten von HUVEC mit konditioniertem Medium der S462-Klone: Das Medium wurde konditioniert, indem die MK-Klone (MK4, MK9) und der Kontroll-Klon (pRc) 96 h mit serumfreiem Medium inkubiert wurden. Das HUVEC-Medium (Medium 199 unter Zusatz von Glutamin und 2% FKS) wurde 1:1 mit konditioniertem Medium verdünnt auf die HUVEC gegeben. Die Wachstumsmessung erfolgte mit dem MTS-Test. Das HUVEC-Medium mit 1% FKS diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen.

4.4.4 VEGF-Genexpression

Konditioniertes Medium von MPNST-Zellen enthält neben MK noch zahlreiche andere Wachstumsfaktoren. Es ist daher möglich, dass die erhöhte Proliferation der HUVEC mit konditioniertem Medium der MK-Klone nicht ausschließlich durch die direkte mitogene Wirkung von MK auf die Endothelzellen verursacht wurde. MK könnte zusätzlich die Expression anderer angiogener Wachstumsfaktoren in den MPNST-Zellen hochreguliert haben. Beispielhaft wurde die Genexpression von VEGF mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 16). Die VEGF-Expression war in den MK-Klonen zeitabhängig. Nach einem Tag Serumentzug waren die VEGF-RNS-Konzentrationen der Klone S462-MK4 und S462-MK9 auf einer Höhe mit der des Kontrollklons. Nach 96 h zeigte sich eine um 4- bis 6-fach erhöhte VEGF-Expression der S462-MK-Klone gegenüber dem Kontrollklon S462-pRc ($p < 0,05$).

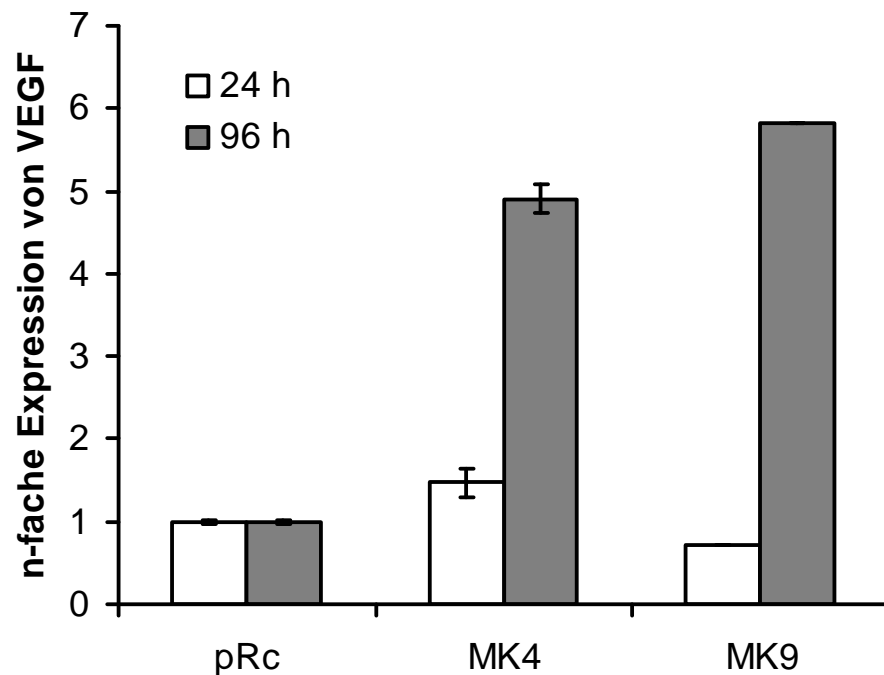


Abb. 16: VEGF-Genexpression nach Serumentzug:

Nach einer Inkubation von 24 h und 96 h wurde RNS von den S462-MK-Klonen (MK4, MK9) bzw. des Kontrollklons (pRc) isoliert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Es sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

5 DISKUSSION

MPNST weisen zahlreiche genetische Alterationen auf, so dass von einer mehrstufigen Tumorgenese ausgegangen werden muss. Wachstumsfaktoren spielen in der Tumorgenese von MPNST eine wichtige Rolle. Der Wachstumsfaktor MK wird in Neurofibromen und MPNST im Vergleich zu normalem Nervengewebe erhöht exprimiert. In verschiedenen Zellkultursystemen konnte gezeigt werden, dass MK eine Tumorigenität induzieren und *in vitro* die Tumoreigenschaften von Zelllinien in Bezug auf Proliferation, Apoptose und Angiogenese verändern kann.

MPNST zeigen ein nur geringfügiges Ansprechen auf konventionelle Chemotherapeutika. Neue Therapieansätze, die spezifisch in die veränderten Zellsignalwege eingreifen, sind Gegenstand der Forschung. Allerdings gibt es für MPNST zurzeit kein Tumormodell zur Evaluierung neuer Therapiekonzepte. In der vorliegenden Arbeit wurden MPNST-Zellklone generiert, die MK stabil überexprimieren. In unserem Tiermodell konnte die MK-Überexpression keine Tumorigenität induzieren.

Die Überexpression von MK in der MPNST-Zelllinie S462 führte dennoch zu Änderungen ihrer Tumorzelleigenschaften. Steigerung der MK-Expression bewirkte eine erhöhte Zellvitalität und schützte vor durch Serumentzug induzierter Apoptose oder Behandlung mit Vincristin. MK-Überexpression konnte allerdings kein Zellwachstum stimulieren. Konditioniertes Medium von mit MK transfizierten S462-Zellen war ein potentes Mitogen für HUVEC. Zusätzlich war die Überexpression von MK von einer erhöhten VEGF-Genexpression begleitet.

5.1 Nachweis von MK in MPNST-Zellen

5.1.1 Genexpression von MK

Die MPNST Zelllinien S462 und ST88-14 konnten erfolgreich mit einem MK kodierenden Plasmid transfiziert werden. Die MK-Klone der MPNST-Zelllinie S462 wiesen eine bis zu zweifach und der Klon ST88-14-MK4 eine fünffach erhöhte MK-Überexpression auf. Zu Beginn der Arbeit war es auf Grund der bereits vorhandenen MK-Genexpression schwer abzuschätzen, um wie viel höher die MK-Expression der mit MK transfizierten Klone sein würde. Es wurde aus diesem Grund eine quantitative RT-PCR zur Bestimmung der MK-Genexpression etabliert, mit der auch geringfügige Expressionsunterschiede noch gemessen werden können. Ein Nachteil der hohen Sensitivität ist die Anfälligkeit gegenüber Messfehlern.

Deshalb wurde zum Ausgleich möglicher Messschwankungen zusätzlich die Expression eines Referenzgens analysiert. In dieser Arbeit wurden die Level von GAPDH zusammen mit denen von MK in den MPNST-Zellen bestimmt. Es wurden dabei keine systematischen Unterschiede in der Expression von GAPDH zwischen den mit MK transfizierten S462-Klonen und der parentalen Zelllinie S462 bzw. dem Kontrollklon S462-pRc beobachtet. GAPDH war daher für unsere Untersuchungen als Referenzgen geeignet. Einige Arbeitsgruppen lehnen GAPDH als Referenzgen ab, weil seine Expression zwischen verschiedenen Gewebetypen stark variieren soll (119). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass unter bestimmten experimentellen Bedingungen wie z.B. Hypoxie die GAPDH-Expression nicht konstant bleibt (119). Die Expression von MK wurde ausschließlich unter Normoxie untersucht. Im weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass GAPDH unter 10 getesteten Referenzgenen in Neuroblastomgewebe und -Zelllinien unabhängig von der Proliferation am stabilsten exprimiert wird (114). Da die in dieser Arbeit verwendeten MPNST-Zelllinien wie Neuroblastom-Zelllinien neuroektodermalen Ursprungs sind, wurde GAPDH als Referenzgen verwendet.

5.1.2 Proteinkonzentration von MK im Zellkulturmedium

MK ist ein heparin-bindender Wachstumsfaktor, der von kultivierten Zellen in das Medium sezerniert wird. In dieser Arbeit wurde ein ELISA für die Messung der Proteinkonzentration von MK im Medium von MPNST-Zellen verwendet. Die Nachweisgrenze für MK liegt bei diesem Verfahren bei 0,05 ng/ml Serum (117,120). Unter Verwendung des ELISA wurde erstmals eine MK-Konzentrationen im konditionierten Medium von SW13-Zellen gemessen.

Bisher wurde die MK-Konzentration im Zellkulturmedium hauptsächlich durch Affinitätschromatographie mit anschließendem Western-Blot bestimmt (121,122). Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die geringe Sensitivität. In der Zelllinie SW13 konnte mit diesem Verfahren kein MK im konditionierten Medium detektiert werden (68,116). Ein weiterer Nachteil der Methode sind größere Abweichungen, die durch viele Arbeitsschritte entstehen. Eine 2-4-fach höhere MK-Konzentration im konditionierten Medium der S462-Klone als in ihren parentalen Zellen wäre nicht zuverlässig messbar gewesen. Der ELISA erwies sich als sensitiver als das bisher verwendete Verfahren.

5.1.3 Vergleich zwischen der Gen- und Proteinexpression von MK

Die MK-Konzentrationen im konditionierten Medium der MPNST-Zellen wurden über 96

h gemessen. Bereits nach 48 h exprimierte ein Teil der S462-MK-Klone MK stärker als die Kontrollen. Eindeutig ist die Überexpression von MK in den MK-Klonen nach 72 h zu sehen. Die Versuche wurden mit serumfreiem Medium durchgeführt, um Verfälschungen der Messwerte durch bovines MK zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen zeigten die S462-MK-Klone nach 72 h 2-6-fach niedrigere Apoptoseraten als die des Kontrollklons. Zum Teil könnte der Unterschied zwischen der gemessenen MK-Überexpression der transfizierten S462-MK-Zellen auf RNS-Ebene (Faktor: 1,5-2) und Proteinebene (Faktor: 2-4) durch das unterschiedliche Apoptoseverhalten hervorgerufen worden sein. Vor einem ähnlichen Hintergrund sind die Ergebnisse der MK-Bestimmung im konditionierten Medium der Zelllinie SW13 und ihrem mit MK transfizierten Klon SWMK1 zu sehen. Das konditionierte Medium der SW13-Zellen diente als Negativkontrolle und das der SWMK1-Zellen als Positivkontrolle für den MK-ELISA. Die MK-Proteinkonzentrationen im konditionierten Medium der SWMK1-Zellen war höher als die im konditionierten Medium der S462-MK-Klone. Dagegen wurde in den SWMK1-Zellen eine MK-Genexpression gemessen, die mehr als 10-fach niedriger war als in den S462-MK-Klonen. Der scheinbare Widerspruch der Ergebnisse erklärt sich am ehesten mit der lichtmikroskopischen Beobachtung, dass die Zellzahl der SWMK1-Zellen unter Serumentzug stark zunahm. Demgegenüber zeigen die Ergebnisse aus den Vitalitätsversuchen, dass die S462-MK-Klone unter Serumentzug nicht proliferieren konnten.

Um den Einfluss eines Wachstumsfaktors auf die biologische Funktion von Tumorzellen zu untersuchen, sind Tumorzelllinien am besten geeignet, die den Wachstumsfaktor kaum oder nicht nachweisbar exprimieren. Dennoch gibt es neben dieser Arbeit eine Reihe ähnlicher Beispiele dafür, dass die Induktion einer 2-5-fachen Überexpression eines Wachstumsfaktors zu einer weiteren Transformation von Tumorzellen führen kann (123-125). So wiesen mit TGF- α transfizierte Klone der humanen Kolonkarzinomzelllinie GEO eine 2-3-fach erhöhte TGF- α -Sekretion in Vergleich zu ihren parentalen Zellen auf. Die Überexpression von TGF- α in den Tumorzellen bewirkte eine erhöhte Kolonienzahl im Soft-Agar-Assay und ein stärkeres Tumorstadium in athymischen Balb/c-Nacktmäusen (123).

5.2 Tumorigenitätsverhalten bei MK-Überexpression

Aus humanen MPNST isolierte Zelllinien sind im Xenotransplantatmodell nicht tumorigen. Entgegen unseren Vorstellungen konnte die stabile Überexpression von MK in S462- und ST88-14-MPNST-Zellen in unserem Mausmodell keine Tumorigenität induzieren.

Die mit MK stabil transfizierten MPNST-Zellen wurden wie in der Mehrzahl der etablierten Xenotransplantate subkutan in die Nod/Scid-Mäuse injiziert. Alternativ wurden die Mäuse auch intramuskulär mit den Zellen inokuliert. Muskelgewebe ist sehr viel stärker vaskularisiert als das Fettgewebe, wodurch sich schneller Tumoren bilden können.

Offen bleibt die Frage, ob die Zellen bei orthotoper Implantation, z.B. in den Nervus ischiadicus, in den Mäusen anwachsen würden. Die von den Gewebszellen sezernierten Wachstumsfaktoren unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Art des Gewebes. Im Nervengewebe werden Wachstumsfaktoren parakrin sezerniert, die möglicherweise das Wachstum von MPNST-Zellen stärker anregen könnten. Zusätzlich ist denkbar, dass von den MPNST-Zellen sezerniertes MK im Nervengewebe eher als in anderen Geweben die Bildung einer das Tumorstadium fördernde Matrix bewirken und den Anschluss an das Gefäßsystem begünstigen kann.

Eine Überexpression des Wachstumsfaktors MK in MPNST-Zelllinien war für die Induktion der Tumorigenität nicht ausreichend. Im Gegensatz zu aus Nagetieren isolierten Zellen, die nach zwei genetischen Veränderungen bereits tumorigen werden, sind menschliche Zellen sehr viel schwieriger zu transformieren (126). So wurden humane Primärkulturen unterschiedlichen Zelltyps durch die Ausschaltung von p53 und pRb in Kombination mit einer Aktivierung von ras, Hochregulation der Telomerase und einer Inhibition der heterotrimeren Serin-Threonin-Phosphatase PP2A tumorigen (126,127). MPNST besitzen bereits eine Vielzahl von molekularen Defekten, die mit einer Induktion der Tumorigenität in Verbindung gebracht wurden. In MPNST-Zelllinien ist es aus diesem Grund sehr wahrscheinlich nicht notwendig, alle genannten molekularbiologischen Defekte von exogen herbeizuführen. Möglicherweise könnte die Stärkung einer anderen Zelleigenschaft, die z.B. zu einer gesteigerten Infiltration von Gewebe führt, zur Tumorigenität und damit zu einem geeigneten Xenotransplantationsmodell führen.

In einer Reihe von Arbeiten wurde gezeigt, dass die alleinige Überexpression von MK die Tumorigenität von verschiedenen Zelllinien induzierte. So führte die stabile Überexpression von MK zur Tumorigenität von NIH3T3 Mausfibroblasten und SW13 Adenokarzinomzellen (68,71). Von beiden Zelllinien bildeten die MK-Klone mehr Kolonien im Soft-Agar-Assay als die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (68,71). Es ist daraus zu schließen, dass die Induktion der Tumorigenität in diesen Zellen nicht nur auf eine gesteigerte Angiogenese und die Interaktion mit stromalen Zellen zurückzuführen war. Vielmehr scheint auch die autokrine bzw.

parakrine Wirkung von MK zwischen den transfizierten Zellen von Bedeutung zu sein. Die Transfektion von MK in MCF-7 Mammakarzinomzellen und UM-UC-3 Harnblasenkarzinomzellen hatte keinen Effekt auf das *in vitro* Wachstum, führte aber zu einer Steigerung des *in vivo* Wachstums mit erhöhter Gefäßdichte (128,129). Interessanterweise wiesen alle genannten Zelllinien vor der Transfektion keine nachweisbare MK-Expression auf. Vielleicht war in den MPNST-Zelllinien S462 und ST88-14 die basale MK-Expression zu hoch und eine Überexpression um den Faktor 2-5 konnte keinen Unterschied auf die Tumorigenität erzielen. Möglich ist auch, dass die MPNST-Zellen spezifische inhibitorische Faktoren produzieren, die die Tumorigenität behinderten und durch Überexpression von MK nicht ausgeglichen werden können.

5.3 Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch MK

5.3.1 Zellvitalität der MPNST-Zellen nach Serumentzug

Im MTS-Assay wurde festgestellt, dass die Zellzahl sowohl des Kontrollklons S462-pRc als auch des MK-Klons S462-MK9 über 72 h Serumentzug nicht zunahm. Dieses Verfahren erteilt keine Auskunft darüber, ob als Ursache eine verringerte Proliferationsrate oder eine höhere Apoptoserate in Frage kam. Die Proliferation von Zellen wird spezifisch über die DNS-Syntheserate gemessen. Eine hierfür gängiges Nachweisverfahren ist die Markierung der DNS mit BrdU. Es ist nicht auszuschließen, dass die Überexpression von MK in der MPNST-Zelllinie S462 oder die Addition von MK zum serumfreien Medium innerhalb der Messperiode die DNS-Synthese geringfügig steigerte. Da die Zellzahl der MPNST-Zellen nach 72 h Serumentzug nicht zunahm bzw. beim Kontrollklon S462-pRc ohne MK-Zusatz in das Medium abnahm, war es wahrscheinlicher, dass MK eine bedeutendere Rolle in der Beeinflussung der Apoptose der S462-Zellen hatte. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf einen BrdU-Assay verzichtet und dafür die Apoptoserate der S462-Klone unter Serumentzug untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung.

Die externe Addition von MK in das Medium von S462-MK9 beeinflusste deutlich geringer die Zellvitalität. Die Ursache hierfür war sicherlich die vorbestehende vielfach höhere MK-Konzentration im Medium des S462-MK-Klons nach 72 h.

5.3.2 Mitogene Rolle von MK in anderen Zelllinien

Die Überexpression von MK in S462-MPNST-Zellen führte nach 72 h Serumentzug nicht

zu einem Anstieg der Zellzahl. Unsere Daten stimmen mit Beobachtungen überein, dass exogene Addition von MK nicht die Proliferation von ST88-14-MPNST-Zellen erhöhte (53). Für bestimmte Zelltypen konnte allerdings gezeigt werden, dass MK mitogen ist. Es stimulierte die Proliferation von humanen rhabdoiden G401 Tumorzellen (130) und moderater die von 10T1/2 Fibroblasten (131). Auf der anderen Seite wurde das Zellwachstum von verschiedenen Zelllinien wie aortale endotheliale Zellen und CC139 Fibroblasten aus dem chinesischen Hamster durch die exogene Addition von MK ähnlich wie in unseren Versuchen nicht beeinflusst (132,133). Die Addition von exogenem MK zu NIH3T3 Fibroblasten führte zu widersprüchlichen Ergebnissen (130,133), wobei stabile Transfektion von MK in NIH3T3-Zellen mitogen wirkte (134). Zusammenfassend ist zu vermuten, dass die mitogene Aktivität von MK in den meisten getesteten Zelllinien eher schwach zu sein scheint. Untersuchungen ergaben, dass MK wahrscheinlich selektiv auf undifferenzierte neuroektodermale Tumorzellen wirkt, da mit Retinsäure behandelte 1009 embryonale Karzinomzellen stärker proliferierten, wenn MK zum Zellkulturmedium addiert wurde, bis sie letztlich zu einem reiferen Phänotyp differenzierten (131). Die exogene Addition von Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF-2 und EGF induzierte eine Proliferation von ST88-14-Zellen (45,135). Ein weiterer Grund dafür, dass MK nicht das Zellwachstum in MPNST-Zelllinien erhöhte, könnte die bereits hohe MK-Expression in der untransfizierten MPNST-Zelllinie S462 und ST88-14 gewesen sein. Behandlung der MPNST-Zelllinie ST88-14 mit „antisense“-Oligonukleotiden für MK führte zu einer starken Abnahme der Wachstumsrate, was ein Hinweis für die mitogene Rolle von MK in MPNST ist (53).

5.3.3 Chemosensitivität gegenüber Vincristin und Cisplatin

Eine höhere Expression von MK in S462-Zellen steigerte ihre Resistenz gegenüber Vincristin, nicht aber gegen Cisplatin. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Behandlung von G401-Tumorzellen mit Cisplatin die MK-Expression temporär reduzierte. Nur exogen addiertes MK war in der Lage, die Zahl der apoptotischen mit Cisplatin behandelten Zellen zu reduzieren (130). Anstelle wie Cisplatin mit der DNS zu interkalieren, bindet Vincristin an Tubulin und stört den Aufbau des Spindelapparates während der Mitose. Möglicherweise ist dieser Unterschied im Wirkungsmechanismus ausschlaggebend für das veränderte Resistenzverhalten bei Überexpression von MK. Es könnte sein, dass die höhere Resistenz zu Vincristin zum Teil auf die durch MK vermittelte Steigerung der VEGF-Expression zurückzuführen ist. VEGF erhöhte die Resistenz gegen Zytostatika in aus Neuroblastomen isolierten Zelllinien und leukämischen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (136,137).

Dagegen zeigen neue Ergebnisse, dass MK allein und keine anderen Wachstumsfaktoren in verschiedenen Zelllinien u.a. SKN-SH Neuroblastomzellen und Saos2 Osteosarkomzellen von chemoresistenten Zellen überexprimiert wurde und eine protektive Funktion auf diese Zellen und die Zellen in ihrem Umfeld hatte (138,139).

5.4 Einfluss auf die Apoptose durch MK

5.4.1 Anti-apoptotische Eigenschaften in unterschiedlichen Zellkultursystemen

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die apoptotischen Zellen durch Färbung von Phosphatidylserin mit Annexin-FITC und DNS mit Propidiumjodid nachzuweisen. Das Verfahren wird mit unfixierten Zellen durchgeführt. Es sind vor allem Suspensionszelllinien für diese Methode geeignet und nicht adhärente Zelllinien wie die MPNST-Zelllinie S462 (118). Daher wurde nach zweifelhaften Ergebnissen der TUNEL-Assay verwendet.

Die Überexpression von MK in S462-Zellen schützte diese vor durch Serumentzug induzierter Apoptose. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das veränderte Apoptoseverhalten in den S462-MK-Klonen für die höhere Zellvitalität nach 72 h Serumentzug im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen ursächlich war. Die geringere Chemosensitivität gegenüber Vincristin der zwei S462-MK-Klone im Vergleich zur parentalen Zelllinie wurde möglicherweise auch durch die anti-apoptotische Wirkung von MK verursacht.

MK schützt Zellen vor durch unterschiedliche Stimuli induzierter Apoptose, vor allem vor Serumentzug oder Zytostatika. Addition von MK zu PC12 Phäochromozytomzellen aus der Ratte, unter serumfreien Bedingungen kultiviert, erniedrigte die Zahl der apoptotischen Zellen (140). Unter dem gleichen Apoptose induzierenden Stress erhöhte MK das Überleben von primären Mäuseneuronen und hemmte die Aktivierung von Caspase-3 (66). Es wurde bereits die Erniedrigung der Apoptoserate von mit Cisplatin behandelten G401-Zellen bei exogener MK Zugabe erwähnt. In diesen Zellen steigerte MK dosisabhängig die Genexpression von bcl-2 (130). In der mit MK vorbehandelten hepatozellulären Karzinom-Zelllinie HepG2 war die durch einen dem Tumor-Nekrose-Faktor ähnlichen Liganden (TRAIL) zusammen mit Actinomycin D ausgelöste Apoptose geringer als in der Kontrollgruppe, die nicht mit MK vorbehandelt wurde. Auch hier war die Aktivität der Caspase-3 verringert. Die Aktivität der Caspase-8 blieb unbeeinflusst hoch (141).

Die Fähigkeit der MPNST-Zellen, in Apoptose überzugehen, war bereits vor der

Transfektion mit Midkine gestört. In MPNST-Tumorgewebeproben wurden Mutationen im *Tp53*-Gen gefunden (35). S462-Zellen besitzen ein LOH in einem Allel von *TP53* (108). Kürzlich konnte herausgefunden werden, dass das zweite Allel eine Punktmutation aufweist, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt (142). Obwohl wahrscheinlich die proapoptische Funktion von p53 in den S462-Zellen verloren gegangen ist, befanden sich interessanterweise immer noch ein Viertel der S462-Rc-Zellen nach 72 h Serumentzug in Apoptose.

5.5 Induktion eines pro-angiogenetischen Phänotyps durch MK

5.5.1 *In vitro* Proliferation von Endothelzellen

Mit einem HUVEC-Assay wurde in dieser Arbeit die Induktion der Proliferation von Endothelzellen untersucht. Die Angiogenese geht von den Endothelzellen aus. Um neue Gefäße zu bilden, müssen die Zellen erst von ihrer stabilen Lokalisation entkommen und die Basalmembran durchbrechen. Anschließend migrieren die Endothelzellen in Richtung eines angiogenen Stimulus, der von den Tumorzellen ausgeht. Dabei proliferieren die Zellen, um die notwendige Anzahl an Zellen für die neugebildeten Gefäße zu bieten. Zuletzt differenzieren die Zellen wieder und bilden eine dreidimensionale tubuläre Struktur.

Neben dem HUVEC-Assay gibt es verschiedene *in vitro* Angiogenese-Assays, mit denen die unterschiedlichen Stadien der Neovaskularisation untersucht werden können. Allerdings weisen im Vergleich zu *in vivo* Angiogenese-Assays *in vitro* Assays wie der HUVEC-Assay viele Schwächen auf. Mit der Proliferation wird nur ein Aspekt der Angiogenese untersucht. Die Endothelzellen in Kultur proliferieren *per se*, während die Endothelzellen bei der Angiogenese erst aus einem Ruhezustand aktiviert werden müssen. Die tumorassoziierte Neovaskularisation geht vor allem von kleinen Gefäßen aus. Die in diesem Proliferationsassay verwendeten humanen venösen Endothelzellen entstammten größeren Gefäßen. Zwischen den Endothelzellen verschiedenen vaskulären Ursprungs gibt es Unterschiede in den Zelleigenschaften. Auch der Wechsel im Proliferationsstatus der Endothelzellen in Kultur ist begleitet von Veränderungen in der Genexpression von Rezeptoren, etc. (143). In der Zellkultur sind die Endothelzellen von einer anderen Zellmatrix umgeben als *in vivo*, die das Verhalten der Zellen weiter modifiziert. Diese Prämissen des *in vitro* Angiogenese-Assays müssen beachtet werden, wenn im Folgendem ‚pro-angiogene Eigenschaften von MK in MPNST‘ postuliert werden. Ziel war es, nach Hinweisen für eine veränderte angiogene Potenz der MK-MPNST-Klone zu suchen.

5.5.2 Pro-angiogene Eigenschaften von MK in MPNST

Konditioniertes Medium von S462-MK-Zellen stimulierte das Wachstum von HUVEC stärker als das konditionierte Medium der Kontrollzellen. Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen führten, ähnlich wie die widersprüchlichen Ergebnisse zu den mitogenen Eigenschaften von MK in NIH3T3-Zellen, zu zwiespältigen Daten über eine mögliche mitogene Aktivität von MK in HUVEC. Partiiell aufgereinigtes MK aus konditioniertem Medium von mit MK transfizierten humanen Zelllinien stimulierte in Übereinstimmung mit unseren Daten die Proliferation von HUVEC (68,116,128). Auf der anderen Seite wirkte natives MK aus dem Huhn und humanes rekombinantes MK nicht mitogen in HUVEC (132,144). Die Unterschiede in den Ergebnissen der Proliferationsversuche könnten einerseits am verwendeten Protein liegen. Aus dem Huhn isoliertes MK ist größtenteils homolog in der Aminosäuresequenz zu humanem MK (57). Es wurde jedoch nie untersucht, ob die bestehenden kleinen Unterschiede einen Einfluss auf die mitogene Wirkung gegenüber humanen Endothelzellen haben. Zusätzlich zeigten Erfahrungen aus unserem Labor, dass wiederholtes Auftauen und Einfrieren die Stabilität des Proteins gefährdete und die Ergebnisse beeinflusste, wodurch es eventuell auch zu Abweichungen der Ergebnisse gekommen sein könnte. Die Widersprüche könnten andererseits an der unterschiedlichen Durchführung der HUVEC-Assays gelegen haben. So gab es Varianzen in der Beschichtung der Kulturgefäße und im verwendeten Kulturmedium. Auch in der verwendeten Passagenzahl könnte es Unterschiede gegeben haben. Je höher die Passage, desto stärker weichen die Zellen von den Primärkulturen ab. Für unsere Versuche wurden stets HUVEC in der 2. Passage verwendet.

Da in den Proliferationsassays das gesamte konditionierte Medium der MPNST-Zellen verwendet wurde und nicht aus dem Medium isoliertes MK, könnte die starke angiogene Potenz der S462-MK-Klone nicht nur durch MK, sondern auch durch andere angiogene Proteine bedingt gewesen sein. Wir konnten zeigen, dass die S462-Klone unter serumfreien Bedingungen mehr VEGF-RNS auswiesen als die mit dem Kontrollvektor transfizierten S462-Zellen. Auch wenn der Nachweis auf Proteinebene fehlt, erlauben diese Ergebnisse anzunehmen, dass MK die Expression von VEGF stimulierte. Es wurde bereits gezeigt, dass andere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF und FGF-2 die VEGF-Expression in Gliomzellen und anderen Zelltypen erhöhten (145). Konditioniertes Medium von mit MK vorbehandelten glatten Muskelzellen stimulierte ebenfalls die Proliferation von HUVEC. Dabei wies im Unterschied zu den hier präsentierten Ergebnissen das konditionierte Medium erhöhte Konzentrationen an Interleukin-8, aber normale

Konzentrationen an VEGF auf (144). Es ist wahrscheinlich, dass die von MK induzierten angiogenen Faktoren von dem benutzten *in vitro* Modell abhängen. Daraus ist zu schlussfolgern, dass der Proliferationsanstieg der mit dem konditionierten Medium von S462-MK-Zellen kultivierten HUVEC nicht nur durch höhere Konzentrationen von MK und VEGF, sondern vermutlich auch durch andere angiogene Faktoren bedingt war, die jedoch erst noch nachgewiesen werden müssen.

Im Gegensatz zu den widersprüchlichen Ergebnissen *in vitro*, zeigte MK eine klare pro-angiogenetische Aktivität *in vivo*. Die Kornea ist normalerweise nicht vaskularisiert. Nach Injektion von mit MK transfizierten MCF-7-Zellen in die Kornea von Kaninchen unterschied sich die Anzahl und Länge der vom venösen limbischen Plexus aus in Richtung Tumorzellen wachsenden Kapillaren deutlich von denen, die nach Injektion der parentalen Zelllinie entstanden sind (128). Für das Wachstum von Tumoren über einige Kubikmillimeter hinaus ist eine starke Expression von pro-angiogenen Faktoren entscheidend (44). Anders als in den MPNST-Zellen führte die Überexpression von MK in MCF-7- und UM-UC-3-Zellen nach deren Implantation in immundefiziente Mäuse zu einem verstärkten Tumorwachstum begleitet von einer verstärkten Mikroneovaskularisierung (128,129).

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel war es, die funktionelle Rolle von MK in MPNST, insbesondere anhand der Zelllinie S462, zu untersuchen. Wichtig war dabei, die Frage zu klären, ob Überexpression von MK in MPNST-Zellen die Tumorigenität induzieren kann, da es bisher keine Xenotransplantatmodelle für MPNST gibt. Das Verstehen der biologischen Funktionen von Wachstumsfaktoren in MPNST-Zellen hilft möglicherweise dabei, neue therapeutische Ziele zu finden. Alternative Wirkstoffe zur Behandlung von MPNST sind von Bedeutung, weil es zur Zeit keine effektive adjuvante Therapie für MPNST gibt (3).

Die stabile Transfektion von MK in die MPNST-Zelllinie S462 hatte keinen Einfluss auf die Proliferation unter serumfreien Bedingungen und induzierte keine Tumorigenität in unserem Tiermodell. Es wurde nicht getestet, ob die mit MK transfizierten MPNST-Zellen bei orthotoper Implantation z.B in den N. ischiadicus anwachsen. Es ist aber zu bezweifeln, dass Tumoren mit einer ausreichenden Größe für präklinische Studien entstehen würden. Möglicherweise führt die Transfektion von anderen Genen (wie z.B. das Gen für EGF) in die bereits mit MK transfizierten MPNST-Zelllinien oder in die parentalen Zellen zu einer Induktion der Tumorigenität. Es sind

Mäuse entwickelt worden, die heterozygot für die Keimbahnmutationen im *NF1*- und *TP53*-Gen sind. Diese genetisch veränderten Mäuse entwickeln MPNST (40). Eventuell wird dieses Modell in Zukunft für präklinische Tests hinzugezogen. Die Nachteile eines solchen Systems sind u.a., dass die Tumoren nicht aus humanen Zellen bestehen und nur definierte genetische Alterationen aufweisen. Außerdem ist mit einem solchen Modell nicht genau planbar, wann, wo und wie viele MPNST die Tiere entwickeln.

Die S462-MK-Klone waren weniger chemosensitiv gegenüber Vincristin. Zukünftige Experimente sollten zeigen, ob MK selber für die geringere Chemosensitivität verantwortlich war oder die Hochregulation von anderen Faktoren insbesondere VEGF durch MK entscheidend war. Außerdem ist zu überprüfen, ob durch MK mehr die Apoptose oder die Proliferation beeinflusst wurde, da beides durch unterschiedliche Signalwege vermittelt wird.

Zum ersten Mal konnte dargestellt werden, dass die Überexpression von MK in der MPNST Zelllinie S462 die durch Serumentzug induzierte Apoptose hemmte. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Vielleicht regulierte MK ebenso die *bcl-2*-Expression bzw. Phosphorylierung von *bcl-2* oder Hemmung der Aktivierung von Caspase-3 wie in anderen Zelllinien. Für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe ist es wichtig herauszufinden, ob es spezifische Rezeptoren gibt, über die MK seine anti-apoptotische Wirkung in MPNST-Zellen entfaltet. Da eine Vielzahl von Rezeptoren wie Integrine, Proteoglykane und LRP als Rezeptoren für MK entdeckt wurden, bindet MK vermutlich eher unspezifisch und fördert über mehrere unterschiedliche Signaltransduktionswege das Überleben der MPNST-Zellen. Dadurch ist es aus heutiger Sicht unwahrscheinlich, dass ein spezifischer Hemmstoff gegen einen Rezeptor von MK entwickelt werden kann, der wie z.B. der EGF-Rezeptorinhibitor Gefitinib® Eingang in die Klinik finden wird. Sehr vielversprechend sind dagegen experimentelle Studien mit „antisense“-Oligonukleotiden, die die MK-Expression herunterregulieren können und im Laufe der letzten Zeit durch Strukturveränderungen verbesserte pharmakodynamische Eigenschaften bei guter Verträglichkeit im Mausmodell bekommen haben (146,147). Durch sie könnte in Zukunft die Apoptose von MPNST-Tumorzellen von Patienten induziert werden und das Ansprechen der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika verbessert werden.

Es wurde gezeigt, dass MK nicht nur eine autokrine Wirkung auf die S462-Zellen hatte, sondern dass konditioniertes Medium von S462-MK-Klonen auch die Wachstumsrate von HUVEC steigern konnte. Da die angiogene Potenz von MK *in vitro* umstritten ist, stellt dieses

Ergebnis einen zusätzlichen wichtigen Hinweis dafür dar, dass MK tatsächlich *in vitro* die Angiogenese steigert. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, verband sich mit der MK-Überexpression auch eine erhöhte VEGF-Genexpression. Interessant ist es also, zu klären, ob MK auch die Expression von anderen pro-angiogenen Wachstumsfaktoren in MPNST induziert und ob die Proteinexpression mit der Genexpression korreliert. Zusätzlich wäre es auch wichtig herauszufinden, ob die Hemmung der Wirkung von VEGF z.B. durch Antikörper wie Bevacizumab® die durch MK induzierte Proliferation von HUVEC aufheben kann. Es stellt sich außerdem die Frage, ob Inhibition von MK und VEGF durch Antikörper eine additive Wirkung oder vielleicht sogar eine synergistische Wirkung auf die Proliferationshemmung von HUVEC hat. Durch Antworten auf die entstandenen Fragen könnten zukünftig wichtige Grundlagen bei der Klärung der Frage, ob die Inhibition von MK einen Teil einer anti-angiogenen Therapie von MPNST und anderen MK überexprimierenden Tumoren darstellen sollte, geschaffen werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*. 1986;57:2006-2021.
- 2 Wong WW, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE, Gunderson LL. Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998;42:351-360.
- 3 Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*. 2002;62:1573-1577.
- 4 Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 1990;249:181-186.
- 5 Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 1990;62:187-192.
- 6 Korf BR. Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist*. 2000;5:477-485.
- 7 Matsui I, Tanimura M, Kobayashi N, Sawada T, Nagahara N, Akatsuka J. Neurofibromatosis type 1 and childhood cancer. *Cancer*. 1993;72:2746-2754.
- 8 Kimura M, Kamata Y, Matsumoto K, Takaya H. Electron microscopical study on the tumor of von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Acta Pathol Jpn*. 1974;24:79-91.
- 9 Wick MR, Swanson PE, Scheithauer BW, Manivel JC. Malignant peripheral nerve sheath tumor. An immunohistochemical study of 62 cases. *Am J Clin Pathol*. 1987;87:425-433.
- 10 Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM. Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest*. 1983;49:299-308.
- 11 Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 2002;39:311-314.
- 12 Woodruff JM. Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet*. 1999;89:23-30.
- 13 Harms D. [Soft tissue malignancies in childhood and adolescence. Pathology and clinical relevance based on data from the kiel pediatric tumor registry]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2004;36:268-274.
- 14 Brecht IB, Treuner J. [Soft tissue sarcoma in children and adolescents: experiences of the cooperative Soft Tissue Sarcoma Group Studies (CWS-81 - 96)]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2004;36:275-281.

- 15 Stark AM, Buhl R, Hugo HH, Mehdorn HM. Malignant peripheral nerve sheath tumours--report of 8 cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)*. 2001;143:357-363; discussion 363-354.
- 16 Meis JM, Enzinger FM, Martz KL, Neal JA. Malignant peripheral nerve sheath tumors (malignant schwannomas) in children. *Am J Surg Pathol*. 1992;16:694-707.
- 17 Carli M, Ferrari A, Mattke A, et al. Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: the Italian and German soft tissue sarcoma cooperative group. *J Clin Oncol*. 2005;23:8422-8430.
- 18 Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:820-823.
- 19 Skuse GR, Kosciulek BA, Rowley PT. Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. *Genes Chromosomes Cancer*. 1989;1:36-41.
- 20 Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW. Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet*. 1993;3:122-126.
- 21 Lothe RA, Saeter G, Danielsen HE, et al. Genetic alterations in a malignant schwannoma from a patient with neurofibromatosis (NF1). *Pathol Res Pract*. 1993;189:465-471.
- 22 Lothe RA, Slettan A, Saeter G, Brogger A, Borresen AL, Nesland JM. Alterations at chromosome 17 loci in peripheral nerve sheath tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:65-73.
- 23 Colman SD, Williams CA, Wallace MR. Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nat Genet*. 1995;11:90-92.
- 24 Daschner K, Assum G, Eisenbarth I, et al. Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234:346-350.
- 25 Serra E, Puig S, Otero D, et al. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet*. 1997;61:512-519.
- 26 Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF. Allelic loss of the NF1 gene in NF1-associated plexiform neurofibromas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;113:65-69.
- 27 Rasmussen SA, Overman J, Thomson SA, et al. Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28:425-431.
- 28 Perry A, Roth KA, Banerjee R, Fuller CE, Gutmann DH. NF1 deletions in S-100 protein-positive

and negative cells of sporadic and neurofibromatosis 1 (NF1)-associated plexiform neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Am J Pathol.* 2001;159:57-61.

29 Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell.* 2001;104:593-604.

30 Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature.* 1992;356:713-715.

31 DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, et al. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell.* 1992;69:265-273.

32 Guha A, Lau N, Huvar I, et al. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene.* 1996;12:507-513.

33 Muir D, Neubauer D, Lim IT, Yachnis AT, Wallace MR. Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient neurofibroma Schwann cells. *Am J Pathol.* 2001;158:501-513.

34 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-331.

35 Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, et al. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5435-5439.

36 Legius E, Dierick H, Wu R, et al. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994;10:250-255.

37 Kindblom LG, Ahlden M, Meis-Kindblom JM, Stenman G. Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumours. *Virchows Arch.* 1995;427:19-26.

38 Halling KC, Scheithauer BW, Halling AC, et al. p53 expression in neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumor. An immunohistochemical study of sporadic and NF1-associated tumors. *Am J Clin Pathol.* 1996;106:282-288.

39 Kourea HP, Cordon-Cardo C, Dudas M, Leung D, Woodruff JM. Expression of p27(kip) and other cell cycle regulators in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas: the emerging role of p27(kip) in malignant transformation of neurofibromas. *Am J Pathol.* 1999;155:1885-1891.

40 Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, et al. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science.* 1999;286:2172-2176.

- 41 Berner JM, Sorlie T, Mertens F, et al. Chromosome band 9p21 is frequently altered in malignant peripheral nerve sheath tumors: studies of CDKN2A and other genes of the pRB pathway. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26:151-160.
- 42 Kourea HP, Orlow I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM. Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol*. 1999;155:1855-1860.
- 43 Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol*. 1999;155:1879-1884.
- 44 Folkman J. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.* *N Engl J Med*. 1995;333:1757-1763.
- 45 DeClue JE, Heffelfinger S, Benvenuto G, et al. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest*. 2000;105:1233-1241.
- 46 Weidner KM, Hartmann G, Sachs M, Birchmeier W. Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8:229-237.
- 47 Strain AJ. Hepatocyte growth factor: another ubiquitous cytokine. *J Endocrinol*. 1993;137:1-5.
- 48 Rao UN, Sonmez-Alpan E, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor and c-MET in benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Hum Pathol*. 1997;28:1066-1070.
- 49 Watanabe T, Oda Y, Tamiya S, Masuda K, Tsuneyoshi M. Malignant peripheral nerve sheath tumour arising within neurofibroma. An immunohistochemical analysis in the comparison between benign and malignant components. *J Clin Pathol*. 2001;54:631-636.
- 50 Holtkamp N, Mautner VF, Friedrich RE, et al. Differentially expressed genes in neurofibromatosis 1-associated neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2004;107:159-168.
- 51 Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36:49-59.
- 52 Cao R, Brakenhielm E, Li X, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. *Faseb J*. 2002;16:1575-1583.
- 53 Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-

derived cells. *Oncogene*. 2001;20:97-105.

54 Matsubara S, Take M, Pedraza C, Muramatsu T. Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem*. 1994;115:1088-1096.

55 Pedraza C, Matsubara S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive element in human midkine gene. *J Biochem*. 1995;117:845-849.

56 Adachi Y, Matsubara S, Pedraza C, et al. Midkine as a novel target gene for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*. 1996;13:2197-2203.

57 Kurtz A, Schulte AM, Wellstein A. Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog*. 1995;6:151-177.

58 Iwasaki W, Nagata K, Hatanaka H, et al. Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *Embo J*. 1997;16:6936-6946.

59 Asai T, Watanabe K, Ichihara-Tanaka K, et al. Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:66-70.

60 Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M. 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*. 1999;274:12474-12479.

61 Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem*. 1994;269:12999-13004.

62 Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*. 1995;121:37-51.

63 Kojima T, Katsumi A, Yamazaki T, et al. Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*. 1996;271:5914-5920.

64 Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, et al. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem (Tokyo)*. 1997;121:197-205.

65 Qi M, Ikematsu S, Maeda N, et al. Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J*

Biol Chem. 2001;276:15868-15875.

66 Owada K, Sanjo N, Kobayashi T, et al. Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem.* 1999;73:2084-2092.

67 Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, et al. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res.* 2003;45:219-224.

68 Stoica GE, Kuo A, Powers C, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.* 2002;277:35990-35998.

69 Muramatsu H, Zou K, Sakaguchi N, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270:936-941.

70 Shibata Y, Muramatsu T, Hirai M, et al. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol.* 2002;22:6788-6796.

71 Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* 2004;204:127-143.

72 Nakamoto M, Matsubara S, Miyauchi T, Obama H, Ozawa M, Muramatsu T. A new family of heparin binding growth/differentiation factors: differential expression of the midkine (MK) and HB-GAM genes during mouse development. *J Biochem.* 1992;112:346-349.

73 Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, Maruta H, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol.* 1993;159:392-402.

74 Matsumoto K, Wanaka A, Mori T, et al. Localization of pleiotrophin and midkine in the postnatal developing cerebellum. *Neurosci Lett.* 1994;178:216-220.

75 Matsumoto K, Wanaka A, Takatsuji K, Muramatsu H, Muramatsu T, Tohyama M. A novel family of heparin-binding growth factors, pleiotrophin and midkine, is expressed in the developing rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994;79:229-241.

76 Matsubara S, Tomomura M, Kadomatsu K, Muramatsu T. Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 1990;265:9441-9443.

77 Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol.*

1992;186:387-406.

- 78 Michikawa M, Kikuchi S, Muramatsu H, Muramatsu T, Kim SU. Retinoic acid responsive gene product, midkine, has neurotrophic functions for mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci Res.* 1993;35:530-539.
- 79 Michikawa M, Xu RY, Muramatsu H, Muramatsu T, Kim SU. Midkine is a mediator of retinoic acid induced neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192:1312-1318.
- 80 Amet LE, Lauri SE, Hienola A, et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol Cell Neurosci.* 2001;17:1014-1024.
- 81 Nakamura E, Kadomatsu K, Yuasa S, et al. Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells.* 1998;3:811-822.
- 82 Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem (Tokyo).* 2002;132:359-371.
- 83 Yoshida Y, Goto M, Tsutsui J, et al. Midkine is present in the early stage of cerebral infarct. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995;85:25-30.
- 84 Wang S, Yoshida Y, Goto M, et al. Midkine exists in astrocytes in the early stage of cerebral infarction. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;106:205-209.
- 85 Miyashiro M, Kadomatsu K, Ogata N, et al. Midkine expression in transient retinal ischemia in the rat. *Curr Eye Res.* 1998;17:9-13.
- 86 Mochizuki R, Takeda A, Sato N, et al. Induction of midkine expression in reactive astrocytes following rat transient forebrain ischemia. *Exp Neurol.* 1998;149:73-78.
- 87 Unoki K, Ohba N, Arimura H, Muramatsu H, Muramatsu T. Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by midkine, a retinoic acid-responsive gene product. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:4063-4068.
- 88 Zhang L, Rees MC, Bicknell R. The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J Cell Sci.* 1995;108:323-331.
- 89 Kojima S, Muramatsu H, Amanuma H, Muramatsu T. Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270:9590-9596.

- 90 Takada T, Kinkori T, Muramatsu H, Hayakawa A, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine, is a novel regulator of intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241:756-761.
- 91 Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, et al. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;105:489-495.
- 92 Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* 1995;55:1792-1797.
- 93 Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett.* 1997;233:29-32.
- 94 Kato S, Ishihara K, Shinozawa T, et al. Monoclonal antibody to human midkine reveals increased midkine expression in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:430-441.
- 95 Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res.* 1993;53:1281-1285.
- 96 Garver RI, Jr., Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:463-466.
- 97 Garver RI, Jr., Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer.* 1994;74:1584-1590.
- 98 Aridome K, Tsutsui J, Takao S, et al. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1995;86:655-661.
- 99 Koide N, Hada H, Shinji T, et al. Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology.* 1999;46:3189-3196.
- 100 Kato M, Maeta H, Kato S, Shinozawa T, Terada T. Immunohistochemical and in situ hybridization analyses of midkine expression in thyroid papillary carcinoma. *Mod Pathol.* 2000;13:1060-1065.
- 101 Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, et al. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology.* 1999;57:253-257.
- 102 O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.* 1996;56:2515-2518.
- 103 Kato M, Shinozawa T, Kato S, Endo K, Terada T. Increased midkine expression in intrahepatic

- cholangiocarcinoma: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *Liver*. 2000;20:216-221.
- 104 Kato H, Watanabe K, Murari M, et al. Midkine expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 2000;37:415-424.
- 105 Ye C, Qi M, Fan QW, et al. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1999;79:179-184.
- 106 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
- 107 Watson MA, Perry A, Tihan T, et al. Gene expression profiling reveals unique molecular subtypes of Neurofibromatosis Type I-associated and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Brain Pathol*. 2004;14:297-303.
- 108 Frahm S, Mautner VF, Brems H, et al. Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis*. 2004;16:85-91.
- 109 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-2756.
- 110 Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*. 1997;4:823-832.
- 111 Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*. 1997;22:176-181.
- 112 Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11:1026-1030.
- 113 Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245:154-160.
- 114 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:18.
- 115 Wellmann S, Taube T, Paal K, et al. Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem*. 2001;47:654-660.
- 116 Mashour GA, Wang HL, Cabal-Manzano R, Wellstein A, Martuza RL, Kurtz A. Aberrant cutaneous expression of the angiogenic factor midkine is associated with neurofibromatosis type-1. *J*

Invest Dermatol. 1999;113:398-402.

117 Ikematsu S, Yano A, Aridome K, et al. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer*. 2000;83:701-706.

118 Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000;243:167-190.

119 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169-193.

120 Mashour GA, Driever PH, Hartmann M, et al. Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5677-5683.

121 Tomomura M, Kadomatsu K, Nakamoto M, et al. A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted protein with heparin binding activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;171:603-609.

122 Muramatsu H, Muramatsu T. Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177:652-658.

123 Ziober BL, Willson JK, Hymphrey LE, Childress-Fields K, Brattain MG. Autocrine transforming growth factor-alpha is associated with progression of transformed properties in human colon cancer cells. *J Biol Chem*. 1993;268:691-698.

124 Jee SH, Shen SC, Chiu HC, Tsai WL, Kuo ML. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene*. 2001;20:198-208.

125 Shim WS, Teh M, Bapna A, et al. Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp Cell Res*. 2002;279:299-309.

126 Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400:464-468.

127 Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*. 2001;15:50-65.

128 Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*. 1997;57:1814-1819.

129 Muramaki M, Miyake H, Hara I, Kamidono S. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy.

Clin Cancer Res. 2003;9:5152-5160.

130 Qi M, Ikematsu S, Ichihara-Tanaka K, Sakuma S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine. *J Biochem.* 2000;127:269-277.

131 Nurcombe V, Fraser N, Herlaar E, Heath JK. MK: a pluripotential embryonic stem-cell-derived neuroregulatory factor. *Development.* 1992;116:1175-1183.

132 Raulais D, Lagente-Chevallier O, Guettet C, Duprez D, Courtois Y, Vigny M. A new heparin binding protein regulated by retinoic acid from chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;174:708-715.

133 Kretschmer PJ, Fairhurst JL, Decker MM, et al. Cloning, characterization and developmental regulation of two members of a novel human gene family of neurite outgrowth-promoting proteins. *Growth Factors.* 1991;5:99-114.

134 Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan QW, Muramatsu H, Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer.* 1997;75:354-359.

135 Badache A, De Vries GH. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. *J Cell Physiol.* 1998;177:334-342.

136 Das B, Yeger H, Tsuchida R, et al. A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65:7267-7275.

137 Wang L, Chen L, Benincosa J, Fortney J, Gibson LF. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia.* 2005;19:344-353.

138 Kang HC, Kim IJ, Park JH, et al. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res.* 2004;10:272-284.

139 Mirkin BL, Clark S, Zheng X, et al. Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene.* 2005;24:4965-4974.

140 Owada K, Sanjyo N, Kobayashi T, et al. Midkine inhibits apoptosis via extracellular signal regulated kinase (ERK) activation in PC12 cells. *J Med Dent Sci.* 1999;46:45-51.

141 Ohuchida T, Okamoto K, Akahane K, et al. Midkine protects hepatocellular carcinoma cells

against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. *Cancer*. 2004;100:2430-2436.

142 Friedrich C, Holtkamp N, Cinatl J, Jr., et al. Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency. *Int J Oncol*. 2005;27:1433-1440.

143 Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:1167-1177.

144 Sumi Y, Muramatsu H, Takei Y, Hata K, Ueda M, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J Cell Sci*. 2002;115:2659-2667.

145 Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg*. 1995;82:864-873.

146 Takei Y, Kadomatsu K, Itoh H, et al. 5',3'-inverted thymidine-modified antisense oligodeoxynucleotide targeting midkine. Its design and application for cancer therapy. *J Biol Chem*. 2002;277:23800-23806.

147 Takei Y, Kadomatsu K, Yuasa K, Sato W, Muramatsu T. Morpholino antisense oligomer targeting human midkine: its application for cancer therapy. *Int J Cancer*. 2005;114:490-497.

7 ANHANG

7.1 Danksagungen

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Henze für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Arbeitsgruppe zu forschen und die Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer Herrn Dr. Pablo Hernáiz Driever, dessen wissenschaftlicher Rat und Motivation eine unschätzbare Hilfe für mich waren.

Ich bedanke mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern unseres Labors, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützt haben, allen voran Dr. Cornelia Eckert für die Hilfe bei der Etablierung der quantitativen RT-PCR, Dr. Renate Kirschner-Schwabe für die Unterstützung bei der RNA-Isolation und reversen Transkription, Dr. Shuling Wu für die Unterstützung beim Umgang mit Bakterienkulturen und der Plasmidenisolation und Stephan Lobitz für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie. Außerdem danke ich Dr. Javier Prada, Kerstin Hasse und Shabnam Shalpour, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich möchte mich auch bei allen MTA bedanken, die mich bei zahlreichen praktischen Fragen unterstützt haben.

Herrn PD Dr. Andreas Kurtz danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und zahlreichen fruchtbaren Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich mich für die gastfreundliche Aufnahme von Prof. Dr. Jindrich Cinatl jr. und seiner Arbeitsgruppe für interdisziplinäre Tumor- und Virusforschung des Instituts für Virologie an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt am Main bedanken, wo ich von September bis Oktober 2002 die Grundlagen der Zellkultur, Transfektion und PCR erlernen durfte.

Herr PD Dr. Victor Mautner stellte die MPNST-Zelllinien S462 und S520 zur Verfügung, wofür ich mich recht herzlich bedanken möchte.

Bei der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung möchte ich mich für das Promotionsstipendium und den Sachmittelzuschuss bedanken. Mit ihrer finanziellen Unterstützung und der Geduld und moralischen Unterstützung meiner Eltern ist die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst möglich geworden.

7.1 Veröffentlichungen

Originalarbeit

Friedrich, C.; Holtkamp, N.; Cinatl, J., Jr.; Sakuma, S.; Mautner, V. F.; Wellman, S.; Michaelis, M.; Henze, G.; Kurtz, A. and Driever, P. H. (2005): Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency, *Int J Oncol* 27 [5], pp. 1433-40.

Kongressbeiträge

Friedrich, C.; Kitzig, F.; Henze, G. and Driever, P. H. (2004): Establishing an animal model for malignant peripheral nerve sheath tumors, *Turkish Journal of Cancer* 34 [1], pp. 41.

Friedrich, C.; Kitzig, F.; Kurtz, A.; Henze, G.; Driever, P. H. (2004): Midkine enhances the angiogenic potential of malignant peripheral nerve sheath tumors, *Klin Padiatr* 216 [03].

7.2 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

7.3 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Carsten Friedrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Modulation der Biologie maligner peripherer Nervenscheidentumorzellen durch Midkine] 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.“

Datum

Unterschrift